



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

María
Flórez Mora

Tesis doctoral

Desarrollo de películas
compuestas respetuosas con el
medio ambiente a base de
quitosano

Lugo, 2023

TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE PELÍCULAS COMPUESTAS RESPETUOSAS CON EL MEDIO AMBIENTE A BASE DE QUITOSANO

María Flórez Mora

Directores: Manuel Vázquez Vázquez, Patricia Cazón Díaz

Tutor: Manuel Vázquez Vázquez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INNOVACIÓN EN SEGURIDAD Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIAS

LUGO

2023

CONFLICTO DE INTERESES

La alumna declara no tener ningún conflicto de interés en relación con el trabajo desarrollado en esta tesis doctoral.

AGRADECIMIENTOS

Al fin ha llegado el momento de redactar este apartado, la ocasión de poner el broche final a una de las etapas más importantes que he vivido hasta ahora. En este tiempo he podido crecer mucho personalmente, a la vez que me llevo grandes aprendizajes en múltiples aspectos. Después de estos años, espero que este final solo signifique el principio de algo todavía mejor.

Para empezar, esta tesis no podría haberse llevado a cabo sin mis directores Manuel y Patricia. Gracias por ser un apoyo y unos guías fundamentales a lo largo de estos años, por enseñarme, por vuestra paciencia y gran capacidad de resolución. Siempre os habéis interesado y esforzado en que esto salga lo mejor que se pueda. Sin vosotros no podría haber vivido experiencias como las de Portugal y Polonia, lugares donde también agradezco que grandes expertos me brindasen su conocimiento y me diesen la oportunidad de desarrollarme con ellos. Gracias por todo vuestro tiempo y dedicación.

En estos agradecimientos no pueden faltar mis compañeras de laboratorio, gracias chicas por los cafés tan necesarios de media mañana. Por vuestros consejos y charlas para desconectar de cualquier problema que pudiese existir, o para resolver otros tantos. Espero que sigáis creciendo y avanzando en vuestros caminos. De la misma manera, gracias a todo el resto del personal del laboratorio con el que he convivido en el día a día de esta aventura.

Papá, mamá, esto no podría haber sido posible sin vosotros. Siempre me habéis apoyado fielmente en cada paso que he decidido dar. Gracias por brindarme la oportunidad de seguir creciendo como persona, siempre dándome toda la ayuda posible cuando el camino se me hacía cuesta arriba. Pero también por ser los primeros en poneros casi más contentos que yo con aquellas cosas buenas que me iban pasando. Vuestra felicidad es la mía también. A lo largo de estos años me habéis demostrado que por muchas piedras que haya en el camino siempre puedo contar con vosotros, y creo que poco más se le puede pedir a unos padres... A ti también Miguel, por ser mi compañero en el día a día de estos últimos meses, y siempre saber cómo entretener mi tiempo libre. Solo puedo sentir admiración por todo lo que estás haciendo, sé que vas a

conseguir todo lo que te has propuesto, y estoy orgullosa de poder ver que lo vas a lograr, ya lo sabes. Os quiero, esto va por vosotros.

Sin duda han sido muchísimas las cosas aprendidas, pero esto tampoco ha sido un camino de rosas. También tuve que aprender a seguir adelante sin gente que consideraba imprescindible para mí, pero que sin duda merecen ser recordadas. En primer lugar, tú, abuela Leo, siempre preocupada porque me fuese bien en todo, aunque nunca llegases a entender bien de qué trataba esto. Aun así, eras la primera en tener impreso en tu mesita del salón cada artículo que conseguía publicar. Gracias por preocuparte siempre que me iba fuera, por haberme hecho conocer la bondad personificada y por batallar hasta el final. Sé que el abuelo Pepe también está a tu lado allí donde estéis, y aunque no podáis ver el final de esto, estoy segura de que estáis muy orgullosos de mí. Mirad hasta donde hemos llegado... *¡Esto es de chalaos!* También tú, abuelo Celes, te me has ido al final de este camino. Pero para mí has sido un ejemplo de superación en todos los obstáculos que te han ido surgiendo, sobre todo en los últimos años... Sin embargo, la abuela Cuqui está aquí para poder ver todo, y sé que de una manera u otra te hará saber que todo ha salido bien. Os quiero a los cuatro y gracias por haberme permitido disfrutar tantos años de vosotros.

Esta etapa no habría sido lo mismo sin mis amigos de Lugo: Xian, Aida, Inés, Bel, Diana, Romi, Sophie, y un largo etcétera. No sé cómo habéis hecho, pero habéis conseguido que solo con vuestra presencia, Lugo se me hiciese hasta bonito. Aunque a veces quería escapar de allí, habéis hecho que esta ciudad se convierta en mi segunda casa durante ocho años. Gracias por los paseos, por hacerme conocer más esta tierra, por las charlas interminables y los grandes consejos, por los abrazos, por las tapas, y por las celebraciones por cualquier cosa, esto último siempre se nos ha dado muy bien. Habéis hecho que Lugo sea una ciudad un poquito más especial para mí y que siempre tendrá un hueco en mi corazón.

Por supuesto, esto también está dedicado a mis amigos de Luarca. Gracias por recogerme los fines de semana con los brazos abiertos, por escucharme y ser mi hombro donde apoyarme en estos años. El pueblín y vosotros habéis sido mi vía de escape en muchos momentos de este camino. Nos hemos visto crecer y otra cosa no, pero no puedo estar más orgullosa de que forméis parte de mi vida. Sois los de siempre y muchos de vosotros quizás no tan de siempre, pero creo que sobran las palabras. Os quiero guajes.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	3
RESUMEN	8
SUMMARY	11
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 ENVASADO ALIMENTARIO	14
1.2 SISTEMA DE ENVASADO ACTIVO E INTELIGENTE	16
1.3 MATERIALES APLICADOS EN EL ENVASADO	23
1.4 POLÍMEROS SINTÉTICOS Y SU PROBLEMÁTICA	25
1.5 POLÍMEROS BIODEGRADABLES COMO ALTERNATIVA	27
1.6 EL QUITOSANO.....	30
1.7 EL QUITOSANO APLICADO AL ENVASADO ACTIVO	34
1.8 APLICACIONES DE ENVASES ACTIVOS A BASE DE QUITOSANO.....	40
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
HIPÓTESIS	47
OBJETIVOS.....	48
3. HERRAMIENTAS METODOLÓGICAS	51
3.1 MATERIALES.....	51
3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIOXIDANTES	52
3.3 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS CON COMPUESTOS ACTIVOS	57
3.4 ANÁLISIS DE LAS PELÍCULAS	60
3.5 ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS ESTUDIADOS.....	68

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.1	EVALUACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS Y DISOLVENTES PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE ORTIGA <i>URTICA DIOICA</i> ..	73
4.2	DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDAS CON EXTRACTO DE ORTIGA <i>URTICA DIOICA</i>	87
4.3	DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDAS CON EXTRACTO DEL ALGA KELP DE AZÚCAR <i>SACCHARINA</i> <i>LATISSIMA</i>	132
4.4	DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDAS CON ACEITE ESENCIAL DE SÁNDALO <i>SANTALUM ALBUM</i> ...	159
5.	DISCUSIÓN GENERAL.....	175
6.	CONCLUSIONES	191
7.	CONCLUSIONS.....	193
	BIBLIOGRAFÍA	196
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	219
	ÍNDICE DE TABLAS	223

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

% E	Porcentaje de alargamiento a la rotura	<i>Percentage of Elongation at break</i>
% W	Contenido de humedad en el equilibrio	<i>Equilibrium moisture content</i>
%T	Porcentaje de transmitancia	<i>Transmittance percentage</i>
μl	Microlitro	
ABTS*	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)	
ANOVA	Análisis de la varianza	<i>Analysis of Variance</i>
ASTM	Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BHT	Butilhidroxitolueno	
BS	Resistencia a la rotura/Fuerza de punción	<i>Burst strength</i>
CA	California	
CE	Comunidad Europea	
Ch/Q	Quitosano	<i>Chitosan</i>
CIE	Comisión Internacional de la Iluminación	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>
DB	Distancia al estallido/Deformación de punción	<i>Distance to burst</i>

DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo	
DSC	Calorimetría diferencial de barrido	<i>Differential scanning calorimetry</i>
EE. UU.	Estados Unidos	
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos	<i>Food and Drug Administration</i>
FEMA	Asociación de Fabricantes de Sabores y Extractos	<i>Flavor Extract Manufacturers Association</i>
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier	<i>Fourier Transform – Infrared Spectroscopy</i>
g	Gramo	
GAE	Equivalente de ácido gálico	<i>Gallic Acid Equivalent</i>
Gly/Gli	Glicerol	<i>Glycerol</i>
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HDPE	Polietileno de alta densidad	
HR	Humedad relativa	
HSD	Diferencia significativa honesta	<i>Honestly significant difference</i>
kg	Kilogramo	
kV	Kilovoltio	
	Litro	

LDPE	Poliétileno de baja densidad	
M	Molar	
MA	Massachusetts	
MDA	Malondialdehído	
ml	Mililitro	
MN	Minnesota	
MPa	Megapascal	
N	Newton	
NE	Extracto de <i>Urtica dioica</i>	<i>Nettle Extract</i>
nm	Nanómetros	
P	Publicación	
PBAT	Poli(Butilén Adipato-co-Tereftalato)	
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)	
PET	Tereftalato de polietileno	
PHBV	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)	
PLA	Ácido poliláctico	
PP	Polipropileno	
PS	Poliestireno	
RMSE	Error cuadrático medio	<i>Root Mean Squared Error</i>
rpm	Revoluciones por minuto	
S	Sellabilidad	<i>Sealability</i>
S.L.	Sociedad Limitada	
 SEM	Microscopía electrónica de barrido	<i>Scanning Electron Microscopy</i>

SEO	Aceite esencial de sándalo	<i>Sandalwood Essential Oil</i>
SLE	Extracto de <i>Saccharina latissima</i>	<i>Saccharina latissima Extract</i>
spp.	Especie	
TBA	4,6-Dihidroxi-2-mercaptopirimidina	
TCA	Ácido tricloroacético	
TGA	Termogravimetría	<i>Thermogravimetry</i>
TPC	Contenido fenólico total	<i>Total Phenolic Content</i>
TS	Resistencia a la tracción	<i>Tensile strength</i>
UE	Unión Europea	
UK	Reino Unido	<i>United Kingdom</i>
UV	Ultravioleta	
WVP	Permeabilidad al vapor de agua	<i>Water Vapor Permeability</i>
YM	Módulo de Young	<i>Young's Modulus</i>

RESUMEN

El quitosano es el segundo polisacárido más abundante en la Tierra. Este compuesto se obtiene a partir de múltiples fuentes renovables, siendo los residuos de la industria pesquera su principal origen. Sus propiedades como la solubilidad, la capacidad de formar películas, la viscosidad, la capacidad quelante y las propiedades antimicrobianas, entre otras muchas, lo convierten en un material realmente interesante para su aplicación en múltiples áreas, incluyendo el envasado activo de alimentos. Además, los envases fabricados a partir de biopolímeros como el quitosano son respetuosos con el medio ambiente, no generando residuos plásticos como los polímeros sintéticos derivados del petróleo.

Las propiedades de los materiales naturales varían en función del método de procesado y el tratamiento aplicado al biopolímero, la matriz y la composición del material, además de los parámetros medioambientales en los que se encuentra. De hecho, biopolímeros que se están utilizando cada vez más en la industria alimentaria carecen de ciertas características fundamentales para su aplicación como envases. La afinidad por la humedad y la tendencia a la aglomeración son algunos de los principales problemas derivados de este tipo de materiales. Por ello, sustancias naturales como aceites esenciales o extractos vegetales, que presentan un perfil interesante de antioxidantes y otros compuestos activos, son aplicadas con frecuencia para potenciar las propiedades activas del envase. Estas sustancias pueden difundirse e interactuar con los alimentos aumentando su resistencia a la oxidación y al deterioro microbiológico, o reteniendo aromas y sabores naturales.

Por consiguiente, el objetivo principal de esta tesis ha sido el desarrollo y caracterización de películas respetuosas con el medio ambiente a base de quitosano, las cuales se enriquecieron con extractos naturales para elaborar envases activos con capacidad antioxidante.

En los resultados, en primer lugar se estudió el proceso de extracción compuestos activos de las hojas de ortiga *Urtica dioica*. A continuación, se evaluó las técnicas, los disolventes y los tiempos de extracción para maximizar la capacidad antioxidante del extracto de la planta. A través de los análisis antioxidantes DPPH, ABTS* y Folin-Ciocalteu, se pudo determinar que el extracto acuoso de las hojas de *Urtica dioica* es una fuente importante de antioxidantes naturales. Tras la obtención de modelos matemáticos y una posterior optimización, se determinó que el tratamiento por ultrasonidos, con agua como disolvente y un tiempo de extracción de 3.15 h son las condiciones idóneas para la obtención del extracto con mayor capacidad antioxidante.

En segundo lugar, se adicionó este extracto acuoso de *Urtica dioica* en diversas concentraciones en la matriz de quitosano. El objetivo fue desarrollar una película activa y caracterizarla midiendo su solubilidad, humedad de equilibrio, permeabilidad al vapor de agua, propiedades espectrales, antioxidantes y microestructura. El extracto de ortiga mostró un efecto significativo en estas propiedades analizadas, obteniendo una película con gran capacidad antioxidante. Se estudió la aplicación de la película desarrollada como separador activo de lonchas del queso tipo Havarti a lo largo de 45 días. A partir de los análisis antioxidantes y TBARS realizados en el alimento se determinó que la película permitió reducir un 56% la oxidación lipídica de este alimento graso.

En tercer lugar, siguiendo el modelo de extracción optimizado previamente, se obtuvo un extracto acuoso del alga *Saccharina latissima* y se analizó su capacidad antioxidante. A continuación, el extracto acuoso del alga *Saccharina latissima* se adicionó en diversas concentraciones como ingrediente activo a la película de quitosano. Esta se caracteriza midiendo la humedad de equilibrio, el contenido de humedad, la permeabilidad al vapor de agua, las propiedades mecánicas, antioxidantes, ópticas, la morfología de superficie y la termoestabilidad. La película se aplicó como separador de lonchas de queso tipo Havarti a lo largo de 45 días de almacenamiento. La adición del extracto de alga a la matriz también permitió disminuir la oxidación lipídica del queso un 52,8%, además de mantener de la capacidad antioxidante de las películas a lo largo del estudio.

En cuarto y último lugar, se adicionó el aceite esencial de sándalo *Santalum album* en diversas concentraciones a la matriz de quitosano, en este caso disuelto en ácido málico, en vez de ácido acético. Se elaboró y caracterizó la película en base al estudio de sus propiedades de contenido de humedad de equilibrio, solubilidad, permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas, ópticas, de termosellabilidad, antioxidantes, morfología de la superficie y termoestabilidad. La película obtenida se aplicó como envasado de mantequilla y se analiza la capacidad de retardar la oxidación lipídica. Tras 3 meses de almacenamiento, se observa una disminución del 36 % en la oxidación de las grasas de la mantequilla. Además, las películas al ser realizadas con ácido málico son termo-sellables totalmente solubles en agua y se retiran fácilmente del alimento sin generar residuos sólidos.

En la Figura 1 se muestra un resumen gráfico de esta tesis doctoral. Abarca el objetivo general y como se ha dividido en los cuatro objetivos específicos que se desarrollaron en los resultados: extracción de hojas de ortiga y aplicación de películas de quitosano enriquecidas en queso; extracción del alga, desarrollo de película de quitosano enriquecida con este extracto y aplicación en queso; desarrollo de película a base de quitosano con aceite esencial de sándalo y aplicación en mantequilla. Al tratarse de una tesis doctoral por compendio de publicaciones, se resalta en negrita la publicación (P) asociadas a cada objetivo. Esta tesis incluye cinco artículos publicados en revistas JCR.

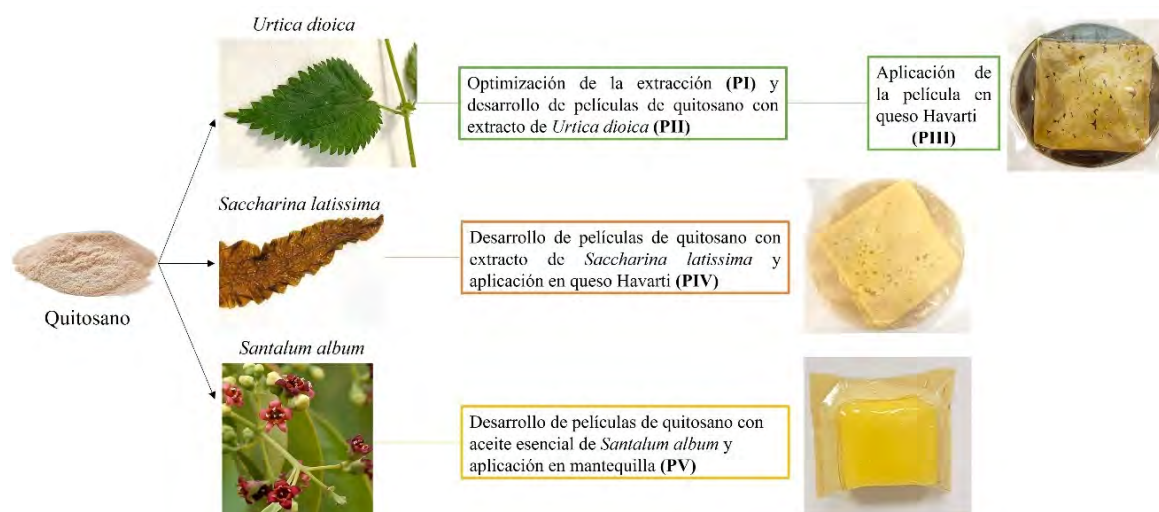


Figura 1. Resumen gráfico de la tesis. P indica el número de artículo donde se publicaron los resultados. Elaboración propia.

SUMMARY

Chitosan is the second most abundant polysaccharide on Earth. This compound is obtained from multiple renewable sources, with waste from the fishing industry being its main origin. Its properties such as solubility, film-forming ability, viscosity, chelating capacity and antimicrobial properties, among many others, make it a very interesting material for application in multiple areas, including active food packaging. Moreover, packaging made from biopolymers such as chitosan is environmentally friendly, as it does not generate plastic waste such as synthetic polymers.

These properties of natural polymers vary depending on the processing method and treatment applied to the biopolymer, the matrix and composition of the material, as well as the environmental parameters in which it is found. In fact, biopolymers that are increasingly used in the food industry lack certain fundamental characteristics for their application as packaging. Affinity to moisture and tendency to agglomerate are some of the main problems associated with this type of material. Therefore, natural substances such as essential oils or plant extracts, which have an interesting profile of antioxidants and other active compounds, are often applied to enhance the active properties of the packaging. These substances can diffuse and interact with the food by increasing its resistance to oxidation and microbiological spoilage, or by retaining natural aromas and flavours.

Therefore, the main objective of this thesis has been the development and characterization of environmentally friendly films based on chitosan, which were enriched with natural extracts to produce active packaging with antioxidant capacity.

In the results, first of all, the extraction process of active compounds from the leaves of *Urtica dioica* nettle was studied. Next, the techniques, solvents and extraction times were evaluated to maximize the antioxidant capacity of the plant extract. Through the DPPH, ABTS•

and Folin-Ciocalteu antioxidant analyses, it was determined that the aqueous extract of *Urtica dioica* leaves is an important source of natural antioxidants. After obtaining mathematical models and to optimize, it was concluded that ultrasonic treatment, with water as a solvent and an extraction time of 3.15 h are the ideal conditions for obtaining the extract with the greatest antioxidant capacity.

Secondly, this aqueous extract of *Urtica dioica* was added in various concentrations to the chitosan matrix. The objective was to develop an active film and characterize it by measuring its solubility, equilibrium humidity, water vapor permeability, spectral properties, antioxidants, and microstructure. The nettle extract showed a significant effect on these properties analyzed, obtaining a film with great antioxidant capacity. The application of the developed film as an active separator of Havarti cheese slices was studied over 45 days. From the antioxidant and TBARS analyzes carried out on the food, it was determined that the film allowed a 56% reduction in lipid oxidation of this fatty food.

Thirdly, following the previously optimized extraction model, an aqueous extract of the algae *Saccharina latissima* was obtained and its antioxidant capacity was analyzed. Next, the aqueous extract of the algae *Saccharina latissima* was added in various concentrations as an active ingredient to the chitosan film. This is characterized by measuring equilibrium humidity, moisture content, water vapor permeability, mechanical, antioxidant, optical properties, surface morphology and thermostability. The film was applied as a separator for Havarti-type cheese slices throughout 45 days of storage. The addition of the algae extracts to the matrix also allowed the lipid oxidation of the cheese to be reduced by 52.8%, in addition to maintaining the antioxidant capacity of the films throughout the study.

Fourth and finally, the essential oil of *Santalum album* sandalwood was added in various concentrations to the chitosan matrix, in this case dissolved in malic acid, instead of acetic acid. The film was prepared and characterized based on the study of its properties of equilibrium moisture content, solubility, water vapor permeability, mechanical, optical, heat sealability, antioxidant properties, surface morphology and thermostability. The film obtained was applied as butter packaging and its ability to retard lipid oxidation was analyzed. After 3 months of storage, a 36% decrease in the oxidation of butter fats is observed. In addition, the films, when

made with malic acid, are heat-sealable, completely soluble in water and are easily removed from the food without generating solid waste.

Figure 1 shows a graphic summary of this doctoral thesis. It covers the general objective and how it has been divided into the four specific objectives that were developed in the results: extraction of nettle leaves and application of chitosan films enriched in cheese; extraction of the algae, development of chitosan film enriched with this extract and application in cheese; development of chitosan-based film with sandalwood essential oil and application in butter. As this is a doctoral thesis based on a compendium of publications, the publication (P) associated with each objective is highlighted in bold. This thesis includes five articles published in JCR journal.

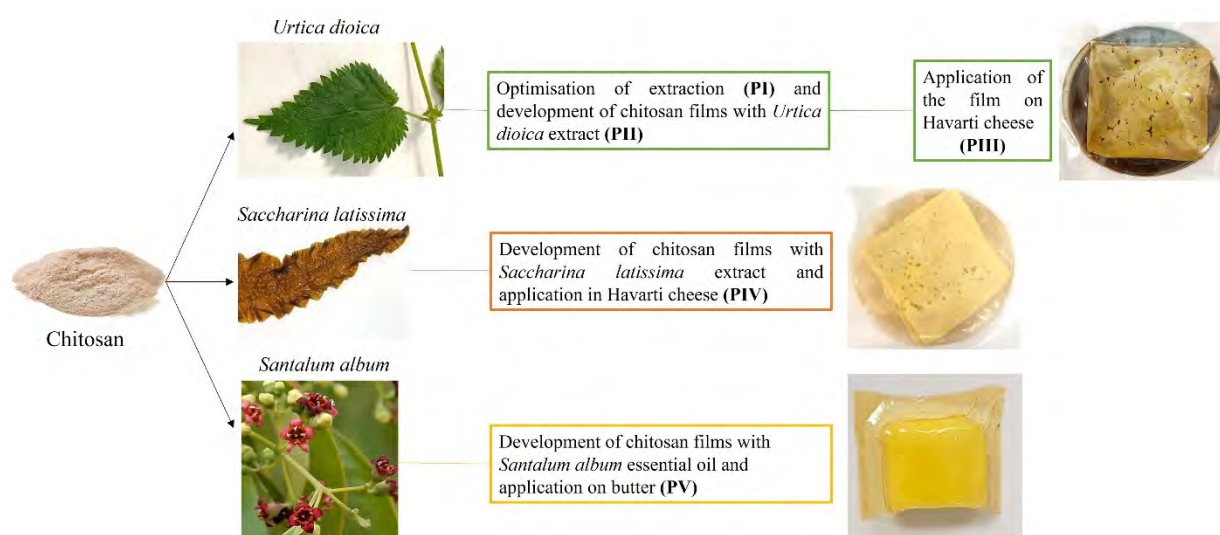


Figure 1. Graphical summary of the thesis. P is the paper number where are the results published.
Own elaboration.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENVASADO ALIMENTARIO

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el envase se define como “cualquier recipiente que contiene alimentos para su entrega como un producto único, que los cubre total o parcialmente, y que incluye los embalajes y envolturas” (<https://www.fao.org/3/y2770s/y2770s02.htm> – visitada el 14 de octubre de 2023). Sin embargo, en la práctica esta definición se queda corta, ya que el envase cumple con otras funciones, pudiéndose definir también como “un sistema coordinado de preparación de los alimentos para su transporte, distribución, almacenamiento, venta y uso final para satisfacer al consumidor con un coste óptimo” (Clark, Jung, & Lamsal, 2014). Por lo tanto, los materiales de envasado deben presentar unas adecuadas propiedades mecánicas, térmicas y ópticas, así como una buena capacidad de barrera frente al oxígeno, dióxido de carbono y a la humedad (Bratovcic, Odobasic, Catic, & Sestan, 2015).

Entre las principales funciones del envasado se encuentran (Clark et al., 2014):

- Contención: consiste en que el envase tenga la capacidad de contener productos para poder trasladarlos o almacenarlos. Esta propiedad es un factor clave para todas las demás funciones del envasado. Todos los productos deben mantenerse dentro del envase desde el punto de producción hasta su destino final.
- Protección: existen dos tipos principales de daños que sufren los alimentos a lo largo de su transporte y almacenamiento. Uno es el daño físico, como golpes, vibraciones, etc. Mientras que el otro es el daño ambiental que se debe a la exposición al agua, luz, gases, microorganismos, etc. Por ello, un buen envase protegerá al alimento o reducirá este tipo de daños en el recipiente.

- Comunicación: el envase informa al consumidor de las particularidades del alimento, tales como la cantidad neta del producto, el nombre/dirección comercial del fabricante, envasador o distribuidor, así como de la información nutricional del alimento. La función de comunicación no solo se refiere a la información proporcionada por texto escrito, sino también aquellos elementos como la forma del envase, el color, los símbolos reconocidos o las marcas que hacen que el consumidor distinga más fácilmente el producto.
- Utilidad: engloba aquellos atributos del envase que aportan un valor añadido y conveniencia a los usuarios del producto y/o envase. Esta propiedad surgió a raíz de que los consumidores exigen cada vez más productos que se adapten a su estilo de vida. Algunos ejemplos son los platos para microondas, las verduras al vapor en bolsa, etc.
- Legislativa: el envase debe cumplir con la legislación, las condiciones y los requisitos tanto del lugar de origen como de destino del envase y del alimento.
- Responsabilidad ambiental: es una función que debe estar presente durante la fabricación, uso, reciclaje y eliminación del envase.
- Economía: los envases deben cumplir todas las funciones descritas, pero con el menor coste posible de fabricación y de distribución, por ejemplo, con la optimización de espacios y reducción de pesos, etc.

La aplicación de un correcto envasado trae consigo una serie de efectos sobre el propio producto, al igual que sobre el fabricante y el consumidor. Esto quiere decir que si se usa un envase adecuado se reducirán los costes de producción, y por tanto se mejorarán los beneficios económicos al aumentar la eficiencia en los procesos de producción, distribución y almacenamiento. Además, el producto alimentario tendrá una mayor durabilidad, manteniendo las características organolépticas, retardando su degradación y consiguiendo un valor añadido. Desde el punto de vista del consumidor, este elegirá aquellos productos con envases más atractivos, obteniendo una mejor imagen pública aquellos que tienen una menor incidencia medioambiental (Peula, 2017).

1.2 SISTEMA DE ENVASADO ACTIVO E INTELIGENTE

La demanda de alimentos de alta calidad y mínimamente procesados, con pocos aditivos, una seguridad excelente y una vida útil prolongada ha aumentado significativamente en los últimos años. Como consecuencia, el papel tradicional del envase ha evolucionado a nuevos sistemas de envasado con los que se cumplan las funciones anteriormente comentadas. Hoy en día, las dos principales tecnologías innovadoras que han surgido son el envasado activo y el envasado inteligente. En la Figura 2 se observa un esquema de las principales diferencias entre ambos tipos.

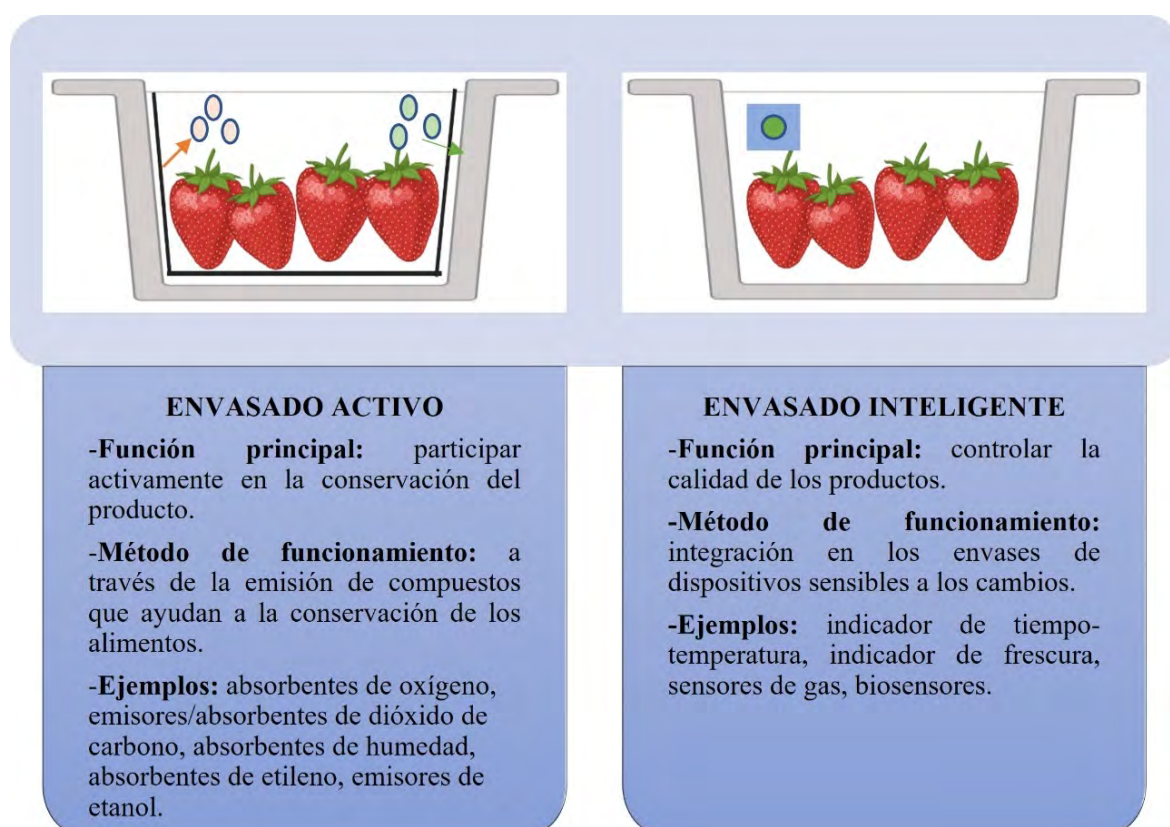


Figura 2. Comparación entre envasado activo e inteligente. Elaboración propia.

Los envases inteligentes monitorizan el estado de los alimentos envasados o el entorno que rodea a los mismos (European Food Safety Authority (EFSA), 2009; Restuccia et al., 2010). Estos recipientes realizan funciones inteligentes como: detectar, registrar, rastrear y comunicar información sobre la calidad del producto y advertir de posibles problemas en el alimento (Yam & Takhistov., 2006). Ejemplos de envasado inteligente son los indicadores de tiempo-

temperatura, indicadores de fuga de gas, humedad relativa o sensores de frescura (Müller & Schmid, 2019).

En cuanto al envase activo, el Reglamento Europeo (CE) nº 450/2009 los define como aquellos sistemas que contienen sustancias que se han agregado intencionalmente a la formulación del material para ser liberadas gradualmente en los alimentos. Este tipo de envase busca una interacción entre el alimento y el material que permita mejorar la estabilidad del producto frente a posibles oxidaciones, crecimiento de microorganismos y/o factores ambientales que puedan alterar las propiedades del alimento (Flores, Pelegrín, Ramos, Jiménez, & Garrigós, 2021). Los compuestos activos que se adicionan pueden incorporarse directamente a la matriz polimérica o colocarse en una bolsita en el interior del envase (Dobrucka & Przekop, 2019). En cuanto al marco legislativo, los aditivos que se utilizan para formular envases activos deben cumplir con los requisitos establecidos en el Reglamento Europeo (CE) nº 1935/2004 sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (European Commission, 2004).

El envase activo debe desempeñar un papel específico, como absorber o eliminar oxígeno, CO₂ y etileno; la humedad y olores y sabores; la liberación de oxígeno, CO₂, vapor de agua, etanol, antioxidantes y otros conservantes y antimicrobianos, entre otras funciones (Ramos, Jiménez, & Garrigós, 2017). Ejemplos típicos de envases activos son los absorbentes de oxígeno, los emisores/absorbentes de dióxido de carbono, los absorbentes de humedad, los absorbentes de etileno, los emisores de etanol, etc (Ozdemir & Floros, 2004).

1.2.1 Absorbentes de oxígeno

Muchos de los productos alimenticios envasados son sensibles a la presencia de oxígeno. De hecho, concentraciones bajas de este gas es suficiente para que se produzcan reacciones que conducen al crecimiento de microorganismos aeróbicos y a la oxidación directa del alimento, dando lugar a cambios organolépticos y a una pérdida de la calidad. El oxígeno es responsable directo de reacciones de descomposición indeseables en lípidos, vitaminas liposolubles y aminoácidos, entre otros. Por ello, la industria alimentaria ha intentado solucionar este

problema modificando la atmósfera de los envases (Dey & Neogi, 2019). Su mecanismo de acción consiste en la reacción entre el oxígeno y el compuesto activo que se usa como captador de O₂ (Yildirim et al., 2018). Las matrices más comúnmente usadas son un polímero derivado de petróleo (como PET) o un biopolímero (como PLA), pero también puede encontrarse en películas multicapa (Vilela et al., 2018). La aplicación de este sistema consigue que el nivel de oxígeno en el envase se encuentre por debajo del 0.01 %, siendo inferior a lo conseguido por otros sistemas convencionales como es el envasado al vacío o en atmósfera modificada (0.3 – 3 %) (Cruz, Ferrerira Soares, & de Andrade, 2007).

En los sistemas de absorción de oxígeno, diversos compuestos pueden funcionar como captadores de oxígeno (Souza, Peruch, & Santos Pires, 2012):

- Oxidación del polvo de hierro: Es el absorbedor de oxígeno más popular y el sistema consiste en la oxidación del hierro en presencia del agua. Generalmente estos absorbentes se comercializan en forma de pequeñas bolsas que contienen los agentes reductores en su interior.
- Oxidación del ácido ascórbico: La acción de este mecanismo se basa en la oxidación del ascorbato a ácido dehidroascórbico. Estas reacciones suelen ser lentas, pero pueden acelerarse con la presencia de luz o de un metal que funcione como catalizador como puede ser el cobre.
- Oxidación enzimática: ciertos sistemas usan una combinación de dos enzimas (glucosa oxidasa y catalasa) que reaccionan con el sustrato para eliminar el oxígeno presente.
- Oxidación de hidrocarburos insaturados: es un eliminador de oxígeno dirigido para alimentos secos. El aceite y/o los hidrocarburos insaturados se mezclan con un catalizador de metal de transición y una sustancia portadora para solidificar la composición secuestrante de oxígeno.
- Oxidación de colorantes fotosensibles: el colorante se encuentra impregnado a una película polimérica. Cuando la película es irradiada con luz ultravioleta, el tinte activa el O₂ a su estado singlete, permitiendo que la reacción de eliminación de oxígeno sea muy eficaz y rápida.

Asimismo, los absorbentes de oxígeno deben cumplir con una serie de requisitos como son: ser inocuos para el cuerpo humano, ejercer la absorción del oxígeno a una velocidad adecuada, no generar sustancias tóxicas ni gases desfavorables, ser compactos, mostrar una calidad y rendimiento constantes y ser económicos (Rooney, 1995).

El nivel de oxígeno en el espacio del envase, la cantidad de oxígeno presente inicialmente en el alimento, el oxígeno que se trasladará del aire circundante al envase a lo largo del almacenamiento, y la naturaleza del propio alimento (tamaño, actividad de agua y tiempo de vida útil) son factores clave que determinarán el absorbente de oxígeno adecuado (Vermeiren, Heirlings, Devlieghere, & Debevere, 2003). Se han descrito el uso de absorbentes de oxígeno en envases de pan, pasteles, pizza, pasta, queso, carnes y pescados curados, salsas, café, cerveza y otras bebidas (Dobrucka & Przekop, 2019).

1.2.2 Emisores/absorbentes de dióxido de carbono

El CO₂ es un gas incoloro que se usa con frecuencia en productos alimenticios como las bebidas carbonatadas. Asimismo, se emplea como refrigerante comercial considerándolo como uno de los más respetuosos con el medio ambiente gracias a sus propiedades termodinámicas, su no toxicidad y no inflamabilidad, su bajo coste y su disponibilidad en el mercado (Lee et al., 2019; Skačánová & Battesti, 2019). Los emisores de dióxido de carbono consiguen altos niveles de este gas en el envase, lo que ejerce un papel beneficioso al frenar el crecimiento microbiano aeróbico en las superficies de alimentos como la carne de aves de corral, y a la vez retrasando la tasa de respiración en frutas y verduras. El CO₂ es soluble en las fases acuosas y grasas de ciertos productos alimentarios, y su efecto antimicrobiano depende del índice de solubilidad que obtenga, además de la cantidad de CO₂ disuelto en el alimento (Yildirim et al., 2018). El sistema más comúnmente usado implica dos sustancias activas: bicarbonato sódico (NaHCO₃) y ácido cítrico. La reacción tiene lugar cuando el agua de los alimentos comienza a disolver estos ingredientes activos que suelen encontrarse como polvos secos dentro de una almohadilla en la superficie del material de envasado (Vilela et al., 2018). Por otro lado, alimentos como los fermentados no pasteurizados que producen cantidades significativas de

CO₂ como producto de sus reacciones catabólicas, son productos claves donde aplicar los absorbentes de CO₂ (Lee, 2016).

El tipo de absorbente utilizado se selecciona teniendo en cuenta las características del alimento, la cantidad de CO₂ que se produce, el nivel deseado de CO₂ y las posibles variables a las que se enfrenta el envase (Lee, 2016). Este sistema consiste en la presencia de soluciones alcalinas o alcalinotérreas, sales y óxidos que reaccionan con el CO₂. El hidróxido de calcio es el eliminador de CO₂ más utilizado en el ámbito tanto de la investigación como en el comercio (Lee et al., 2022). La reacción que ocurre en este caso es termodinámicamente espontánea y se produce en condiciones habituales de almacenamiento y distribución de los envases alimentarios. Además, no se requiere de otro reactivo para eliminar el CO₂ y produce CaCO₃ y agua como productos de reacción, por lo que en este proceso se generan sustancias no nocivas (Lee, 2016).

1.2.3 Absorbentes de humedad

Muchos alimentos secos son extremadamente sensibles a la humedad, e incluso en condiciones de baja humedad relativa (HR), pudiendo modificarse las características organolépticas del alimento. Igualmente, el exceso de humedad dentro de envases con alimentos con una alta actividad hídrica, fomenta la proliferación de bacterias y mohos, con la consecuente pérdida de calidad y seguridad alimentaria, reduciendo la vida útil del producto (Yildirim et al., 2018). El aumento de HR dentro del envase se puede producir debido a una baja permeabilidad al vapor de agua del envase. Aunque generalmente ocurre con la respiración de productos frescos, fluctuaciones de temperatura en paquetes de alimentos con una HR de equilibrio alta o por el goteo del tejido de carnes de cortadas y aves de corral (Rooney, 1995). El control de este parámetro en los envases es crucial para detener la proliferación microbiana y mejorar la presentación del producto (Ozdemir & Floros, 2004).

La regulación de la humedad en el envasado de alimentos puede realizarse de tres maneras: reducción de la humedad, prevención y eliminación. La reducción de la humedad consiste en reemplazar el aire húmedo del espacio de cabeza por un gas seco o vacío. La prevención de la

humedad se considera cuando se utilizan materiales de envasado que poseen una alta barrera frente al agua, impidiendo la penetración del vapor de agua en el envase. Mientras que los sistemas de eliminación son los que se considerarían envases activos, los cuales consisten en la expulsión total de la humedad (Flores et al., 2021).

Entre los absorbentes de humedad más comúnmente usados está el gel de sílice al no ser corrosivo ni tóxico. Además, se suele usar tamices moleculares, arcillas naturales (ej: montmorillonita), óxido de calcio, cloruro de calcio y almidón modificado. La presentación de este sistema puede ser de tres maneras (da Silva et al., 2021; Ozdemir & Floros, 2004):

- I) Una manta o almohadilla desecante que envuelve el alimento a envasar para absorber el agua. Se componen principalmente de materiales como polímeros porosos (por ejemplo, PP, LDPE) o materiales inorgánicos (zeolitas, arcillas, gel de sílice, etc). Las sustancias que contienen en su interior pueden ser bentonita, sorbitol o cloruro cálcico. Se usa en carne de aves, pescado o mariscos.
- II) Una película polimérica laminada que posee una capa absorbente de humedad formada a partir de un injerto de poliéster y una resina. Normalmente está estructurada por una resina de poliuretano, una resina acrílica y una resina de vinilo. Por ejemplo, se puede utilizar para absorber el hielo derretido durante el transporte de marisco refrigerado (Dobrucka & Cierpiszewski, 2014).
- III) Una bolsita que comúnmente se aplica en alimentos con bajo nivel de humedad como son nueces, especias, galletas, leche en polvo o café instantáneo.

1.2.4 Absorbentes de etileno

El etileno (C_2H_4) es un hidrocarburo insaturado puro que se encuentra en la naturaleza. Es un compuesto volátil de enorme importancia como hormona vegetal (Zhu et al., 2019). Se necesitan concentraciones muy bajas para desencadenar actividades fisiológicas como la floración o la senescencia. A su vez, el etileno es también responsable de la degradación de la clorofila y la producción de sabores amargos (Yildirim et al., 2018). Por estas razones, el control

de la concentración de este compuesto en el envase es una de las cuestiones más críticas en el envasado de frutas y hortalizas frescas (Vilela et al., 2018).

A la hora de eliminar o regular la presencia de etileno, existen diferentes enfoques que se clasifican en tres categorías (Gaikwad, Singh, & Negi, 2020):

- 1) Reducción de etileno vía atmósfera modificada, cambiando los gases dentro del envase.
- 2) Uso de materiales de envase perforados, permitiendo el intercambio de gases dentro y fuera del mismo.
- 3) Absorbentes de etileno, que funcionan a través de una reacción química entre dos materiales (absorción) o que retienen físicamente la molécula de etileno (adsorción).

El método de absorción es sin duda el que tiene más popularidad en el mercado, siendo múltiples las empresas que utilizan este procedimiento para alargar la vida de los productos frescos. Este sistema de eliminación de etileno está formado por un pequeño saco de papel que contiene un agente de eliminación en su interior, o bien el eliminador se encuentra incorporado en el propio material de envasado. El método más reconocido, económico y común es el permanganato de potasio (KMnO_4), el cual es un agente que elimina el etileno de forma química a través de un proceso de oxidación. En esta reacción, el permanganato oxida al etileno, dando lugar a dióxido de carbono y agua. Para maximizar la eliminación, el permanganato de potasio normalmente se impregna en una matriz inerte como puede ser gel de sílice, alúmina o sepiolita. Los eliminadores que se encuentran en el mercado tienen una capacidad absorbente de 3 a 6.5 $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ de etileno, y generalmente contienen entre 4 y 6 % de KMnO_4 . Sin embargo, debido que este producto es altamente tóxico, no debe usarse en contacto directo con los alimentos, por ello se encuentran en forma de sacos o filtros tubulares en el envase (Gaikwad et al., 2020; Martínez-Romero et al., 2007).

1.2.5 Emisores de etanol

El etanol es ampliamente conocido como conservante en productos alimentarios como son el pan, galletas y otros productos de panadería, ya que ha demostrado ser eficaz en la prevención del crecimiento de moho, levaduras y bacterias, y consecuentemente en la prolongación de la

vida útil de estos alimentos (Ozdemir & Floros, 2004). Las propiedades antisépticas y antimicrobianas del etanol lo hace una sustancia interesante para adicionar a los envases activos (Axel, Zannini, & Arendt, 2017). Este puede pulverizarse directamente sobre el producto o el envase, así como también puede depositarse en el interior del paquete como emisor de etanol (De Pilli, 2020). El emisor de etanol más común es el que se presenta en forma de bolsita liberando etanol en el espacio libre del envase (Dobrucka & Cierpiszewski, 2014). El tamaño y la capacidad de la bolsita emisora de etanol utilizada va a depender del peso del alimento, de su actividad de agua y de la vida útil deseada. A su vez, la eficacia del sistema va a depender del tipo y tamaño del envase, la cantidad de etanol atrapado por el envase, la permeabilidad del material al vapor de agua y al etanol y la actividad del agua del alimento (Ozdemir & Floros, 2004).

La presencia de etanol en envases alimentarios está regulado bajo el Reglamento (UE) 10/2011 sobre los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Además, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha etiquetado al etanol como una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS), lo que significa que es una sustancia exenta de riesgos para su uso en productos alimentarios (<https://www.chemicalsafetyfacts.org/> - visitada el 21 de julio de 2023).

1.3 MATERIALES APLICADOS EN EL ENVASADO

El envasado de alimentos es una técnica milenaria. Durante la prehistoria, solo se disponía de materiales naturales para envasar, como eran las hojas, pieles de animales o cortezas. Posteriormente, se comenzaron a usar cestas de juncos, cajas y barriles de madera. Más tarde llegaron las vasijas de cerámica, y en siglo XVIII se comenzó a usar la hojalata. Un siglo más tarde, concretamente en el año 1817 se fabricó comercialmente la primera caja de cartón ondulado, también llamada corrugado. Los avances producidos durante el siglo XX incluyeron los cierres de baquelita en botellas y el celofán transparente como envoltorio, aumentando la eficacia del procesado y mejorando la seguridad alimentaria del alimento. Al mismo tiempo, se comenzó a incorporar como material el aluminio y los plásticos. En pleno siglo XXI, el

envasado de alimentos se ha convertido en toda una industria especializada con una amplia gama de materiales a emplear (Gupta & Dudeja, 2017).

El vidrio es uno de los materiales de envasado más populares, ya que no es tóxico, es fácil de limpiar, no reacciona con alimentos ni productos químicos, no es poroso y es relativamente barato. Todos estos atributos lo convierten en un material ideal, salvo por el hecho de que es fácil de quebrar, pesado y frágil. Es ampliamente utilizado en el envasado de líquidos y salsa, además de utilizarse en la fabricación de botellas y tarros. Las botellas de vidrio suelen utilizarse para almacenar bebidas frías, alcohol, encurtidos, mermeladas, etc (Gupta & Dudeja, 2017).

El aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre. Se caracteriza por su ligereza y brillo, además de ser duradero, reciclable y poseer una buena propiedad de barrera. Se utiliza para fabricar latas, bandejas metálicas y moldes para alimentos listos para cocinar que resisten altas y bajas temperaturas, por lo que se puede aplicar tanto en alimentos congelados como a temperatura ambiente. El aluminio se puede emplear en forma de láminas para envasar alimentos directamente, así como para laminar papel o plástico y aumentar así su resistencia, estabilidad térmica y de barrera contra la humedad, el aire y los olores. Se suelen aplicar para envasar sopas y especias (Gupta & Dudeja, 2017).

Plástico es un término genérico para múltiples materiales sintéticos relacionados con el petróleo que se utilizan habitualmente en el envasado de alimentos. Sus principales características son la resistencia, duración, ligereza, y hermetismo. Además, muchos de estos plásticos son transparentes, por lo que se puede observar el alimento perfectamente sin necesidad de abrir el envase. Este material se puede utilizar para fabricar muchos tipos de materiales de envasado como bolsas, envoltorios, botellas, tarrinas, cubos, bolsas resellables, etc. A pesar de sus múltiples aplicaciones, es preocupante la falta de biodegradabilidad y la difusión a los alimentos de sustancias utilizadas en su fabricación (Gupta & Dudeja, 2017).

El papel es un material de envasado ancestral que se elabora a partir de materiales a base de celulosa. Entre sus características nos encontramos con que es permeable al aire, vapor de agua y a los gases como el oxígeno, y que tiene poca resistencia al desgarro. A partir de este

material se fabrican una amplia gama de bolsas y cajas que comúnmente se usan para transportar alimentos secos como son el azúcar, la sal, la harina, etc. Asimismo, se pueden elaborar envases de cartón para guardar aperitivos, frutos secos o incluso vasos para beber. La capacidad de reciclarse o biodegradarse para el compostaje son algunas de las características más atractivas de este material.

1.4 POLÍMEROS SINTÉTICOS Y SU PROBLEMÁTICA

Como se comentó anteriormente, materiales como el plástico, vidrio, metal y papel han sido utilizados en la fabricación de envases. Sin embargo y con el paso de los años, los polímeros plásticos derivados del petróleo han reemplazado a estos materiales tradicionales. Los polímeros son compuestos químicos formados por macromoléculas constituidas por largas cadenas de pequeñas unidades repetidas llamadas monómeros (Singh, Saengerlaub, Wani, & Langowski, 2012). Los más comúnmente usados en la industria alimentaria son el polietileno de alta y baja densidad (HDPE y LDPE, respectivamente), el poliestireno (PS), el propileno (PP) y el tereftalato de polietileno (PET). Estos materiales tienen numerosas ventajas, donde destaca su ligereza, extraordinarias propiedades mecánicas y térmicas, resistencia a la corrosión, fácil manejo y sencillo procesado, además de su coste (Zhang et al., 2022). Gracias a estas propiedades, los polímeros sintéticos se han convertido en el material de embalaje predominante en la mayoría de los sectores. En el año 2021, la producción europea de plásticos alcanzó las 57.2 millones de toneladas, siendo su principal mercado de aplicación la industria del envasado (39.1%), seguido por la construcción (21.3%) y la automoción (8.6%) (Plastics Europe, 2022). Aunque la producción de plásticos en Europa disminuyó de 61.8 a 57.9 millones toneladas de 2018 a 2019, la producción mundial se vio incrementada de 359 a 368 millones de toneladas en tan solo un año (PlasticsEurope, 2020). Sin embargo, la gestión de los residuos derivados de esta masiva producción sigue siendo inadecuada o inexistente en algunos países. Como consecuencia, el plástico permanece en el medio natural donde su durabilidad le permite perdurar durante cientos o miles de años, y su ligereza le permite ser transportado largas distancias a través de las corrientes de aire o marinas (Barnes, Galgani, Thompson, & Barlaz, 2009). De ahí deriva la acumulación de los macroplásticos (plásticos mayores a 5 mm) y microplásticos (plásticos menores a 5 mm) en los medios terrestres y acuáticos. Se ha informado

de la presencia de residuos plásticos en terrenos agrícolas (Rillig, Ingraffia, & De Souza Machado, 2017), lagos y arroyos de agua dulce (Dris et al., 2015) e incluso en el hielo Ártico (Obbard et al., 2014). Por ende, la fauna terrestre y acuática está constantemente expuesta al plástico, como puede ser el caso de las algas (Carson, Nerheim, Carroll, & Eriksen, 2013) o las tortugas (Duncan et al., 2019), entre otro muchos animales marinos y terrestres. A su vez, este uso masivo de plásticos trae consigo inconvenientes como el agotamiento de los recursos petrolíferos y las emisiones derivadas de la incineración de estos materiales que alteran el medio ambiente (Verma & Fortunati, 2019).

Para combatir esta problemática, la Unión Europea cuenta con una legislación que presenta unos requisitos exigentes en cuanto al uso y el reciclaje de los plásticos. Con el objetivo de convertirse en el primer continente climáticamente neutro en 2050, Europa estableció en 2020 el Plan de Acción de Economía Circular, ubicado dentro del Pacto Verde Europeo. Dicha normativa abarca una serie de objetivos como son una producción focalizada en la reducción, reutilización y reciclaje de materiales sostenibles, y un menor uso de plásticos desechables. Asimismo, la Directiva (UE) 2019/904 relativa a la reducción del impacto de determinados productos de plástico en el medio ambiente, estimula la producción y el uso de alternativas sostenibles que eviten la basura marina. El objetivo es reducir la basura plástica vertida al océano en un mínimo del 50 % hasta el año 2030. Esta misma directiva propone medidas claves como el impedimento de la introducción en el mercado de productos de plástico de un solo uso cuando existan otras alternativas sostenibles, asequibles y fácilmente accesibles.

España ocupa el cuarto lugar a nivel europeo en la producción de plásticos, después de Alemania, Francia e Italia. Por ello, dentro de la normativa nacional encontramos la Estrategia Española de Economía Circular. En ella se establecen las bases para impulsar un modelo de producción y consumo renovado, que se alinea con los planes de acción de economía circular de la UE comentados previamente. Esta Estrategia establece una serie de objetivos a cumplir para el año 2030 representadas en la Figura 3. La medida se pretende aplicar en seis sectores prioritarios de actividad: sector de la construcción, agroalimentario, pesquero y forestal, industrial, bienes de consumo, turismo y textil y confección (<https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/economia-circular/estrategia.html> - Visitada el 27 de septiembre de 2023).

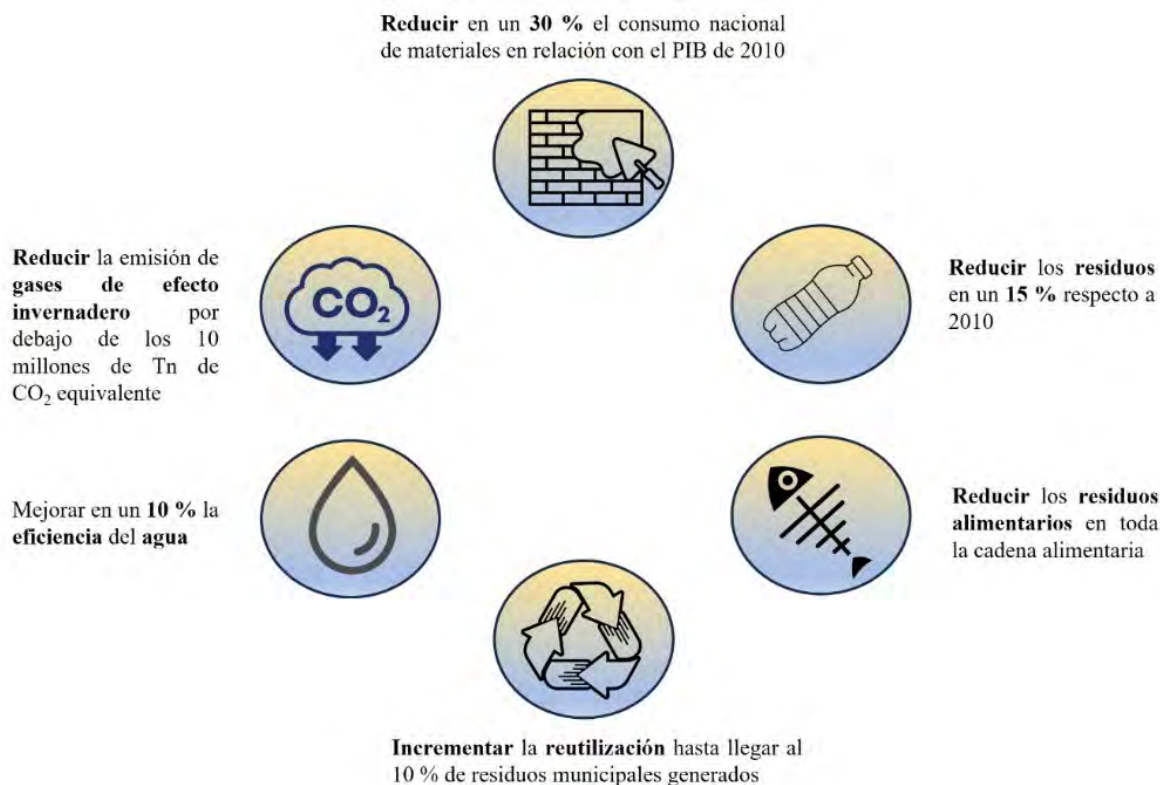


Figura 3. Objetivos de la Estrategia Española de Economía Circular para el año 2030. Adaptación de (Flores et al., 2021). Elaboración propia.

1.5 POLÍMEROS BIODEGRADABLES COMO ALTERNATIVA

Como solución a esta problemática derivada de los polímeros sintéticos, en las últimas décadas ha aumentado el interés por el desarrollo de los llamados “biopolímeros”. Según la Asociación Europea de Bioplásticos, los biopolímeros se definen como polímeros de origen biológico, biodegradable o ambos a la vez (<https://www.european-bioplastics.org/market/> - Visitada el 25 de septiembre de 2023). Este término deriva de las palabras griegas “bio” y “polymer”, que significa naturaleza u organismos vivos (Ezeoha, 2013). Los biopolímeros son macromoléculas biológicas formadas por la polimerización de monómeros como son las proteínas (polímeros de aminoácidos), ácidos nucleicos (polímeros de nucleótidos) y polisacáridos (polímeros de carbohidratos). Las principales ventajas de estos materiales son que reducen la producción de dióxido de carbono y la cantidad de desechos enviados a vertederos (Valdés & Garrigós, 2016). Además, los biopolímeros son recursos renovables que tienen

características únicas como su baja densidad y peso, rentabilidad y facilidad de producción. La baja energía de enlace C-C característica de los polímeros naturales los hace vulnerables a la degradación. Por lo que, a diferencia de la mayor parte de los polímeros sintéticos, los naturales se descomponen fácilmente en el medio ambiente bajo la influencia del aire, la luz, el calor y los microorganismos (Aaliya, Sunooj, & Lackner, 2021). Asimismo, además de su biodegradabilidad característica, se ha comprobado que esta clase de polímeros son altamente biocompatibles, lo que los hace interesantes en múltiples aplicaciones como películas comestibles, emulsiones o materiales de envasado en la industria alimentaria. De igual modo, se pueden aplicar como materiales de transporte de fármacos, apósitos, implantes médicos o material en ingeniería tisular (Baranwal, Barse, Fais, Delogu, & Kumar, 2022).

La Figura 4 representa la clasificación de los biopolímeros, donde se encuentran los grupos principales en función de su origen renovable/no renovable y su carácter biodegradable/no biodegradable.

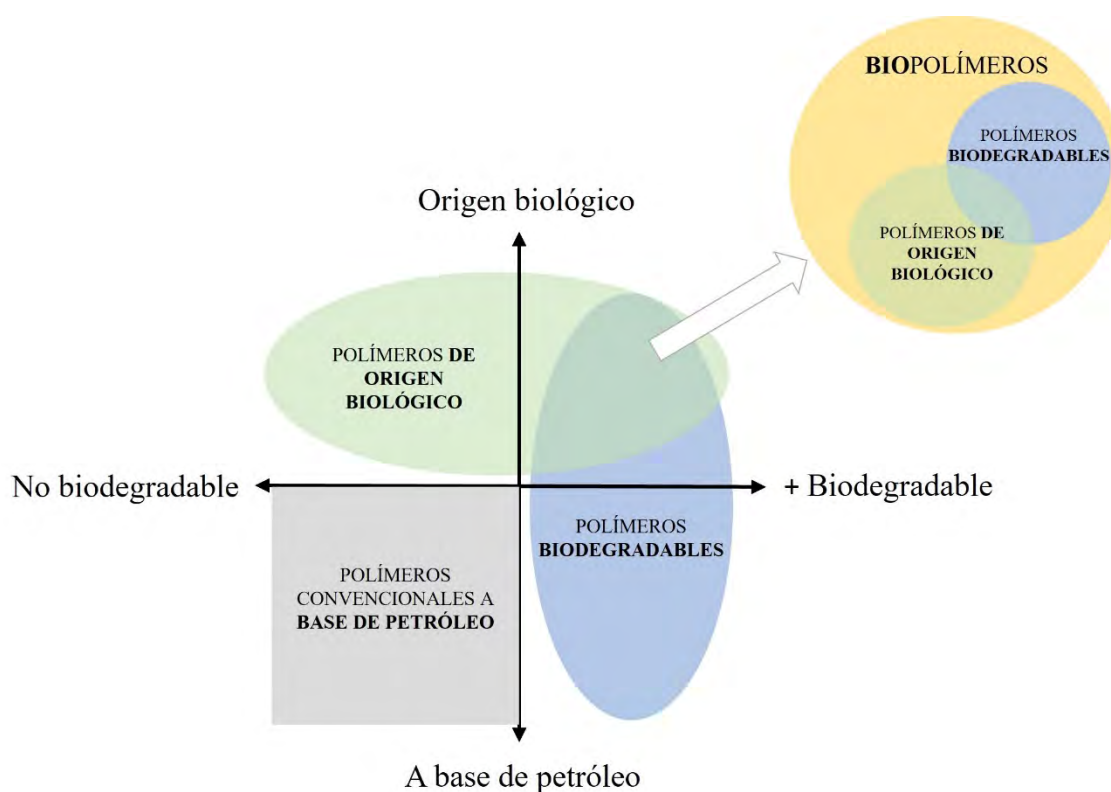


Figura 4. Tipos de polímeros en función de su origen y biodegradabilidad. Adaptación de (Flores et al., 2021). Elaboración propia.

pueden tener la capacidad de ser biodegradables como es el caso del Poli(Butilén Adipato-co-Tereftalato) (PBAT) y la poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Imre & Pukánszky, 2013). El uso de polímeros biodegradables y de fuentes renovables es una alternativa realmente interesante. Sin embargo, estos biopolímeros deben ser capaces de equiparar las propiedades de los termoplásticos convencionales. De esta manera se puede preservar la calidad de los alimentos y la seguridad de los consumidores, al mismo tiempo que se reduce la eliminación de residuos y la huella de CO₂ (Flores et al., 2021).

Biopolímeros como el almidón, el pululano, la celulosa, el quitosano, el poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) o el ácido poliláctico (PLA) entre otros han sido propuestos como materiales innovadores para el envasado de alimentos (Jafarzadeh et al., 2020). Se prevé que el 52 % de la producción mundial de biopolímeros sea para el envasado de alimentos en 2024, como podemos observar en la Figura 5 (<https://www.european-bioplastics.org/market/> - Visitada el 25 de septiembre de 2023).

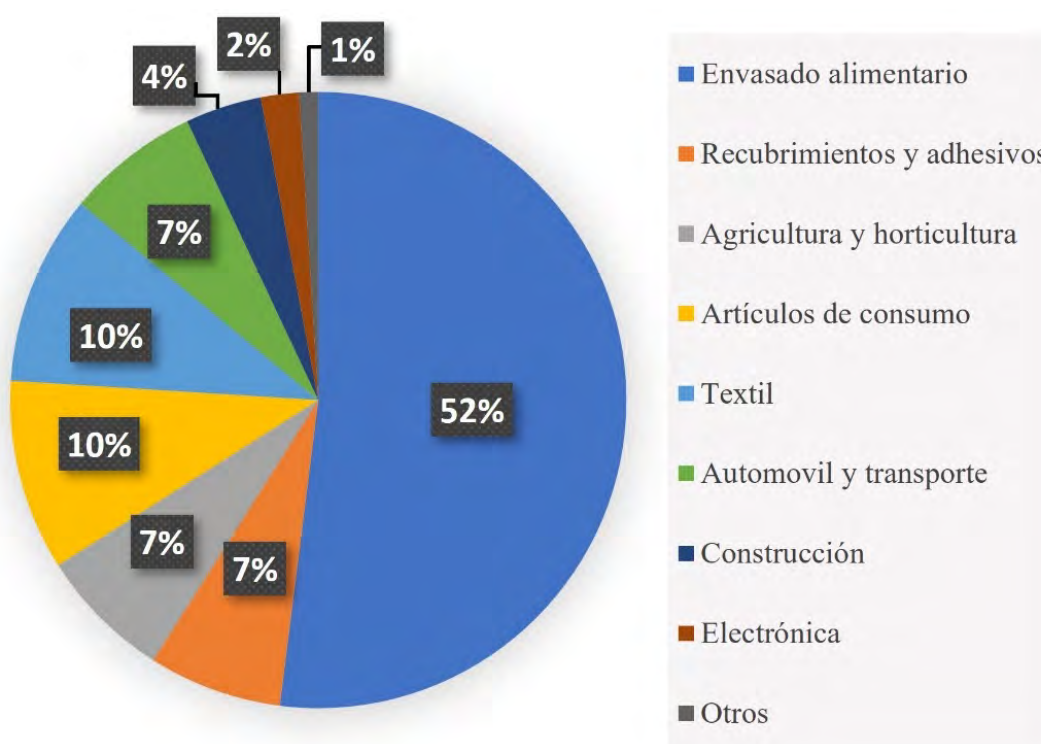


Figura 5. Capacidad de producción global (%) de biopolímeros en 2024 en función del sector del mercado. Adaptación de (Flores et al., 2021). Elaboración propia.

1.6 EL QUITOSANO

La quitina es uno de los polímeros biodegradables más abundantes en la Tierra después de la celulosa. Este biopolímero se encuentra ampliamente distribuido tanto en el reino animal como en el vegetal. La quitina es uno de los principales componentes que conforman los exosqueletos de artrópodos, los tendones y los revestimientos de su sistema excretor, respiratorio y digestivo, al igual que la cutícula de los insectos. También se puede encontrar en los iridóforos, epidermis de cefalópodos, artrópodos y moluscos, además de en la cutícula de vertebrados (Khoushab & Yamabhai, 2010). Además, es un compuesto estructural que forma parte de la pared celular de los hongos. Por lo tanto, las principales fuentes comerciales de la quitina proceden del caparazón de cangrejos, gambas, krill y hongos, los cuales generalmente son desperdiciados por la industria alimentaria. Por ejemplo, el caparazón de los crustáceos cuenta con un 20-30% de quitina, siendo las proteínas un 30-40% y un 30-50% restante de carbonato y fosfato cálcicos (Bakshi, Selvakumar, Kadirvelu, & Kumar, 2020).

En 1811, el profesor Braconnot escribió la primera descripción explícita de la quitina, donde denominó “fungina” a la fracción resistente al álcali de ciertos hongos superiores. Unos años después, en 1823, Odier encontró una sustancia en la cutícula de escarabajos que poseía unas características similares a las de la fungina. La denominó “quitina”, derivada de la palabra griega “chitón” que significa túnica (Bakshi et al., 2020). Por otro lado, Rouget hirvió la quitina en una solución de hidróxido de potasio, descubriendo que esta sustancia se volvía soluble en presencia de ácidos orgánicos. Esto llevó al descubrimiento del quitosano en 1859. Sin embargo, no fue hasta 1894 que Hoppe Seyler bautizó esta sustancia con el nombre de quitosano (Hoppe-Seyler, 1894).

El proceso de obtención del quitosano se muestra de manera esquematizada en la Figura 6. En primer lugar, se debe obtener los residuos de marisco (exoesqueleto de crustáceos). A continuación, se deben procesar los residuos con una disolución acuosa diluida de HCl, con el objetivo de descalcificarlos. Seguidamente, se tratan con una solución de hidróxido de sodio al 40% durante 1-3 h a 120 °C para la desproteínización. Finalmente, se lava para desmineralizar y decolorar, obteniendo así la quitina, compuesta por unidades (N-acetil-D-glucos-2-amina)

(Zargar, Asghari, & Dashti, 2015). El quitosano se consigue a partir de la desacetilación alcalina de la quitina, donde los grupos acetamida se convierten en grupos de aminoácidos primarios. Este tiene una estructura que está conformada principalmente por unidades β -(1-4)-2-acetamido-D-glucosa (N-acetil-D-glucosamina) y β -(1-4)-2-amino-D-glucosa (D-glucosamina) (Abd El-Hack et al., 2020).

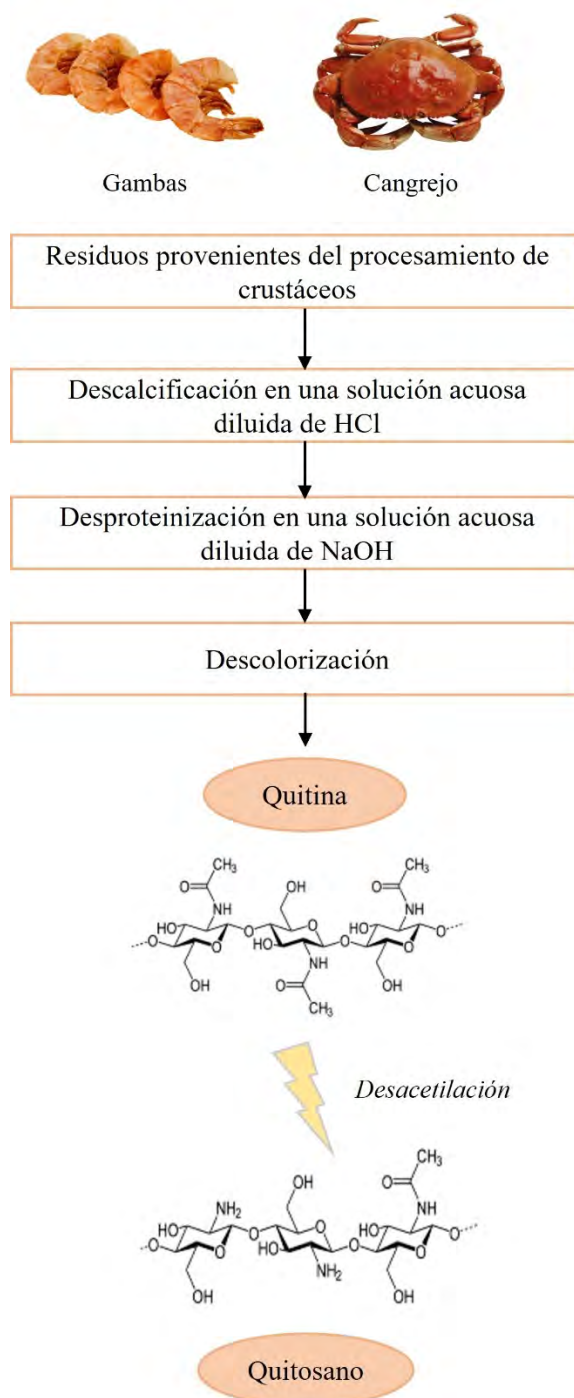


Figura 6. Esquema del proceso de obtención de quitosano. Adaptación de (Zargar et al., 2015). Elaboración propia.

El quitosano se puede encontrar en forma de polvo, escamas de color blanco ligeramente translúcido o en solución. En la naturaleza, el quitosano es extremadamente sensible a la degradación debido a que sus enlaces glicosídicos se rompen fácilmente (Ibrahim & El-Zairy, 2015). Las propiedades que posee el quitosano lo convierten en una sustancia realmente interesante para su estudio como posible material de envasado.

1.6.1 Propiedades fisicoquímicas

Tras la extracción, las propiedades fisicoquímicas del quitosano varían según la fuente de origen, la especie de crustáceo del que proviene, el tiempo de reacción y el grado de desacetilación de la sustancia, entre otros (Oladzadabbasabadi et al., 2022). El quitosano se caracteriza por tener poca solubilidad en agua, además de ser insoluble en muchos disolventes orgánicos. Esto se debe a la presencia en su estructura del grupo acetilo, el cual es de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo, generalmente es soluble en diversas soluciones de ácidos orgánicos diluidos como es el ácido acético, cítrico, fórmico, láctico, málico o tartárico (Cazón & Vázquez, 2019). La solubilidad está íntimamente relacionada con los grupos amino presentes a lo largo de su cadena. Por ejemplo, en condiciones ácidas con un pH inferior a 6, los grupos amino se protonan por completo convirtiendo al quitosano en una sustancia altamente soluble. En cambio, cuando el pH se encuentra por encima de 6, la solubilidad se reduce gradualmente ya que tiene lugar la deprotonación de los grupos amino y la pérdida de carga positiva de la sustancia (Moran, Turley, Andersson, & Lavelle, 2018). Otros factores que influyen en esta característica son el grado de desacetilación y el peso molecular del quitosano. El grado de desacetilación indica la cantidad total de grupos acetamida que son convertidos en amina (Cánepa, 2018). Generalmente, a mayor grado de desacetilación, hay mayor número de grupos amino potencialmente protonados que confieren cargas positivas, lo que facilita la disolución del quitosano. Por otro lado, cuanto mayor es el peso molecular de la sustancia, esta tiene mayor número de enlaces hidrógeno intermoleculares e intramoleculares entre las cadenas que lo conforman. Esto da lugar a la formación de cadenas moleculares muy entrelazadas entre sí, por lo que la disolución del quitosano es más compleja (Moran et al., 2018).

 El quitosano presenta tres formas distintas de polimorfismo (α -, β - y γ -quitosano), diferenciándose entre ellas por la disposición de sus cadenas moleculares (Zargar et al., 2015).

El α -quitosano tiene una estructura ordenada compuesta por dos cadenas paralelas e inversas de polisacáridos. Este tipo de estructura proporciona una alta cristalinidad y una densa unión intermolecular, aumentando la resistencia a la solubilidad del biopolímero. Asimismo, el α -quitosano es la forma más común de quitosano (Jung & Zhao, 2012)

1.6.2 Propiedades antimicrobianas

El carácter antimicrobiano del quitosano es uno de los grandes atractivos para su posterior aplicación como material de envasado de alimentos, dispositivos biomédicos, ingeniería de tejidos y sistemas de administración de fármacos. Esta actividad antimicrobiana se ejerce sobre todo en situaciones donde hay un pH ácido. En estos casos se forma una mayor densidad de carga catiónica en los grupos aminos del quitosano, los cuales tienen una gran afinidad por las membranas biológicas que tienen carga negativa (Shanmuganathan et al., 2019). Esto se debe a que el medio ácido protona la cadena de quitosano casi por completo, lo que facilita la interacción con la diana bacteriana (Oladzadabbasabadi et al., 2022).

La capacidad antimicrobiana depende de factores intrínsecos como son el peso molecular, el grado de desacetilación y factores extrínsecos, como son la especie de microorganismo y el pH del entorno (Bagheri-Khoulenjani, Taghizadeh, & Mirzadeh, 2009). Asimismo, el quitosano tiene un amplio espectro de actividades antimicrobianas contra bacterias (especialmente las Gram-positivas), algas y hongos (Costa, Silva, Pina, Tavaría, & Pintado, 2012). Diversos estudios han hallado una correlación entre la actividad microbiana y el peso molecular del quitosano. El quitosano con alto peso molecular no puede atravesar las membranas bacterianas externas. Por ello, su efecto antimicrobiano lo aplica adhiriéndose a la superficie de la célula, formando una capa impermeable alrededor de ella, bloqueando el transporte de nutrientes esenciales al interior de la célula y provocando así la lisis celular bacteriana (Hosseinnejad & Jafari, 2016).

Además de poseer una carga positiva, el quitosano con mayor grado de desacetilación, mayor densidad de carga y mayor solubilidad también puede limitar el crecimiento bacteriano eficazmente (Cazón & Vázquez, 2019). Esta actividad antimicrobiana puede explicarse a través

de dos mecanismos. El primer mecanismo indica que la superficie bacteriana cargada negativamente se une a los grupos NH_3^+ del quitosano, lo que altera la permeabilidad de las células y permite la salida de los solutos fuera de las células. Mientras que el segundo mecanismo propone la unión del quitosano con el ADN de las bacterias, lo cual impide la correcta síntesis de ADN/ARN y produce la consecuente muerte celular (Lunkov, Ilyina, & Varlamov, 2018).

1.6.3 Propiedades antioxidantes

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia de detener o retrasar la oxidación de otras moléculas (Zhang et al., 2021). Esta propiedad no se ha investigado tanto como las citadas anteriormente, ya que no es una de las principales propiedades del quitosano. Realmente el quitosano tiene una actividad de eliminación de radicales libres muy baja, lo que puede explicarse por el hecho de que esta sustancia no tiene átomos de hidrógeno que puedan suministrarse con facilidad para ejercer el efecto antioxidante (Schreiber, Bozell, Hayes, & Zivanovic, 2013). Del mismo modo, posee una baja capacidad de eliminación de radicales libres de los grupos amino libres en la posición C-2 de las cadenas de quitosano (Genskowsky et al., 2015). Para mejorar las propiedades antioxidantes del quitosano se suele sintetizar derivados del quitosano (Abd El-Hack et al., 2020). Por ejemplo, los monómeros derivados de quitosano que presentan en su composición un grupo amino y dos grupos hidroxilo que pueden reaccionar con los radicales libres, por lo que esto les aporta una capacidad de eliminación de radicales adecuada (Castro Marín et al., 2019; Feng, Du, Li, Hu, & Kennedy, 2008).

1.7 EL QUITOSANO APLICADO AL ENVASADO ACTIVO

En la industria alimentaria, las películas y recubrimientos de base biológica ofrecen muchas ventajas debido a su inocuidad, propiedades de barrera contra microorganismos patógenos, y capacidad de degradarse. Como ya hemos comentado, el quitosano se presenta como un biopolímero con interesantes aplicaciones como envase activo (Ahmed, Mulla, Arfat, & Thai T, 2017). Las películas de quitosano han demostrado tener éxito en diversos productos frescos,

donde ejercen protección contra el deterioro microbiano, aumentando la vida útil de los alimentos y manteniendo su calidad (Rahman, Mujeeb, & Muraleedharan, 2017; Tan, Lim, Tay, Lee, & Thian, 2015). Las películas de quitosano también presentan propiedades como la flexibilidad, durabilidad, alta resistencia a la rotura (Martínez-Camacho et al., 2010), y una moderada permeabilidad al agua y al oxígeno, lo que ayuda a reducir la tasa respiratoria de los alimentos (Agulló, Rodríguez, Ramos, & Albertengo, 2003).

Sin embargo, este tipo de polímeros no tienen un perfil funcional perfecto. Para mejora algunas propiedades se incorporan de agentes naturales a la matriz. Los biopolímeros usados como material de envasado son perfectamente compatibles con plastificantes, extractos de plantas y otros materiales, lo cual se traduce en una elevada presencia de grupos hidroxilo, amino, carbonilo y polares cuando se forma el envase activo. Esta estructura de red de enlaces de hidrógeno formada entre los grupo polares permite que la película adopte buenas propiedades mecánicas y de barrera (Dehghani, Hosseini, & Regenstein, 2018).

Asimismo, múltiples compuestos activos extraídos de la naturaleza presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, como son los flavonoides y los ácidos fenólicos (Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2009). Estos compuestos están presentes en la mayoría de las plantas y son responsables de las propiedades biológicas de la planta, formando parte de los metabolitos secundarios de las plantas, contribuyendo a su protección contra la radiación ultravioleta, patógenos, parásitos y depredadores (Vieira et al., 2022). Algunos ejemplos son los aceites esenciales y extractos naturales extraídos de las hojas, frutos, semillas y raíces de diversas plantas (Flórez et al., 2022b). La composición de estos compuestos va a depender de la técnica de extracción aplicada, el disolvente, las condiciones atmosféricas y la pieza vegetal de la que se extraiga, entre otros factores (Vieira et al., 2022). A su vez, existe una lista de aceites esenciales y extractos que han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) como sustancias seguras *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=182.20> – Visitada el 15 de octubre de 2023).

Se ha estudiado el efecto de estos compuestos naturales sobre las características técnicas en el envasado a base de quitosano. Respecto a las propiedades mecánicas de películas a base de quitosano, estas mejoraron con la adición de aceite esencial de anís (Mahdavi, Hosseini, & Sharifan, 2018) y de lavanda (Zhang et al., 2013). A su vez, la presencia de extractos de berenjena morada y negra (Yong et al., 2019) y de extracto del alga espirulina (Balti et al., 2017) reforzaron las propiedades mecánicas de las películas de quitosano, haciéndolas más resistentes a la rotura. También su propiedad de barrera mejoraban cuando compuestos fenólicos se adicionaba a la matriz de quitosano, como es el caso del extracto de manzana (Riaz et al., 2018) y de extractos obtenidos de la cáscara de banana (Zhang et al., 2020). Sin embargo, esta propiedad no sufría modificaciones importantes cuando se adicionaban aceites esenciales, y esto puede deberse a la composición lipídica del aceite y la interacción que tiene con la estructura del quitosano (Flórez et al., 2022b).

Por otra parte, las características funcionales de las películas de quitosano adicionadas con extractos también han sido analizadas. Entre los extractos que aportaban una mayor actividad antioxidante se encontraron el extracto hidroalcohólico de *Artemisia campestris* (Moalla et al., 2021), diversos polifenoles presentes en la manzana (Riaz et al., 2018) y el aceite esencial de comino (Hromiš et al., 2015), entre otros. Asimismo, la capacidad antimicrobiana es otra característica crucial para el envasado alimentario. En este caso se observó que la presencia de aceites esenciales de clavo y canela en la película de quitosano inhibían el crecimiento de hongos (Xu et al., 2019). Igualmente el crecimiento de hongos se veía disminuido en aquellas matrices donde se añadía aceite esencial de eucalipto (Hafsa et al., 2016). Los extractos polifenólicos también mejoraban las propiedades antimicrobianas, como era el caso de la adición de extracto de piel de granada (Yuan, Lv, Yang, Chen, & Sun, 2015), extractos de té verde (Amankwaah, Li, Lee, & Pascall, 2020) y extracto de maíz morado (Qin et al., 2019). Sin embargo, existen potenciales extractos vegetales autóctonos y con bajo valor comercial que aún no han sido evaluados en películas activas de quitosano, pudiendo igualmente ejercer una mejora técnico-funcional de la matriz.

1.7.1 Extracto de *Urtica dioica*

Urtica dioica, comúnmente conocida como ortiga, es una planta perenne presente en Europa, Asia, norte de África y América. En la actualidad, *U. dioica* se considera una mala hierba invasiva que suele encontrarse en suelos húmedos (Jan, Zarafshan, & Singh, 2017). El género *Urtica* pertenece a la familia *Urticaceae*, que es el grupo principal de las angiospermas (plantas con flores). Esta planta tiene un tallo que puede alcanzar una altura de entre 10 a 50 cm y que sostiene sus características hojas rugosas y dentadas, además de poseer una larga historia como remedio herbal y aditivo nutritivo en la dieta (Mzid, Ben Khedir, Bardaa, Sahnoun, & Rebai, 2017).

Aunque la composición de la ortiga varía según la época de recolección, el tipo de suelo, la exposición al sol y otros factores (Đurović et al., 2017), los compuestos fenólicos como los flavonoides y los ácidos fenólicos (ácido siríngico, cafeico, ferúlico, gálico) son los principales componentes de las hojas de la ortiga. Estas sustancias son conocidas por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antivirales (Ćetković et al., 2007). Además, la ortiga tiene en su composición clorofilas, carotenoides y ácidos grasos. La clorofila y los carotenoides desempeñan un papel de pigmentos captadores de luz en la ortiga. Concretamente, los carotenoides antioxidantes naturales. A su vez, las ortigas también contienen ácidos grasos, siendo los ácidos grasos insaturados los más abundantes. Dentro de este grupo, el ácido α -linolénico, el ácido palmítico y el ácido *cis*-9, 12-linolénico son los ácidos grasos más comunes. Los ácidos grasos ω -3 y ω -6 se encuentran en proporciones significativas y desempeñan funciones antiinflamatorias, vasodilatadoras, antitrombóticas e hipolipidémicas (Simopoulos, 2003). En cuanto a su aplicación como agente activo en el envasado alimentario, el extracto de *U. dioica* no ha sido estudiado exhaustivamente hasta la fecha. Únicamente se aplicó el extracto vegetal en forma de nanoliposomas a películas de quitosano, y se estudió sus características fisicoquímicas, antimicrobianas y antioxidantes (Almasi, Zandi, Beigzadeh, Haghju, & Mehrnow, 2016; Haghju, Beigzadeh, Almasi, & Hamishehkar, 2016). Sin embargo, no existe ningún estudio publicado de películas de quitosano con el extracto de ortiga añadido aplicado al envasado de alimentos.

1.7.2 Extracto de *Saccharina latissima*

Los polisacáridos derivados de algas constituyen una fuente renovable, abundante, biodegradable y biocompatible para la producción de biopolímeros. Se utilizan ampliamente en la industria alimentaria como espesantes, gelificantes o emulsionantes, pero también como parte del material de envasado en el caso de películas activas e inteligentes (Ścieszka & Klewicka, 2019). La especie de alga *Saccharina latissima*, también conocida como kelp o kombu real, es un alga parda característica del Atlántico Norte que se ha cultivado con éxito en acuicultura terrestre y en aguas abiertas, tanto en monocultivo como en acuicultura multitrófica integrada (Azevedo, Marinho, Silva, & Sousa-Pinto, 2016). De hecho, es la especie más cultivada en términos de volumen y número de empresas en Europa (Araújo et al., 2021).

S. latissima se usa en aplicaciones alimentarias debido a su interesante perfil lipídico y su composición nutricional y se considera una fuente prometedora de ingredientes alimentarios funcionales (Rey et al., 2019). Este alga tiene la fucoxantina como carotenoide principal, además de presentar un contenido considerable de polifenoles totales (Rodríguez-Bernaldo de Quirós, Lage-Yusty, & López-Hernández, 2010). La fucoxantina desempeña un papel captador de la luz, aunque también tiene función fotoprotectora en las algas (Fariman, Shastan, & Zahedi, 2016). De hecho, este carotenoide liposoluble tiene un alto interés comercial por sus efectos bioactivos como protección frente a los rayos UV-B, además de poseer una gran capacidad antioxidante (Holdt & Kraan, 2011). No obstante, se ha observado que la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, las precipitaciones, la salinidad y los niveles de radiación afectan a la composición del alga (Fariman et al., 2016).

Como ya se ha comentado, las algas presentan compuestos bioactivos interesantes que pueden extraerse con diversos disolventes e introducirse en la solución filmógena para obtener materiales de envasado activos. Diversas especies de algas se han utilizada como componente activo en películas de quitosano. Se evaluaron películas de quitosano con extractos de *Himanthalia elongata* y *Palmaria palmata* como envoltura de hamburguesas de pescado, observándose una reducción de la oxidación y una mejora del deterioro microbiano (Albertos, Martín-Diana, Burón, & Rico, 2019). También se desarrollaron películas compuestas con almidón y quitosano donde se añadieron micropartículas de *Undaria pinnatifida* obteniéndose una mejora mecánica de la película (Merino & Alvarez, 2020). Estas películas activas también se aplicaron en alimentos, como fue el caso de las películas de proteína de suero y quitosano

adicionadas con extracto de *Fucus vesiculosus* empleadas para envolver pechuga de pollo. La película fue capaz de prolongar la vida útil del alimento durante 25 días (Andrade et al., 2021). Sin embargo, y a pesar de las múltiples cualidades de las algas, no hay publicaciones previas sobre el enriquecimiento de películas de quitosano con extracto de *S. latissima* para el desarrollo de envases alimentarios activos.

1.7.3 Aceite esencial de *Santalum album*

El sándalo es un árbol perteneciente a la familia Santalaceae que se encuentra en las regiones montañosas tropicales del sur de la India, Sri Lanka y múltiples islas del archipiélago indonesio. El sándalo es considerado un árbol milenario y tiene diversos usos en los mercados modernos y tradicionales (Subasinghe, Gamage, & Hettiarachchi, 2013). El valor del árbol de sándalo depende de tres características principales: el volumen del duramen, su concentración, y la calidad del aceite obtenido del duramen (Brand, Fox, Pronk, & Cornwell, 2007). Se sabe que el duramen es la parte del árbol que tiene la mayor proporción de alcoholes sesquiterpénicos santaloles, además de presentar la mayor concentración de aceite (Baldovini, Delasalle, & Joulain, 2011).

El aceite esencial de sándalo es un líquido de color amarillo pálido a amarillo, con un olor característico suave y amaderado con un sabor ligeramente amargo y resinoso (Burdock & Carabin, 2008). Debido a sus propiedades aromáticas y fijadoras, el aceite de sándalo se utiliza principalmente en perfumería. Sin embargo, también se aplica como ingrediente aromatizante en la industria alimentaria, además de en ámbitos medicinales y ceremoniales (Baldovini et al., 2011). Los dos componentes principales de este aceite esencial son los alcoholes sesquiterpénicos: *cis*- α -santalol (7 - 60 %) y *cis*- β -santalol (7 - 33 %). El olor distintivo del sándalo se debe a estos alcoholes. Sin embargo, es importante tener en cuenta constituyentes menores como los hidrocarburos sesquiterpénicos (6 %), ésteres (2 - 4 %), fenoles, lactonas, terpenos, compuestos volátiles y sustancias aromáticas (Subasinghe et al., 2013). Se han estudiado ampliamente las propiedades que el aceite de sándalo puede aportar, entre ellas:

capacidad antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y anticancerígena (Moy & Levenson, 2017).

En Estados Unidos, el aceite esencial de sándalo ha sido aprobado y reconocido como seguro para su uso en alimentos como componente aromatizante por la Asociación de Fabricantes de Sabores y Extractos (FEMA) (<https://www.femaflavor.org/> - Visitada el 27 de septiembre 2023). De la misma manera, el aceite figura en el Codex de Productos Químicos Alimentarios de la FDA como ingrediente aromatizante natural (<https://precision.fda.gov/uniisearch/srs/unii/x7x01wmq5f> - Visitada el 27 de septiembre de 2023). A su vez, existe una especificación internacional para el aceite de sándalo (ISO 3518:2002) (<https://www.iso.org/standard/32037.html> - Visitada el 27 de septiembre de 2023).

En cuanto a su aplicación en la industria alimentaria, y a pesar del gran potencial que presenta el aceite de sándalo, no se han realizado investigaciones sobre su aplicación en películas de quitosano.

1.8 APLICACIONES DE ENVASES ACTIVOS A BASE DE QUITOSANO

1.8.1 Productos lácteos

El contenido de grasa afecta a la calidad a lo largo del almacenamiento de los productos lácteos frescos. La grasa juega un papel importante en el desarrollo del sabor, aroma y textura durante el almacenamiento, lo que puede alterar la vida útil y aceptabilidad del producto final. El queso es un ejemplo de producto lácteo que podría someterse a un envasado con películas activas. El deterioro de este alimento puede producirse durante el procesado y la maduración, así como por el crecimiento de especies termodúricas que son capaces de sobrevivir a los tratamientos térmicos (Lu & Wang, 2017).

Otro producto lácteo usado en el estudio del envasado activo es la mantequilla. Como cualquier otro alimento procesado, la calidad de la mantequilla se ve afectada por la materia

prima, la forma en que se prepara, los tratamientos térmicos y las condiciones de almacenamiento (Özer, 2014). Además, diversos tipos de bacterias y hongos crecen en este alimento, los cuales representan un peligro significativo para el mantenimiento de la vida útil. Las bacterias como *Pseudomonas* spp y *Flavobacterium* spp., suelen proliferar en la superficie de la mantequilla dando lugar a un enranciamiento del sabor. A su vez, ciertos hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* también se relacionan con el deterioro de la mantequilla (Jay, Loessner, & Golden, 2000). El crecimiento de estos hongos puede causar decoloración, descomponer grasas y producir sabores desagradables (Lu & Wang, 2017). Por ello, el envasado activo aplicado en productos lácteos está recibiendo cada vez más interés e investigación.

Se estudió la adición de sorbato potásico y vainillina a la película de quitosano que envolvía pastel de mantequilla. Mientras que en el pastel envuelto solo con película de quitosano el moho crecía a los 4 días, los agentes activos provocaron que no se observara moho tras 8 días de almacenamiento (Sangsuwan, Rattanapanone, & Pongsirikul, 2015).

Respecto al envasado activo del queso, películas de quitosano adicionadas con aceite esencial de orégano mostraron capacidad de evitar la pérdida de peso de quesos semiduros durante su maduración, además de inhibir el crecimiento de hongos (Cano et al., 2017). El queso en crema también se estudió aplicando una película a base de quitosano/extracto de cáscara de granada/esencia de *Melissa officinalis*. La adición de estos agentes activos aumentó la capacidad antioxidante de las películas, además de tener un efecto antimicrobiano sobre *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Pirsa, Karimi Sani, Pirouzifard, & Erfani, 2020). Igualmente, el crecimiento de bacterias y hongos se retrasó en el queso Mongol cuando se le aplicaba como envase activo una película a base de quitosano/almidón/aceite de perilla (Mei, Yuan, Wu, & Li, 2013).

1.8.2 Productos cárnicos

Los productos cárnicos son aquellos resultantes del procesamiento de la carne, comestibles y por tanto aptos para el consumo humano. La carne conservada bajo condiciones de refrigeración y en estado fresco, que es el formato más popular, tiene una vida útil limitada (5-

6 días). Debido a cambios autolíticos post mortem relacionados con la transformación del músculo, es común que se produzca fenómenos como la oxidación de lípidos y proteínas, crecimiento de microorganismos y la presencia de patógenos. Estos fenómenos hacen que la carne sea extremadamente perecible, lo que reduce su calidad organoléptica y vida útil (Valenzuela & Pérez, 2016). Actualmente nos encontramos en un ambiente de progreso tecnológico y evolución de estilo de vida de los consumidores que hace necesario desarrollar nuevas estrategias para prevenir el deterioro de la carne. Aunque se han estudiado diversas metodologías de conservación, también se ha conseguido la prolongación de la vida útil de productos cárnicos a través del envasado activo con películas de quitosano. El efecto antimicrobiano se demostró en películas de quitosano enriquecidas con aceites esenciales de albahaca y tomillo que estaban en contacto con productos cárnicos derivados del cerdo (Jeannine Bonilla, Vargas, Atarés, & Chiralt, 2014). La reducción de la población de levaduras presente en lonchas de jamón cocido fue posible con la aplicación de películas de quitosano enriquecidas con aceite esencial de tomillo (Quesada, Sendra, Navarro, & Sayas-Barberá, 2016). Por otro lado, el recuento microbiano de microorganismos psicotróficos fueron significativamente inferiores en el pollo que estaba envasado con películas de quitosano incorporado con extractos de cáscara de cacahuete y residuos derivados de pimienta rosa (Serrano-León et al., 2018). Asimismo, surgió un efecto antimicrobiano y antioxidante en hamburguesas de pollo cuando el aceite esencial de anís era añadido a la película (Mahdavi et al., 2018). También la oxidación de grasas se redujo en hamburguesas de carne de cerdo cuando éstas estaban envasadas con películas de quitosano enriquecidas con polifenoles del té. Además se mantuvo la calidad sensorial a lo largo del tiempo de almacenamiento del producto (Qin et al., 2013).

1.8.3 Productos pesqueros

Debido al aumento de la población y a las mejoras en los canales de distribución de alimentos, la producción y el consumo mundial de pescado ha aumentado a gran velocidad. Se trata de un alimento que presenta un perfil nutricional muy interesante, además de la presencia de ácidos grasos ω -3 en su composición. Sin embargo, el pescado es un producto altamente perecedero y su deterioro comienza rápidamente tras su captura. Existen dos mecanismos principales de deterioro: la autólisis, que es responsable de la degradación de diversos

compuestos, como son las proteínas, grasas y compuestos nitrogenados. Mientras que el otro mecanismo es el deterioro microbiológico, el cual produce una amplia gama de compuestos químicos como son las aminas biógenas y los aldehídos. Estos compuestos son responsables de la pérdida de calidad de los productos pesqueros, los cuales han generado una mayor preocupación sobre la calidad del producto (Baliño Zuazo, 2016).

Como ejemplo se puede comentar que se estudió la aplicación de películas de quitosano enriquecidas con aceite esencial de tomillo (*Origanum minutiflorum*) en la trucha arco iris ahumada, y se observó que no se excedió el límite de deterioro hasta el día 63 del estudio (Doğan & İzci, 2017). A su vez, filetes de bonito que estaban envueltos con películas de quitosano presentaron un crecimiento ralentizado de bacterias aerobias, por lo que con este hecho se reafirma su fuerte efecto antimicrobiano (Alak, Aras Hisar, Hisar, Kaban, & Kaya, 2009). La inclusión de lisozima en la matriz del quitosano también permitió la creación de películas con una alta eficacia de inhibición contra *Staphylococcus aureus* y la oxidación lipídica en la corvina amarilla grande (Wu et al., 2018). Por otro lado, la vida útil de la gamba rosada se vio aumentada a 15 días al ponerla en contacto con películas de quitosano enriquecidas con aceite esencial de piel de naranja (Alparslan & Baygar, 2017). La película de quitosano también se aplicó como capa interna del material de envasado de filetes frescos de merluza y lenguado. En este caso, los filetes presentaron una reducción de población microbiana en comparación al control, lo que confirma que este polisacárido es una alternativa prometedora para mejorar la calidad de alimentos del mar (Fernández-Saiz, Sánchez, Soler, Lagaron, & Ocio, 2013). En otro estudio, el residuo derivado de la pimienta rosa fue adicionado a la película de quitosano para su posterior aplicación en filetes de salmón fresco. En tal caso, los análisis presentaron una reducción significativa de los valores de oxidación lipídica del pescado, además de una reducción del recuento bacteriano en comparación al grupo control. Al mismo tiempo, los filetes presentaron resultados satisfactorios relacionados con el olor desagradable y el aspecto general (Merlo et al., 2019).

1.8.4 Productos vegetales

Las frutas y verduras son alimentos limitados por su carácter perecedero. Los principales sistemas de deterioro que presentan este grupo de alimentos son cambios en la textura

relacionados con la pérdida de agua, en el color debido al oscurecimiento enzimático, y una pérdida de nutrientes y rápido desarrollo microbiano (Salinas, González, & Ulín, 2007). Aunque existen diversos estudios, la aplicación de envase activo a base de quitosano en frutas y verduras es un campo que requiere mayor investigación.

Se ha estudiado la aplicación de películas de quitosano enriquecidas con dióxido de silicio como recubrimiento para arándanos frescos, observándose un efecto antimicrobiano sobre las poblaciones de microorganismos aerobios mesófilos, levaduras y mohos (Li et al., 2021). La película de quitosano enriquecida con extracto de cáscara de plátano aplicada en muestras de manzanas mejoró la calidad postcosecha en comparación a la película pura de quitosano (Zhang et al., 2020). Asimismo, la vida útil de las fresas frescas aumentó en comparación a la fruta sin recubrimiento debido al efecto antimicrobiano ejercido por las películas de quitosano con extracto de granada (Duran et al., 2016). Por otro lado, películas enriquecidas con melatonina mantuvieron la calidad, la firmeza, y la degradación del color de pepinos, brócolis y melones frescos cortados a lo largo de 5 días (Zhao et al., 2020).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Uno de los principales problemas medioambientales es la fabricación masiva de materiales derivados del petróleo. Su producción y uso incontrolado conlleva un impacto negativo en el medio ambiente, debido a que son materiales difícilmente reciclables, no compostables y no biodegradables.

Como solución a este problema, el uso de polímeros naturales biodegradables es una alternativa que ejerce un menor impacto medioambiental. Asimismo, la aplicación de biopolímeros podría mejorar las propiedades del envasado, a la vez que se disminuyen los costes de producción. Se ha demostrado que el quitosano, un residuo de la industria alimentaria, posee extraordinarias propiedades filmogénicas, lo que lo hace ideal para su aplicación como posible envase alimentario. A su vez, se ha demostrado que las propiedades de los biopolímeros, tales como las características mecánicas o funcionales, podrían verse mejoradas con la incorporación de compuestos activos naturales.

Los extractos naturales de plantas y algas son una gran fuente de antioxidantes y compuestos activos como son los polifenoles, flavonoides, entre otros. Además, mucho de estos extractos se pueden obtener de residuos o biomasa con bajo interés comercial, a pesar de poseer un valioso perfil antioxidante. Otro punto interesante es el uso de plantas autóctonas que se consideran invasivas, como es el caso de la ortiga, ya que esto nos permite tener un acceso más fácil a estos compuestos de interés.

Por lo tanto, la hipótesis de esta tesis doctoral es que mediante la combinación de quitosano con estos extractos naturales se podría obtener películas activas con una potente capacidad

antioxidante. Además, las interacciones entre quitosano – extracto puede conducir a una mejora de las propiedades fisicoquímicas de la matriz polimérica. Estas películas podrían aplicarse en alimentos con elevado contenido lipídico como envases activos para retardar las oxidaciones lipídicas de estos productos, prolongando así su vida útil.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

Objetivo general

Desarrollar y caracterizar películas respetuosas con el medio ambiente a base de quitosano enriquecidas con extractos naturales y evaluar su aplicación como envases activos con capacidad antioxidante.

Objetivos específicos

1. Evaluar diferentes técnicas y disolventes para la optimización de la obtención de extractos antioxidantes de ortiga *Urtica dioica*.

Este objetivo se desenvuelve en el artículo I publicada en la revista *Molecules*.

2. Desarrollar películas activas a base de quitosano enriquecidas con extracto de ortiga *Urtica dioica* y su aplicación como separador de lonchas de queso tipo Havarti, incluyendo:

a. Caracterización y análisis del efecto del extracto de ortiga en la microestructura y las propiedades mecánicas, de permeabilidad al vapor de agua, de solubilidad, de humedad en equilibrio, de retención de agua, térmicas, ópticas y de barrera a la radiación UV de la película de quitosano, así como su capacidad antioxidante.

b. Evaluación de la película activa desarrollada como separador de lonchas de queso tipo Havarti y su aplicación para retardar la oxidación lipídica del queso en lonchas.

Este objetivo se desenvuelve en los artículos II y III publicados en las revistas *International Journal of Biological Macromolecules* y *LWT*.

3. Desarrollar películas activas a base de quitosano enriquecidas con extracto de alga kelp de azúcar *Saccharina latissima*, incluyendo:

- a. Caracterización y análisis del efecto del extracto del alga kelp de azúcar *Saccharina latissima* en microestructura y las propiedades mecánicas, de permeabilidad al vapor de agua, de solubilidad, de humedad en equilibrio, de retención de agua, térmicas, ópticas y de barrera a la radiación UV de la película de quitosano, así como su capacidad antioxidante.
- b. Evaluación de la película activa desarrollada como separador de lonchas de queso tipo Havarti y su aplicación para retardar la oxidación lipídica del queso en lonchas

Estos objetivos se desenvuelven en el artículo IV, publicado en la revista *Food Hydrocolloids*.

4. Desarrollar películas activas a base de quitosano enriquecidas con aceite esencial de sándalo *Santalum album*, incluyendo:

- a. Caracterización y análisis de efecto del aceite esencial de sándalo *Santalum album* en la microestructura y las propiedades mecánicas, de resistencia al sellado, de permeabilidad al vapor de agua, de humedad en equilibrio, de solubilidad, térmicas, ópticas y de barrera frente a la radiación UV de la película de quitosano.
- b. Evaluación de la película activa desarrollada como envoltorio de mantequilla y su aplicación para retardar la oxidación lipídica del producto.

Este objetivo se desenvuelve en el artículo V publicado en la revista *Food Packaging and Shelf Life*.

3. HERRAMIENTAS METODOLÓGICAS

3.1 MATERIALES

El quitosano (CAS 9012-76-4) utilizado en esta tesis es de la marca Acros organics (Geel, Bélgica) con un peso molecular de 100000-300000. El ácido DL-málico extra puro (CAS 6915-15-7) y el ácido acético (CAS 64-19-7) que se usaron para diluir el quitosano, junto con el glicerol (CAS 56-81-5) fueron suministrados por Scharlau Microbiology (Barcelona, España). Para facilitar la homogenización de la mezcla se utilizó lecitina de soja suministrada por Ynsadiet (Madrid, España). El aceite esencial puro de sándalo fue suministrado por Pranarôm (Ghislenghien, Bélgica). Las hojas de *Urtica dioica* fueron recolectadas en Lluarca (Asturias, España) en el intervalo de tiempo de enero a febrero de 2022. Mientras que el alga *Saccharina latissima* deshidratada se adquirió a KosterAlg (Gotemburgo, Suecia). Las películas de poliamida/polietileno utilizadas como control en los experimentos se adquirieron a Plastinal S.L. (La Rioja, España).

En cuanto a los análisis realizados, para el estudio de propiedades antioxidantes de las películas se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfowolframato), suministrado por Panreac (Barcelona, España). Mientras que los reactivos 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio) ABTS[•] se obtuvieron a través de Alfa Aesar (Haverhill, MA, EE. UU.). El metanol, etanol y carbonato sódico usados para este análisis, fueron adquiridos a Scharlau Microbiology (Barcelona, España). En el análisis de la oxidación lipídica del queso, el reactivo 4,6-Dihidroxi-2-mercaptopirimidina (TBA) fue suministrada por Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.), mientras que el ácido tricloroacético (TCA) se obtuvo a través de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). En el análisis de oxidación lipídica de las muestras de mantequilla, se usaron ácido acético glacial y butilhidroxitolueno (BHT), los cuales fueron suministrados

por Scharlau Microbiology (Barcelona, España). La mantequilla fue adquirida a Mantequería Arias (Madrid, España) y queso tipo Havarti a IFA RETAIL SA (Madrid, España).

3.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ANTIOXIDANTES

3.2.1 Extracto de *Urtica dioica* (NE)

La ortiga *Urtica dioica* se recolectó en Lueca (Asturias, España) en el intervalo de tiempo de enero a febrero de 2022. Una vez en el laboratorio, la planta se limpió y deshojó para seleccionar aquellas hojas sanas y con un tamaño similar, eliminando sus tallos y peciolo. Las hojas se secaron en un deshidratador modelo 3500 (Excalibur® Food, Sacramento, CA, EE. UU.) a 45 °C durante 24 h para reducir el contenido de agua. A continuación, las hojas se trituraron y molieron hasta convertirlas en polvo con la ayuda de un molinillo eléctrico. El polvo de ortiga se almacenó en frascos herméticos a temperatura ambiente hasta su utilización.

Se evaluaron tres métodos de extracción (extracción asistida por ultrasonidos, extracción sin agitación y extracción por agitación) y tres disolventes (agua, metanol y etanol) para obtener mezclas con la mayor cantidad de compuestos antioxidantes. En todos los casos, se pesó 1 g de polvo seco de ortiga, se transfirió a un tubo plástico con tapón de rosca y se diluyó con 15 ml de disolvente. La extracción asistida por ultrasonidos se realizó a 65 °C en un baño de ultrasonidos. En el caso de la extracción sin agitación, los tubos se sumergieron en un baño caliente a 65 °C. Mientras que la extracción con agitación se realizó en un agitador orbital a 65 °C y 150 rpm.

La extracción se llevó a cabo durante un total de 4 h, y la toma de muestras para observar la capacidad antioxidante del extracto se realizó a cada hora. La temperatura de extracción se determinó en función de resultados de estudios previos (Bucić-Kojić, Planinić, Tomas, Jakobek, & Šeruga, 2009; Spigno, Tramelli, & De Faveri, 2007) en los que se encontró un mayor rendimiento de extracción de antioxidantes a temperaturas más altas. A continuación, cada extracto se filtró con papel de filtro Whatman nº 1 en un embudo para eliminar los residuos de

ortiga presentes en el líquido. El extracto se almacenó en refrigeración durante 24 h antes de filtrarse nuevamente. Finalmente, se hizo una dilución 1/100, y estos extractos diluidos se almacenaron en oscuridad y refrigeración (5 °C) hasta su análisis.

La optimización del método de extracción se realizó con el programa Design Expert® (Stat-Ease, Minneapolis, MN, EE.UU.). Para ello se establecieron una serie de criterios de prioridad, basados en una escala de 1 (prioridad más baja) a 5 (prioridad más alta), en la que a cada parámetro y respuesta se le asignaron los siguientes valores: tiempo = 3, método = 3, disolvente = 3, ABTS*(%) = 3, DPPH (%) = 3 y TPC = 5.

3.2.1.1. Análisis de la capacidad antioxidante del extracto

La actividad antioxidante se puede definir como la capacidad de una sustancia de bloquear o retrasar la oxidación de otras moléculas (Zhang et al., 2021). Los ensayos llevados a cabo para analizar la capacidad antioxidante de los extractos fueron la eliminación de radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS*), junto con el contenido fenólico total (TPC).

El ensayo para la determinación de radicales libres DPPH nos permite determinar el grado de extinción del radical DPPH en presencia de un antioxidante durante un tiempo determinado. Como se puede observar en la Figura 7, este ensayo es visual ya que se produce un cambio de color de violeta oscuro a amarillo en función de la capacidad antioxidante que tenga el extracto.



Figura 7. Tras el ensayo, a la izquierda solución de radicales DPPH y a la derecha extracto de ortiga. Foto propia.

Para la realización de este ensayo, se preparó una solución de radicales DPPH 0.5 M. Para conseguirla se añadió 0.0099 g del reactivo DPPH en un matraz de 50 ml de capacidad, y se vertió metanol hasta la marca de aforo. A continuación, se preparó la solución metanol-DPPH. Para ello, en un vaso de precipitados con metanol se adicionó gota a gota la solución radical DPPH 0.5 M elaborada al inicio. Esta solución se midió en un espectrofotómetro V-670 (Jasco Inc, Japón) a una longitud de onda de 515 nm, hasta alcanzar una absorbancia entre 0.9990 – 1.0010. Seguidamente, en unos tubos de ensayo, se vertieron 2 ml de extracto natural y 1.5 ml de la solución radical DPPH. Para la preparación del control, se añadió en un tubo 2 ml de metanol y 1.5 ml de la solución radical DPPH. Los tubos se dejaron reaccionar durante 30 min en oscuridad y alejados de otros productos químicos. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se determinó mediante la siguiente Ecuación:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde A_0 es el valor de la absorbancia de la solución alcohólica del radical DPPH y A se corresponde con el valor medio de la absorbancia de la solución analizada.

El siguiente ensayo fue la determinación de radicales libres ABTS[•]. Este es un método más estable que el anteriormente comentado ya que el color de los extractos no se altera con tanta facilidad. En este caso, y como se observa en la Figura 8, la solución control tiene un color azul y cuanto más se aclare la muestra, significa que esta tiene mayor capacidad antioxidante.

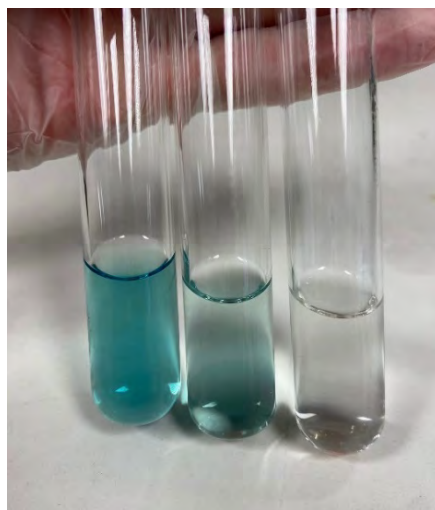


Figura 8. Cambio de color en las muestras durante el ensayo ABTS[•]. Foto propia.

Para su realización, primero se debe preparar la solución catión radical entre 16 y 24 h antes del ensayo planeado. Para ello se disolvió 0.0132 g (2.45 mmol/L) de persulfato de potasio en 20 ml de agua destilada, y por otro lado se disolvió 0.0180 g (7 mmol/L) de ABTS[•] en 5 ml de agua destilada. A continuación, se añadió 5 ml de la solución de persulfato de potasio a 5 ml de solución de ABTS[•]. Esta solución se mantuvo en oscuridad y sin químicos cerca durante 16-24 h. Tras las 16-24 h, se preparó el reactivo con ABTS[•]. Para ello en un vaso de precipitados con etanol (96 %) se vertió gota a gota la solución ABTS[•] hasta conseguir en el espectrofotómetro una absorbancia de la disolución de $0.7 \pm 0,02$ (0,6980 – 0,7020) a 734 nm de longitud de onda.

Una vez preparada la solución reactiva de ABTS[•], se transfirió 0.75 ml del extracto natural y 3 ml de la solución catión radical a un tubo de ensayo. En cuanto a la preparación del control, 0.75 ml de etanol y 3 ml de la solución radical ABTS[•] se vertieron en un tubo de ensayo. Tras agitarlos en vortex, se mantuvieron en oscuridad durante 6 min para que tuviese lugar la reacción, se agitaron nuevamente y se midió la absorbancia a 734 nm. El análisis se realizó por triplicado para cada muestra a analizar. La actividad de eliminación de radicales ABTS[•] se determinó mediante la siguiente Ecuación:

$$ABTS^{\bullet}(\%) = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \cdot 100 \quad (2)$$

Donde A_0 es el valor de la absorbancia de la solución radical ABTS $^{\bullet}$ y A se corresponde con el valor medio de la absorbancia del extracto analizado.

El tercer ensayo, consistió en la determinación del contenido fenólico total por el método Folin-Ciocalteu. Este ensayo se llevó a cabo en un ambiente alcalino donde tenía lugar una reacción de color entre el reactivo Folin-Ciocalteu y los compuestos fenólicos de la muestra. En él, el Mo (VI) acepta un electrón y se reduce a Mo (V), formándose un anión fenólico que reduce al reactivo Folin-Ciocalteu. Por tanto, el mecanismo de reacción se basa en la transferencia de electrones.

Para la realización del ensayo se usó un tubo eppendorf en el cual se añadió 20 μ l de muestra a analizar o de agua en el caso del control, 1.58 ml de agua destilada, 100 μ l de reactivo Folin-Ciocalteu y 300 μ l de carbonato de sodio. El eppendorf se llevó a un baño seco a 40 °C durante 30 min para provocar la reacción. Tras este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de muestra seca. La fórmula utilizada se determinó a partir de la recta de calibrado con ácido gálico:

$$TPC(\text{mg GAE/g muestra seca}) = 1010 \cdot Abs - 85.311 \quad (3)$$

Donde Abs es el valor medio de la absorbancia del extracto analizado.

3.2.2 Extracto de *Saccharina latissima* (SLE)

Para la extracción del alga kelp de azúcar se aplicaron las condiciones optimizadas para la ortiga. Primeramente, las hojas secas de *S. latissima* se molieron con un molinillo eléctrico para

obtener un polvo. Este polvo se almacenó en frascos de plástico herméticos a temperatura ambiente. La extracción se realizó usando como disolvente el agua y el baño de ultrasonidos como método de extracción. Para ello, se añadió 15 ml de agua destilada a 1 g de polvo de algas secas en un tubo con tapón de rosca. El tubo se mantuvo durante 3.15 h en un baño ultrasónico a 65 °C. La solución se filtró a vacío utilizando un papel de filtro Whatman nº 1 para eliminar cualquier presencia de restos sólidos en el extracto. El extracto acuoso se llevó al frigorífico durante 24 h y tras ello se volvió a filtrar a vacío. Finalmente, el líquido se sometió a un proceso de centrifugación (9000 rpm/ 5°C /20 min) por triplicado y se llevó a refrigeración hasta su utilización. Para los análisis pertinentes, se realizó una dilución 1/10 del extracto de alga.

3.2.3 Extracto de *Santalum album* (SEO)

El extracto de aceite esencial de sándalo *Santalum album* se obtuvo de manera comercial.

3.3 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS CON COMPUESTOS ACTIVOS

3.3.1 Película de quitosano enriquecida con extracto de *Urtica dioica*

Las películas de quitosano se fabricaron disolviendo un 2% (p/p) de quitosano en una solución acuosa de ácido acético al 1% (p/v) (Tabla 1). Con la ayuda de un agitador magnético, la solución madre se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Como plastificante, se utilizó glicerol a una concentración de 0, 0.25 y 0.5% (p/v). Consecutivamente, se añadió extracto de *Urtica dioica* a la solución de quitosano hasta una concentración final de extracto en el rango de 0, 12.5 y 25% (v/v). Para una correcta mezcla de los componentes, la solución se sometió a una homogeneización a 15000 rpm durante 2 min en un Ultra-Turrax® (IKA, Staufen, Alemania). Las burbujas obtenidas en la solución filmogénica se eliminaron a través de un baño de ultrasonidos.

Tabla 1. Composición de las películas de quitosano y extracto de *Urtica dioica*. Ch es quitosano; Gly es glicerol; NE es extracto de ortiga. El número en la muestra de película muestra el % de ese compuesto.

Muestra de película	Glicerol % (p/v)	NE % (v/v)
Ch_Gly0	0	0
Ch_Gly0_NE12.5	0	12.5
Ch_Gly0_NE25	0	25
Ch_Gly0.25	0.25	0
Ch_Gly0.25_NE12.5	0.25	12.5
Ch_Gly0.25_NE25	0.25	25
Ch_Gly0.5	0.5	0
Ch_Gly0.5_NE12.5	0.5	12.5
Ch_Gly0.5_NE25	0.5	25

En una placa de Petri, se vertieron 40 mL de la solución filmogénica resultante. Tras 48 h la solución se había secado y ya era posible despegarla de la placa, obteniéndose la película esperada. En función del ensayo a realizar, las películas se cortaron a un tamaño determinado y se acondicionaron durante 5 días. El espesor (mm) se midió en cinco puntos aleatorios con un medidor de espesor ET115S (Etari GmbH, Stuttgart, Alemania).

3.3.2 Película de quitosano enriquecida con extracto de *Saccharina latissima*

Las películas de quitosano se obtuvieron disolviendo un 2 % (p/p) de quitosano con un 1 % (p/v) de ácido acético en una solución acuosa (Tabla 2). La solución madre se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche bajo agitación magnética. Al día siguiente se añadió glicerol como plastificante en una concentración al 0.1 % (p/v). Esta concentración se seleccionó en base a la optimización del proceso de extracción anteriormente comentado. El extracto de alga previamente preparado se añadió gradualmente a la solución de quitosano en un rango de concentración de 0, 10 y 20% (v/v). Para que se produzca una correcta homogenización se usó el Ultra-Turrax® a 15000 rpm durante 2 min. De este modo la concentración final de quitosano en la solución filmogénica fue del 1 % (p/p). Para eliminar las posibles burbujas presentes en la solución se utilizó un baño ultrasónico durante 15 min.

Como anteriormente, la solución filmogénica obtenida se vertió (40 ml) en una placa Petri. Después de 48 h a temperatura ambiente, se despegaron las películas de las placas. Las películas se cortaron a un tamaño preciso y se sometieron a las diferentes pruebas.

Tabla 2. Composición de las películas de quitosano y extracto de *Saccharina latissima*. Ch es quitosano; SLE es extracto de alga. El número en la muestra de película muestra el % de ese compuesto.

Muestra de película	Glicerol % (p/v)	SLE % (v/v)
Ch	0.1	0
Ch_SLE10	0.1	10
Ch_SLE20	0.1	20

3.3.3 Película de quitosano enriquecida con aceite esencial de *Santalum album*

Las películas de quitosano se elaboraron disolviendo un 1% (p/p) de quitosano en una solución acuosa de ácido málico al 2% (p/v) (Tabla 3). La concentración de ácido se ajustó hasta que el quitosano se disolvió por completo, obteniéndose una solución totalmente clara. Esta solución madre se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente con la ayuda de un agitador magnético. La lecitina de soja (0.1% p/v) fue añadida a la solución como emulsionante natural. Esta solución de quitosano y lecitina de soja se homogeneizó a 15000 rpm durante 5 min con un homogenizador Ultra-Turrax®. Debido a esta agitación se generó una espuma que se eliminó con la ayuda de un baño de ultrasonidos durante 15 min. Tras este tiempo, se añadió el aceite esencial de sándalo hasta alcanzar una concentración final del 0 - 2% (v/v) y se homogeneizó de nuevo a 15000 rpm durante 5 min. Se repitió el proceso de desgasificación en un baño de ultrasonidos durante 5 min.

De la solución filmogénica resultante, se vertieron 40 ml en una placa de Petri y se secaron durante 48 h a temperatura ambiente. Una vez secas, las películas se cortaron a un tamaño específico y se almacenaron en condiciones determinadas en función de la prueba a realizar.

Tabla 3. Composición de las películas de quitosano y aceite esencial de Santalum album. Chitosan es quitosano; SEO es aceite esencial de sándalo. El número en la muestra de película muestra el % de ese compuesto.

Muestra de película	Lecitina % (p/v)	SEO % (v/v)
SEO-Chitosan_0	0	0
SEO-Chitosan_0.5	0.1	0.5
SEO-Chitosan_1	0.1	1.0
SEO-Chitosan_2	0.1	2.0

3.4 ANÁLISIS DE LAS PELÍCULAS

3.4.1 Capacidad antioxidante de las películas

Los ensayos llevados a cabo para analizar la capacidad antioxidante de los extractos puros fueron los mismos que los realizados en los extractos obtenidos a partir de las películas. Es decir, la eliminación de radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS*), y el contenido fenólico total.

En primer lugar, se preparó extractos metanólicos de las películas a analizar. Para ello, se añadieron 24 ml de metanol a 1 g de muestra de película cortada previamente en trozos pequeños. Se mezclaron con la ayuda de un mortero durante 3 min, con una fuerza constante y aplicando rozamiento entre muestra y mortero para extraer los componentes antioxidantes. Se vertió la muestra líquida juntos con los restos sólidos de película en un tarro de cristal con tapa de rosca, y se dejó durante 24 h en oscuridad y temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla se filtró a través de un papel de filtro y con ayuda de un embudo, obteniéndose así los extractos puros de la película. A continuación, se llevaron a cabo los análisis antioxidantes como previamente se han comentado.

La medición de las propiedades mecánicas permite predecir el comportamiento de la película bajo diferentes condiciones de procesamiento y manejo de alimentos. Las propiedades mecánicas más analizadas y recogidas en la bibliografía son la resistencia a la tracción (TS, MPa), el porcentaje de alargamiento a la rotura (%E, %) y el módulo de Young (YM, MPa). Se debe tener en cuenta las características del quitosano (grado de desacetilación y peso molecular), el método de producción de la película, la concentración de quitosano, las condiciones en el momento de las mediciones y a lo largo de la prueba, así como el disolvente empleado ya que estos son factores que afectan a las propiedades mecánicas (Cazón & Vázquez, 2019).

a) Ensayos de tracción

La tensión máxima que puede soportar la película antes de romperse se conoce como resistencia a la tracción, la mayor elongación de la película antes de la rotura se expresa como porcentaje de elongación a la rotura y el módulo de Young relaciona el esfuerzo con la deformación unitaria que experimenta la película al ser sometido a cargas externas (Cazón, Velazquez, Ramírez, & Vázquez, 2017; Rayas, Rodríguez-Vera, & Martínez, 2003).

Los análisis se realizaron siguiendo el método estándar ASTM D882 para plásticos en forma de láminas y películas finas de menos de 1.0 mm de espesor (<https://www.astm.org/d0882-18.html>). Para analizar estas propiedades se usó un texturómetro (TA-XT plus, Stable Micro System, Reino Unido). Previamente, las películas precortadas (15 x 100 mm) y con espesores conocidos se acondicionaron durante 5 días a temperatura ambiente y a una humedad relativa del 57%. Las muestras de películas se colocaron entre las mordazas del texturómetro a una distancia inicial de 40 mm y una velocidad de test de 1 mm/s. Una vez se inició el análisis, el brazo superior del texturómetro se desplazó hacia arriba en dirección vertical a una velocidad constante hasta que se producía la rotura de la película, tal y como se observa en la Figura 9.

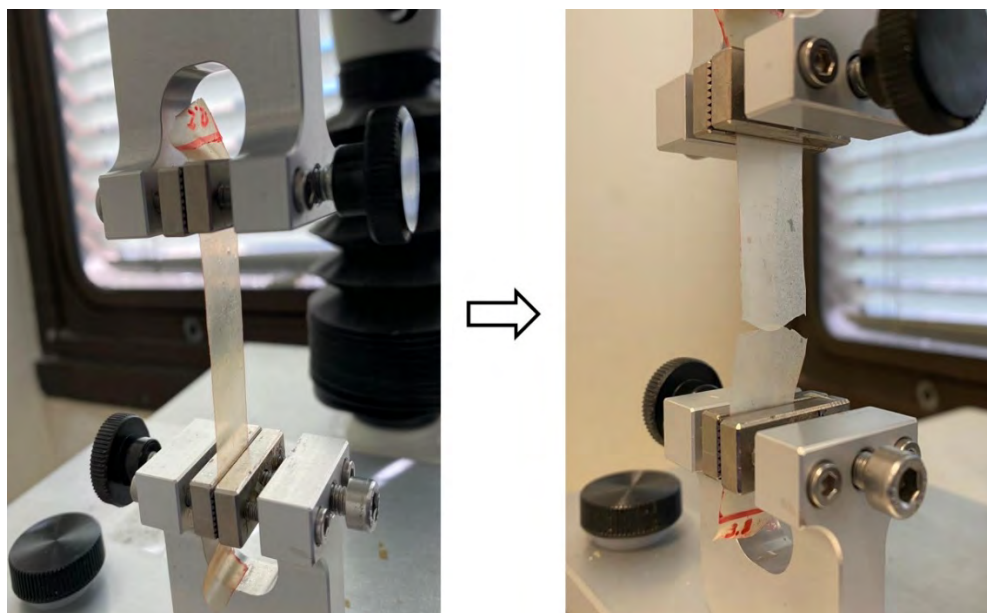


Figura 9. Ensayo de tracción en las películas a analizar. Foto propia.

El texturómetro mide la fuerza aplicada para mantener constante la velocidad y la distancia recorrida hasta la rotura de la película. El software del texturómetro registra los datos obtenidos y se consigue un gráfico donde se representa la tensión-deformación. Los valores de la tensión de tracción, el porcentaje de alargamiento a la rotura y el módulo de Young se determinan a partir de estos datos obtenidos.

b) Ensayos de punción

Los ensayos de punción determinan la resistencia de la película a la penetración de una sonda cilíndrica a velocidad constante (resistencia a la rotura o fuerza de punción; BS, N/mm), así como la distancia en el punto de rotura (distancia al estallido o deformación de punción; DB, mm) (Spotti, Cecchini, Spotti, & Carrara, 2016). Con esta prueba se puede predecir la resistencia a la rotura de una película que está en contacto con protuberancias presentes en bandejas, cajas o productos alimenticios.

En este análisis se utiliza nuevamente un texturómetro, pero con un soporte de película HDP/FSR (Stable Micro System, UK) como se puede observar en la figura 10. Las muestras de películas se cortaron en forma de cuadrado (30 x 30 mm) y se acondicionaron a una humedad relativa del 57% durante al menos 5 días antes del análisis. Las películas se fijan en el soporte

y son sometidas a perforación por una sonda cilíndrica (diámetro = 3 mm), moviéndose a una velocidad constante de 1 mm/s hasta la rotura. Los resultados se registraron en el software del texturómetro expresándose como una curva de fuerza (g) frente a deformación (mm).

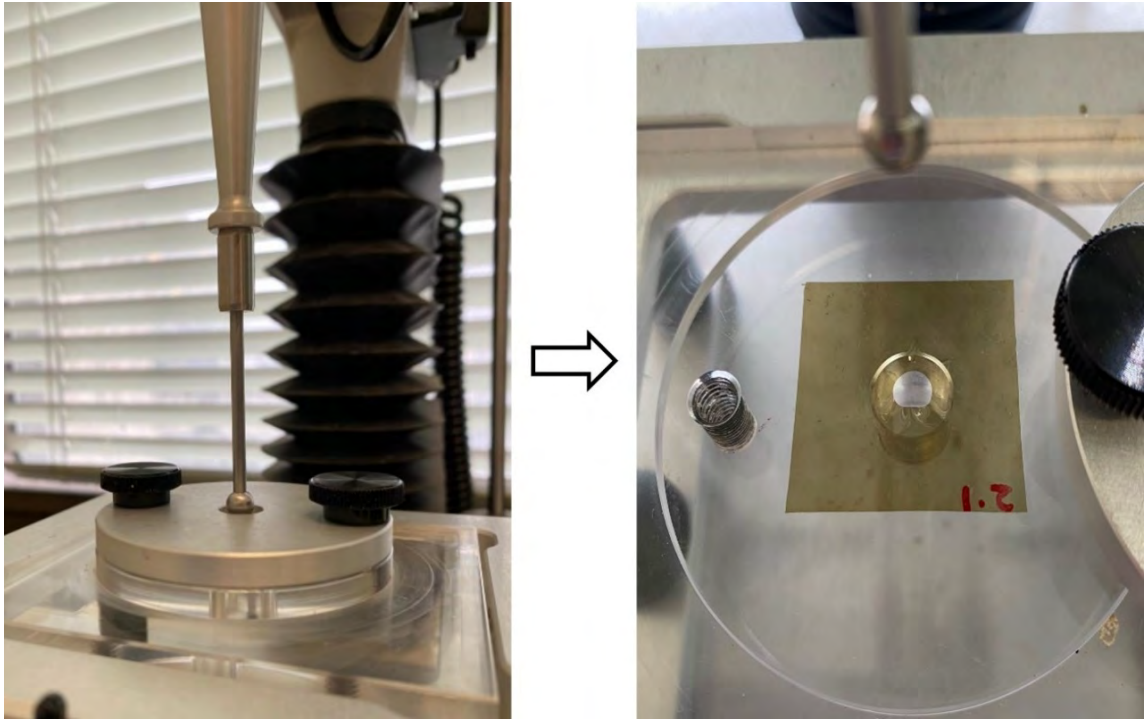


Figura 10. Ensayo de perforación en las películas a analizar. Foto propia.

3.4.3 Sellabilidad

Una correcta sellabilidad por parte de las películas es un requisito necesario si esta se va a utilizar como envase. A partir de este ensayo se calcula la fuerza de sellado que se conoce como la fuerza máxima necesaria para provocar el fallo del sellado y se expresa en N/m

Las muestras de las películas se cortaron en un tamaño determinado (15 x 100 mm) y se colocaron dos láminas juntas para termosellarlas. La resistencia al sellado de las películas se determinó de acuerdo con el método estándar ASTM F88/F88M-21 (https://www.astm.org/f0088_f0088m-21.html) usando un texturómetro. El área termosellada (10 x 10 mm) se mantuvo sellada durante 2.5 s y se consiguió usando una termoselladora al vacío (Modelo PH7 Food Machinery, Madrid, España). Cada cola de la película sellada se

sujetó a las mordazas opuestas y la junta sellada permaneció sin soporte mientras se realizaba la prueba, tal y como se observa en la Figura 11. La distancia establecida entre las mordazas fue de 50 mm, con una velocidad de ensayo de 30 mm/min.

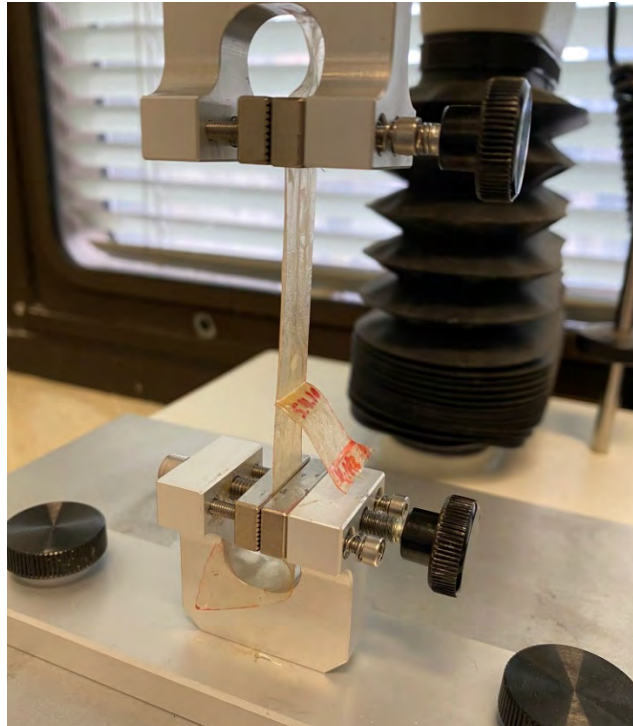


Figura 11. Ensayo de fuerza de sellado en las películas a analizar. Foto propia.

La resistencia del sellado se calculó a través de la siguiente Ecuación (Prateepchanachai, Thakhiew, Devahastin, & Soponronnarit, 2019):

$$\text{Fuerza de sellado (N/m)} = \text{fuerza máxima} / \text{anchura de la película} \quad (4)$$

Donde fuerza máxima se refiere a la fuerza máxima necesaria para despegar el sellado creado entre las dos películas.

3.4.4 Permeabilidad al vapor de agua

Las propiedades de barrera desempeñan un papel fundamental en la conservación de los productos alimenticios envasados ya que una de las principales funciones de las películas de

envasado es separar los alimentos de la atmósfera circundante para retardar el deterioro de los alimentos (Flórez et al., 2022a).

Entre las propiedades que abarca este apartado, la más estudiada es la permeabilidad al vapor de agua (WVP). Esto puede deberse a que el mantenimiento de este factor en niveles adecuados permite que los alimentos se mantengan frescos y crujientes, además de prevenir la deshidratación de estos. Asimismo, es una propiedad que es sencilla de medir al no requerir de un equipo específico (Cazón, Morales-Sanchez, Velazquez, & Vázquez, 2022).

La WVP indica la cantidad de agua que atraviesa la película por unidad de superficie y tiempo ($\text{g/m}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa}$), teniendo en cuenta las condiciones de diferencia de presión en las que se realiza el ensayo y el espesor de la película. La permeabilidad al vapor de agua se determinó de acuerdo con el método estándar para la determinación gravimétrica del índice de transmisión de vapor de agua de los materiales ASTM E96 (https://www.astm.org/e0096_e0096m-22ae01.html). El análisis se llevó a cabo a una temperatura de 30 °C y una humedad relativa del 50 %, durante al menos 4 h ya que se consideró un tiempo suficiente para alcanzar un equilibrio dinámico en el flujo de vapor. La prueba se realizó por triplicado.

3.4.5 Contenido de humedad en el equilibrio

A partir del método gravimétrico se midió el contenido de humedad en el equilibrio (%W). Para ello, se cortaron tres muestras de cada película a analizar en forma de cuadrados (3 x 3 cm) y se mantuvieron en desecadores con silica gel durante 5 días. La muestra seca (P_{seco}) se pesó con una precisión de 0.0001 g utilizando una balanza de precisión. A continuación, cada muestra se sumergió en un recipiente hermético con 100 ml de agua destilada y estas se almacenaron a 25 °C durante 24 h hasta que las muestras alcanzasen el equilibrio. El exceso de agua superficial de las muestras húmedas se eliminó usando un papel de filtro. Las muestras húmedas se pesaron ($P_{\text{húmedo}}$) y la retención de agua de cada muestra se calculó a partir de la siguiente Ecuación:



$$\%W (\%) = \frac{P_{\text{húmedo}} - P_{\text{seco}}}{P_{\text{seco}}} \cdot 100 \quad (5)$$

3.4.6 Solubilidad de las películas

A su vez, también se estudió la solubilidad de las películas aplicando nuevamente el método gravimétrico. Para ello, se cortaron porciones de películas (3 x 3 cm) y se secaron en un horno a 105 °C durante 24 h. Al día siguiente, las muestras se pesaron con una precisión de 0.0001 g para obtener el peso seco inicial (P_0). Cada muestra de película se llevó a un recipiente que contenía 100 ml de agua destilada y se mantuvo en agitación continua a 25 °C durante 24 h. Tras ello, la película restante que no fue disuelta se secó a 105 °C durante 24 h en un horno hasta alcanzar un peso constante para determinar el peso seco final (P_f). La solubilidad de la película se calculó usando la siguiente Ecuación:

$$\%S (\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \cdot 100 \quad (6)$$

3.4.7 Propiedades ópticas, transparencia y opacidad

La luz ultravioleta (UV) que es visible en el espectro de 200 a 400 nm, puede perjudicar a los alimentos envasados al generar radicales libres a través de una amplia variedad de reacciones fotoquímicas orgánicas. De ahí la importancia de desarrollar películas biodegradables que tengan unas correctas propiedades de barrera a la luz ultravioleta. Así, la vida útil de los alimentos se verá aumentada, manteniendo una correcta calidad alimentaria y unas adecuadas propiedades organolépticas (Cazón & Vázquez, 2019).

Las propiedades ópticas de las películas se analizaron con la ayuda de un espectrofotómetro midiendo la transmitancia de las muestras en una longitud de onda UV-visible que iba de 190 a 800 nm. El ensayo se realizó por duplicado. La transparencia de la película se calculó a partir del porcentaje de transmitancia a 600 nm usando la siguiente Ecuación:


$$\text{Transparencia} = \frac{(\log \% T_{600})}{x} \quad (7)$$

Donde $\%T_{600}$ es el porcentaje de transmitancia a 600 nm y x es el espesor de la película expresado en milímetros. En cuanto a la opacidad, se calculó aplicando la siguiente Ecuación:

$$\text{Opacidad} = \frac{Abs_{500}}{x} \quad (8)$$

Donde Abs_{500} es la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 500 nm y x es el espesor de la película (mm).

3.4.8 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de las películas es otro punto clave a analizar. El hecho de que las películas puedan someterse, sin alterar su estructura, a procedimientos habituales de la industria alimentaria como es la pasteurización, hacen aún más interesante su uso.

Para analizar las propiedades de estabilidad térmica de las películas se utilizaron equipos de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido TGA/DSC (Mettler Toledo, Suiza). Las muestras de las películas se colocaron en bandejas herméticas de aluminio, y el ensayo se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, de 50 a 400 °C, en una atmósfera de nitrógeno (50 ml/min).

3.4.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para examinar y caracterizar la morfología de las películas a estudiar se utilizó un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6360LV, Jeol Ltd, Tokio, Japón) que funcionaba a un voltaje de aceleración de 20 kV para fotografiar las muestras secas y recubiertas de oro. Para evitar que se moviesen, las muestras se adhirieron a portaobjetos con cinta adhesiva conductiva de carbono de doble cara.

3.4.10 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

A partir de esta prueba se puede determinar la presencia de ciertos grupos químicos y su reticulación en las películas. Para ello se usó un equipo FT-IR 6800 (Jasco Inc., Japón) y las muestras se acondicionaron a 65 ± 2 % de humedad relativa y 21 ± 1 °C durante 48 h. Los espectros FT-IR se registraron con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y en un intervalo de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$.

3.5 ANÁLISIS DE LOS ALIMENTOS ESTUDIADOS

3.5.1 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Este ensayo tiene como objetivo conocer el estrés oxidativo en alimentos inducido por la peroxidación lipídica. El TBA reacciona con el malondialdehído (MDA), lo que da lugar a un compuesto de color que se puede determinar a través de un método espectrofotométrico.

En primer lugar, se preparó una solución estándar de TBA (4.0 mM), disolviendo en un matraz 28.83 mg de TBA en 50 ml de ácido acético glacial. A continuación, se prepararon las muestras de mantequilla a analizar: 1 g de mantequilla se mezcló con 5 ml de ácido acético glacial. A la mezcla se le añadió 0.5 µl de BHT. Seguidamente, se filtró la mezcla para obtener un extracto sin restos de sólidos. Se mezcló una alícuota de 1 ml de extracto de mantequilla con 1 ml de solución de TBA, y esta mezcla se incubó a 95 °C durante 1 h. Finalmente se midió la absorbancia con un espectrofotómetro y a una longitud de onda de 532 nm. El análisis se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como mg de MDA/kg de muestra:

$$\text{TBARS (MDA/kg de muestra)} = \frac{(Ac \cdot V)}{W} \quad (9)$$

Donde Ac es la cantidad determinada a partir de la curva de calibración, V es el volumen en mililitros y W es el peso de la muestra analizada.

Cuando el análisis se llevó a cabo en las muestras de queso Havarti, se realizaron modificaciones en el proceso. En este caso, 2 g de queso se homogeneizaron con ácido TCA al 7.5 % en agua durante 1 minuto, y posteriormente se filtró la mezcla con papel de filtro y un embudo. A la solución se le añadió 5 ml de TBA 0.02 M y se calentó a 95 °C durante 45 min. Tras este tiempo, las muestras se enfriaron en oscuridad durante 15 minutos. A continuación, las muestras se sometieron a centrifugación 3000 rpm durante 5 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 532 nm. La Ecuación 8 citada anteriormente fue utilizada para determinar los resultados de TBARS en queso.

3.5.2 Análisis antioxidante

Se realizaron extractos para estudiar cómo evolucionaba la capacidad antioxidante del queso tipo Havarti a lo largo de los estudios. Para la realización de los análisis, 2 g de queso se diluyeron en 9 ml de agua destilada. Esta mezcla se homogeneizó en un vortex durante 1.5 minutos y se filtró a través de papel de filtro y embudo. La mezcla obtenida era de un color opaco, por lo que se necesitó hacer una dilución 1/100 de las soluciones. Los análisis DPPH y ABTS* se llevaron a cabo como se comentó previamente en el apartado sobre el análisis de la capacidad antioxidante del extracto (3.2.1.1.).

3.5.3 Análisis de las propiedades ópticas de los alimentos

Para la medición de las propiedades ópticas del queso y la mantequilla se utilizó el equipo de colorimetría ColorStriker presentado en la Figura 12 (Mathai, Hannover, Germany). Para ello, el equipo se conectó a un teléfono móvil a través de Bluetooth, y en la aplicación ColorStriker instalada en el dispositivo se mostraban los valores de L^* , a^* y b^* de las muestras del alimento.



Figura 12. Medición de una muestra envasada de mantequilla con el equipo ColorStriker. Foto propia.

3.5.4 Análisis estadístico

En cuanto al análisis de los resultados, los parámetros estadísticos empleados para describir los valores de las técnicas de referencia fueron la media y la desviación estándar. Para cada parámetro (*one-way*), se utilizaron el análisis de varianza ANOVA y el test de *Tukey HSD* (*Honestly Significant Difference*) a través del programa Microsoft Excel®. Si $p < 0,05$, se consideraban diferencias significativas. Además, los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa informático Design Expert 11®. El diseño experimental denotó las variables independientes como glicerol y contenido del respectivo extracto como A y B, respectivamente. Con la distancia de *Cook* se detectaban valores atípicos del modelo. El programa estadístico analizaba 4 modelos de regresión: lineal, interacción de 2 factores (2FI), cuadrático y cúbico. La adecuación del modelo se midió con los estadísticos de bondad de ajuste (*fit statistics*): r^2 , r^2 ajustado, r^2 predicho, precisión adecuada (ratio señal-ruido) y el error cuadrático medio (RMSE). Finalmente, se examinaron los valores F y p de cada variable independiente para determinar su impacto en el modelo

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS Y DISOLVENTES PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ANTIOXIDANTES DE ORTIGA *URTICA DIOICA*

Estos resultados responden al objetivo específico 1 y se publicaron en la siguiente revista Q1 con los datos bibliográficos de la Tabla 4:

Publicación I (PI): Flórez, M.; Cazón, P.; Vázquez, M. (2022). Antioxidant Extracts of Nettle (*Urtica dioica*) Leaves: Evaluation of Extraction Techniques and Solvents. *Molecules*, 27, 6015. DOI: 10.3390/molecules27186015

Tabla 4. Datos publicación I.

Título		Antioxidant Extracts of Nettle (<i>Urtica dioica</i>) Leaves : Evaluation of Extraction Techniques and Solvents
Autores		María Flórez, Patricia Cazón, Manuel Vázquez
Afilaciones		Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología; Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo
Año		2022
Revista		Molecules
Volumen		27
Editorial		MDPI
eISSN		1420-3049
DOI		https://doi.org/10.3390/molecules27186015
Contribución del doctorando		Desarrollo y análisis experimental, y redacción del borrador del artículo
Indicadores de calidad 2022	Factor de impacto	4,71
	Ranking Revista	Q1 (9/33) Chemistry miscellaneous
Licencia		CC BY
Copia íntegra		Anexo I

La Figuras 13 muestra un resumen gráfico de estos resultados.



Figura 13. Resumen gráfico Publicación I. Elaboración propia.

Se estudiaron tres métodos de extracción (ultrasonidos, sin agitación y agitación) y tres disolventes diferentes (metanol, agua y etanol) para la obtención de extractos de ortiga durante un tiempo de extracción de 1 a 4 h (Tabla 5). Se midió la capacidad antioxidante de estos extractos. A partir de los resultados obtenidos se obtuvieron modelos matemáticos que permitieron una optimización del método de extracción. En el análisis estadístico, las variables independientes se definen como: A (tiempo en horas), B (método de extracción) y C (disolvente). En la Figura 14 se muestra un esquema del proceso de obtención del extracto de ortiga.

Tabla 5. Resumen de las condiciones de los procesos de extracción.

Método de extracción	Disolvente	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
Ultrasonidos	Agua	1-4	65
Sin agitación	Metanol		
Agitación	Etanol		

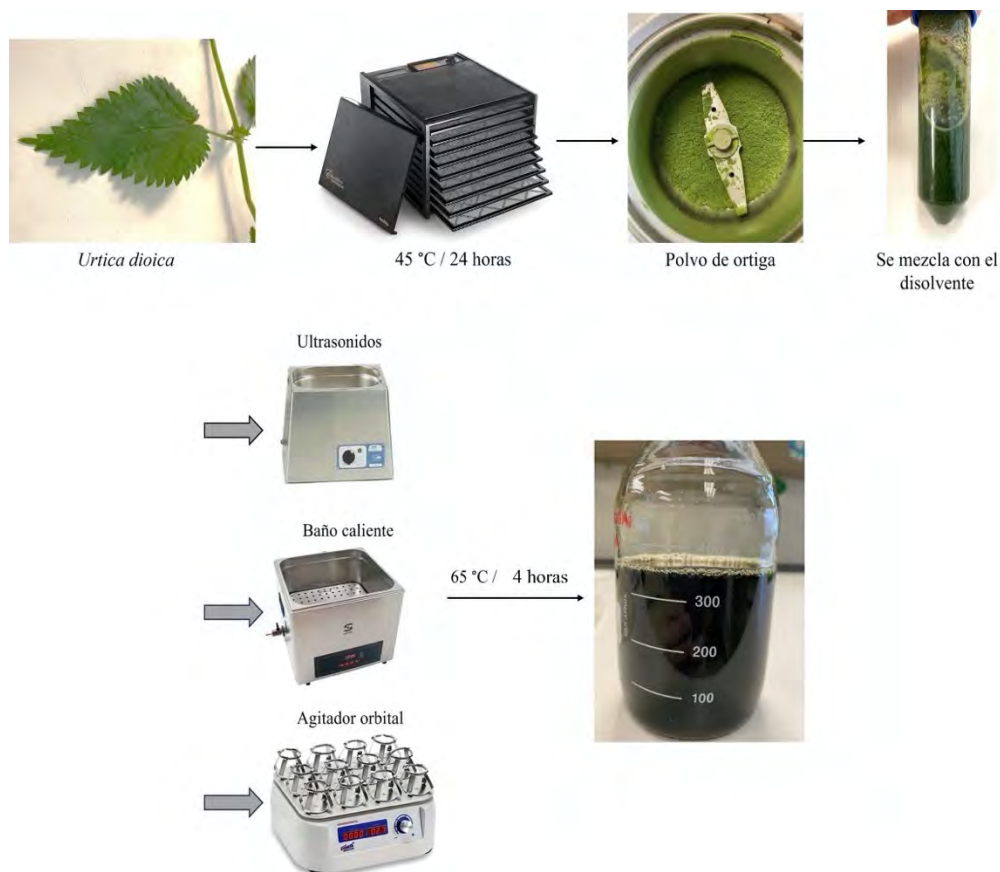


Figura 14. Estudio del proceso de extracción de las hojas de ortiga *Urtica dioica*. Elaboración propia.

La Tabla 6 muestra el diseño experimental con los 36 experimentos realizados y los valores de capacidad antioxidante obtenidos. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Tabla 6. Diseño experimental y resultados de las variables antioxidantes de los extractos secos de ortiga. TPC es el contenido fenólico total, DPPH es el ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo y ABTS[•] es el ensayo de ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.

Hora de extracción	Método	Disolvente	TPC mg eq ac gálico/g ortiga seca	DPPH%	ABTS [•] %
1	Sin agitación	Metanol	7.3 ± 0.1	75.0 ± 2.1	47.8 ± 1.6
2	Sin agitación	Metanol	6.2 ± 0.1	66.6 ± 1.1	39.6 ± 1.1
3	Sin agitación	Metanol	8.1 ± 0.4	87.1 ± 1.1	58.4 ± 0.9
4	Sin agitación	Metanol	7.3 ± 0.1	73.1 ± 1.3	52.1 ± 0.6
1	Sin agitación	Agua	11.5 ± 0.1	69.7 ± 1.4	63.7 ± 0.1
2	Sin agitación	Agua	12.4 ± 0.2	85.4 ± 0.4	82.6 ± 4.9
3	Sin agitación	Agua	15.3 ± 1.1	84.5 ± 0.8	82.2 ± 2.9
4	Sin agitación	Agua	13.4 ± 0.6	87.7 ± 0.2	90.8 ± 1.0
1	Sin agitación	Etanol	3.7 ± 0.3	32.9 ± 2.2	27.7 ± 1.7
2	Sin agitación	Etanol	3.4 ± 0.2	33.7 ± 1.7	30.5 ± 0.6
3	Sin agitación	Etanol	3.5 ± 0.2	37.1 ± 3.4	33.0 ± 1.6
4	Sin agitación	Etanol	4.5 ± 0.6	33.6 ± 1.5	34.2 ± 1.3
1	Ultrasonidos	Metanol	5.5 ± 0.3	69.4 ± 5.5	69.9 ± 5.4
2	Ultrasonidos	Metanol	10.0 ± 0.6	89.1 ± 0.7	89.3 ± 0.7
3	Ultrasonidos	Metanol	13.2 ± 0.4	90.2 ± 0.5	90.4 ± 0.5
4	Ultrasonidos	Metanol	12.5 ± 0.5	89.5 ± 0.3	89.6 ± 0.3
1	Ultrasonidos	Agua	12.8 ± 0.0	50.2 ± 1.4	32.4 ± 0.4
2	Ultrasonidos	Agua	12.1 ± 0.3	78.6 ± 0.7	43.0 ± 0.1
3	Ultrasonidos	Agua	24.2 ± 2.1	82.8 ± 0.6	80.4 ± 1.8
4	Ultrasonidos	Agua	27.0 ± 1.4	85.0 ± 1.0	91.8 ± 2.6
1	Ultrasonidos	Etanol	3.6 ± 0.0	29.9 ± 0.3	16.4 ± 2.2
2	Ultrasonidos	Etanol	7.5 ± 0.4	56.7 ± 0.8	37.6 ± 0.7
3	Ultrasonidos	Etanol	9.3 ± 1.2	65.7 ± 0.5	42.2 ± 0.5
4	Ultrasonidos	Etanol	8.2 ± 0.5	52.4 ± 4.4	38.5 ± 0.8
1	Agitación	Metanol	11.1 ± 0.6	69.0 ± 0.5	86.6 ± 0.5
2	Agitación	Metanol	8.6 ± 0.6	57.6 ± 2.2	74.1 ± 2.6
3	Agitación	Metanol	9.1 ± 0.2	54.0 ± 1.7	70.3 ± 0.1
4	Agitación	Metanol	8.8 ± 0.2	65.3 ± 1.2	75.4 ± 4.4
1	Agitación	Agua	10.7 ± 0.3	25.8 ± 2.0	47.5 ± 3.8
2	Agitación	Agua	10.9 ± 0.6	85.9 ± 0.9	33.8 ± 3.6
3	Agitación	Agua	13.3 ± 0.6	91.1 ± 0.6	33.3 ± 1.1
4	Agitación	Agua	12.9 ± 0.4	85.9 ± 1.0	21.8 ± 4.5

1	Agitación	Etanol	7.4 ± 0.2	61.0 ± 0.4	30.4 ± 4.7
2	Agitación	Etanol	5.2 ± 0.6	48.8 ± 0.2	8.1 ± 0.6
3	Agitación	Etanol	6.5 ± 0.1	66.5 ± 1.2	16.9 ± 0.9
4	Agitación	Etanol	5.9 ± 0.4	62.1 ± 0.9	13.4 ± 6.2

Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar.

Estos resultados se analizaron estadísticamente. El análisis de la varianza presentado en la Tabla 7 muestra que los modelos y sus términos obtenidos para predecir el efecto de las variables de estudio sobre la capacidad antioxidante de los extractos (TPC, DPPH y ABTS[•]) son estadísticamente significativos.

Tabla 7. Análisis de varianza y estadísticas de ajuste para el análisis antioxidante de ortigas. Contenido fenólico total (TPC), % DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y %ABTS[•] (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).

	TPC		%DPPH		%ABTS [•]	
	F-valor	<i>p</i> -valor	F-valor	<i>p</i> -valor	F-valor	<i>p</i> -valor
Modelo	20.85	$2.14 \cdot 10^{-9}$	7.30	$3.07 \cdot 10^{-5}$	24.85	$3.78 \cdot 10^{-10}$
A	20.56	$1 \cdot 10^{-4}$	13.09	$1.6 \cdot 10^{-3}$	8.77	$7.1 \cdot 10^{-3}$
B	16.98	$3.46 \cdot 10^{-5}$	1.22	$3.15 \cdot 10^{-1}$	13.87	$1 \cdot 10^{-4}$
C	80.10	$7.94 \cdot 10^{-11}$	25.55	$2.37 \cdot 10^{-6}$	83.84	$5.10 \cdot 10^{-11}$
AB	14.46	$9.75 \cdot 10^{-5}$	1.17	$3.29 \cdot 10^{-1}$	15.58	$6.07 \cdot 10^{-5}$
AC	5.20	$1.41 \cdot 10^{-2}$	3.58	$4.59 \cdot 10^{-2}$	2.12	$1.43 \cdot 10^{-1}$
BC	4.24	$1.06 \cdot 10^{-2}$	5.25	$4.2 \cdot 10^{-3}$	20.85	$3.17 \cdot 10^{-7}$
A ²			5.17	$3.34 \cdot 10^{-2}$		
r ²	0.92		0.82		0.93	
r ² ajustada	0.88		0.71		0.89	
r ² predicha	0.80		0.44		0.81	
Precisión	20.28		9.00		17.94	

A se refiere a tiempo (h), B a método (sin agitación, ultrasonidos o agitación) y C a disolvente (metanol, agua o etanol).

El modelo matemático utilizado como primera aproximación fue un modelo polinómico de segundo orden. En la Tabla 8, se muestran las ecuaciones ajustadas para predecir la capacidad antioxidante (TPC, DPPH y ABTS*) de los extractos en función del tiempo de extracción (variable continua) para cada combinación de método de extracción y disolvente (variables categóricas).

Tabla 8. Modelos matemáticos para la predicción de la capacidad antioxidante de ortigas. Contenido fenólico total (TPC), % DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y %ABTS* (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) en función del tiempo de extracción, para cada método y disolvente utilizado.

Método de extracción	Disolvente	Modelo
Sin agitación	Metanol	$TPC = 7.5 - 0.0 \cdot Tiempo(h)$
Sin agitación	Agua	$TPC = 9.1 + 1.6 \cdot Tiempo(h)$
Sin agitación	Etanol	$TPC = 4.4 - 0.2 \cdot Tiempo(h)$
Ultrasonidos	Metanol	$TPC = 3.7 + 2.7 \cdot Tiempo(h)$
Ultrasonidos	Agua	$TPC = 8.1 + 4.4 \cdot Tiempo(h)$
Ultrasonidos	Etanol	$TPC = 0.8 + 2.5 \cdot Tiempo(h)$
Agitación	Metanol	$TPC = 10.8 - 0.6 \cdot Tiempo(h)$
Agitación	Agua	$TPC = 9.0 + 1.2 \cdot Tiempo(h)$
Agitación	Etanol	$TPC = 8.00 - 0.7 \cdot Tiempo(h)$
Sin agitación	Metanol	$DPPH(\%) = 58.6 + 18.8 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Sin agitación	Agua	$DPPH(\%) = 41.0 + 28.3 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Sin agitación	Etanol	$DPPH(\%) = 13.9 + 20.2 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Ultrasonidos	Metanol	$DPPH(\%) = 53.1 + 24.6 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Ultrasonidos	Agua	$DPPH(\%) = 18.9 + 34.2 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Ultrasonidos	Etanol	$DPPH(\%) = 16.3 + 25.9 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Agitación	Metanol	$DPPH(\%) = 34.6 + 22.7 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Agitación	Agua	$DPPH(\%) = 21.5 + 32.3 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Agitación	Etanol	$DPPH(\%) = 29.3 + 24.1 \cdot Tiempo(h) - 4.0 \cdot Tiempo^2(h)$
Sin agitación	Metanol	$ABTS^*(\%) = 42.1 + 2.8 \cdot Tiempo(h)$

Sin agitación	Agua	$ABTS^*(\%) = 59.3 + 8.2 \cdot Tiempo(h)$
Sin agitación	Etanol	$ABTS^*(\%) = 24.6 + 2.7 \cdot Tiempo(h)$
Ultrasonidos	Metanol	$ABTS^*(\%) = 60.1 + 9.9 \cdot Tiempo(h)$
Ultrasonidos	Agua	$ABTS^*(\%) = 23.8 + 15.3 \cdot Tiempo(h)$
Ultrasonidos	Etanol	$ABTS^*(\%) = 10.0 + 9.8 \cdot Tiempo(h)$
Agitación	Metanol	$ABTS^*(\%) = 94.1 - 7.0 \cdot Tiempo(h)$
Agitación	Agua	$ABTS^*(\%) = 38.2 - 1.6 \cdot Tiempo(h)$
Agitación	Etanol	$ABTS^*(\%) = 34.9 - 7.1 \cdot Tiempo(h)$

4.1.1 Modelización del contenido fenólico total

Como se observa en la Tabla 6, los valores de contenido fenólico total obtenidos se encontraban entre 3.3 y 27.0 mg eq ácido gálico/g ortiga seca. Los resultados se ajustaron correctamente a un modelo matemático de interacción de dos factores. Según el análisis ANOVA mostrado en la Tabla 7, el modelo matemático obtenido es significativo ($p < 0.05$). Los valores de TPC de las muestras de ortiga seca dependen del tiempo, el método de extracción y el disolvente utilizado. El F-valor fue de 20.85 y el p -valor de 2.14×10^{-9} . Los p -valor de los términos del modelo indicaron que el efecto lineal del tiempo (A), el método (B), el disolvente (C) y la interacción entre tiempo-método (AB), tiempo-disolvente (AC) y método-disolvente (BC) eran significativos ($p < 0.05$). Los F-valor de los términos se utilizaron para determinar qué componente del modelo tuvo el mayor efecto sobre la respuesta. El efecto del disolvente utilizado (F-valor = 80.10) y el tiempo de extracción (F-valor = 20.56) fueron los términos que mostraron un mayor efecto sobre la extracción de compuestos fenólicos de las muestras de ortigas.

En cuanto a los parámetros estadísticos del ajuste, se obtuvo un r^2 del modelo predictivo de 0.92. El r^2 ajustado se usa para comparar la bondad de ajuste (la precisión del modelo) de los modelos de regresión con diferentes números de variables independientes. Por otra parte, el r^2 predicho evalúa lo bien que el modelo predice un valor de respuesta. Para que exista una concordancia razonable, la diferencia entre el r^2 ajustado y el r^2 predicho debe ser inferior a

0.20. Por otro lado, la precisión adecuada mide la relación señal-ruido. Se aplica para comparar el rango de valores predichos en los puntos de diseño con el error medio de la predicción del modelo (Vázquez, Velazquez, & Cazón, 2021). Una precisión adecuada que sea superior a 4 muestra una discriminación adecuada del modelo. En este caso, el r^2 predicho (0.81) coincide razonablemente con el r^2 ajustado (0.88). A su vez, el valor de precisión adecuada fue de 20.28, lo que indicaba una señal adecuada.

La Figura 15 muestra los datos obtenidos (puntos de color) y los valores predichos del modelo matemático (líneas continuas), en función del disolvente aplicado (rojo: metanol, verde: agua y azul: etanol) y del método de extracción (rojo: sin agitación, verde: agitación y azul: ultrasonido) para los valores de TPC. Las líneas de puntos indican las bandas de confianza del 95 %.

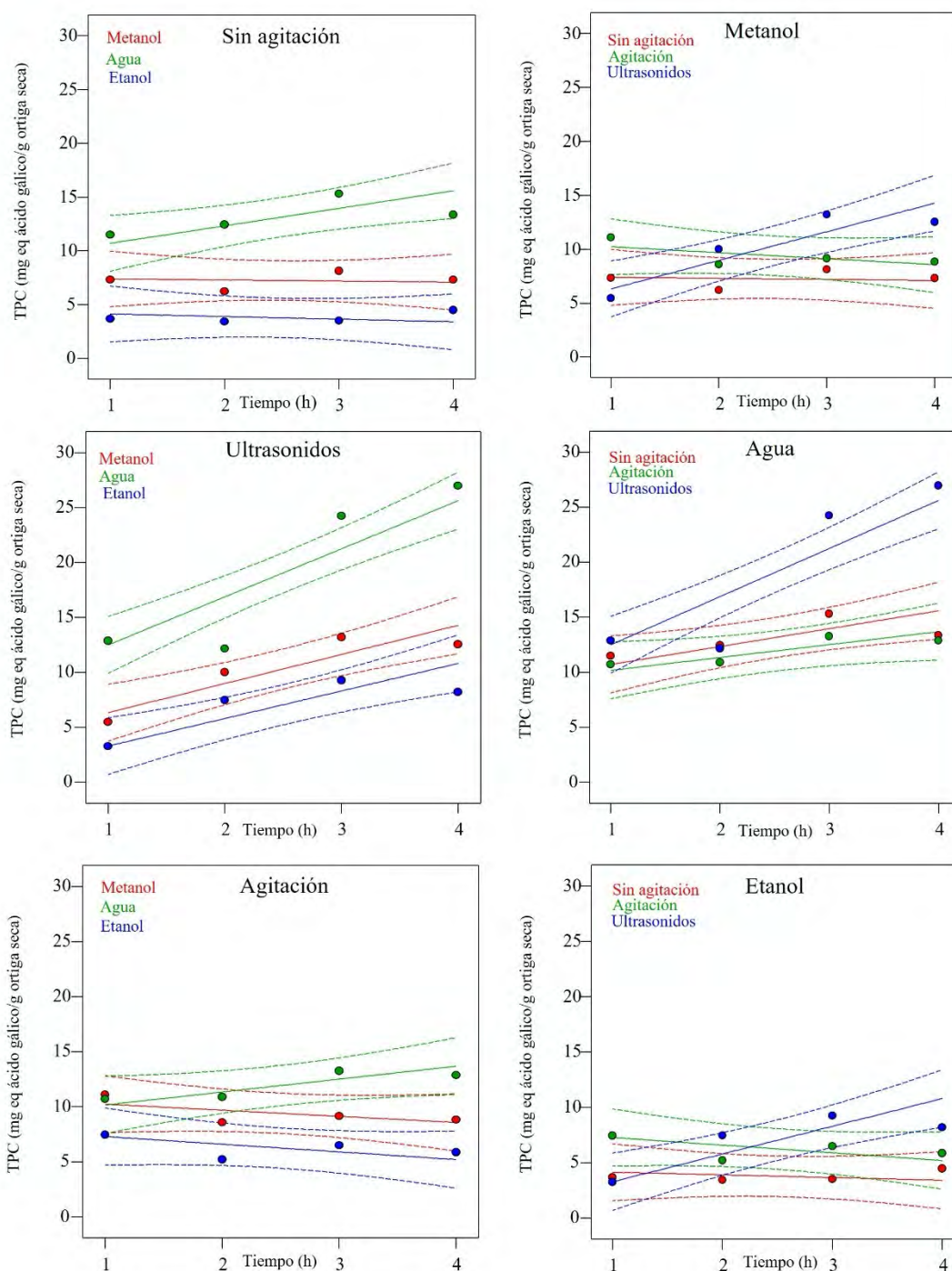


Figura 15. Dependencia experimental y prevista del contenido fenólico total (TPC) en función del tiempo, con diferente métodos y disolventes en ortigas. Elaboración propia.

Como se puede observar en la Figura 15, los valores más altos de TPC se alcanzaron con la extracción realizada por ultrasonidos (27.0 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca). Este suceso podría explicarse por el hecho de que durante el proceso de ultrasonidos, el disolvente

producido por la cavitación aceleró el proceso de disolución y difusión del soluto, mejorando la eficacia de la extracción (Zhang et al., 2018). El segundo método con el que se obtuvo mejores resultados fue la extracción estática, seguido de la extracción con agitación.

En cuanto a la mejor elección de disolvente, la utilización de agua mostró los valores más altos de TPC (de 10.7 a 27.0 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca). Seguido del agua, el metanol fue el segundo mejor disolvente, mientras que la extracción llevada a cabo con etanol generó los valores más bajos de TPC en los extractos finales.

A partir de los datos obtenidos, se puede concluir que el método de extracción que obtiene mejores resultados de TPC es el método de ultrasonidos con agua como disolvente y 4 h de extracción. Se observó que el agua es un buen disolvente para los posibles ácidos fenólicos y glucósidos que podrían estar presentes en la composición de la ortiga.

4.1.2 Modelización de la actividad de eliminación de radicales DPPH

La actividad de eliminación de radicales DPPH de los extractos se encontraba en un rango de 25.9 a 91.1 %, tal y como se observa en la Tabla 6. Los datos se ajustaron estadísticamente a un modelo matemático cuadrático. El análisis de varianza y estadísticas de ajuste del modelo (Tabla 7) muestran un F-valor de 7.30 y p -valor de 3.07×10^{-5} , indicando que el modelo obtenido es significativo ($p < 0.05$). Si se analizan los p -valor de los términos del modelo, se concluye que todos ellos fueron significativos a excepción del método de extracción (p -valor = 0.3150) y la interacción tiempo-método (p -valor = 0.3291). En cuanto a los F-valor, mostraron que el disolvente utilizado (F-valor = 25.55) y el tiempo de extracción (F-valor = 13.09), tenían un mayor efecto sobre la respuesta de la actividad de neutralización del radical DPPH.

En cuanto a los valores estadístico de ajuste, se obtuvo un r^2 de 0.83. Mientras que el r^2 predicho tenía un valor de 0.44 y el r^2 ajustado fue 0.72. Esto indicaba que los valores no estaban tan próximos como cabría esperar, y además la diferencia era superior a 0.2. Sin embargo, el modelo tenía una precisión adecuada de 9.00, lo que indica que tiene una relación señal-ruido

adecuada. En la Figura 16 se observa los resultados experimentales y los valores predichos del modelo matemático.

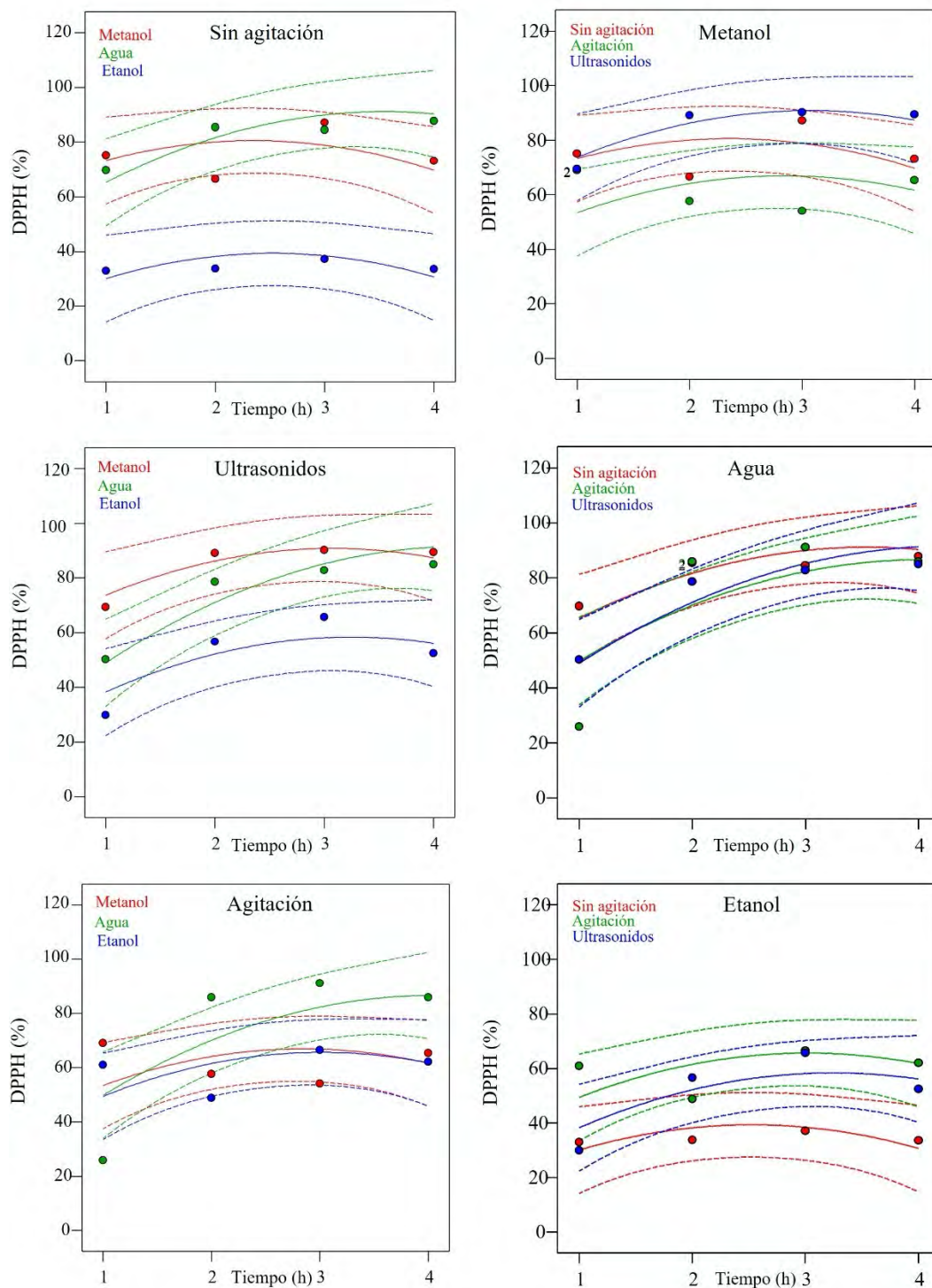


Figura 16. Dependencia experimental y prevista de la actividad de neutralización DPPH en función del tiempo, con diferente métodos y disolventes en ortigas. Elaboración propia.

Los valores de DPPH variaban mucho en función del disolvente utilizado. Para el método estático, el valor más alto se obtuvo cuando el agua se utilizaba como disolvente (87.7 %), mientras que si el método usado era el ultrasonido, el valor más alto se consiguió con el metanol (90.2 %). Cuando la extracción se realizaba por agitación, el valor más alto se consiguió usando el agua (91.1 %).

A partir de estos resultados, se puede determinar que existe una clara relación entre el método de extracción y el disolvente utilizado. El agua fue el disolvente que mostró valores de DPPH más altos, seguido del metanol y el etanol. Esto nos permite concluir que el extracto acuoso sometido a cualquiera de los tres métodos de extracción es el que obtuvo mayores valores de DPPH en 3 h. Esto podría justificarse por el hecho de que el uso de disolventes polares mostró una mayor afinidad, lo que permite obtener extractos con un mayor potencial antioxidante que los disolventes ligeramente polares (Kowalska, Baj, Kowalski, & Szymańska, 2021).

4.1.3 Modelización de la actividad de eliminación de radicales ABTS*

Como se observa en la Tabla 6, los valores de la actividad de eliminación de radicales ABTS* se encontraban en un rango de 8.1 a 91.8 %. Los datos se ajustaron correctamente a un modelo matemático de interacción de dos factores cuyo análisis de varianza y estadísticas de ajuste se muestran en la Tabla 7. El F-valor del modelo fue de 24.85, mientras que el p -valor fue de 3.78×10^{-10} . Esto indicaba que el modelo era significativo ($p < 0.05$). Excepto la interacción tiempo-disolvente, cuyo p -valor fue 0.1432, todos los términos del modelo eran significativos. Los valores estadísticos de ajuste fueron r^2 de 0.94, r^2 predicho era de 0.82 y el r^2 ajustado de 0.90. En este caso, el r^2 predicho y el r^2 ajustado concordaban razonablemente. La precisión adecuada tenía un valor de 17.95, por lo que tenía una señal-ruído adecuada. En la Figura 17 se muestra los resultados experimentales y predichos del modelo matemático de la actividad de neutralización de radicales ABTS*.

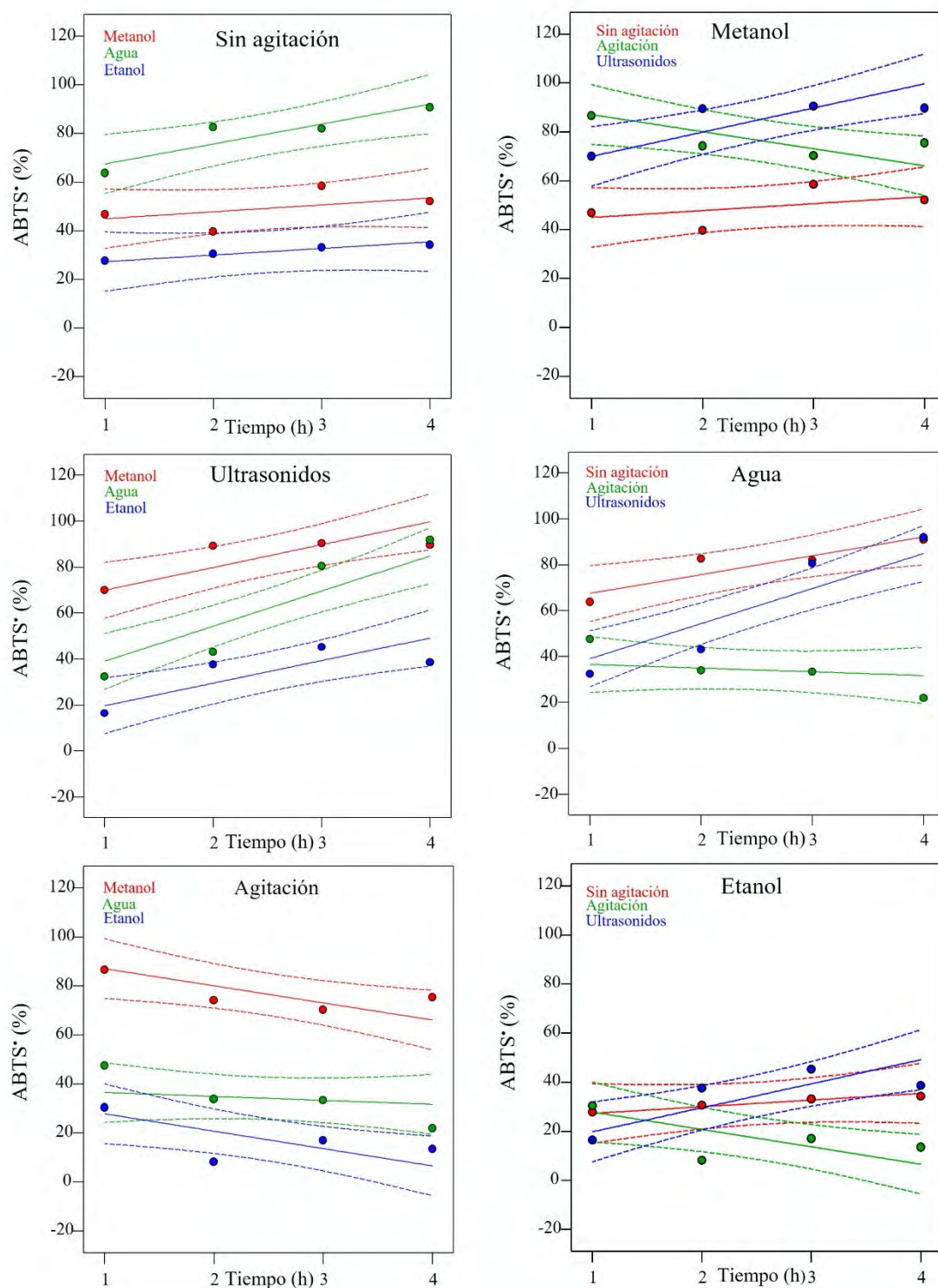


Figura 17. Dependencia experimental y prevista de la actividad de neutralización ABTS* en función del tiempo, con diferente métodos y disolventes en ortigas. Elaboración propia.

utilizado. Para la extracción con ultrasonidos, el uso de agua por 4 h produjo los valores más altos de ABTS*, con valores de 91.8 %. Para las condiciones estáticas, los valores más altos de ABTS* se obtuvieron también con la aplicación de agua como disolvente y un tiempo de 4 h de extracción (90.8 %). Sin embargo, el metanol fue el mejor disolvente cuando se utilizó 1 h para el método con agitación (86.6 %).

Por otro lado, la relación entre el disolvente y el método de extracción utilizado demostró que el agua mejoraba la eficiencia de la extracción, con resultados de 21.84 a 91.83 %. El etanol fue el segundo mejor disolvente (8.1 a 42.2 %), mientras que los extractos metanólicos fueron los que obtuvieron resultados más bajos (39.6 a 90.4 %). Los resultados sugieren que la extracción acuosa por ultrasonidos es la mejor opción. Esto podría explicarse porque el ensayo ABTS* es de base acuosa, lo que favorece que se liberen aquellos compuestos hidrófilos con capacidad antioxidante (Schlesier, Harwat, Böhm, & Bitsch, 2002).

4.1.4 Optimización de la extracción de compuestos antioxidantes de la planta *Urtica dioica*

Los modelos matemáticos obtenidos para predecir la capacidad antioxidante se utilizaron para optimizar el proceso de extracción. Los criterios de prioridad establecidos para la optimización del método ya se explicaron en el apartado 3.2.1.2. sobre la optimización del extracto de *Urtica dioica*. Los resultados obtenidos, de acuerdo con los criterios establecidos y los modelos predictivos, indicaron que el método de extracción más adecuado sería el tratamiento de ultrasonidos con agua como disolvente y una duración de la extracción de 3.15 h. De esta manera, se espera que la capacidad antioxidante predicha de los extractos de *Urtica dioica* tuvieran un valor de TPC de 21.9 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca, % ABTS* de 71.8 % y % DPPH de 86.6.

4.2 DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDAS CON EXTRACTO DE ORTIGA *URTICA DIOICA*

Estos resultados responden al objetivo específico 2 y se publicaron en las siguientes revistas Q1 cuyos datos bibliográficos se muestran en la Tabla 9 y 10:

Publicación II (PII): Flórez, M.; Cazón, P.; Vázquez, M. (2023). Characterization of active films of chitosan containing nettle *Urtica dioica* L. extract: Spectral and water properties, microstructure, and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127318. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127318

Publicación III (PIII): Flórez, M.; Cazón, P.; Vázquez, M. (2023). Enhancing the quality of Havarti cheese: chitosan films with nettle *Urtica dioica* L. extract as slice separators to retard lipid oxidation. *Food Science and Technology (LWT)*, 189, 115504. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115504

Las Figuras 18 y 19 muestran los resúmenes gráficos de estos resultados.

Tabla 9. Datos publicación II

Título	Characterization of active films of chitosan containing nettle <i>Urtica dioica</i> L. extract: Spectral and water properties, microstructure, and antioxidant activity.	
Autores	María Flórez, Patricia Cazón, Manuel Vázquez	
Afiliaciones	Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología; Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo	
Año	2023	
Revista	International Journal of Biological Macromolecules	
Volumen	253	
Editorial	ELSEVIER	
eISSN	0141-8130	
DOI	https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127318	
Contribución del doctorando	Desarrollo y análisis experimental, y redacción del borrador del artículo	
	Factor de impacto	8,025

Indicadores de calidad 2023	Ranking Revista	Q1 (39/425) Biochemistry, Genetics and Molecular Biology
Licencia		CC BY
Copia íntegra		Anexo II

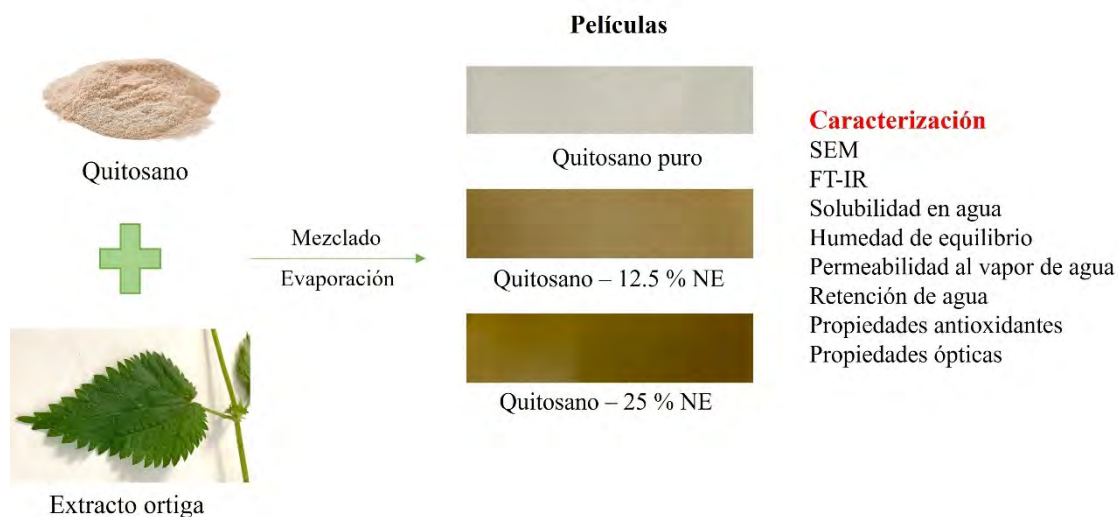


Figura 18. Resumen gráfico Publicación II. Elaboración propia.

Tabla 10. Datos publicación III.

Título	Enhancing the quality of Havarti cheese: chitosan films with nettle <i>Urtica dioica</i> L. extract as slice separators to retard lipid oxidation
Autores	María Flórez, Manuel Vázquez, Patricia Cazón
Afiliaciones	Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología; Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo
Año	2023
Revista	Food Science and Technology (LWT)
Volumen	189
Editorial	ELSEVIER
eISSN	1096-1127
DOI	https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115504
Contribución del doctorando	Desarrollo y análisis experimental, y redacción del borrador del artículo
Factor de impacto	6,056

Indicadores de calidad 2023	Ranking Revista	Q1 (42/338) Agricultural and Biological Sciences – Food Science
Licencia		CC BY-NC-ND
Copia íntegra		Anexo III

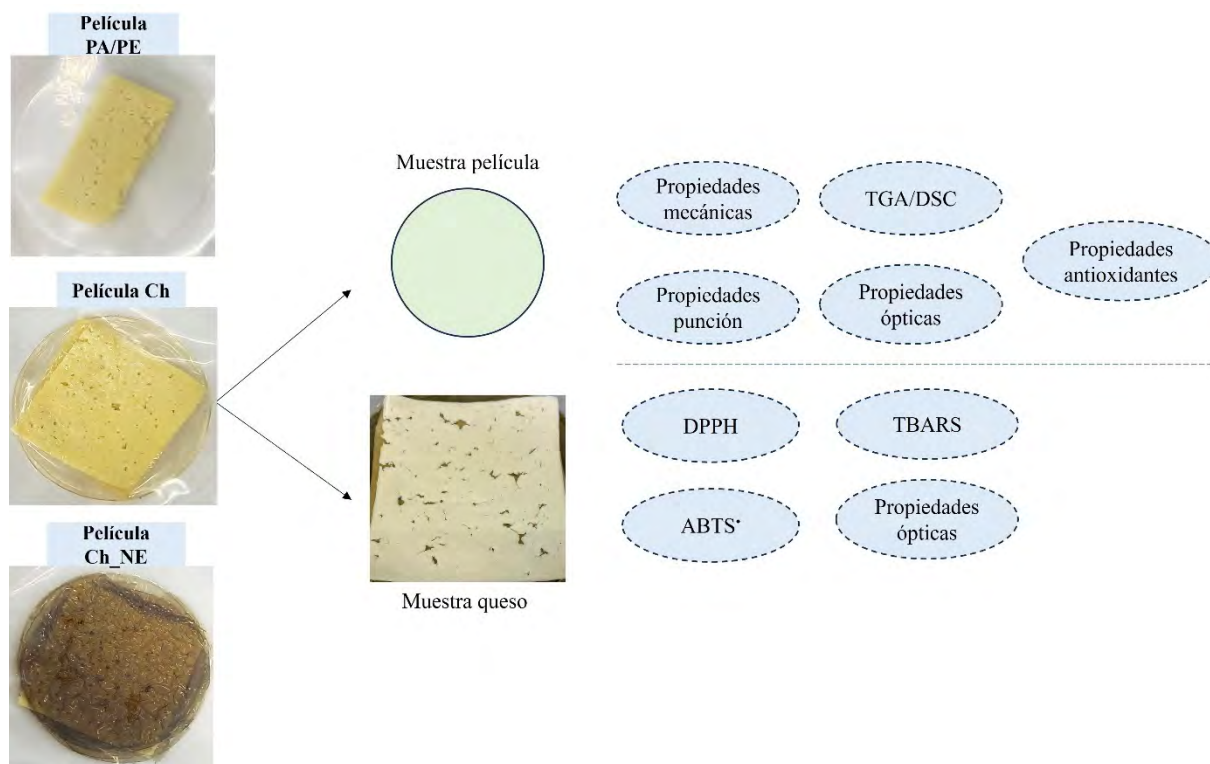


Figura 19. Resumen gráfico Publicación III. Elaboración propia.

La ortiga es una planta ampliamente disponible en nuestro entorno y con propiedades y aplicaciones poco conocidas, entre ellas la capacidad antioxidante de sus extractos, tal como se evaluó en la sección anterior. Por ello, se desarrolló una película activa a base de quitosano con la adición de extracto de ortiga en su composición para aportar el efecto antioxidante. Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de extracto de ortiga (NE) sobre las propiedades ópticas, de solubilidad, de retención de agua, de contenido de humedad de equilibrio, de WVP, mecánicas y antioxidantes de las películas. Además, se analizó la morfología de las muestras a través del SEM, y la compatibilidad de estas por los espectros de FT-IR. La termoestabilidad

se estudió a través del TGA/DSC. Se estudió la aplicación de estas películas como separadores de lonchas de queso tipo Havarti envasado al vacío. Para testar las propiedades activas como separador se midió cada 15 días la oxidación lipídica, así como las propiedades antioxidantes y ópticas del queso envasado y de la película. El estudio tuvo una duración total de 45 días, por lo que se realizó la toma de muestras en 3 ocasiones. En el análisis estadístico realizado, las variables independientes se llamaron A (glicerol, % p/v) y B (NE, % v/v).

4.2.1 Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes SEM de la parte superior, transversal e inferior de las películas quitosano-NE se muestran en la Figura 20. Las imágenes SEM inferiores (base) son las que corresponden con la cara que está directamente en contacto con la placa Petri. Como se puede observar, la morfología de la superficie de la película de quitosano es aparentemente lisa, compacta y sin poros. Se puede confirmar que la adición de NE permitió una distribución homogénea, sin grietas ni perforaciones. Este comportamiento también se observó en películas de quitosano a las que se les adicionó extractos del tallo, hojas y semillas de *Pistacia terebinthus* (Kaya, Khadem, et al., 2018). En cuanto a las imágenes SEM superiores (superficie) son aquellas que se corresponden con la cara superficial de la película, y por tanto es la parte que está en contacto directo con el medio ambiente. Al igual que en las imágenes SEM inferiores, la presencia de glicerol y NE no produjo alteraciones significativas en la morfología de las muestras. La formación de una matriz ordenada y homogénea sugiere una buena compatibilidad entre el quitosano y el NE para la creación de películas.

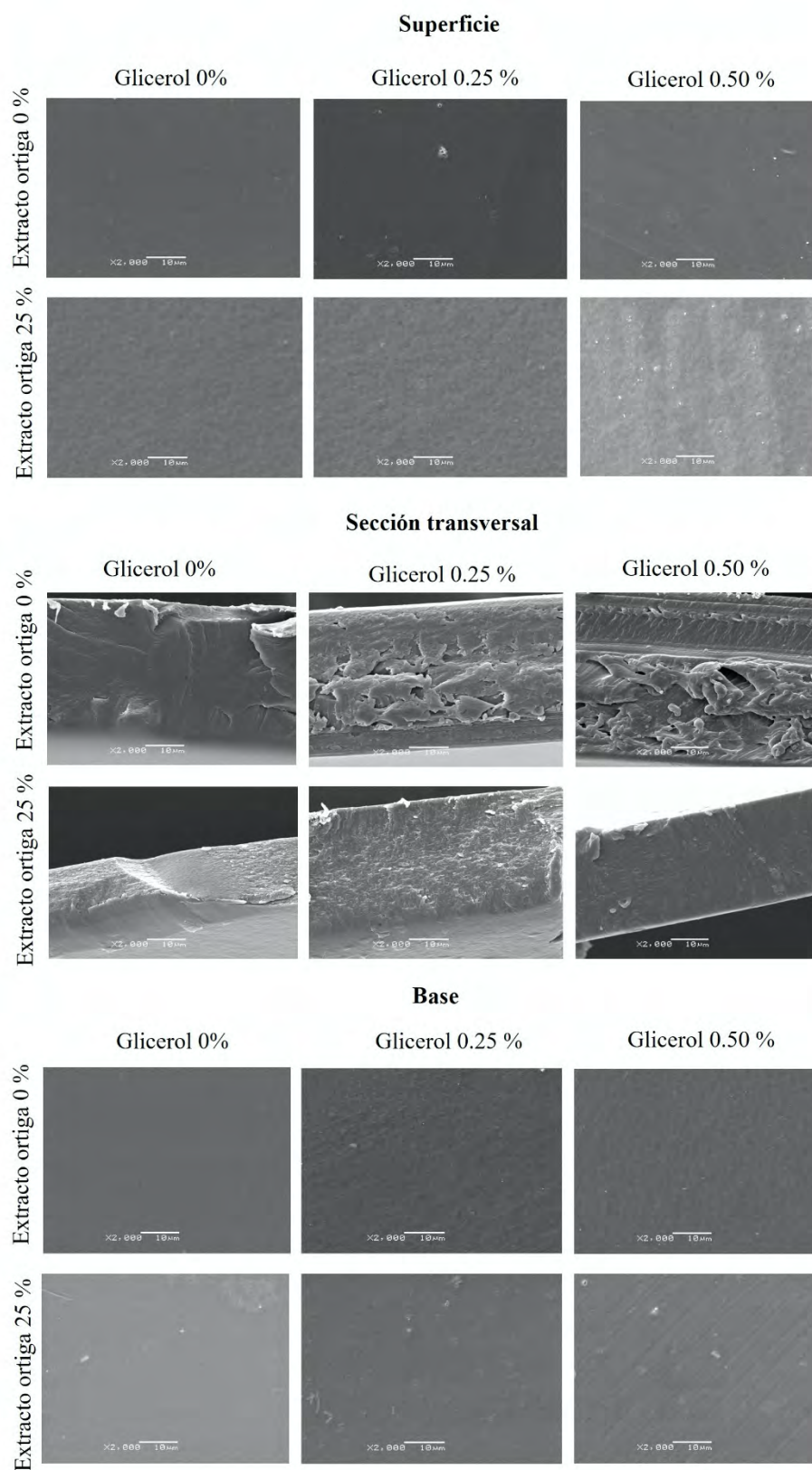


Figura 20. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la parte superior, transversal e inferior de las películas de quitosano y quitosano-extracto de ortiga. Elaboración propia.

Por otro lado, esta ausencia de irregularidades tanto en la cara superior como en la inferior de las películas demuestra que el baño ultrasónico ejerció un efecto positivo al eliminar cualquier burbuja de aire (Cazón, Antoniewska, Rutkowska, & Vázquez, 2021). En cuanto a las imágenes transversales (sección transversal), son aquellas obtenidas cuando se le realiza un corte a la película. En este caso, las películas de quitosano puro mostraban una estructura homogénea y más densa, mientras que el glicerol promovió una estructura más heterogénea debido a su efecto hidratante. Sin embargo, cuando el NE se encontraba presente en la matriz se obtenía una estructura más densa y uniforme incluso con la presencia de glicerol.

4.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

El análisis de los espectros de FT-IR se llevó a cabo para identificar las interacciones moleculares entre los grupos funcionales propios del quitosano, el glicerol y el NE. La Figura 21 muestra los espectros FT-IR de las películas de quitosano puro (Figura 21.I), con una concentración del 12.5 % de NE (Figura 21.II) y con un 25 % de NE (Figura 21.III) a diferentes concentraciones de glicerol en un rango comprendido entre 4000 y 400 cm^{-1} . Los espectros FT-IR de las muestras de películas mostraron una serie de bandas significativas. En primer lugar, la banda que aparece a 3256 – 3800 cm^{-1} está relacionada con la vibración de estiramiento de los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ del quitosano (Haghju et al., 2016). El pico de absorción en torno a 3276 cm^{-1} se debe a la presencia de glicerol y su respectiva concentración de grupos $-\text{OH}$. Por este motivo la curva es más pronunciada en las películas que tienen una concentración al 0.5 % (línea azul). A su vez, las vibraciones de estiramiento $-\text{NH}$ propias del quitosano también se encuentran representadas en esta absorbancia (Bilican et al., 2020; Priyadarshi, Sauraj Kumar, & Negi, 2018).

Se puede determinar que la adición de glicerol a la matriz afectó a las interacciones moleculares. Esto se observa por el aumento de la intensidad a los 3256 – 3800 cm^{-1} , que se relaciona con la vibración de estiramiento del grupo $-\text{OH}$. Por otro lado, los picos representados alrededor de 1600 cm^{-1} se atribuyeron a los anillos bencénicos de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de ortiga (Schulz & Baranska, 2007). El pequeño pico encontrado alrededor de 1347 cm^{-1} podría atribuirse a los compuestos fenólicos presentes en el extracto de

la planta, ya que se volvía más intenso en las películas que tenían una mayor concentración de NE (Haghju et al., 2016).

En base a estos resultados, se puede determinar que hay una clara interacción entre los componentes que constituyen la película. La presencia de glicerol y de NE produjo un cambio y aumento de la absorbancia en unos picos específicos. Se observaron comportamientos similares en películas de quitosano a las que se le añadieron extractos de plantas como *Malaleuca alternifolia* (Cazón et al., 2021) y *Pistacia terebinthus* (Kaya, Khadem, et al., 2018).

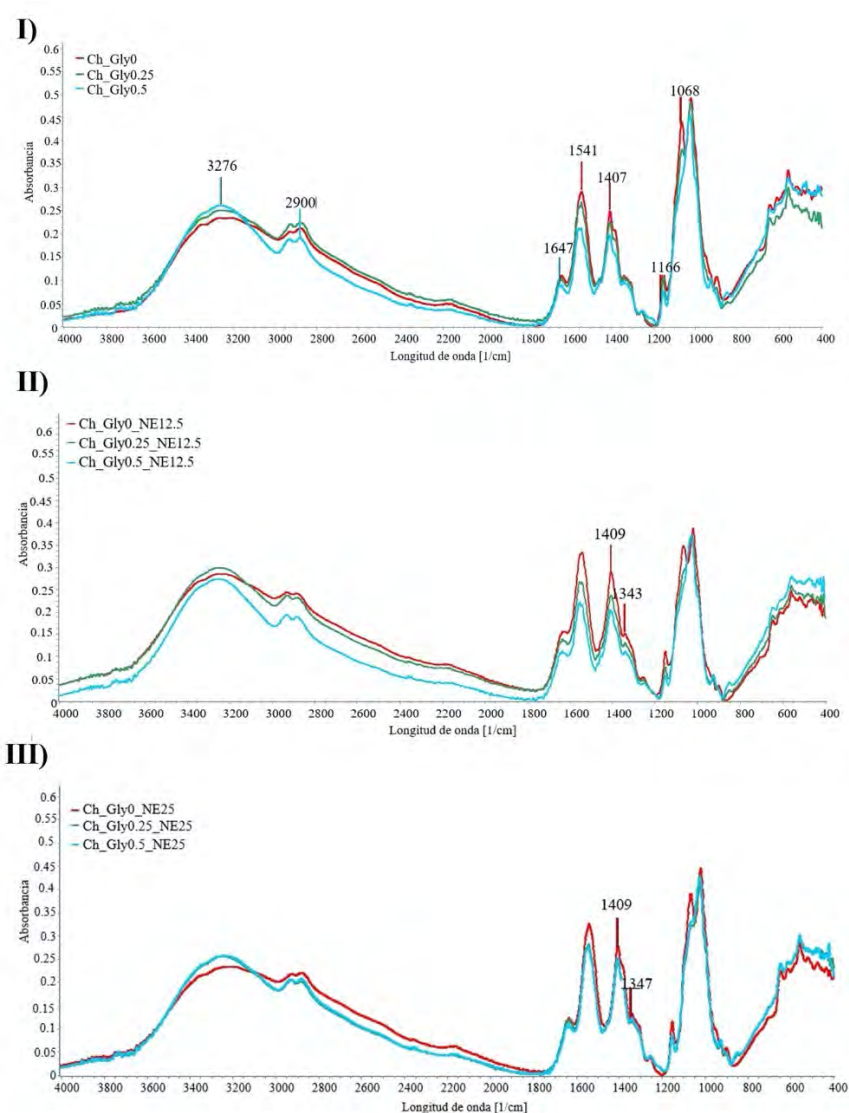


Figura 21. Espectros FT-IR de películas de quitosano (Ch) a diferentes concentraciones de glicerol (Gly) (0, 0.25 y 0.5 %) y extracto de ortiga (NE) (0, 12.5 y 25 %). I) Solo quitosano; II) con 12.5% de NE; III) con 25% de NE.

Elaboración propia.

4.2.3 Evaluación de la solubilidad en agua, el contenido de humedad de equilibrio y la permeabilidad al vapor de agua

La solubilidad (S) en agua de las películas se determinó analizando la materia soluble de las muestras. En la Tabla 11 se puede observar los resultados de los análisis realizados, y se puede apreciar que los valores de S oscilaron entre 0.64 y 1.26 %. El modelo matemático obtenido fue significativo, indicando que la solubilidad de las muestras dependía de la formulación de la película.

Tabla 11. Propiedades hídricas de las películas de quitosano (Ch) con glicerol (Gly) y extracto de ortiga (NE). El número en la muestra de película muestra el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra	S	%W	WVP
	%	%	g/m·s·Pa
Ch_Gly0	0.64 ± 0.17 ^a	0.98 ± 0.23 ^{acd}	3.43·10 ⁻¹¹ ± 4.81·10 ⁻¹² ^a
Ch_Gly0_NE12.5	0.65 ± 0.37 ^{ac}	0.68 ± 0.23 ^{ac}	4.11·10 ⁻¹¹ ± 1.73·10 ⁻¹¹ ^{ab}
Ch_Gly0_NE25	1.06 ± 0.16 ^{abc}	0.53 ± 0.09 ^a	2.22·10 ⁻¹¹ ± 5.02·10 ⁻¹² ^a
Ch_Gly0.25	0.70 ± 0.10 ^{ac}	1.32 ± 0.44 ^{acd}	3.25·10 ⁻¹¹ ± 4.691·10 ⁻¹² ^{ab}
Ch_Gly0.25_NE12.5	1.24 ± 0.19 ^{bc}	1.45 ± 0.32 ^{acd}	3.86·10 ⁻¹¹ ± 2·10 ⁻¹² ^{ab}
Ch_Gly0.25_NE25	1.15 ± 0.05 ^{abc}	1.03 ± 0.51 ^{acd}	3.67·10 ⁻¹¹ ± 2.15·10 ⁻¹² ^{ab}
Ch_Gly0.5	0.69 ± 0.21 ^{ac}	2.76 ± 0.85 ^{bc}	5.53·10 ⁻¹¹ ± 6.58·10 ⁻¹² ^b
Ch_Gly0.5_NE12.5	1.17 ± 0.09 ^{cd}	1.73 ± 0.12 ^{cbd}	3.93·10 ⁻¹¹ ± 1.20·10 ⁻¹¹ ^{ab}
Ch_Gly0.5_NE25	1.26 ± 0.07 ^{bd}	2.07 ± 0.31 ^d	5.64·10 ⁻¹¹ ± 9.14·10 ⁻¹¹ ^b

S es solubilidad, %W es contenido de humedad de equilibrio, WVP es permeabilidad al vapor de agua.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la Tabla 12 se presenta los resultados del análisis de varianza sobre las propiedades hídricas de las películas de quitosano. En base a esto, el F-valor y *p*-valor fueron 8.74 y 0.0167, respectivamente. Los *p*-valor de los términos del modelo indicaron que el efecto lineal de NE (B) era el único término significativo (*p*-valor < 0.05), con un notable efecto sobre la propiedad de solubilidad. En cuanto al efecto de la concentración de glicerol (A), este término no fue significativo (*p*-valor > 0.05). La Tabla 13 muestra las estadísticas de ajuste de las propiedades analizadas.

Tabla 12. Análisis de varianza para las propiedades hídricas de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.

	S		%W		WVP	
	F-valor	<i>p</i> -valor	F-valor	<i>p</i> -valor	F-valor	<i>p</i> -valor
Modelo	8.74	0.0167	42.92	0.0003	3.30	0.1078
A	3.89	0.0961	76.70	0.0001	6.49	0.0435
B	13.60	0.0102	9.15	0.0233	0.10	0.7564

S es solubilidad, %W es contenido de humedad de equilibrio, WVP es permeabilidad al vapor de agua.

Tabla 13. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades hídricas de las películas de quitosano.

	S	%W	WVP
r ²	0.7446	0.9347	0.5240
r ² ajustada	0.6594	0.9129	0.3653
r ² predicha	0.5368	0.8507	-0.1617
Precisión	8.00	16.66	4.06

S es solubilidad, %W es contenido de humedad de equilibrio, WVP es permeabilidad al vapor de agua.

La Ecuación 10 obtenida predice la respuesta de solubilidad en términos de factores reales de concentración de glicerol y NE:

$$S (\%) = 0.58 + 0.51 \cdot \text{Glicerol} (\%) + 0.02 \cdot \text{NE} \quad (10)$$

aumentó ligeramente hasta el 1.26 % en comparación con el 0.64 % de las películas de quitosano puro. Esto se debe a la presencia simultánea de glicerol (0.5 %) y NE (25 %). El rango de concentraciones de glicerol empleado en el presente trabajo no modificó la solubilidad de la muestra, al igual que la presencia de NE en la matriz tampoco ejerció cambios. Como conclusión, la baja concentración de glicerol utilizada en la matriz no fue suficiente para producir alteraciones significativas en la solubilidad de las películas. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el análisis FT-IR, el aumento de enlaces O–H en la matriz puede fomentar la interacción con las moléculas de agua (Cerqueira, Souza, Teixeira, & Vicente, 2012). Como consecuencia de esto, las nuevas interacciones entre los grupos de quitosano con los grupos hidrófilos del plastificante y el NE dieron lugar a un biopolímero con una solubilidad muy baja. Sin embargo, esta baja solubilidad hace interesante a la película para su aplicación en alimentos con alto contenido en humedad como es la carne, el queso y las frutas.

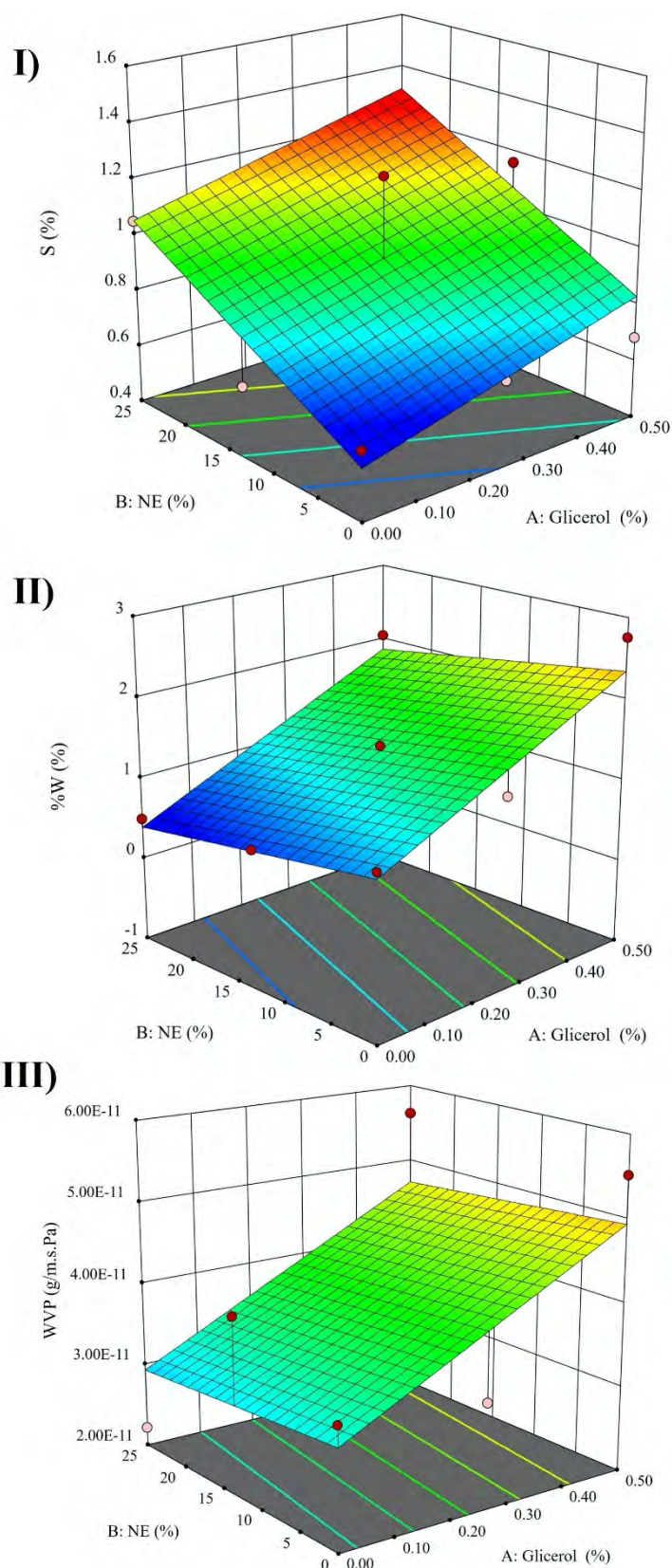


Figura 22. Predicción de los modelos de las propiedades hídricas de las películas: I) S es solubilidad, II) %W es contenido de humedad de equilibrio y III) WVP es permeabilidad al vapor de agua. NE es extracto de ortiga. Elaboración propia.

En cuanto a los valores de %W, estos oscilaron entre 0.53 y 2.76 % (Tabla 11). En este caso, los datos se ajustaron utilizando una ecuación logarítmica, como recomendaba el diagrama de Box-Cox. Tal como se muestra en la Tabla 12, el F-valor era de 42.92 y el *p*-valor de 0.0003, lo que indicaba que el modelo era significativo. Los *p*-valor mostraron que el efecto lineal del glicerol (A) y el contenido de NE (B) tenían un efecto significativo sobre la propiedad de %W. Asimismo, los F-valor mostraron que el glicerol tenía un efecto notable sobre la propiedad del contenido de humedad (F-valor = 76.70). Los valores estadísticos de ajuste representados en la Tabla 13 indicaron un valor de r^2 de 0.93. Mientras que el r^2 predicho (0.85) y el r^2 ajustado (0.91) concordaban razonablemente, la precisión también obtuvo valores adecuados (16.66).

La Ecuación 11 muestra los valores de %W de las películas de quitosano en función de la concentración de glicerol y NE:

$$\text{Ln (\%W) (\%)} = -0.064 + 0.961 \cdot \text{Glicerol (\%)} - 0.003 \cdot \text{NE (\%)} \quad (11)$$

La Figura 22.II muestra la predicción del modelo para la propiedad de %W dada por la Ecuación 11. De acuerdo con los datos de la Tabla 11, la muestra con glicerol al 0.5 % (p/p) consiguió el valor más alto de %W (2.76 %). Esto se explica porque el glicerol es un plastificante hidrófilo, por lo que a mayor concentración, las películas pueden absorber más agua en su matriz (Thakhiew, Devahastin, & Soponronnarit, 2010). Inversamente, la presencia de NE produjo una disminución de esta propiedad. De hecho, en las imágenes SEM comentadas previamente se observaba una matriz más compacta en aquellas películas con NE en su composición. Esta estructura densa dificultó la retención de moléculas de agua, dando lugar a valores más bajos de %W. De hecho, este efecto se mantiene incluso en muestras con un alto contenido de glicerol (0.5 %). Además, los fenoles característicos de las ortigas formaron interacciones con los grupos -OH y -NH₂ del quitosano. De esta manera, se limitaba la disponibilidad del grupo funcional del quitosano para interactuar con el agua (Kadam & Lele, 2018).

En cuanto a la propiedad de WVP, los valores oscilaron entre $2.22 \cdot 10^{-11}$ y $5.64 \cdot 10^{-11}$ g/m²·s·Pa. Los datos se ajustaron correctamente a un modelo lineal. Como muestra la Tabla 12,

el F-valor del modelo fue de 3.30 y el p -valor fue de 0.1078, lo que significa que el modelo era significativo. En cuanto a los p -valor de los términos del modelo, solo la concentración de glicerol (p -valor < 0.05) era significativa. Respecto a los valores estadísticos de ajuste de la Tabla 13, el r^2 fue de 0.52. Sin embargo, los valores del r^2 predicho y ajustado no tenían una concordancia entre ellos, pero la precisión (4.06) sí que mostraba una señal adecuada. La propiedad de WVP de las muestras de las películas pudo predecirse con la Ecuación 12 obtenida:

$$\text{WVP (g/m}\cdot\text{s}\cdot\text{Pa)} = 3.18\cdot 10^{-11} + 3.56\cdot 10^{-11}\cdot \text{Glicerol (\%)} - 9.06\cdot 10^{-14}\cdot \text{NE (\%)} \quad (12)$$

La predicción del modelo sobre la propiedad de WVP se muestra en la Figura 22.III. A partir de los resultados, se pudo concluir que la adición de NE no mostró diferencias significativas (p -valor > 0.05) en los valores de WVP al compararlas con las películas de quitosano puro. Únicamente se observó una disminución significativa (p -valor < 0.05) de los valores de WVP cuando la concentración de NE fue del 25 % y no se utilizó glicerol. Esto podría explicarse porque las interacciones entre el quitosano y el NE podrían reducir la disponibilidad de grupos hidrófilos en el quitosano y así disminuir sus interacciones con el agua (Wang et al., 2019).

Por otro lado, la adición de glicerol en las muestras tampoco tenía un efecto significativo sobre esta propiedad. Solamente cuando se añadió glicerol con una concentración del 0.5 % a la matriz de quitosano puro se produjo un aumento significativo (p -valor < 0.05) en la permeabilidad de las películas. Esto se debe a que el glicerol es una molécula hidrófila que puede insertarse entre cadenas poliméricas adyacentes. De esta manera, se reduce las interacciones intermoleculares y se facilita la migración de las moléculas de vapor de agua, aumentando el WVP (Ziani, Oses, Coma, & Maté, 2008).

4.2.4 Evaluación de las propiedades antioxidantes

La capacidad antioxidante de las películas se evaluó a través de tres métodos: DPPH, ABTS[•] y Folin-Ciocalteu. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla

Tabla 14. Propiedades antioxidantes de películas de quitosano (Ch) con glicerol (Gly) y extracto de ortiga (NE).
El número de la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestras	DPPH (%)	ABTS [•] (%)	Folin-Ciocalteu
			(mg GAE/g película)
Ch_Gly0	0.00 ± 0.25 ^a	10.38 ± 4.37 ^a	0.00 ± 0.01 ^a
Ch_Gly0_NE12.5	76.11 ± 0.74 ^b	92.32 ± 1.49 ^b	0.12 ± 0.09 ^b
Ch_Gly0_NE25	95.48 ± 0.14 ^c	98.71 ± 0.00 ^b	0.67 ± 0.07 ^c
Ch_Gly0.25	0.33 ± 1.48 ^a	11.61 ± 10.89 ^a	0.00 ± 0.01 ^a
Ch_Gly0.25_NE12.5	92.20 ± 0.38 ^d	98.46 ± 0.11 ^b	0.63 ± 0.05 ^c
Ch_Gly0.25_NE25	95.48 ± 0.14 ^c	97.24 ± 1.15 ^b	1.57 ± 0.06 ^d
Ch_Gly0.5	0.66 ± 2.75 ^a	15.17 ± 6.14 ^a	0.00 ± 0.04 ^a
Ch_Gly0.5_NE12.5	84.65 ± 1.14 ^c	98.71 ± 0.00 ^b	0.64 ± 0.17 ^c
Ch_Gly0.5_NE25	95.40 ± 0.14 ^{cd}	98.34 ± 0.00 ^b	1.52 ± 0.06 ^d

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Las películas enriquecidas con NE mostraron una fuerte actividad de eliminación de radicales libres con valores que oscilaban entre el 76.11 % y el 95.48 % para DPPH. Estos datos se ajustados a un modelo de raíz cuadrada como recomendaba el diagrama de Box-Cox. En la Tabla 15 se muestra el análisis de la varianza de las propiedades antioxidantes. El F-valor de 659.66 y el p -valor < 0.0001 indicaron que el modelo era significativo. Los p -valor de los términos mostraron que la concentración de NE (B) y el efecto cuadrático de NE (B²) tenía una respuesta significativa sobre los valores de DPPH. Por otro lado, los F-valor mostraron que el contenido de NE (F-valor = 1495.85) y el efecto cuadrático del contenido de NE (F-valor = 664.73) eran los dos factores que tenían un mayor impacto sobre esta propiedad. La interacción glicerol-NE (F-valor = 3.52), la concentración de glicerol (F-valor = 0.70) y el efecto cuadrático del contenido de glicerol (F-valor = 2.88) demostraron que tenían una influencia insignificante sobre la propiedad de barrido.

Tabla 15. Análisis de varianza de las propiedades antioxidantes de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.

	DPPH		ABTS*		Folin-Ciocalteu	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	659.66	<0.0001	639.48	$9.73 \cdot 10^{-5}$	40.81	0.0003
A	0.70	0.4636	0.22	0.6702	4.81	0.0707
B	1495.85	<0.0001	917.51	$7.90 \cdot 10^{-5}$	76.81	0.0001
AB	3.52	0.1573	1.47	0.3117		
A ²	2.88	0.1883	0.01	0.9195		
B ²	664.73	0.0001	753.23	0.0001		

Los valores estadísticos de ajuste se presentaron en la Tabla 16. En este caso, se indicó un valor de r^2 de 0.99. Además, el r^2 predicho (0.99) y el r^2 ajustado (0.99) concordaban razonablemente. El modelo mostró una precisión adecuada con un valor de 55.01.

Tabla 16. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades antioxidantes de las películas de quitosano.

	DPPH	ABTS*	Folin-Ciocalteu
r^2	0.9991	0.9990	0.9315
r^2 ajustada	0.9976	0.9975	0.9087
r^2 predicha	0.9930	0.9911	0.8340
Precisión	55.01	51.45	15.49

La Ecuación 13 predice los valores de DPPH de las películas de quitosano en función del contenido de glicerol (A) y NE (B):

$$\sqrt{\text{DPPH}} = -0.04 + 3.83 \cdot \text{Glicerol}(\%) + 1.03 \cdot \text{NE}(\%) - 0.06 \cdot \text{Glicerol}(\%) \cdot \text{NE}(\%) - 4.27 \cdot \text{Glicerol}^2(\%) - 0.02 \cdot \text{NE}^2(\%) \quad (13)$$

En la Figura 23 se muestra la predicción de los valores antioxidantes en base a las ecuaciones matemáticas dadas. En el caso del análisis DPPH (Figura 23.I), los valores aumentan drásticamente cuando el NE se añade a la composición, lo que ya se mencionó en el comentario

estadístico previamente. A raíz de estos resultados, se puede determinar que la capacidad antioxidante de las películas aumentó una vez añadido el NE (Güder & Korkmaz, 2012).

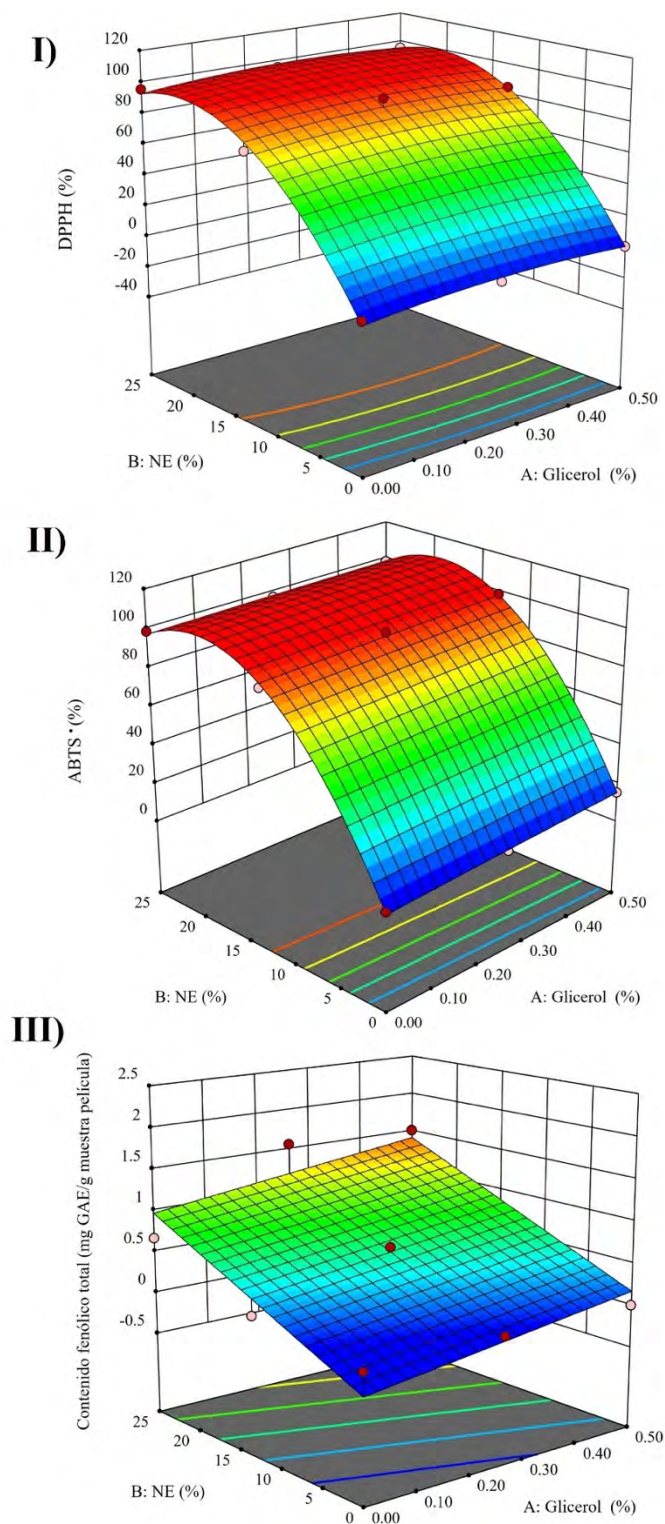


Figura 23. Predicción de los modelos de propiedades antioxidantes: I) DPPH (%), II) ABTS• y III) Contenido total fenólico (mg GAE/g de muestra de película). NE es el extracto de ortiga. Elaboración propia.

En cuanto al segundo análisis antioxidante, el ABTS*, los valores de las muestras oscilaron entre el 10.38 y el 98.71 % (Tabla 12). El F-valor del modelo fue 639.48, mientras que el *p*-valor fue < 0.05, lo que implica que el modelo era significativo. Los *p*-valor de la concentración de NE (B) y el efecto cuadrático de NE (B²) fueron los términos que tuvieron una respuesta significativa sobre la propiedad antioxidante. En cuanto a los F-valor, el contenido de NE (F-valor = 917.51) y el efecto cuadrático del contenido de NE (F-valor = 753.23) fueron con gran diferencia los valores que más afectaron a los valores de ABTS*. Respecto a los valores estadísticos de ajuste, el r² fue de 0.99, mientras que el r² predicho (0.99) y el r² ajustado (0.99) coincidieron totalmente. Por último, la precisión del modelo fue de 51.45, por lo que se consideró adecuada al ser un valor mayor a 4.

La Ecuación 14 estima la respuesta ABTS* en función de la concentración de glicerol y NE en las películas de quitosano:

$$\text{ABTS}^* = 9.24 + 13.68 \cdot \text{Glicerol} (\%) + 10.13 \cdot \text{NE} (\%) - 0.41 \cdot \text{Glicerol} (\%) \cdot \text{NE} (\%) - 2.64 \cdot \text{Glicerol}^2 (\%) - 0.26 \cdot \text{NE}^2 (\%) \quad (14)$$

En la Figura 23.II se observa la predicción del modelo de la propiedad ABTS*. En ella puede observarse el efecto significativo del NE sobre los valores antioxidantes. En la película pura de quitosano, el valor ABTS* fue del 10.38 % mientras que la adición de NE al 12.5 % ya produjo un aumento hasta el 92.32 %.

El tercer método para estimar la capacidad antioxidante fue el Folin-Ciocalteu. Los resultados sobre el TPC obtenido se encuentran en la Tabla 14. Los valores de las muestras de película oscilaron entre 0 y 1.57 mg GAE/g película. Estos datos se ajustaron a un modelo de raíz cuadrada según lo recomendado en el diagrama Box-Cox. En la Tabla 15 se presenta el análisis de la varianza de esta propiedad. El F-valor del modelo fue de 40.81 y el *p*-valor fue < 0.05, lo que confirma que el modelo era significativo. Únicamente la concentración de NE fue un término significativo (*p*-valor = 0.0001). En cuanto al F-valor, el NE (F-valor = 76.81) fue el factor que más afectó a esta propiedad. Los valores de la estadística de ajuste se muestran en la Tabla 16.

La Ecuación 15 predice la respuesta de TPC en películas de quitosano en función de la concentración de glicerol y NE:

$$\sqrt{\text{TPC}} = -0.10 + 0.55 \cdot \text{Glicerol} (\%) + 0.04 \cdot \text{NE} (\%) \quad (15)$$

En la Figura 23.III se observa la predicción del modelo para el TPC. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las películas de quitosano y las películas con NE en su composición. Este aumento de los valores de TPC en películas enriquecidas con NE proporciona una prueba más de la gran riqueza fenólica del extracto acuoso (Flórez, Cazón, & Vázquez, 2022b).

4.2.5 Evaluación de las propiedades ópticas

Las características de barrera frente a los rayos UV de las películas se evaluaron mediante los valores de transmitancia obtenidos en la región UV. La Tabla 17 muestra el porcentaje medio de transmitancia de las películas Ch_NE en las distintas regiones UV, mientras que la Figura 24 muestra el espectro UV de las películas analizadas. Las películas quitosano-NE presentaron valores de %T en la región UV-C que oscilaban entre 0.01 y 20.19 %. Los datos de las propiedades de barrera UV-C se ajustaron utilizando una ecuación logarítmica en base a lo recomendado por el diagrama Box-Cox. En la Tabla 18 se muestra que el F-valor del modelo fue de 269.95 y el p -valor < 0.0001 , lo que indica que el modelo es significativo. Los p -valor de los términos indicaron que los efectos lineales y cuadráticos de la concentración de NE (B y B²) fueron los únicos términos significativos ($p < 0.05$) con efecto como barrera frente a los rayos UV-C. Por otro lado, la presencia de glicerol no influyó en la transmisión de los rayos UV-C.

Tabla 17. Propiedades ópticas de las películas de quitosano (Ch) con glicerol (Gly) y extracto de ortiga (NE). El número en la muestra de película muestra el % (p/p) de ese compuesto.

	UV-C	UV-B	UV-A		
Muestra película	200–280 nm	280–315 nm	315–400 nm	Transparencia	Opacidad
	%T	%T	%T		
Ch_Gly0	17.20 ± 11.34	34.76 ± 22.57	47.32 ± 24.89	45.37	4.11
Ch_Gly0_NE12.5	0.52 ± 0.22	1.82 ± 0.65	11.43 ± 1.73	37.19	6.78
Ch_Gly0_NE25	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.03	2.46 ± 0.43	38.10	9.54
Ch_Gly0.25	20.19 ± 0.40	42.87 ± 0.74	58.31 ± 0.13	41.38	2.35
Ch_Gly0.25_NE12.5	0.21 ± 0.09	0.79 ± 0.29	9.97 ± 1.62	40.24	6.53
Ch_Gly0.25_NE25	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.02	3.60 ± 0.60	42.07	9.18
Ch_Gly0.5	15.58 ± 0.27	32.58 ± 0.59	51.01 ± 0.07	37.32	2.11
Ch_Gly0.5_NE12.5	0.18 ± 0.11	0.74 ± 0.38	8.53 ± 1.77	36.45	7.48
Ch_Gly0.5_NE25	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	2.55 ± 0.20	34.50	8.42

% T es el porcentaje de transmitancia.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

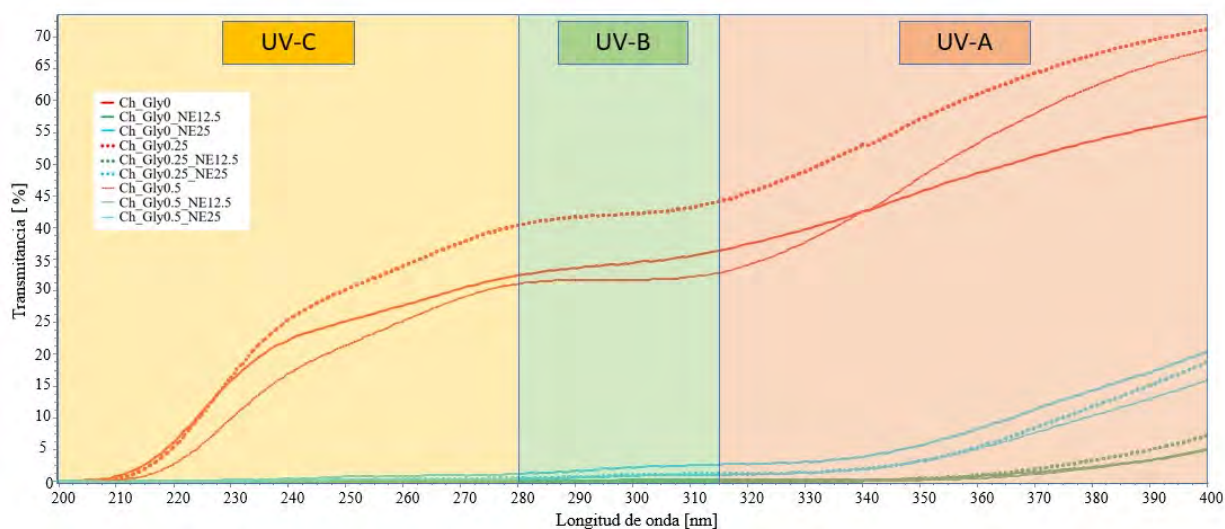


Figura 24. Perfil de los espectros UV de películas de quitosano (Ch) con diferentes concentraciones de glicerol (Gly) (0, 0.25 y 0.5 %) y extracto de ortiga (NE) (0, 12.5 y 25 %). Elaboración propia.

Tabla 18. Análisis de varianza de las propiedades ópticas de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.

	UV-C 200–280 nm		UV-B 280–315 nm		UV-A 315–400 nm		Transparencia	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
	Opacidad		L*		a*		b*	
Modelo	269.95	<0.0001	362.39	<0.0001	250.01	<0.0001	2.40	0.1708
A			9.58	0.0270			3.05	0.1311
B	434.68	<0.0001	521.71	<0.0001	374.02	<0.0001	1.75	0.23
AB			8.15	0.0356				
A ²								
B ²	11.85	0.0138			3.19	0.1242		
	Opacidad		L*		a*		b*	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	39.29	0.0003	58.37	0.0034	134.29	1.04·10 ⁻⁵	347.01	6.29·10 ⁻⁷
A	1.31	0.2955	4.23	0.1316	3.07	0.1299	1.37	0.2854
B	77.28	0.0001	109.28	0.0018	265.51	3.40·10 ⁻⁶	692.64	1.98·10 ⁻⁷
AB			0.06	0.8144				
A ²			4.44	0.1255				
B ²			24.42	0.0158				

L*, luminosidad: negro = 0 y blanco = 100; a*, verde = -a* y rojo = +a*); b*, azul = -b* y amarillo = +b*.

Tabla 19. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades ópticas de las películas de quitosano.

	UV-C 200–280 nm	UV-B 280–315 nm	UV-A 315–400 nm	Transparencia
	Opacidad	L*	a*	b*
r ²	0.9890	0.9954	0.9881	0.4450
r ² ajustada	0.9853	0.9927	0.9842	0.2601
r ² predicha	0.9753	0.9809	0.9733	-0.23
Precisión	32.49	44.70	31.52	4.34
r ²	0.9290	0.9898	0.9781	0.9914
r ² ajustada	0.9054	0.9728	0.9708	0.9885
r ² predicha	0.8419	0.8881	0.9627	0.9830
Precisión	14.05	18.25	25.52	38.87

L*, luminosidad: negro = 0 y blanco = 100; a*, verde = -a* y rojo = +a*); b*, azul = -b* y amarillo = +b*

Los resultados relacionados con la estadística de ajuste se encuentran representados en la Tabla 19. En la propiedad UV-C se obtuvo un r^2 de 0.98, mientras que el r^2 ajustado fue de 0.98 y el r^2 predicho fue de 0.97. Al haber una diferencia entre ambos valores mayor de 0.20 se considera que existe una concordancia razonable del modelo. El modelo también mostró una señal adecuada (32.49) al ser mayor de 4.

La Figura 25.I muestra visualmente la predicción calculada de la propiedad UV-C. Por otro lado, la Ecuación 16 predice la respuesta UV-C en términos de factores reales de concentración de glicerol y NE:

$$\text{Ln (UV- C) (\%)} = 1.249 - 0.173 \cdot \text{NE (\%)} + 0.003 \cdot \text{NE}^2 (\%) \quad (16)$$

En cuanto a la transmitancia UV-B, esta mostró valores de 0.01 a 42.87 % (Tabla 17). En cuanto a los valores de ANOVA presentados en la Tabla 18, el modelo tenía un F-valor de 362.39 y el p -valor fue < 0.0001 , por lo que el modelo era significativo. Realmente todos los términos eran significativos, ya que todos los p -valor eran < 0.05 . En cuanto a los F-valor del modelo, el efecto lineal del NE fue el término con el valor más alto, lo que hacía que fuese el más influyente. Los resultados estadísticos de ajuste (Tabla 19) indicaron un r^2 de 0.99, un r^2 predicho de 0.98 y un r^2 ajustado de 0.99. El modelo mostró una concordancia razonable y una precisión adecuada de 44.70.

La Ecuación 17 pronostica la respuesta UV-B en función de las concentraciones de glicerol y NE, mientras que la predicción de la propiedad UV-B se representa en la Figura 25.II:

$$\text{Ln (UV- B) (\%)} = 1.58 - 0.07 \cdot \text{Glicerol (\%)} - 0.11 \cdot \text{NE (\%)} - 0.05 \cdot \text{Glicerol (\%)} \cdot \text{NE (\%)} \quad (17)$$

Los valores de la propiedad UV-A oscilaron entre el 2.46 y el 58.31 % (Tabla 17). El modelo matemático resultó significativo (Tabla 18), ya que su p -valor fue < 0.0001 y F-valor fue 250.01. El único término que fue significativo fue el efecto lineal de NE (p -valor ≤ 0.0001). En cuanto al F-valor, los términos con valores más altos fueron el efecto lineal del NE (F-valor = 374.02) y el efecto cuadrático del NE (F-valor = 3.19). La estadística de ajuste presentada en la Tabla 19 mostró valores de r^2 de 0.98. El r^2 ajustado (0.98) y el r^2 predicho (0.97) concordaban

razonablemente al tener una diferencia menor a 0.20. La precisión del modelo fue de 31.52, por lo que había una discriminación adecuada del modelo.

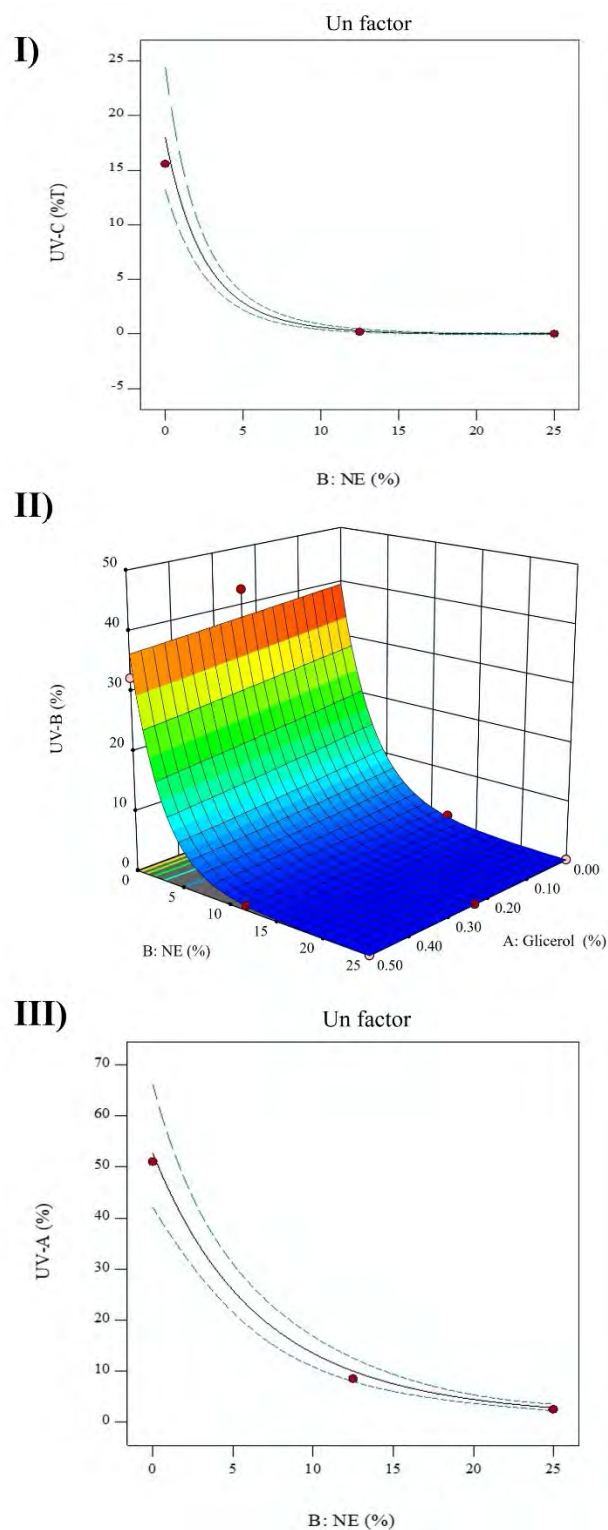


Figura 25. Predicción de los modelos para la transmitancia UV: I) UV-C (%T), II) UV-B (%T) y III) UV-A (%T). NE es extracto de ortiga. Elaboración propia.

La Figura 25.III representa la predicción calculada de la transmitancia UV-A. Por otro lado, la Ecuación 18 predice la respuesta de esta propiedad UV:

$$\text{Ln (UV- A) (\%)} = 1.7161 - 0.0646 \cdot \text{NE (\%)} + 0.0005 \cdot \text{NE}^2 (\%) \quad (18)$$

A raíz de estos resultados comentados, se puede determinar que la adición de NE ejerció una fuerte disminución en la transmitancia de la luz UC en la comparación con la película de quitosano. De hecho, la transmisión más baja se encontró en las películas que tenían una mayor concentración de extracto. Estos resultados confirman que las películas de quitosano-NE pueden retardar la oxidación lipídica inducida por la luz UV en sistemas alimentarios debido a su gran efecto barrera.

Por otro lado, el color y la opacidad de las películas se determinaron a partir de los valores de transmitancia en la región visible. La Tabla 17 muestra que los valores de transparencia en las películas de quitosano puro oscilaron entre 37.32 y 45.37. La adición de NE a la matriz provocó una ligera disminución de la transparencia (34.50 – 42.07). Sin embargo, el modelo matemático obtenido no fue significativo, lo que se traduce en que la transparencia de las muestras no depende de su formulación. El F-valor y *p*-valor del modelo fueron de 2.40 y 0.1708, respectivamente (Tabla 18). Al tratarse de un modelo no significativo, ninguno de sus términos implicados tuvo un *p*-valor < 0.05. Los resultados de las estadísticas de ajuste (Tabla 19) indicaron un r^2 de 0.44. El r^2 ajustado y el r^2 predicho fueron de 0.26 y -0.23, respectivamente. La precisión fue adecuada al tener un valor de 4.34. En base a estos resultados, se puede deducir que el modelo carece de fiabilidad estadística y no debe utilizarse.

Respecto a los valores de opacidad presentados en la Tabla 17, estos aumentaron de 2.11 a 9.54 al añadir NE a la composición de la película. En este caso, el modelo matemático fue significativo, mostrando un F-valor de 39.29 y un *p*-valor de 0.0003 (Tabla 18). Los *p*-valor de los términos indicaron que el efecto lineal de la concentración de NE era el único término significativo (*p*-valor = 0.0001). Este mismo resultado se observó en cuanto al F-valor, donde el efecto lineal del NE tuvo el F-valor más alto (77.28), lo que explica que el NE tiene un gran efecto en la opacidad de la película. En cuanto a los valores estadísticos de ajuste (Tabla 19), el

r^2 fue de 0.92, el r^2 predicho de 0.84 y el r^2 ajustado de 0.90. Esto indica que había una concordancia razonable del modelo, además de tener una precisión adecuada de 14.05.

La Ecuación 19 predice la respuesta de la opacidad en términos de los factores reales de la concentración de glicerol y NE en las películas:

$$\text{Opacidad} = 3.58 - 1.61 \cdot \text{Glicerol} (\%) + 0.24 \cdot \text{NE} (\%) \quad (19)$$

La Figura 26 muestra la predicción del modelo para la opacidad de las películas. Este aumento de la opacidad puede atribuirse al color tan saturado del NE. Además, cuando se añadió NE a la matriz, la estructura tendió a volverse más blanquecina en comparación con la película de quitosano puro. Esto podría atribuirse a la hidrofilia de los compuestos polifenólicos presentes en el NE (Riaz et al., 2020).

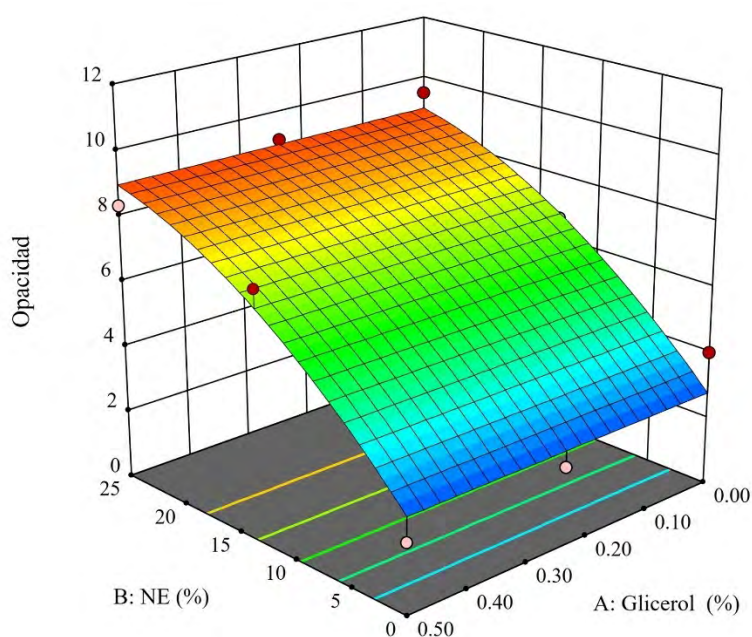


Figura 26. Predicción del modelo para la opacidad de las películas. NE es extracto de ortiga. Elaboración propia.

Las coordenadas CIE de las películas quitosano-NE se muestran en la Tabla 20. La luminosidad varió de 72.08 a 91.39. La adición de NE a las películas de quitosano tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$), dando lugar a una disminución de los valores de L^* . Esto se interpreta como un oscurecimiento de la película al aplicar el extracto de ortiga. El F-valor del

modelo fue de 58.37 y el p -valor de 0.0034, lo que indica que el modelo fue significativo. Según los p -valor, solo los efectos lineales y cuadráticos de la concentración de NE eran significativos (p -valor < 0.05). En a los F-valor, los términos que tuvieron más influencia en la luminosidad fueron el efecto lineal de NE (F-valor = 109.28) y el efecto cuadrático del NE (F-valor = 24.48) (Tabla 18). El ajuste estadístico nos aportó valores de r^2 de 0.98, mientras que el r^2 ajustada fue de 0.97 y el r^2 predicha fue de 0.88, respectivamente. El modelo contaba con una precisión adecuada del 18.25, lo que indica que el modelo concuerda razonablemente (Tabla 19).

La Ecuación 20 predice los valores L^* de las películas de quitosano, mientras que la predicción de su modelo se muestra en la Figura 27.I:

$$L^* = 90.17 + 16.49 \cdot \text{Glicerol} (\%) - 1.45 \cdot \text{NE} (\%) - 0.05 \cdot \text{Glicerol} (\%) \cdot \text{NE} (\%) - 32.13 \cdot \text{Glicerol}^2 (\%) + 0.03 \cdot \text{NE}^2 (\%) \quad (20)$$

Tabla 20. Parámetros de color de las películas a base de quitosano. Ch es quitosano, Gly es glicerol, NE es extracto de ortiga. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestras	L^*	a^*	b^*
Ch_Gly0	90.19 ± 0.01 ^a	-0.22 ± 0.04 ^c	2.12 ± 0.19 ^a
Ch_Gly0_NE12.5	77.32 ± 1.53 ^{bc}	-2.10 ± 0.19 ^b	14.15 ± 1.19 ^b
Ch_Gly0_NE25	72.08 ± 0.47 ^b	-3.82 ± 0.06 ^c	26.20 ± 1.39 ^c
Ch_Gly0.25	91.28 ± 0.36 ^a	-0.28 ± 0.03 ^a	2.51 ± 0.04 ^a
Ch_Gly0.25_NE12.5	79.45 ± 1.36 ^c	-2.95 ± 0.12 ^d	15.58 ± 1.60 ^b
Ch_Gly0.25_NE25	74.69 ± 1.24 ^{bc}	-4.41 ± 0.12 ^e	24.19 ± 1.38 ^c
Ch_Gly0.5	91.39 ± 0.52 ^a	-0.53 ± 0.06 ^a	3.23 ± 0.08 ^a
Ch_Gly0.5_NE12.5	75.22 ± 3.56 ^{bc}	-2.53 ± 0.15 ^f	16.13 ± 0.98 ^b
Ch_Gly0.5_NE25	72.59 ± 0.69 ^b	-4.33 ± 0.02 ^e	26.18 ± 0.46 ^c

L^* . luminosidad: negro = 0 y blanco = 100; a^* . verde = - a^* y rojo = + a^* ; b^* . azul = - b^* y amarillo = + b^* .

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

las películas tienden al verde. Esto es un hecho evidente debido al color verde intenso del extracto de ortiga. El modelo matemático obtenido fue también significativo, con un F-valor de 134.29 y p -valor de $1.04 \cdot 10^{-5}$. El único término del modelo que fue significativo fue la concentración de NE (p -valor = $3.40 \cdot 10^{-6}$), además de tener el mayor valor de F-valor (F-valor = 265.51) en la propiedad a^* (Tabla 18). El r^2 fue de 0.97, el r^2 ajustada fue de 0.97 y el r^2 predicho fue de 0.96, lo que indica una concordancia razonable. Además, el modelo tenía una precisión adecuada de 25.52 (Tabla 19). La Figura 27.II representa la predicción del modelo para la propiedad de a^* de las películas de quitosano basado en la Ecuación 21:

$$a^* = -0.22 - 0.82 \cdot \text{Glicerol (\%)} - 0.15 \cdot \text{NE (\%)} \quad (21)$$

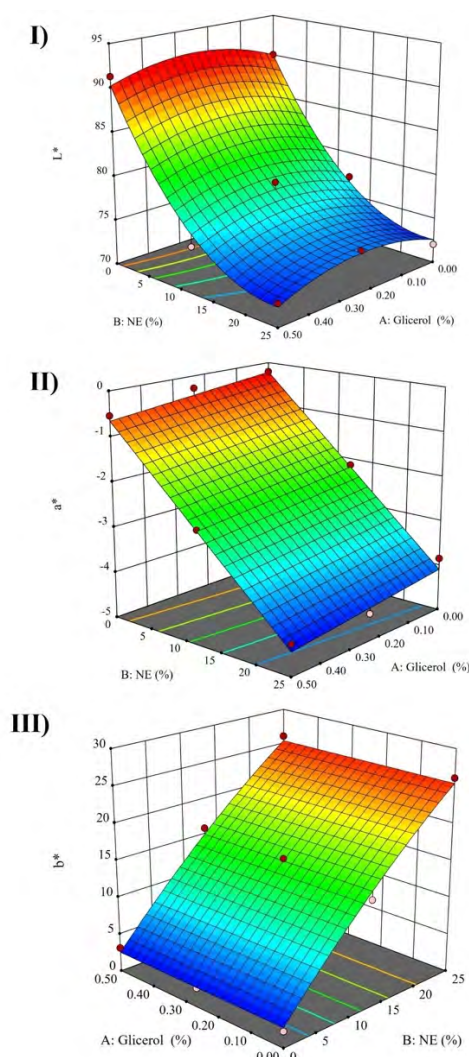


Figura 27. Predicción de los modelos para las coordenadas CIE: I) L^* , II) a^* y III) b^* . NE es extracto de ortiga. Elaboración propia.

En cuanto a los valores de b^* , las películas con NE en su composición presentaron una tendencia al amarilleamiento, con valores que oscilaron entre 2.12 y 26.20 (Tabla 20). El modelo matemático tenía un F-valor de 347.01 y p-valor de $6.29 \cdot 10^{-7}$, lo que indica que era significativo. Igual que en la propiedad b^* , el término con p-valor < 0.05 y el mayor F-valor (692.64) fue el efecto lineal del NE (Tabla 18). Respecto a los valores estadísticos de ajuste, r^2 fue de 0.99, el r^2 predicho de 0.98 y el r^2 ajustado de 0.98. Esto significa que existía una concordancia razonable del modelo, además de tener una precisión adecuada de 38.87 (Tabla 19).

La predicción del modelo para el parámetro b^* de las películas de quitosano basada en la Ecuación 22 se encuentra representada en la Figura 27.III:

$$b^* = 2.51 + 2.04 \cdot \text{Glicerol (\%)} + 0.91 \cdot \text{NE (\%)} \quad (22)$$

4.2.6 Evaluación de las propiedades mecánicas

Los resultados obtenidos de la evaluación de las propiedades mecánicas de las películas de quitosano-NE se encuentran representados en la Tabla 21.

Tabla 21. Propiedades de tracción de las películas de quitosano. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra película	TS	%E	YM
	MPa	%	MPa
Ch_Gly0	58.02 ± 7.26^{ab}	3.43 ± 0.90^a	1535.92 ± 121.43^a
Ch_Gly0_NE12.5	52.99 ± 1.84^a	3.15 ± 0.19^a	1445.90 ± 158.28^a
Ch_Gly0_NE25	35.13 ± 4.07^b	4.90 ± 2.25^a	948.68 ± 106.63^b
Ch_Gly0.25	24.66 ± 0.99^c	11.71 ± 1.50^b	810.81 ± 121.22^c
Ch_Gly0.25_NE12.5	13.93 ± 1.23^d	25.20 ± 4.31^{bc}	140.62 ± 41.51^d
Ch_Gly0.25_NE25	6.76 ± 0.84^c	21.64 ± 4.44^c	26.24 ± 5.10^d
Ch_Gly0.5	6.98 ± 1.91^c	25.22 ± 5.73^c	18.92 ± 1.38^d

Ch_Gly0.5_NE12.5	6.18 ± 0.43 ^e	19.57 ± 1.55 ^c	51.08 ± 9.49 ^d
Ch_Gly0.5_NE25	1.81 ± 0.09 ^e	21.81 ± 0.99 ^c	4.43 ± 0.67 ^d

Ch es quitosano, Gly es glicerol, NE es extracto de ortiga, TS es resistencia a la tracción, %E es alargamiento a la rotura y YM es módulo de Young.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El ensayo de tracción para la película quitosano-NE mostró valores en el rango 1.81 – 58.02 MPa (Tabla 21). Los datos se ajustaron correctamente a un modelo cuadrático. El F-valor fue de 78.15 y el p -valor de 0.0022, indicando que el modelo era significativo. Los p -valor de los términos mostraron que sólo el efecto cuadrático del glicerol (A2) tenía un efecto significativo sobre la TS con un F-valor de 30.04. El efecto lineal de la concentración de glicerol y del NE tuvo un efecto insignificante sobre la TS, como lo demuestran sus respectivos p -valor y F-valor (Tabla 22). En la Tabla 23 se muestra los valores estadísticos ajustes de las propiedades mecánicas. En el caso de la TS indicaron un r^2 de 0.99, un r^2 predicho de 0.93 y un r^2 ajustado de 0.98 concordando razonablemente, además de tener una precisión adecuada de 23.88.

Tabla 22. Análisis de varianza para las propiedades mecánicas de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.

	TS		%E		YM	
	F-valor	p -valor	F-valor	p -valor	F-valor	p -valor
Modelo	78.15	0.0022	8.17	0.0193	23.59	0.0014
A	0.13	0.7422	16.01	0.0070	40.40	0.0007
B	2.73	0.1969	0.33	0.5829	6.77	0.0406
AB	8.56	0.0611				
A ²	30.04	0.0119				
B ²	0.99	0.3912				

TS es la resistencia a la tracción, %E es el porcentaje de alargamiento a la rotura, YM es el módulo de Young.

Tabla 23. Estadístico de ajuste del modelo obtenido para las propiedades mecánicas de las películas de quitosano.

	TS	%E	YM
r^2	0.9923	0.7316	0.8872
r^2 ajustada	0.9796	0.6421	0.8495
r^2 predicha	0.9273	0.5269	0.7285
Precisión	23.88	6.48	12.66

TS es la resistencia a la tracción, %E es el porcentaje de alargamiento a la rotura, YM es el módulo de Young.

La ecuación 23 predice los valores de TS de las películas de quitosano en función de las concentraciones de glicerol y NE. La Figura 28.I muestra la predicción del modelo para la propiedad TS dada por la Ecuación 23:

$$TS = 60.09 - 19.904 \cdot \text{Glicerol (\%)} - 0.062 \cdot \text{NE (\%)} + 0.0141 \cdot \text{Glicerol (\%)} \cdot \text{NE (\%)} + 1.8776 \cdot \text{Glicerol}^2 (\%) - 0.0001 \cdot \text{NE}^2 (\%) \quad (23)$$

En la Figura 28.I podemos observar la fuerte disminución de los valores de TS cuando el glicerol era adicionado a la formulación. Sin embargo, el contenido de NE en la matriz no provocó una gran diferencia entre las muestras con glicerol. Este comportamiento de las películas podría estar relacionado con la reducción de las interacciones intermoleculares entre las cadenas de quitosano cuando el NE está presente en la composición (Mir, Dar, Wani, & Shah, 2018). La presencia de flavonoides y ácido fenólico en el extracto dio lugar a interacciones intermoleculares entre las cadenas de quitosano se debilitaran (Đurović et al., 2017).

Respecto al análisis de la elongación a la rotura, este mostró valores de %E comprendidos entre el 3.15 y el 25.22 % (Tabla 21). Los datos se ajustaron correctamente a un modelo lineal (Tabla 22). El F-valor del modelo fue de 8.17, mientras que el p -valor fue de 0.0193 indicando que el modelo era significativo. En cuanto a los términos del modelo, únicamente la concentración de glicerol (p -valor = 0.0070) tuvo un efecto estadísticamente significativo.

Según el modelo matemático predictivo, el NE no afectó a la propiedad de %E (Tabla 23). Los valores estadísticos de ajuste fueron r^2 de 0.73, r^2 predicho de 0.53 y r^2 ajustado de 0.64. Los

valores de r^2 predicho y ajustado estaban en razonable acuerdo, mientras que la precisión (6.48) indicaba una señal adecuada.

La %E de las películas puede predecirse utilizando la Ecuación 24, y su modelo predictivo se encuentra en la Figura 28.II:

$$\%E = 4.66 + 3.674 \cdot \text{Glicerol} (\%) + 0.010 \cdot \text{NE} (\%) \quad (24)$$

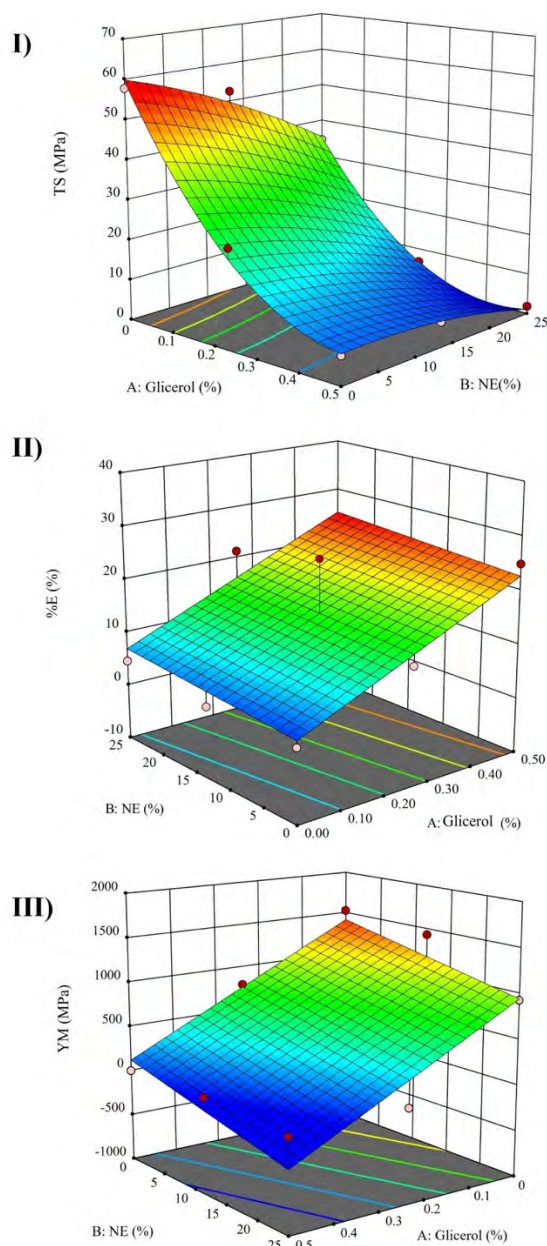


Figura 28. Predicción de los modelos para las propiedades mecánicas: TS es la resistencia a la tracción, %E es el porcentaje de alargamiento a la rotura, YM es el módulo de Young. NE es extracto de ortiga. Elaboración propia.

En base a la Figura 28.II, se reveló que la concentración de glicerol incrementaba la propiedad de %E. Sin embargo, a bajas concentraciones de glicerol, el efecto plastificante del glicerol se vio potenciado por la presencia del NE, incluso duplicando los valores de %E. Si se tienen en cuenta de manera conjunta los valores de TS y %E, puede deducirse que a bajas concentraciones de glicerol, la presencia de polifenoles (como puede ser luteolina, ácido gálico, ácido gentísico, etc) y polisacáridos como la pectina presente en el NE, reduce las interacciones de la cadena polimérica. Esto provoca una disminución de los valores de TS y un aumento de los valores de %E. Sin embargo, a mayor concentración de glicerol, la resistencia a la rotura de la película disminuye significativamente, lo que provoca limitaciones en los valores de %E (Cegledi, Garofulić, Zorić, Roje, & Dragović-Uzelac, 2022).

Los valores del Módulo de Young de las películas oscilaron entre 4.43 y 1535.92 MPa (Tabla 21). Los datos se ajustaron a una ecuación logarítmica natural, tal y como recomendaba el gráfico Box-Cox. El análisis estadístico indicó que el modelo tenía un F-valor de 23.59 y un *p*-valor de 0.0014, lo que indica que el modelo era significativo. En cuanto a los *p*-valor de los términos, el glicerol y la concentración de NE eran significativos. Los F-valor mostraron que el efecto del contenido de glicerol (F-valor = 40.40) era mayor que el efecto del NE en la propiedad de YM de las películas de quitosano (Tabla 22). El ajuste estadístico aportó valores de r^2 de 0.88, de r^2 ajustada de 0.84 y r^2 predicha de 0.72. Esto significa que hay una concordancia razonable entre los valores, mientras que la precisión era de 12.66 (Tabla 23) La Ecuación 25 predice los valores de YM, y la esta predicción se muestra en la Figura 28.III:

$$\ln(YM) = 3.49 - 0.379 \cdot \text{Glicerol (\%)} - 0.003 \cdot \text{NE (\%)} \quad (25)$$

Basándose en estos resultados, se puede determinar que el glicerol ejerció un efecto plastificante con una reducción drástica de la TS y YM, mientras se producía un incremento de la %E (Dicharry et al., 2006). Cuando el NE se añadía a la formulación, las películas adquirirían una estructura menos rígida al reducirse la cohesión de las fuerzas que conforman la red polimérica (Flórez et al., 2022a). Este efecto plastificante se vio ligeramente potenciado por la presencia de NE, siendo más prominente a bajas concentraciones de glicerol y especialmente en las propiedades de TS y YM. Un comportamiento similar se observó en películas de quitosano con la adición de extracto de fruto de *Berberis crataegina* (Kaya et al., 2018).

En cuanto a los ensayos de punción, la Tabla 24 muestra los resultados de las propiedades de BS y DB. Los valores de BS oscilaron entre 849 y 3465.61 g. Los datos se ajustaron adecuadamente a un modelo cuadrático. El análisis de la varianza del modelo (Tabla 25) mostró un F-valor de 2721.56 y un p -valor < 0.0001 . En este caso, todos los términos del modelo fueron significativos ($p < 0.05$). La concentración de glicerol (F-valor = 847.17) fue el término que promovió mayores alteraciones en la propiedad BS, seguido de la interacción entre el glicerol y el contenido de NE (F-valor = 714.25). El modelo dio un valor de r^2 de 0.99, mientras que el r^2 predicho (0.99) concordaba razonablemente con el r^2 ajustado (0.99). La precisión adecuada (154.74) fue muy alta, lo que indica una señal adecuada (Tabla 26).

Tabla 24. Propiedades de punción de las películas de quitosano. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra películas	BS	DB
	g	mm
Ch_Gly0	3465.61 $\pm$ 1564.82 ^a	3.21 $\pm$ 1.00 ^a
Ch_Gly0_NE12.5	2704.73 $\pm$ 428.40 ^{bc}	4.07 $\pm$ 0.19 ^{ab}
Ch_Gly0_NE25	1351.99 $\pm$ 338.48 ^{abc}	3.74 $\pm$ 0.89 ^{abc}
Ch_Gly0.25	2779.13 $\pm$ 838.50 ^{ab}	4.96 $\pm$ 0.73 ^{bcd}
Ch_Gly0.25_NE12.5	2331.10 $\pm$ 298.02 ^{bc}	5.78 $\pm$ 0.23 ^{cd}
Ch_Gly0.25_NE25	1269.89 $\pm$ 397.87 ^{abc}	5.59 $\pm$ 0.65 ^d
Ch_Gly0.5	1860.29 $\pm$ 228.03 ^{abc}	5.46 $\pm$ 0.26 ^{cd}
Ch_Gly0.5_NE12.5	1630.18 $\pm$ 375.40 ^c	5.06 $\pm$ 0.16 ^{bcd}
Ch_Gly0.5_NE25	849.00 $\pm$ 121.14 ^{abc}	5.07 $\pm$ 0.10 ^{bcd}

Ch es quitosano, Gly es glicerol, NE es extracto de ortiga, BS es resistencia al estallido y DB es distancia al estallido.

Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 25. Análisis de varianza para las propiedades de punción de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y NE (% v/v), respectivamente.

	BS		DB	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	2721.56	<0.0001	9.99	0.0435
A	846.17	<0.0001	5.59	0.0991
B	682.51	0.0001	0.00	0.9469
AB	714.25	0.0001	1.76	0.2765
A ²	105.44	0.0020	16.92	0.0260
B ²	402.83	0.0003	1.48	0.3106

BS es la resistencia a la rotura, DB es la distancia a la rotura.

Tabla 26. Estadístico de ajuste del modelo obtenido para las propiedades de punción de las películas de quitosano.

	BS	DB
r ²	0.9997	0.9433
r ² ajustada	0.9994	0.8489
r ² predicha	0.9975	0.3411
Precisión	154.74	8.57

BS es la resistencia a la rotura, DB es la distancia a la rotura.

La Ecuación 26 predice el parámetro BS en función de las concentraciones de glicerol y NE en las películas de quitosano:

$$BS = 3457.82 - 202.631 \cdot \text{Glicerol (\%)} - 3.700 \cdot \text{NE (\%)} + 0.8818 \cdot \text{Glicerol (\%)} \cdot \text{NE (\%)} - 23.9584 \cdot \text{Glicerol}^2 (\%) - 0.0187 \cdot \text{NE}^2 (\%) \quad (26)$$

La Figura 29.I muestra la predicción del modelo para la propiedad de BS. Como se puede observar, tanto el glicerol como el extracto de ortiga provocaron una disminución de los valores de BS. La película de quitosano puro (sin glicerol ni NE) mostraron el valor de BS más alto (3465.61 g).

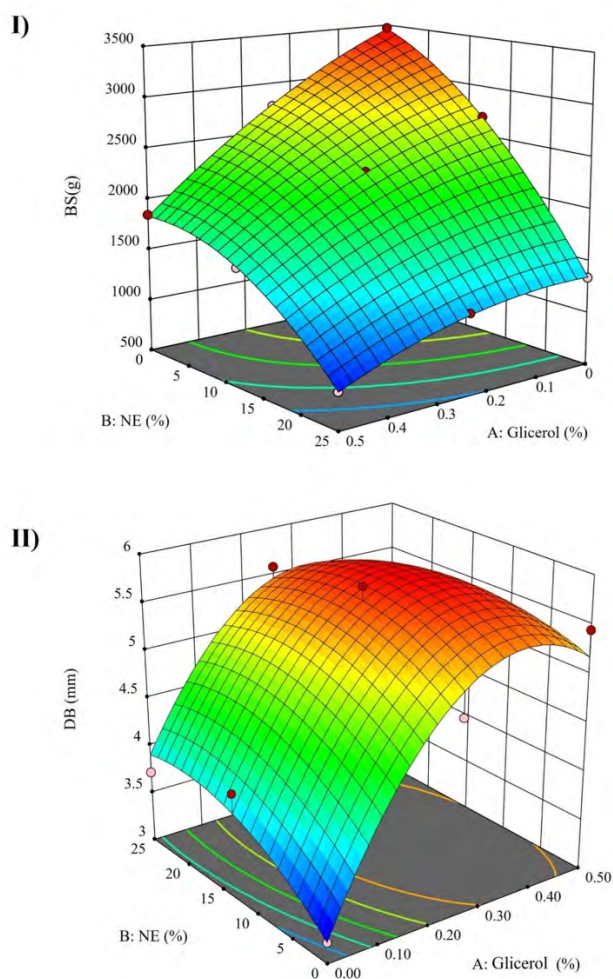


Figura 29. Predicción de los modelos para las propiedades mecánicas: I) BS es la resistencia a la rotura, II) DB es la distancia a la rotura. NE es extracto de ortiga. Elaboración propia.

Los valores de DB de las películas sometidas a la fuerza de punción oscilaron entre 3.21 y 5.78 mm (Tabla 24). El F-valor del modelo fue de 9.99 y el p -valor de 0.04, lo que significa que el modelo era significativo. Los p -valor mostraron que únicamente el término cuadrático del glicerol (A^2) tenía un efecto significativo sobre la DB (Tabla 25). El valor de r^2 fue de 0.94, el del r^2 predicho de 0.34 y el del r^2 ajustado de 0.84. Esto indica que los valores no fueron tan próximos como cabría esperar y se considera que no existe concordancia entre ellos. Sin embargo, la precisión del modelo fue adecuada (8.57) (Tabla 26).

La Ecuación 27 predice la respuesta DB de las películas de quitosano en función de la concentración de glicerol y NE:

$$DB = 3.21 + 1.203 \cdot \text{Glicerol (\%)} + 0.007 \cdot \text{NE (\%)} - 0.0007 \cdot \text{Glicerol (\%)} \cdot \text{NE (\%)} - 0.1613 \cdot \text{Glicerol}^2 (\%) \quad (27)$$

La Figura 29.II muestra la predicción del modelo para la DB. La adición de glicerol a la matriz aumentó claramente los valores de DB. Las películas sin glicerol tenían un valor de 3.21 mm, mientras que para las películas con mayor concentración de glicerol (0.5 %) tenía un valor de 5.46 mm. En general, la incorporación de glicerol y NE produjo una disminución de la BS y un aumento de la DB. El impacto y la tendencia que se observaron en los parámetros del ensayo de tracción también se observaron en el ensayo de punción, demostrando un efecto significativo ($p < 0.05$). El glicerol a las concentraciones evaluadas mostró un claro comportamiento plastificante, además de actuar como un lubricante interno, facilitando la movilidad de las cadenas poliméricas al reducir las fuerzas de fricción entre las cadenas de quitosano. Asimismo, la presencia de NE redujo las interacciones quitosano-quitosano, para formar nuevas interacciones, probablemente más débiles, resultando en una reducción de los valores de BS y un aumento de DB.

4.2.7 Evaluación de las propiedades térmicas

La Figura 30 muestra los termogramas de las películas de quitosano, puras o enriquecidas con extracto de ortiga hasta 25 % y con glicerol de 0 a 0.5%.

Las curvas termogravimétricas mostraron la degradación en tres pasos principales. El primer paso se observó a temperaturas entre 50 y 150 °C, donde la pérdida de masa puede atribuirse a la evaporación del agua (10-15 % de pérdida de peso para cada película) (Kaya et al., 2018). El segundo paso, que se produjo entre los 150 y 285 °C, se atribuye a una pérdida de peso relacionada con la evaporación de glicerol (Dou, Dupont, Williams, Chen, & Ding, 2009). La pérdida de masa en esta etapa fue próxima al porcentaje en peso de glicerol en la composición. Por este motivo, la curva de la pérdida de masa fue más pronunciada en aquellas películas con una concentración de glicerol de 0.5 %. Finalmente, la mayor pérdida de peso se produjo entre los 240 y 350 °C debido a la desnaturalización de la estructura polimérica del quitosano y del NE (Zawadzki & Kaczmarek, 2010).

Como se observa en la Figura 31, la pérdida de peso siguió una tendencia muy similar tanto en las películas de quitosano puro como en las que tenían NE en su composición. A 275 °C, las pérdidas de peso totales de las muestras aumentaron con la concentración de glicerol, siendo de 25.90 % para Ch_Gly0, 51.28 % para Ch_Gly0.5, 32.98 % para Ch_Gly0_NE25 y 46.59 % para las muestras de Ch_Gly0.5_NE25.

Las películas de quitosano mostraron picos endotérmicos entre 75 y 295 °C. Todas las muestras de películas presentaron dos picos a 75 °C y a 140-150 °C, respectivamente, lo que indica la volatilización de sustancias gaseosas y la pérdida de estructura de las cadenas de quitosano (Zhang et al., 2020). De hecho, esta temperatura es inferior al valor de 205 °C para el quitosano puro que se ha reportado previamente (Sakurai, Maegawa, & Takahashi, 2000). Esto se atribuyó a los efectos del plastificante en las películas (Mathew, Brahmakumar, & Abraham, 2007). Por otro lado, el pico endotérmico de 295 °C se debe a la temperatura de inversión de fase para la descomposición del quitosano. Sin embargo, la temperatura de inversión de fase se redujo con la adición de NE, bajando hasta los 275 °C, lo que resultó en una ligera disminución de la estabilidad térmica (Park & Zhao, 2004).

A partir de estos resultados, se puede determinar que las interacciones generadas entre el quitosano y el NE alteraron ligeramente la estabilidad térmica de las películas. Además, la estabilidad de las películas no se vio alterada a 120 °C, lo que permite su aplicación en procesos térmicos alimentarios llevados a cabo a temperaturas de esterilización. Se observó una tendencia similar en las películas de quitosano con extractos polifenólicos como extractos de té verde o negro (Peng, Wu, & Li, 2013).

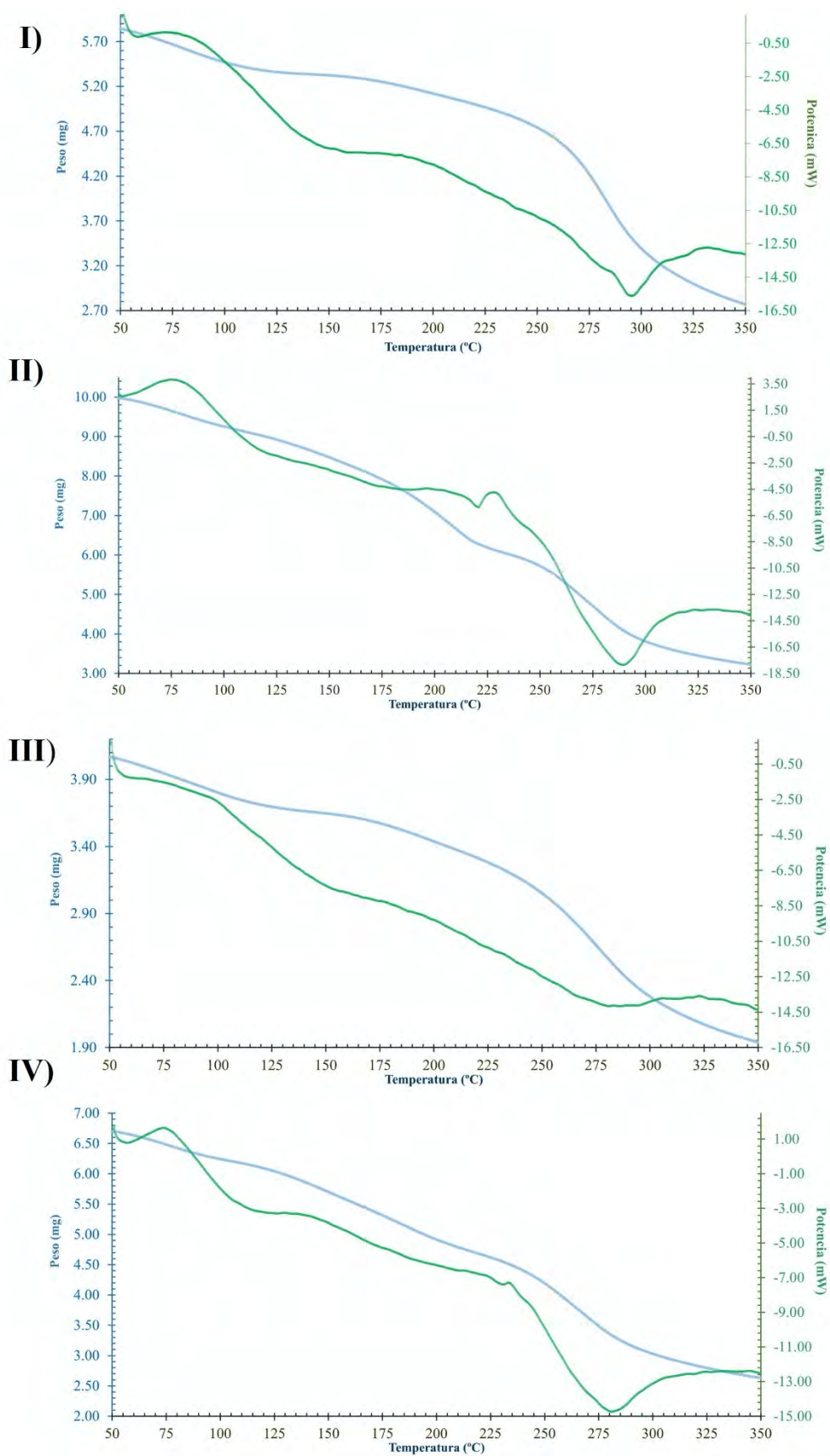


Figura 30. Termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido de películas de quitosano-NE. Elaboración propia.

4.2.8 Evaluación de la estabilidad antioxidante del queso Havarti con separadores de lonchas activos

El queso tipo Havarti suele tener un contenido graso entre 300 – 450 g/kg de grasa. En nuestro caso, el queso tenía un contenido de 380 g/kg de grasa. Las propiedades antioxidantes de las películas quitosano-NE como separadores de lonchas de queso Havarti se testaron durante 45 días. La Figura 31 presenta las muestras de queso selladas en bolsas de PA/PE al vacío utilizando diferentes formulaciones de películas como separadores de lonchas.



Figura 31. Queso Havarti con separador de lonchas de película de poliamida/polietileno (PA/PE), película de quitosano puro (Ch) y película de quitosano-NE (NE es extracto de ortiga). Elaboración propia.

Los valores de DPPH y ABTS* de los separadores de lonchas desarrollados se midieron a lo largo del tiempo de prueba (45 días) para evaluar la estabilidad de la capacidad antioxidante de las películas (Tabla 27).

Las películas utilizadas como control (películas PA/PE), mostraron valores residuales de DPPH del 4.13 al 7.63 %, y valores de ABTS* del 4.63 al 10.10 %. A partir de estos resultados no se pudo considerar que la película tuviera una capacidad antioxidante relevante debido a los valores tan bajos observados. Se obtuvieron resultados similares al analizar la película de quitosano puro, mostrando valores de DPPH que oscilaban entre el 2.84 y el 7.85 %, y valores de ABTS* entre el 7.01 y el 14.40 %. Sin embargo, cuando el NE se añadía en una concentración del 18.1 % las películas mostraban una extraordinaria capacidad antioxidante a lo largo del estudio. Tras 45 días, las muestras de quitosano-NE mostraron una capacidad de eliminación

del radical DPPH del 93.22 % y del 95.40 % para el radical ABTS[•]. Se observó que hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) en ambos parámetros en comparación con las películas de quitosano o las de PA/PE. Como conclusión, los resultados demostraron una estabilidad de la capacidad antioxidante de las películas a lo largo del tiempo del estudio.

Tabla 27. Propiedades antioxidantes medidas en las películas utilizadas como separadores de lonchas y en las muestras de queso Havarti envasado.

Días de almacenamiento		Muestra película		
		PA/PE	Ch	Ch_NE
DPPH (%)	0	4.65 ± 1.60 ^a	3.49 ± 0.29 ^a	84.05 ± 0.25 ^a
	15	4.13 ± 1.54 ^a	7.85 ± 6.89 ^a	93.93 ± 0.00 ^b
	30	7.63 ± 0.36 ^a	6.60 ± 1.55 ^a	93.00 ± 0.14 ^c
	45	4.96 ± 2.88 ^a	2.84 ± 1.23 ^a	93.22 ± 0.49 ^c
ABTS[•] (%)	0	4.63 ± 0.76 ^a	7.01 ± 0.59 ^a	98.05 ± 1.04 ^a
	15	5.58 ± 0.93 ^a	13.82 ± 0.18 ^b	99.39 ± 0.10 ^{ab}
	30	9.10 ± 0.37 ^b	14.18 ± 0.65 ^b	99.52 ± 0.10 ^b
	45	10.10 ± 1.79 ^b	14.40 ± 3.30 ^b	95.40 ± 0.38 ^c
Días de almacenamiento		Muestra queso		
		PA/PE	Ch	Ch_NE
DPPH (%)	0	4.32 ± 1.00 ^a	5.73 ± 3.44 ^a	11.79 ± 1.56 ^a
	15	5.67 ± 2.04 ^a	7.77 ± 1.58 ^a	12.55 ± 5.17 ^a
	30	6.76 ± 0.54 ^a	7.94 ± 1.52 ^a	12.34 ± 0.72 ^a
	45	6.54 ± 0.55 ^a	7.72 ± 1.52 ^a	12.14 ± 0.72 ^a
ABTS[•] (%)	0	11.70 ± 1.28 ^a	12.55 ± 8.14 ^a	23.52 ± 0.64 ^a
	15	8.67 ± 0.21 ^b	12.85 ± 0.52 ^a	19.52 ± 4.40 ^b
	30	9.16 ± 0.54 ^b	9.87 ± 0.31 ^a	27.05 ± 0.68 ^c

45 8.23 ± 0.46^b 9.74 ± 0.69^a 26.80 ± 0.28^c

PA/PE es poliamida/polietileno, Ch es quitosano, Ch_NE es quitosano (1 % p/v) enriquecido con extracto de ortiga (18.1 % v/v) y glicerol (0.1 % p/v).

Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, se evaluó la capacidad antioxidante de las muestras de queso para probar si se producía una posible migración de los compuestos antioxidantes de la matriz polimérica al alimento (Tabla 27). Los quesos envasados con películas de PA/PE como separadores de lonchas mostraron diferencias no significativas en cuanto a sus valores de DPPH (4.32 – 6.76 %). Sin embargo, los valores de ABTS[•] oscilaron entre 8.23 y 11.70 % y mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el valor del tiempo inicial y el resto de las mediciones realizadas a lo largo del estudio. Sin embargo, teniendo en cuenta estos resultados, los valores antioxidantes tanto de la muestra envasada con el control como la envasada con película de quitosano presentaron valores muy bajos que pueden considerarse como despreciables. Estos valores pueden deberse a las variaciones en las condiciones de ensayo que se producen debido al método indirecto utilizado.

Sin embargo, las muestras de queso que estaban separadas con películas de quitosano-NE mostraron valores antioxidantes más alto al compararlas con las muestras en contacto con película de control o quitosano. Los valores DPPH oscilaron entre el 11.79 y el 12.55 %, mientras que los valores de ABTS[•] mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) oscilando entre el 19.52 y el 27.05 %, aumentando con el paso del tiempo. Esto podría deberse al hecho de que parte de los compuestos antioxidantes migraron de la película al alimento. Este resultado concuerda con estudios anteriores que demostraron una mejora de la capacidad antioxidante del queso Kareish cuando se envasó con un recubrimiento de quitosano/gelatina y se enriqueció con hojas de papaya y tomillo (Hassan, Korany, Zeinhom, Mohamed, & Abdel-Atty, 2022).

4.2.9 Oxidación lipídica del queso Havarti envasado con separadores de lonchas activos

La Figura 32 muestra los mg MDA/kg de queso medidos en el queso Havarti durante 45 días en refrigeración en función del separador utilizado: PA/PE, quitosano puro o películas de quitosano-NE. Los valores de TBARS aumentaron en las muestras separadas con quitosano puro y películas de quitosano-NE hasta el día 15 de almacenamiento, mientras que las muestras con separadores de PA/PE siguieron aumentando hasta el día 30. El aumento de estos valores durante el almacenamiento puede ser un indicador de que los lípidos se oxidan continuamente, produciendo como resultado subproductos oxidativos (Abdou, Galhoum, & Mohamed, 2018). Los valores de TBARS para el queso Havarti separado con películas de PA/PE oscilaron entre 5.87 y 11.57 mg MDA/kg de queso, mientras que las muestras de queso separadas con películas de quitosano puro mostraron valores de 7.50 a 15.39 mg MDA/kg de queso en el día 15. Estas variaciones producidas a lo largo del estudio pueden deberse al hecho de que las películas no proporcionan una barrera completa contra la oxidación lipídica.

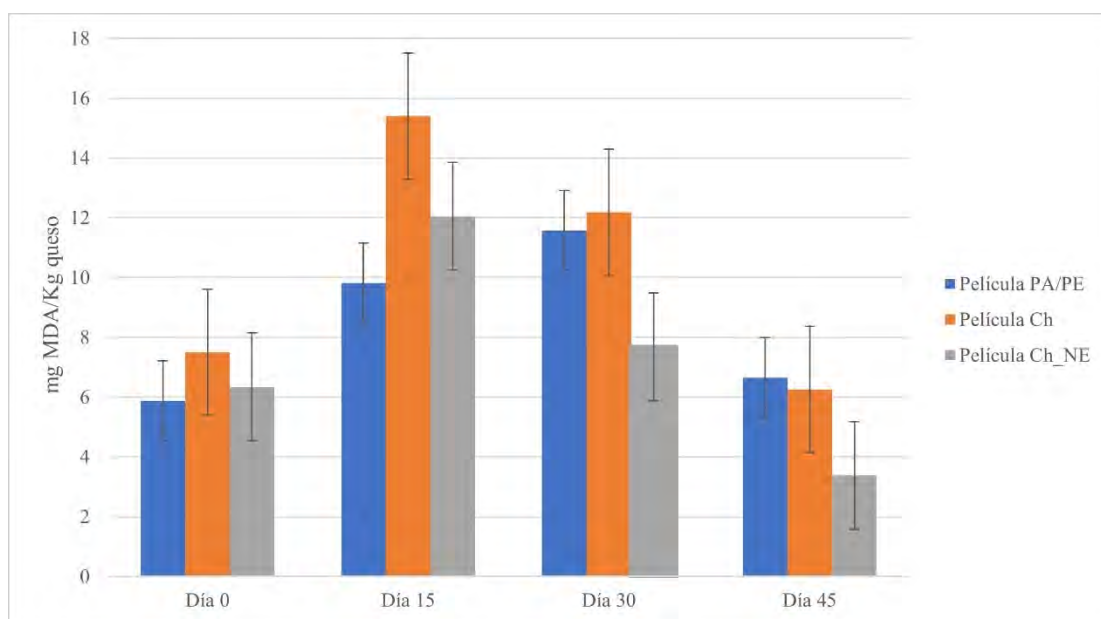


Figura 32. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las muestras de queso tipo Havarti. PA/PE es poliamida/polietileno, Ch es quitosano, Ch_NE es quitosano (1 % p/v) enriquecido con extracto de ortiga (18.1 % v/v) y glicerol (0.1 % p/v). Elaboración propia.

En cuanto a la película quitosano-NE, los valores de TBARS alcanzaron un máximo de 12.05 mg MDA/kg de queso a los 15 días. Al final del estudio (45 días) se alcanzó el valor más bajo de TBARS (3.38 mg MDA/Kg de queso). Esto significa que se produce una disminución del 56 % en la oxidación lipídica utilizando los separadores de lonchas de las películas de quitosano-NE en comparación con los separadores de lonchas a base de PA/PE o de quitosano.

Se debe tener en cuenta que el ensayo TBARS tiene ciertas limitaciones, ya que solo puede medir sustancias reactivas al TBA, que pueden también degradarse durante el proceso de oxidación lipídica. El aumento del contenido de MDA en las lonchas de queso envasado a los 15 días sugirió que el estado oxidativo de las lonchas alcanzó el pico de oxidación (Andrade, Ribeiro-Santos, Guerra, & Sanches-Silva, 2019).

Por otro lado, el queso separado con películas de quitosano puro mostró una menor actividad antioxidante en comparación las películas quitosano-NE. Por lo tanto, la adición de compuestos antioxidantes a la solución de quitosano redujo significativamente la oxidación de los lípidos presentes en el alimento (Farsanipour, Khodanazary, & Hosseini, 2020). Según los resultados obtenidos, los valores de TBARS de las lonchas de queso Havarti se vieron afectados por el almacenamiento y el material de envasado. Comportamientos similares se observaron cuando una película a base de gelatina de pescado enriquecida con extracto de *Lepidium Sativum* mostró valores más bajos de TBARS en comparación con la muestra de queso Ricotta sin envasar (Salem et al., 2021).

4.2.10 Propiedades ópticas del queso Havarti y de las películas utilizadas como separadores

El color de las películas y del queso envasado se evaluó durante todo el estudio mediante las coordenadas CIE (Tabla 28). Se estudiaron las variaciones de color de las películas y la alteración del color del queso debido a la posible migración de componentes coloreados de la matriz polimérica al queso.

Tabla 28. Parámetros ópticos de las películas a base de quitosano utilizadas como separadores de lonchas.

		Muestra película		
Días de almacenamiento		PA/PE	Ch	Ch_NE
L*	0	81.50 ± 0.01 ^a	82.90 ± 0.03 ^a	67.11 ± 2.89 ^a
	15	83.13 ± 0.03 ^a	84.38 ± 0.03 ^b	63.42 ± 0.36 ^a
	30	77.16 ± 0.01 ^b	82.49 ± 0.08 ^{ac}	64.38 ± 0.18 ^a
	45	81.97 ± 1.32 ^{ac}	81.97 ± 0.64 ^{ac}	70.44 ± 0.08 ^{ab}
a*	0	1.29 ± 0.04 ^a	1.10 ± 0.01 ^a	4.72 ± 0.66 ^a
	15	-0.48 ± 0.04 ^b	-0.37 ± 0.06 ^b	2.53 ± 0.08 ^b
	30	-0.61 ± 0.24 ^{bc}	-0.45 ± 0.09 ^{bc}	1.93 ± 0.09 ^{bc}
	45	-0.26 ± 0.21 ^{bc}	-0.36 ± 0.03 ^{bc}	1.08 ± 0.03 ^{bd}
b*	0	5.58 ± 0.01 ^a	8.26 ± 0.01 ^a	21.02 ± 3.44 ^a
	15	1.93 ± 0.03 ^b	4.72 ± 0.05 ^b	16.98 ± 0.18 ^a
	30	2.84 ± 0.06 ^c	5.81 ± 0.10 ^c	16.99 ± 0.17 ^a
	45	1.39 ± 0.21 ^d	3.92 ± 0.20 ^d	10.89 ± 0.09 ^{bc}

PA/PE es poliamida/polietileno, Ch es quitosano puro (1 % p/p) y Ch_NE es quitosano (1 % p/v) enriquecido con extracto de ortiga (18.1 % v/v) y glicerol (0.1 % p/v).

L*, luminosidad: negro = 0 y blanco = 100; a*, verde = -a* y rojo = +a*; b*, azul = -b* y amarillo = +b*.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para todos los valores y muestras analizadas. En el caso de la película PA/PE, los valores de L* oscilaron entre 771.6 y 83.13, mientras que los valores de a* oscilaron entre 1.29 y -0.48. Estos resultados sugieren que había una tendencia inherente hacia los tonos más oscuros, mientras que la película mostraba una propensión gradual hacia colores ligeramente más verdes a medida que avanzaba el tiempo. En cuanto a los valores de b*, la película comenzó con un valor de 5.58 y disminuyó a 1.39 el

último día del estudio (día 45). Esto significa que se produjo una ligera disminución del amarilleamiento de la película a lo largo del estudio, probablemente atribuida a la presencia de restos de queso y grasa en la película.

Este comportamiento fue similar en las películas de quitosano. Los valores de L^* oscilaron entre 81.97 y 84.38, mientras que los valores de a^* oscilaron entre 1.10 y -0.45. Los valores de b^* también disminuyeron con el tiempo, oscilando entre 8.26 y 3.92. Por otro lado, en el caso de las películas de quitosano-NE, los valores de L^* fueron inferiores a los de las demás películas, oscilando entre 63.42 y 70.44. Esto tenía sentido ya que la película con NE era significativamente más oscura que las otras formulaciones usadas como separadores. Los valores de a^* y b^* disminuyeron con el tiempo, oscilando entre 4.71 y 1.08 para el parámetro a^* y entre 21.02 y 10.89 para el parámetro b^* . Esto significa que la presencia de NE tuvo un impacto en el color de la película, provocando un cambio perceptible hacia un color sutilmente verdoso. A este hecho le acompañó la reducción del amarilleamiento de la película a lo largo del estudio.

En cuanto a las propiedades ópticas del queso (Tabla 29), las muestras envasadas con separadores PA/PE mostraron valores en el día 0 de L^* , a^* y b^* de 80.03, -0.43 y 22.95, respectivamente. Con el tiempo, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el queso, sobre todo en las coordenadas L^* y a^* siendo 79.64 y -1.10, respectivamente en el último día del estudio (día 45). Estos cambios cromáticos provocaron un oscurecimiento en el queso. En cuanto a las muestras de queso separadas con la película pura de quitosano se mostraron en el primer día un valor de L^* de 74.69, de a^* de -1.27 y de b^* de 25.31. En el último día del estudio, el valor de L^* aumentó a 79.13, mientras que los valores a^* disminuyeron ligeramente a -1.16 y los valores b^* a 20.89. Esto significa que las muestras de queso se volvieron grisáceas (aumento de claridad y disminución del enrojecimiento) según aumentaba el tiempo de almacenamiento. Estas alteraciones de color en las muestras probablemente se debieron a la oxidación lipídica y otras degradaciones del queso durante el almacenamiento (Siripatrawan & Noipha, 2012).

Tabla 29. Parámetros ópticos de las muestras de queso tipo Havarti.

Tiempo de almacenamiento		Muestra queso		
		PA/PE	Ch	Ch_NE
L*	0	80.03 ± 0.10 ^a	74.69 ± 0.26 ^a	84.41 ± 0.13 ^a
	15	80.59 ± 0.19 ^b	81.95 ± 0.78 ^b	75.80 ± 0.57 ^b
	30	80.26 ± 0.01 ^a	80.77 ± 0.06 ^{bc}	76.84 ± 0.07 ^{bc}
	45	79.64 ± 0.04 ^{ac}	79.13 ± 0.13 ^{bd}	71.12 ± 0.03 ^d
a*	0	-0.43 ± 0.04 ^a	-1.27 ± 0.10 ^a	-1.53 ± 0.18 ^a
	15	-1.38 ± 0.25 ^b	-1.52 ± 0.03 ^a	-0.98 ± 0.03 ^b
	30	-0.87 ± 0.06 ^a	-1.96 ± 0.02 ^b	-1.18 ± 0.12 ^a
	45	-1.10 ± 0.05 ^{bc}	-1.16 ± 0.11 ^{abc}	-1.18 ± 0.12 ^a
b*	0	22.95 ± 0.78 ^{ab}	25.31 ± 0.16 ^a	31.42 ± 0.31 ^a
	15	22.30 ± 0.14 ^a	26.68 ± 0.02 ^b	30.40 ± 0.28 ^b
	30	23.74 ± 0.03 ^{ab}	25.20 ± 0.11 ^a	27.43 ± 0.03 ^c
	45	24.05 ± 0.06 ^b	20.89 ± 0.08 ^c	18.54 ± 0.02 ^d

PA/PE es poliamida/polietileno, Ch es quitosano puro (1 % p/p) y Ch_NE es quitosano (1 % p/v) enriquecido con extracto de ortiga (18.1 % v/v) y glicerol (0.1 % p/v).

L*, luminosidad: negro = 0 y blanco = 100; a*, verde = -a* y rojo = +a*; b*, azul = -b* y amarillo = +b*.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otra parte, las muestras de queso que fueron separadas por películas de quitosano-NE sufrieron una disminución significativa ($p < 0.05$) en todas las coordenadas. El brillo varió de 84.41 a 71.12. El valor a* disminuyó muy ligeramente de -1.53 a -1.18, lo que significa que hay una ligera disminución del verdor de la muestra de queso con el paso del tiempo. Los valores b* oscilaron entre 31.42 y 18.54, lo que significa que las muestras perdieron su color amarillento característico, íntimamente relacionado con la capacidad de la película para oscurecer la muestra que se observa en la Figura 30.

4.3 DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDAS CON EXTRACTO DEL ALGA KELP DE AZÚCAR *SACCHARINA LATISSIMA*

Estos resultados responden al objetivo 3 y se publicaron en la siguiente revista Q1 cuyos datos bibliográficos se muestran en la Tabla 30. Un resumen gráfico se incluye en la Figura 33.

Publicación IV (PIV): Flórez, M.; Cazón, P.; Vázquez, M. Sugar kelp *Saccharina latissima* extract as an innovative ingredient for chitosan films: case study as cheese slice separators. *Food Hydrocolloids* 149 (2024) 109571.

Tabla 30. Datos publicación IV.

Título		Sugar kelp <i>Saccharina latissima</i> extract as an innovative ingredient for chitosan films: case study as cheese slice separators.
Autores		María Flórez, Patricia Cazón, Manuel Vázquez
Afiliaciones		Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología; Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo
Año		2023
Revista		Food Hydrocolloids
Volumen		<i>pendiente</i>
Editorial		ELSEVIER
eISSN		0268-005X
DOI		https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109571
Contribución del doctorando		Desarrollo y análisis experimental, y redacción del borrador del artículo
Indicadores de calidad 2023	Factor de impacto	11,504
	Ranking Revista	Q1 (5/338) Agricultural and Biological Sciences – Food Science
Licencia		CC BY
Copia íntegra		Anexo IV



Figura 33. Resumen gráfico Publicación IV. Elaboración propia.

En este estudio el objetivo fue desarrollar un envase activo con capacidad antioxidante a base de quitosano y enriquecido con el extracto acuoso de kelp de azúcar *Saccharina latissima* (SLE). Siguiendo las condiciones de optimización de la extracción de compuestos antioxidantes de la ortiga, se obtuvo el extracto acuoso de *S. latissima* con potente capacidad antioxidante. En la Figura 34 se aprecia un esquema del proceso de obtención de extracto acuoso del alga. Se analizó el efecto de la inclusión del extracto a diferentes concentraciones (0, 10 y 20 %) (definida como variable independiente A en el análisis estadístico) sobre la propiedad de humedad de equilibrio, el contenido de humedad y la permeabilidad al vapor de agua de películas de quitosano. Además, se estudiaron las propiedades mecánicas, antioxidantes y ópticas. Se evaluó la morfología de la superficie, la termoestabilidad y la compatibilidad de las películas a través de los análisis FT-IR, SEM y TGA/DSC, respectivamente. Esta nueva formulación se aplicó como película separadora de lonchas de queso Havarti envasado al vacío. Para evaluar las propiedades activas de los separadores, se midió las propiedades antioxidantes de las películas y de las muestras de queso en contacto con la película. Se analizó la oxidación lipídica de las muestras de queso envasadas durante 45 días en refrigeración.

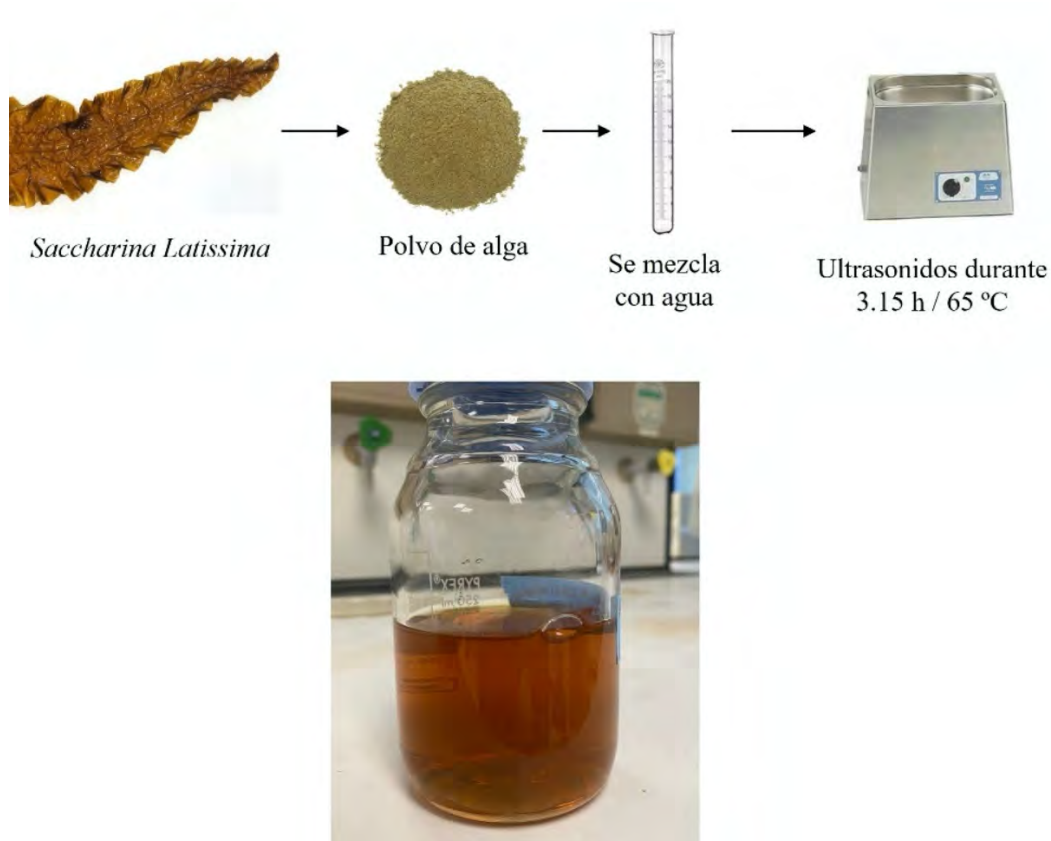


Figura 34. Proceso de extracción del alga *Saccharina latissima*. Elaboración propia.

4.3.1 Microscopía electrónica de barrido

La Figura 35 muestra las imágenes SEM de las secciones inferior, superior y transversal de las películas de quitosano-SLE. Las películas presentaban una morfología superficial compacta y sin poros. En cuanto a las imágenes relacionadas con la parte inferior de la película, en el caso de SLE al 20% se pueden observar pequeñas partículas en la superficie, lo que indica que el extracto de algas no se disolvió completamente. Se observó un comportamiento similar cuando se añadió extracto de aguja de pino a películas de quitosano (Kadam et al., 2021). Asimismo, se observan ciertas líneas en la superficie, que se atribuyen a posibles rayaduras en la superficie plástica de la placa Petri.

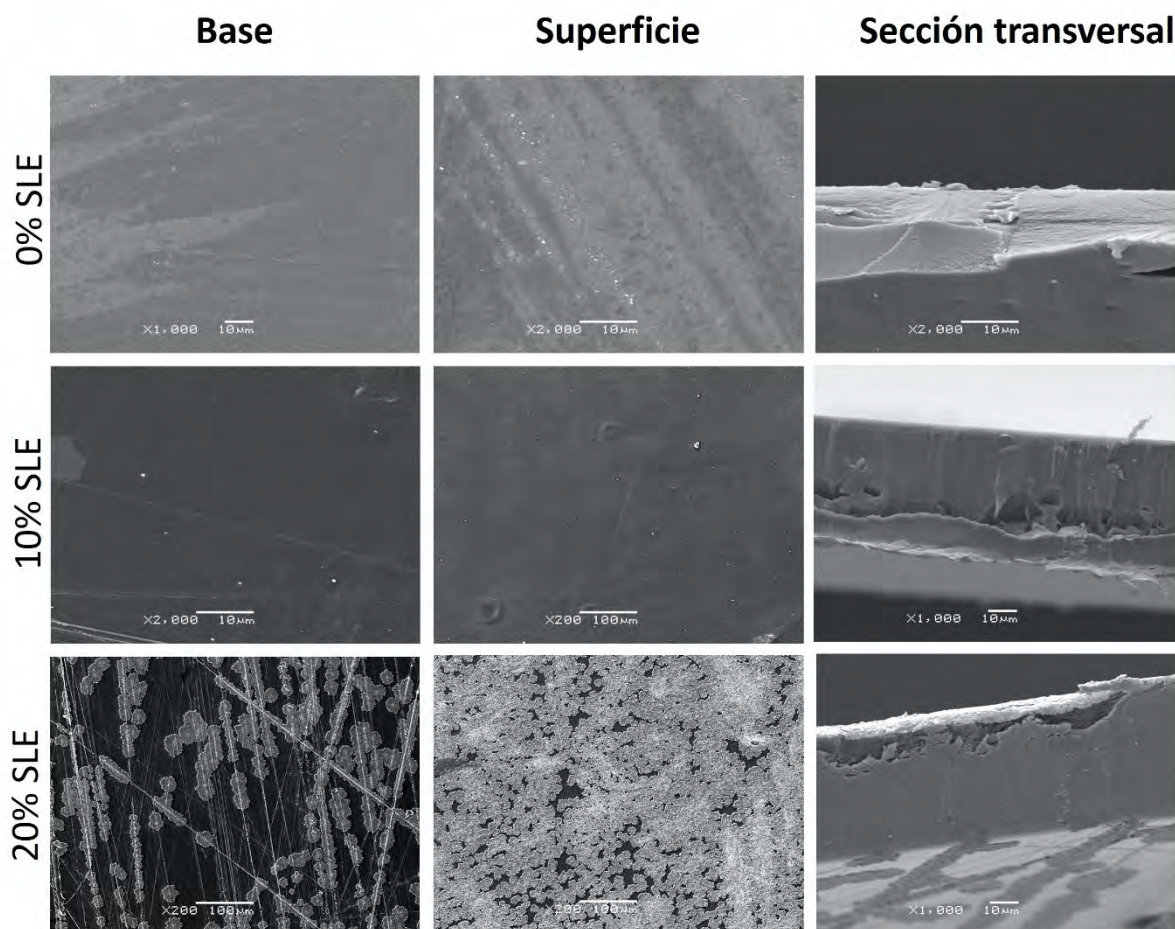


Figura 35. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la parte inferior, superior y transversal de películas de quitosano con glicerol (0.1 %) y SLE (0, 10 y 20 %). SLE es extracto del alga *Saccharina latissima*.
Elaboración propia.

Las imágenes SEM relacionadas con la superficie de la película mostraron un comportamiento similar al anterior. En general, se puede determinar que la solución se mezcló correctamente dando lugar a una película homogénea, excepto cuando la concentración de SLE fue del 20 %. De hecho, en la superficie de estas se observa una aglomeración de partículas pertenecientes al SLE.

En cuanto a las imágenes SEM transversales, la adición de una concentración al 10 % de SLE dio lugar a una estructura muy similar a la de la película sin extracto. Sin embargo, cuando la concentración del SLE era del 20 %, la película presentaba irregularidades, sobre todo en la superficie y en la base. De igual modo, las películas enriquecidas con extracto de aguja de pino a alta concentración mostraron alteraciones en la microestructura de la superficie de las imágenes SEM (Kadam et al., 2021).

4.3.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La Figura 36 muestra los espectros FT-IR en las películas analizadas en una longitud de onda entre 4000 y 800 cm^{-1} . La película de quitosano puro es la línea roja, con un 10 % de SLE es la línea verde y la con 20 % de SLE es la línea amarilla. En base a los resultados, se pueden observar diferencias notables en las películas enriquecidas con SLE, mostrando una menor absorbancia en comparación con las películas de quitosano sin SLE. El primer pico característico fue a los 2950 cm^{-1} , relacionado con los grupos hidroxilo (-OH) del quitosano. La presencia del SLE reveló una debilitación de la película, disminuyendo sus valores de absorbancia. De hecho, cuanto mayor es la concentración de SLE en la matriz, menor es la presencia de grupos -OH (Rai, Dutta, & Mehrotra, 2017). Seguidamente, se aprecian los tres picos característicos del quitosano (amida I: 1650 cm^{-1} , amida II: 1541 cm^{-1} y amida III: 1407 cm^{-1}) que son causados por la desacetilación de la quitina (Bilican et al., 2020). El pico que se aprecia a 1346 cm^{-1} está relacionado con las vibraciones de flexión N-H (Qiao, Ma, Zhang, & Yao, 2017), mientras que el siguiente pico característico a 1150 cm^{-1} se atribuye al estiramiento de C-O en la estructura del anillo de quitosano (Priyadarshi, Sauraj Kumar, et al., 2018). En cuanto al rango entre 1080 y 1000 cm^{-1} , este está caracterizado por fuertes vibraciones de estiramiento de C-O, C-N y C-C (Valentin, Bonelli, Garrone, Di Renzo, & Quidnard, 2007). Además, la flexión de los enlaces C-H en la estructura del quitosano está explicada por los espectros de absorción observados en el rango de 1200 a 800 cm^{-1} (Liu, Adhikari, Guo, & Adhikari, 2013).

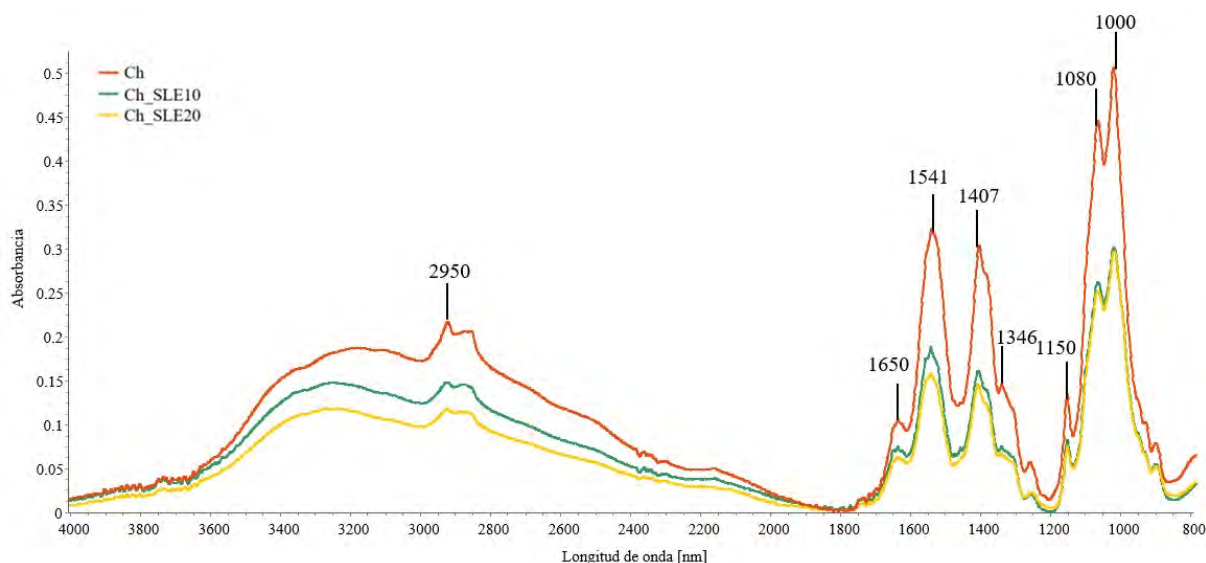


Figura 36. Espectro FT-IR de películas de quitosano con glicerol (0.1 %) y SLE (0, 10 y 20 %). SLE es extracto del alga *Saccharina latissima*. Elaboración propia.

En general, los espectros de las películas de quitosano puro y de aquellas enriquecidas con SLE mostraron un patrón de bandas relativamente similar. Esto indica que existe una buena miscibilidad del SLE con la matriz polimérica. Solo se ha producido un pequeño cambio de las ondas en ciertos picos al aumentar la concentración de SLE. Esto podría explicarse por la presencia del SLE, ya que al mezclarse con la matriz de glicerol-quitosano, se podría alterar la disponibilidad del grupo -OH dentro de la red polimérica (Riaz et al., 2020). Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos cuando se adicionó extracto de *Herba Lophatheri* a películas de quitosano (Wang et al., 2019).

4.3.3 Evaluación del contenido de humedad de equilibrio y la permeabilidad al vapor de agua

Como se muestra en la Tabla 31, los valores de la humedad de equilibrio oscilaron entre 0.85 y 1.2 %. Estos datos se ajustaron a un modelo cuadrático. Los p -valor del modelo indicaron que el efecto cuadrático SLE (A^2) fue el único término significativo ($p < 0.01$) (Tabla 32). Sin embargo, los resultados de las estadísticas de ajuste indicaron un r^2 bajo de 0.65 para poder obtener un modelo factible (Tabla 33).

Tabla 31. Propiedades de punción y mecánicas de películas de quitosano con extracto de *Saccharina latissima*. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra película	%W	WVP	TS	%E
	%	g/m ² ·s·Pa	MPa	%
Ch	1.18 ± 0.11 ^{ab}	3.41 · 10 ⁻¹¹ ± 7.27 · 10 ⁻¹³ ^a	48.99 ± 1.20 ^a	6.24 ± 3.44 ^a
Ch_SLE10	0.85 ± 0.18 ^a	4.00 · 10 ⁻¹¹ ± 5.77 · 10 ⁻¹² ^a	48.06 ± 3.03 ^a	4.03 ± 1.47 ^a
Ch_SLE20	1.20 ± 0.13 ^b	5.46 · 10 ⁻¹¹ ± 8.99 · 10 ⁻¹² ^{ba}	36.16 ± 4.24 ^b	7.40 ± 6.67 ^a

Muestra película	YM	BS	DB
	MPa	g	mm
Ch	929.49 ± 105.19 ^a	2343.64 ± 449.02 ^a	3.06 ± 0.52 ^a
Ch_SLE10	973.63 ± 105.84 ^a	3210.90 ± 393.97 ^b	4.01 ± 0.40 ^a
Ch_SLE20	743.71 ± 67.82 ^b	3716.79 ± 523.70 ^{bc}	5.61 ± 0.28 ^b

Ch es quitosano, SLE es extracto de *Saccharina latissima*, %W es contenido de humedad de equilibrio, WVP es permeabilidad al vapor de agua, TS es resistencia a la tracción, %E es porcentaje de elongación a la rotura, YM es módulo de Young, BS es resistencia al estallido, DB es distancia hasta el estallido.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 32. Análisis de varianza para propiedades de punción y mecánicas de películas de quitosano con extracto de *Saccharina latissima*. A es la concentración de SLE.

	%W		WVP		TS	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	5.81	0.0395	16.53	0.0048	65.43	<0.0001
A	0.02	0.8869	16.53	0.0048	65.43	<0.0001
A ²	11.59	0.0144				

	YM		BS		DB	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	70.94	<0.0001	14.91	0.0062	55.30	0.0001
A	80.12	0.0001	14.91	0.0062	55.30	0.0001
A ²	61.76	0.0002				

%W es contenido de humedad de equilibrio, WVP es permeabilidad al vapor de agua, TS es resistencia a la tracción, %E es porcentaje de elongación a la rotura, YM es módulo de Young, BS es resistencia al estallido, DB es distancia hasta el estallido.

Los valores de %W de las películas disminuyeron cuando se añadió SLE al 10% en comparación con el control a base de quitosano puro. Cuando la concentración del extracto fue del 20 %, los valores de %W incrementaron. Esto puede deberse a que las alga se caracterizan por tener una naturaleza higroscópica, lo que podría aumentar la capacidad de absorción de humedad de las películas con alta concentración de extracto (Kanatt et al., 2015). Estas variaciones de %W fueron estadísticamente significativas como lo demuestra la prueba de Tukey.

Tabla 33. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades de función y mecánicas de las películas de quitosano con extracto de *Saccharina latissima*.

	%W	WVP	TS
r^2	0.6593	0.7025	0.9034
r^2 ajustada	0.5457	0.6600	0.8896
r^2 predicha	0.2334	0.4967	0.8417
Precisión	4.27	7.04	14.01
	YM	BS	DB
r^2	0.9594	0.6806	0.8876
r^2 ajustada	0.9459	0.6349	0.8716
r^2 predicha	0.9087	0.4431	0.8117
Precisión	15.95	6.68	12.88

%W es contenido de humedad de equilibrio, WVP es permeabilidad al vapor de agua, TS es resistencia a la tracción, %E es porcentaje de elongación a la rotura, YM es módulo de Young, BS es resistencia al estallido, DB es distancia hasta el estallido.

Otro de las propiedades más significativas es la WVP, donde los valores oscilaron entre $3.41 \cdot 10^{-11}$ y $5.46 \cdot 10^{-11}$ g/m·s·Pa (Tabla 31). En este caso, los datos se ajustaron a un modelo lineal. La estadística de ajuste de r^2 fue de 0.70 para la WVP (Tabla 33). La permeabilidad de la película aumentó al aumentar la concentración de SLE. El comportamiento WVP de la película de quitosano puro se debe a la presencia de grupos amino e hidroxilo, que actúan como puntos de unión de las moléculas de agua en la cadena de quitosano (Bourtoom & Chinnan, 2008). Sin embargo, este aumento de WVP podría explicarse a la naturaleza hidrófila de las algas. La alta presencia de grupos hidroxilo libres en las algas podría incrementar la interacción entre las algas y las moléculas de agua, aumentando la velocidad de transmisión del agua a

través de la película (Khalil et al., 2018). Por otro lado, el valor más alto de WVP se obtuvo con una concentración de SLE al 20 %, esto podría deberse a la aglomeración de las partículas del extracto en la matriz, tal y como se observó en el análisis SEM previamente comentado. Este carácter hidrofílico de las películas también se observó cuando se adicionó las algas *Fucus vesiculosus* (Andrade et al., 2021) y *Kappaphycus alvarezii* (Khalil et al., 2018) a películas de proteína de suero o almidón de maíz, respectivamente.

4.3.4 Evaluación de las propiedades mecánicas

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas de tracción y punción para caracterizar las propiedades mecánicas se muestran en la Tabla 31. Los resultados de la prueba de tracción para las películas oscilaron entre 36.16 y 48.99 MPa para la TS. Los datos se ajustaron a un modelo lineal. En esta propiedad el F-valor y *p*-valor del modelo fueron de 65.43 y < 0.0001 , respectivamente (Tabla 32). Debido a que el *p*-valor < 0.05 , el modelo se consideró significativo. Los valores de las estadísticas de ajuste se encuentran en la Tabla 33, donde se mostró un valor de r^2 de 0.90. Mientras que la Ecuación 28 predice los valores de TS de las películas quitosano-SLE. La predicción de esta propiedad se muestra en la Figura 35.I:

$$TS \text{ (MPa)} = 50.56 - 0.57 \cdot SLE \text{ (\%)} \quad (28)$$

Como se observa en la Figura 37.I, es evidente que con una mayor concentración de SLE en la matriz, hay una reducción más pronunciada de la resistencia a la tracción. La dispersión heterogénea y la agregación de SLE pueden haber disminuido las propiedades mecánicas de la matriz polimérica. Esto lleva a la formación de una red heterogénea y a una pérdida de cohesión en las películas, como se evidencia en la imágenes SEM (Deshmukh et al., 2021).

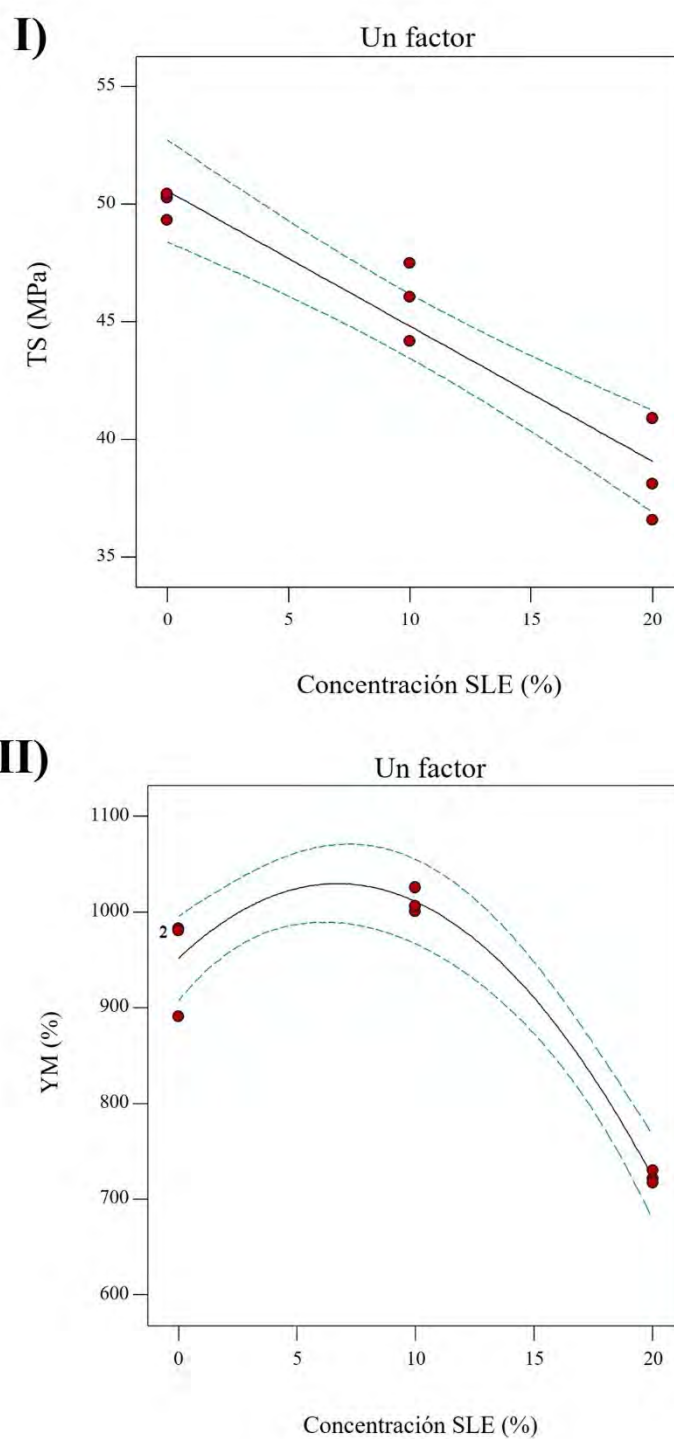


Figura 37. Efecto previsto de la concentración de extracto de *Saccharina latissima* (SLE) en I) Resistencia a la tracción (TS), II) Módulo de Young (YM). Elaboración propia.

En cuanto al análisis de %E, las películas mostraron valores que oscilaron entre 4.03 y 7.4 % (Tabla 31). En este caso, los datos no se ajustaban a ningún modelo matemático. Esto se debe

a que no existe una gran diferencia entre los resultados obtenidos. Por tanto, el valor medio de los datos sugiere que la adición de SLE a la formulación no afecta al valor de %E.

Por otro lado, los valores del módulo de Young (YM) oscilaron entre 743.71 y 973.63 MPa (Tabla 31). Estos datos se ajustaron a un modelo cuadrático. El análisis estadístico indicó que el modelo tenía un F-valor de 70.94 y un p -valor < 0.0001 (Tabla 32). Esto significa que el modelo es estadísticamente significativo. En cuanto al factor más significativo que afectó al YM fue el efecto lineal de la concentración de SLE (F-valor = 80.12), seguido del efecto cuadrático del extracto (F-valor = 61.76). Respecto al r^2 fue de 0.95 (Tabla 33). La Ecuación 29 muestra la predicción de los valores de YM de las películas:

$$YM \text{ (MPa)} = 951.47 + 23.32 \cdot SLE \text{ (\%)} - 1.73 \cdot SLE^2 \text{ (\%)} \quad (29)$$

La predicción del YM se encuentra en la Figura 37.II. Según los resultados obtenidos, con una baja concentración de SLE (10 %), el extracto se podía dispersar bien en la matriz de quitosano, lo que aumentaba ligeramente la rigidez de la película. Sin embargo, cuando la concentración aumentaba (20 %), el extracto no se distribuía correctamente, provocando una disminución de los valores de esta propiedad mecánica. Esta tendencia también se observó en otros estudios donde se adicionaba extracto de alga *Ulva ohnoi* a películas de celulosa (Saedi, Kim, Shokri, Kim, & Shin, 2023).

Respecto a los resultados obtenidos de los análisis de punción, se produjo un aumento de la BS y de la DB con el incremento de la concentración de SLE (Tabla 21). Los valores de BS oscilaron entre 2343.64 y 3716.79 g. Todos los datos se ajustaron a un modelo lineal. El F-valor del modelo fue de 14.91, mientras que el p -valor fue de 0.0062. Como el p -valor < 0.05 , se puede determinar que el modelo era estadísticamente significativo (Tabla 32), aunque su r^2 fuese bajo (0.68) (Tabla 33). En cuanto a los valores de BS fueron ligeramente ($p < 0.05$) más altos en las películas de quitosano-SLE que en las películas de quitosano puro. Esto podría deberse a que se produce una plastificación más efectiva en las películas con extracto (Blanco-Pascual, Montero, & Gómez-Guillén, 2014). Los valores de DB de películas de quitosano-SLE oscilaron entre 3.06 y 5.61 mm. Estos resultados se ajustaron a un modelo lineal con un F-valor significativo de 55.30, un $p < 0.0001$ y un r^2 de 0.88. En general, se observó un incremento en

las propiedades de BS y DB con el aumento de la concentración de SLE. Esto podría deberse a que los enlaces hidrógeno entre compuestos presentes en los extractos de plantas y moléculas de polisacáridos, aumentan las interacciones moleculares de los biopolímeros. Como resultado de esto, se confirma que la adición de extractos vegetales indujo alteraciones en las propiedades físicas, incluyendo la BS y DB (Wang et al., 2012).

4.3.5 Evaluación de las propiedades antioxidantes de los extractos

La capacidad antioxidante del extracto de algas fue analizada a través de los métodos de análisis antioxidantes DPPH y ABTS[•]. Los extractos diluidos a 1/10 mostraron resultados de DPPH de 85.70 ± 0.49 % y de ABTS[•] de 85.88 ± 0.84 %. En base a estos resultados, se pudo determinar que el extracto de kelp de azúcar posee una poderosa capacidad antioxidante. De hecho los florotaninos son la clase principal de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante que se encuentran en las algas, como las algas marinas *Saccharina latissima* (Cotas et al., 2020). A su vez, el fucoídano y los carotenoides están presentes en concentraciones significativas en las especies de *Saccharina*. Estos compuestos pueden mejorar la capacidad antioxidante del extracto (Jacobsen, Sørensen, Holdt, Akoh, & Hermund, 2019).

Por otro lado, el método de extracción representa un factor crucial para lograr una mayor capacidad antioxidante en el extracto. Múltiples estudios demostraron que la extracción por ultrasonidos utilizada en este caso fue el método más eficaz para recuperar fenoles y antioxidantes de las algas (Generalic Mekinić et al., 2019; Ummat et al., 2020). Asimismo, el uso de agua como disolvente permitió obtener valores antioxidantes más altos debido a que los solventes más polares son capaces de liberar de manera más efectiva los polisacáridos de la pared celular, promoviendo la extracción de los compuestos antioxidantes (Mildenberger, Stangeland, & Rebours, 2022).

4.3.6 Evaluación de las propiedades antioxidantes de las películas

Los valores de la capacidad antioxidantes de las películas analizadas se encuentran en la Tabla 34. En comparación con la matriz de quitosano puro, las películas con SLE adicionado demostraron tener una importante acción eliminadora de radicales libre. Los valores de DPPH oscilaron entre 1.68 % en películas de quitosano puro y 18.8 % en películas de quitosano con 20 % de SLE. Los datos se ajustaron correctamente a un modelo lineal significativo con un F-valor de 1001.79 ($p < 0.0001$) y un r^2 de 0.99 (Tabla 35).

Tabla 34. Propiedades antioxidantes de las películas desarrolladas a base de quitosano con extracto de *Saccharina latissima*. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestras	DPPH (%)	ABTS* (%)
Ch	1.68 ± 0.37 ^a	1.86 ± 1.04 ^a
Ch_SLE10	10.72 ± 0.96 ^b	56.30 ± 2.51 ^b
Ch_SLE20	18.80 ± 0.50 ^c	90.81 ± 1.45 ^c

Ch es quitosano, SLE es extracto de *Saccharina latissima*.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La Ecuación 30 pronostica los valores de DPPH de las películas en función de la concentración de SLE. La predicción se muestra en la Figura 38.I:

$$\text{DPPH} = 1.84 + 0.85 \cdot \text{SLE} (\%) \quad (30)$$

Por otro lado, los valores de ABTS* de las muestras de películas variaron desde 1.86 % en películas puras de quitosano hasta 90.81 % en películas de quitosano con un 20 % de SLE (Tabla 34).

Tabla 35. Propiedades antioxidantes de las películas desarrolladas a base de quitosano con extracto de *Saccharina latissima*. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

	DPPH		ABTS*	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	1001.79	<0.0001	1906.44	<0.0001
A	1001.79	<0.0001	3750.11	<0.0001
A ²			62.77	0.0002
	DPPH		ABTS*	
r ²	0.9931		0.9984	
r ² ajustada	0.9921		0.9979	
r ² predicha	0.9899		0.9965	
Precisión	54.82		86.60	

Se apreció una clara mejoría en la actividad ABTS* en las películas enriquecidas con SLE. El modelo cuadrático se ajustó bien a los datos y fue estadísticamente significativo, con un F-valor de 1906.44 y un *p*-valor < 0.0001. Los F-valor indicaron que el efecto lineal de la concentración de SLE (F-valor = 3750) tuvo la mayor influencia en los valores de ABTS*, seguido del efecto cuadrático (F-valor = 62.77) (Tabla 35). El valor de r² fue de 0.99. La Ecuación 31 pronostica los valores de ABTS* en función de la concentración de SLE. La predicción de esta propiedad se muestra en la Figura 38.II:

$$ABTS^* = 1.86 + 6.44 \cdot SLE (\%) - 0.09 \cdot SLE^2 (\%) \quad (31)$$

Esta mejora de las propiedades antioxidantes también se observó cuando se agregaron extractos acuosos de algas como *Himanthalia elongata* y *Palmaria palmata* a películas de quitosano, extendiendo la vida útil de las hamburguesas de pescado fresco (Albertos et al., 2019).

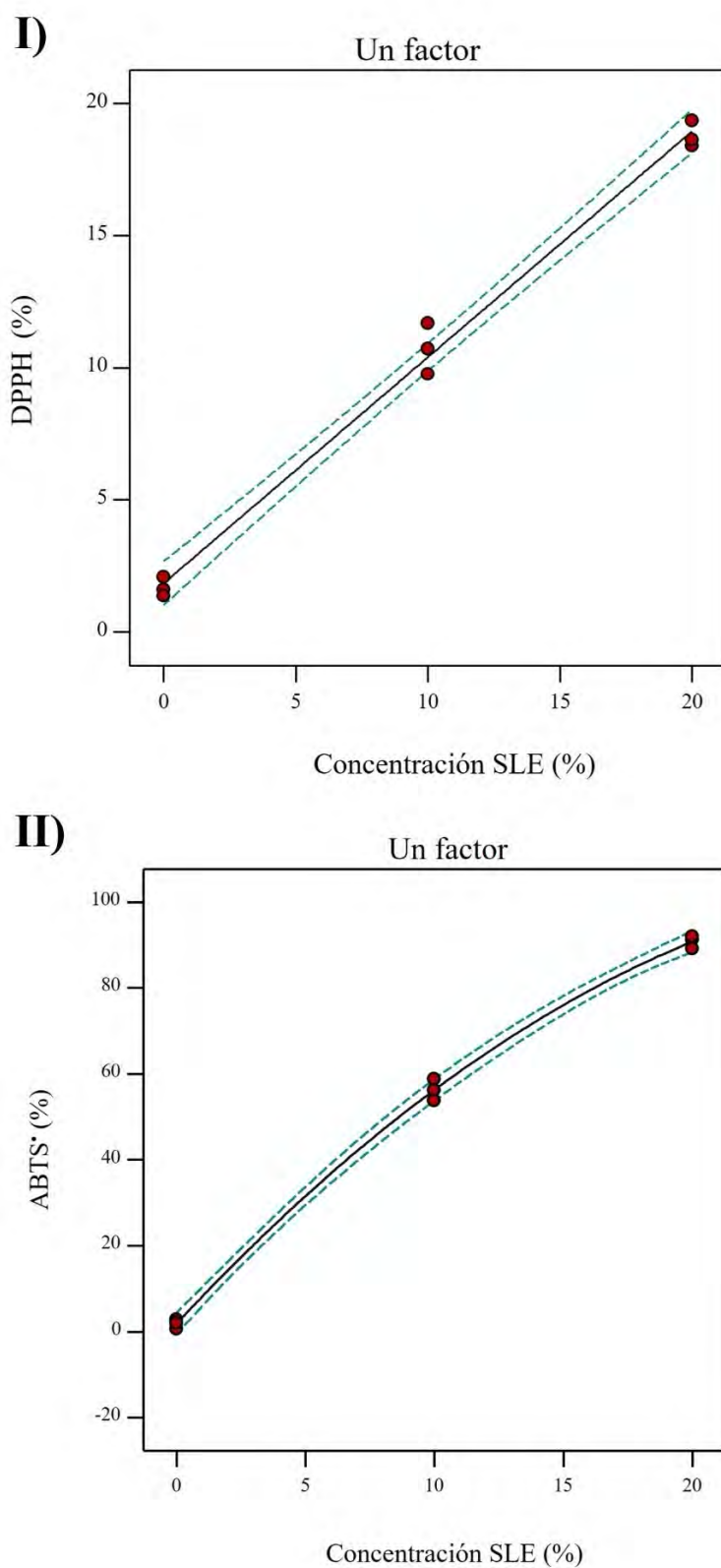


Figura 38. Gráfico de respuesta del efecto previsto de la concentración de SLE en I) DPPH y II) ABTS*. SLE es extracto del alga *Saccharina latissima*. Elaboración propia.

4.3.7 Evaluación de las propiedades ópticas de las películas

Las propiedades de barrera a los rayos UV de las películas se determinaron utilizando los valores de transmitancia UV. La Tabla 36 muestra el porcentaje medio de transmitancia de las películas de quitosano puro y de quitosano-SLE en las diferentes regiones UV. La Figura 39 muestra los espectros del perfil UV de las películas. Las películas de quitosano-SLE mostraron valores de %T en la región UV-C que oscilaron entre 6.26 y 21.15 %. El F-valor del modelo para UV-C fue 475.44 y el p -valor < 0.0001 , lo que implica que el modelo fue significativo (Tabla 37). Los resultados de las estadísticas de ajuste mostraron un r^2 de 0.99 (Tabla 38).

La Ecuación 32 pronostica la respuesta UV-C en función de la concentración de SLE:

$$UV-C = 21.47 - 1.93 \cdot SLE (\%) + 0.05 \cdot SLE^2 (\%) \quad (32)$$

Por otro parte, la propiedad UV-B mostró valores de 18.80 hasta 46.17 % (Tabla 36). El F-valor del modelo fue 424.83 y el p -valor < 0.05 . Por tanto, el modelo fue significativo, además de tener un r^2 de 0.99 (Tabla 37 y 38). La respuesta UV-B se predice en función de la concentración de SLE mediante la Ecuación 33:

$$UV-B = 45.56 - 3.40 \cdot SLE (\%) + 0.10 \cdot SLE^2 (\%) \quad (33)$$

Tabla 36. Propiedades ópticas y parámetros de color de las películas a base de quitosano. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra película	UV-C %T	UV-B %T	UV-A %T	Transparencia	Opacidad
Ch	21.15 ± 1.12	46.17 ± 2.09	59.54 ± 1.54	47.43	3.35
Ch_SLE10	7.85 ± 0.54	21.59 ± 0.98	40.75 ± 0.03	48.23	4.96
Ch_SLE20	6.26 ± 0.91	18.80 ± 13.46	38.85 ± 0.49	41.57	4.37
Muestra película	L*	a*	b*		
Ch	89.19 ± 0.03	-0.13 ± 0.00 ^a	1.91 ± 0.00 ^a		
Ch_SLE10	86.11 ± 1.34	-0.32 ± 0.11 ^a	5.73 ± 0.15 ^b		
Ch_SLE20	86.15 ± 2.38	-0.65 ± 0.01 ^b	6.55 ± 1.48 ^{bc}		

Ch es quitosano, SLE es extracto del alga *Saccharina latissima*. UV-C (200 – 280 nm), UV-B (280 – 315 nm), UV-A (315 –400 nm).

% T es el porcentaje de transmitancia.

L*. luminosidad: negro = 0 y blanco = 100; a*. verde =-a* y rojo =+a*); b*. azul =-b* y amarillo=+b*.

Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar.

Respecto a la propiedad UV-A, esta obtuvo valores entre 38.85 y 59.54 % (Tabla 36). Los datos relacionados con el modelo matemático UV fueron significativos ya que su p -valor fue < 0.0001 y el F-valor fue 521.88 (Tabla 37). Los resultados de la estadística de ajuste indicaron un r^2 de 0.99 (Tabla 38). La respuesta UV-A se predice en función de la concentración de SLE mediante la Ecuación 34:

$$UV-A = 59.99 - 2.80 \cdot SLE (\%) + 0.08 \cdot SLE^2 (\%) \quad (34)$$

En base a los resultados de las propiedades UV de las películas, se puede determinar que estos valores disminuyeron con el aumento del SLE. Estos resultados llevan a la conclusión de que la presencia del SLE en la composición mejora la capacidad de bloqueo de los rayos UV en las películas formuladas.

Por otro lado, la transparencia y opacidad también fueron estudiadas, mostrando sus valores en la Tabla 36. Los valores de transparencia en las muestras de películas oscilaron entre 41.57 y 48.23. El modelo matemático obtenido fue significativo, lo que indicaba que la transparencia de las películas dependía del contenido de SLE. El modelo tuvo un F-valor de 508.69 y un p -valor < 0.0001 (Tabla 37). Además de presentar un r^2 de 0.99 (Tabla 38). La Ecuación 35 pronostica la respuesta de la transparencia en términos del factor real de concentración de SLE en las películas:

$$Transparencia = 47.39 + 0.50 \cdot SLE (\%) - 0.04 \cdot SLE^2 (\%) \quad (35)$$

Tabla 37. Análisis de varianza para las propiedades ópticas de películas de quitosano con extracto del alga *Saccharina latissima* (A).

	UV-C		UV-B		UV-A	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	475.44	<0.0001	424.83	<0.0001	521.88	<0.0001
A	780.00	<0.0001	695.86	<0.0001	844.93	<0.0001
A ²	170.88	<0.0001	153.79	<0.0001	198.83	<0.0001
	Transparencia		Opacidad		L*	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
Modelo	508.69	<0.0001	135.49	<0.0001	10.05	0.0157
A	637.43	<0.0001	116.59	<0.0001	10.05	0.0157
A ²	379.95	<0.0001	154.39	<0.0001		
	a*		b*			
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor		
Model	108.20	<0.0001	48.55	0.0002		
A	108.20	<0.0001	84.42	<0.0001		
A ²			12.69	0.0119		

Tabla 38. Estadísticas de ajuste del modelo obtenido para las propiedades ópticas de películas de quitosano con extracto del alga *Saccharina latissima*.

	UV-C	UV-B	UV-A
r ²	0.9937	0.9930	0.9943
r ² ajustado	0.9916	0.9907	0.9924
r ² predicho	0.9859	0.9842	0.9871
Precisión	34.49	37.30	41.10
	Transparencia	Opacidad	L*
r ²	0.9942	0.9783	0.5894
r ² ajustado	0.9922	0.9711	0.5308
r ² predicho	0.9868	0.9513	0.3134
Precisión	41.72	22.85	5.49
	a*	b*	

r^2	0.9392	0.9418
r^2 ajustado	0.9306	0.9224
r^2 predicho	0.9160	0.8691
Precisión	18.01	12.99

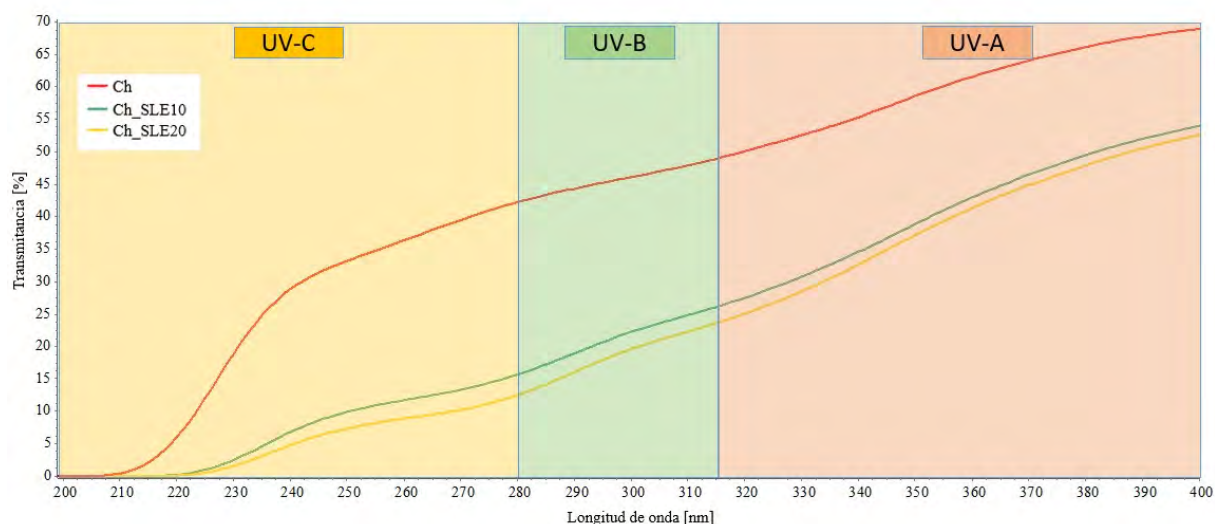


Figura 39. Perfil de espectros UV de películas de quitosano (Ch) con glicerol (0.1 %) y SLE (0, 10 y 20 %). SLE es extracto del alga *Saccharina latissima*. Elaboración propia.

La Figura 40.I muestra la representación gráfica de la transparencia de las películas según lo determinado por la Ecuación 34. Generalmente, una menor transparencia implica una mayor opacidad. En este caso, los valores de transparencia de las películas de quitosano-SLE disminuyeron ligeramente en comparación con las películas de quitosano puro.

Respecto a la opacidad, los valores oscilaron entre 3.35 y 4.96 (Tabla 36). El modelo matemático fue significativo y mostró un F-valor de 135.49 y un p -valor < 0.0001 (Tabla 37), además de tener un r^2 de 0.97 (Tabla 38). La Ecuación 36 predijo la respuesta de opacidad en función de la concentración de SLE. La figura 40.II ilustra el gráfico que representa la opacidad de la película de quitosano-SLE:

$$\text{Opacidad} = 3.373 + 0.242 \cdot \text{SLE} (\%) - 0.009 \cdot \text{SLE}^2 (\%) \quad (36)$$

Se observó que los valores de opacidad de las películas de quitosano aumentaron con la concentración de SLE. Se observaron resultados similares cuando se adicionó el alga *Kappaphycus alvarezii* a películas de almidón de maíz (Khalil et al., 2018).

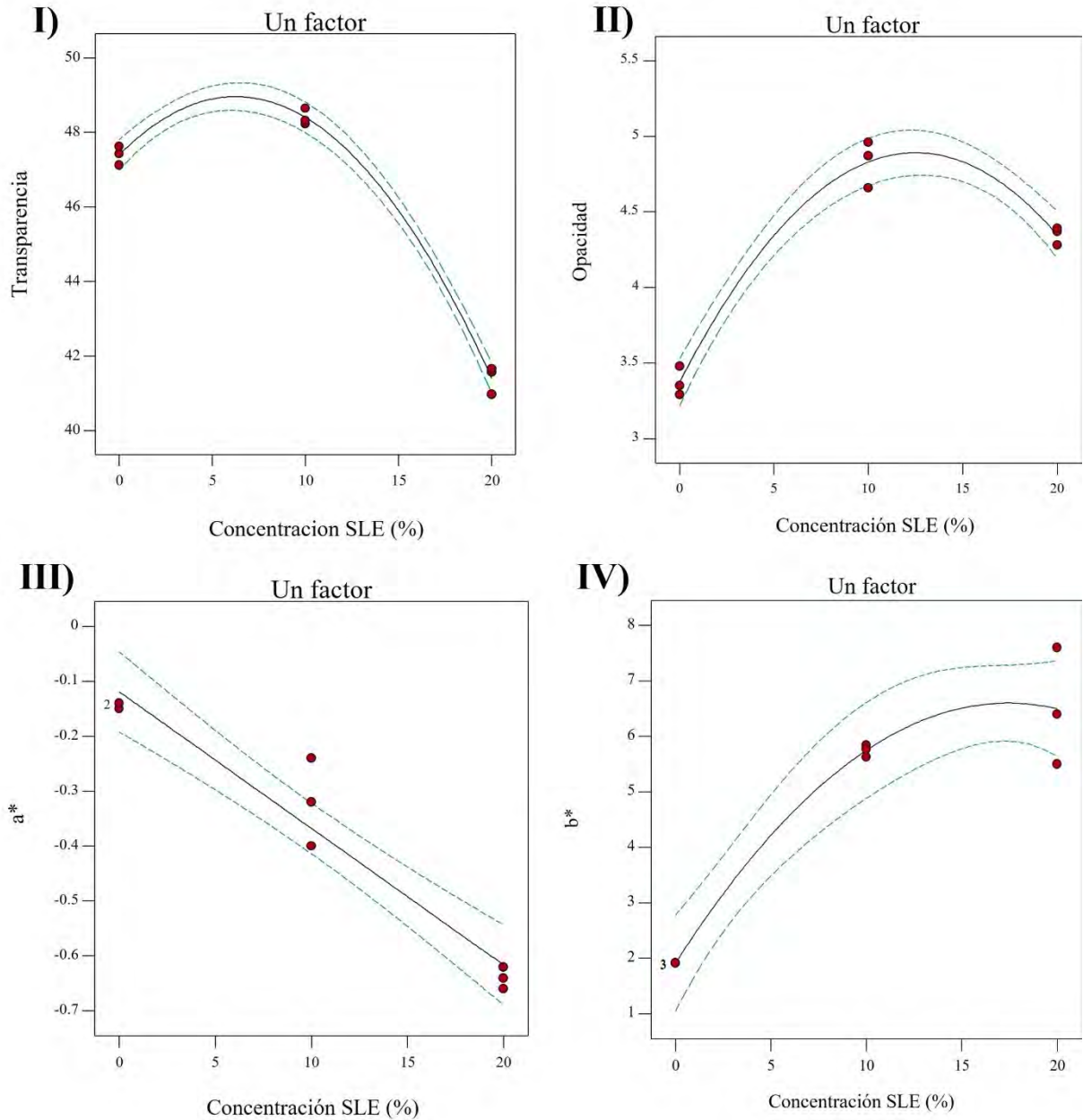


Figura 40. Gráfico de respuesta del efecto previsto de la concentración de SLE en los valores de I) Transparencia, II) Opacidad, III) a* y IV) b*. SLE es el extracto de alga *Saccharina latissima*. Elaboración propia.

La Tabla 36 muestra las coordenadas CIE de las películas de quitosano-SLE. Todos los datos se ajustaron a un modelo lineal. La propiedad L* osciló entre 86.11 y 89.19. Mientras que

el F-valor del modelo fue 10.05 y el p -valor = 0.0157 (Tabla 37). Sin embargo, el r^2 fue de 0.58, considerándolo bastante bajo. Respecto a los valores de la propiedad a^* , estos oscilaron entre -0.13 y -0.65 (Tabla 36). El modelo matemático fue significativo, con un F-valor de 108.20 y $p < 0.0001$, y un r^2 de 0.93 (Tabla 38). La Ecuación 37 predice los valores de a^* en función de la concentración de SLE. Mientras que la Figura 40.III muestra la representación gráfica de los valores de a^* de las películas:

$$a^* = -0.11 - 0.02 \cdot SLE (\%) \quad (37)$$

Por otro lado, los valores de b^* oscilaron entre 1.91 y 6.55 (Tabla 36), lo que significa que las películas tenían una tendencia hacia el amarillo cuando se añadió el extracto. El modelo matemático tuvo un F-valor de 48.55 y un p -valor = 0.0002 (Tabla 37), lo que indica que el modelo era significativo, con un r^2 de 0.94 (Tabla 38). La Ecuación 38 predice los valores b^* de las películas de quitosano-SLE. Por otro lado, la Figura 40.IV muestra la representación gráfica de los valores b^* de las películas:

$$b^* = 1.91 + 0.53 \cdot SLE (\%) - 0.01 \cdot SLE^2 (\%) \quad (38)$$

En base a los resultados obtenidos sobre las coordenadas CIE, los valores de a^* disminuyeron con la concentración de SLE, indicando una ligera tendencia al enrojecimiento. Mientras que los valores de b^* aumentaron, lo que significa que las películas parecían ser más amarillas cuando se añadió SLE a la composición.

4.3.8 Evaluación de las propiedades térmicas

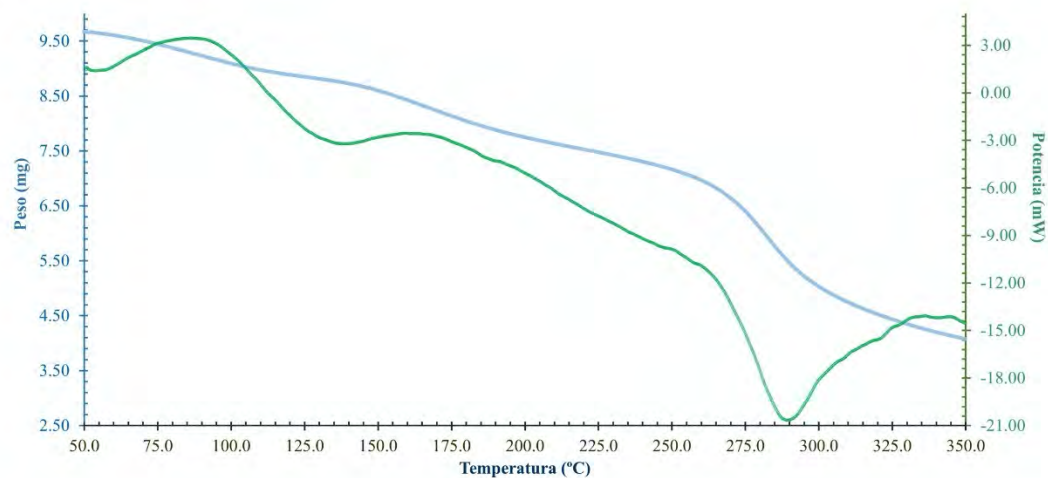
Los efectos del SLE sobre la propiedad térmica de las películas se estudiaron utilizando el TGA/DSC. Los termogramas de las películas se muestran en la Figura 41. La pérdida de peso en el rango de 50 a 125 °C se debió a la evaporación del ácido acético residual y el agua (libre y ligada) (Moura et al., 2015). La descomposición de unidades amina y grupos funcionales oxigenados puede ser responsable del segundo punto de pérdida de peso, que tuvo lugar entre 150 y 300 °C (Martínez-Camacho et al., 2010). La degradación del quitosano suele tener lugar

a una temperatura de 280 °C, aunque estudios previos demostraron que esta degradación podía ocurrir a temperaturas algo más elevadas (290 °C) (Leceta, Peñalba, Arana, Guerrero, & De La Caba, 2015). La degradación de las algas también ocurre en este rango de temperatura, además este paso está relacionado con otros procesos degradativos, como la despolimerización y descomposición de unidades poliméricas (Albertos et al., 2019; Peniche-Covas, Argüelles-Monal, & San Román, 1993). El tercer y último paso de pérdida de masa se produce de 300 a 350 °C debido a la degradación de $-\text{CH}_2\text{OH}$ y la desnaturalización de la estructura polimérica del biopolímero (Moura et al., 2015; Zawadzki & Kaczmarek, 2010). Los resultados mostraron que la pérdida de peso tanto en las películas de quitosano puro como en aquellas con SLE añadido a la matriz siguió una tendencia muy similar. Las pérdidas de peso total de las muestras fueron del 33.86 %, 34.24 % y 35.81 % en películas con SLE en una concentración del 0, 10 y 20 %, respectivamente. A partir de estos resultados, sugieren que la adición de extracto de algas a la matriz de quitosano no alteró las propiedades térmicas de la película. De hecho, se estudió y observó una mejoría de esta propiedad cuando se agregaron a la matriz algas y extractos acuosos de *Himanthalia elongate* y *Palmaria palmata* (Albertos et al., 2019).

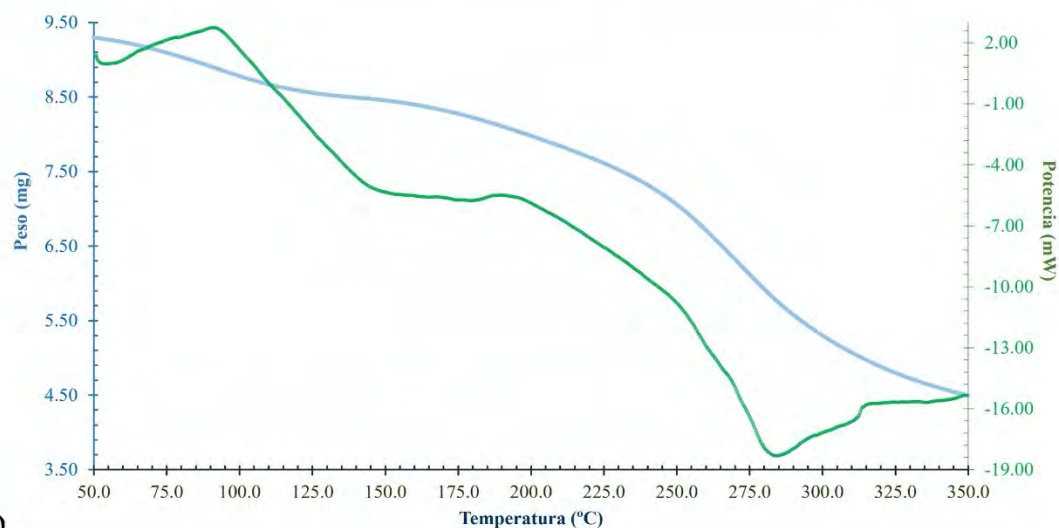
En cuanto al DSC, las películas exhibieron picos exotérmicos entre 50 y 125 –150 °C, debido a la evaporación del ácido acético y agua respectivamente (Moura et al., 2015). Además, durante esos picos se produjo la pérdida de las cadenas de quitosano (L. Zhang et al., 2021). La gráfica presentada en la Figura 39 muestra un claro pico endotérmico a 290 °C, que se debe a la descomposición del quitosano (Park & Zhao, 2004). Este pico es menos marcado y cambia a temperatura más bajas (280 – 285 °C) cuando se añadía SLE a la matriz. En muestras donde el SLE estaba presente, había una ligera tendencia a permanecer estable a los 175 – 200 °C. Esto podría deberse a la temperatura de fusión de las algas, como se observó en un estudio previo con el alga *Kappaphycus alvarezii* (Hermawan et al., 2019).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que la presencia de SLE en la matriz de quitosano no tiene influencia significativa en la estabilidad térmica de las películas. Además, la baja pérdida de peso observada durante el análisis indica que estas películas podrían ser usadas en el envasado de productos que requieren una exposición a temperaturas de pasteurización.

I)



II)



III)

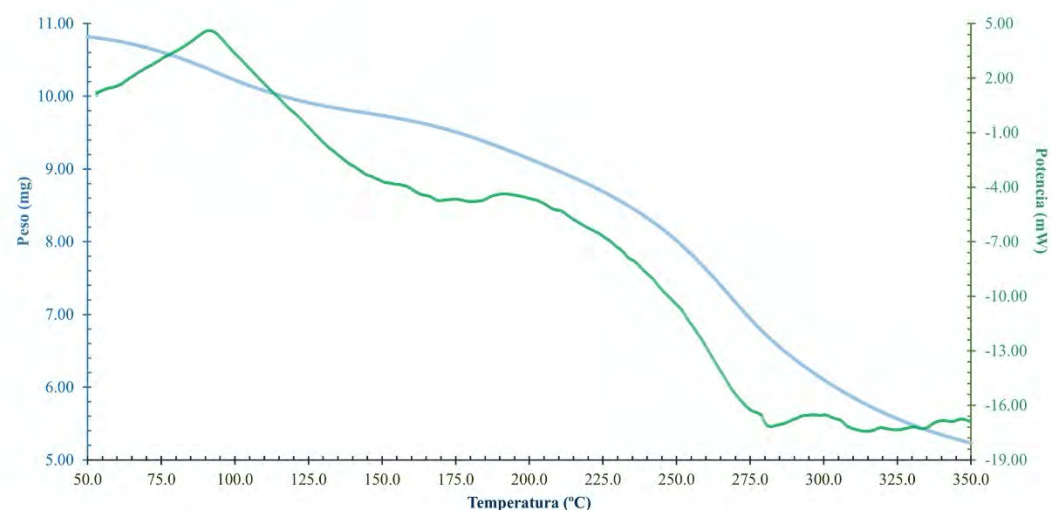


Figura 41. Termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido de películas de quitosano con glicerol (0.1 %) y extracto de alga *Saccharina latissima*: I) 1% de quitosano, II) 1% de quitosano y 10 % de extracto de alga marina, III) 1% de quitosano y 20% de extracto de alga marina. Elaboración propia.

4.3.9 Capacidad antioxidante en queso Havarti con películas activas como separadores

En la Figura 42 se puede observar las películas de quitosano puro y de quitosano-SLE usándose como separadores de las lonchas de queso Havarti. La actividad antioxidante, medida mediante los ensayos DPPH y ABTS*, se analizó tanto para las películas como para las muestras de queso. Los resultados se muestran en la Tabla 39.

Tabla 39. Propiedades antioxidantes de las películas utilizadas como separadores y de las muestras de queso Havarti envasadas. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

		Películas		
Días de almacenamiento		Ch	Ch_SLE10	Ch_SLE20
DPPH (%)	0	4.65 ± 1.60	3.49 ± 0.29	84.05 ± 0.25 ^a
	15	4.13 ± 1.54	7.85 ± 6.89	93.93 ± 0.00 ^b
	30	7.63 ± 0.36	6.60 ± 1.55	93.00 ± 0.14 ^b
	45	4.96 ± 2.88	2.84 ± 1.23	93.22 ± 0.49 ^b
ABTS* (%)	0	4.63 ± 0.76 ^a	7.01 ± 0.59 ^a	98.05 ± 1.04 ^b
	15	5.58 ± 0.93 ^a	13.82 ± 0.18 ^b	99.39 ± 0.10 ^c
	30	9.10 ± 0.37 ^b	14.18 ± 0.65 ^{bc}	99.52 ± 0.10 ^c
	45	10.10 ± 1.79 ^b	14.40 ± 3.30 ^{bc}	95.40 ± 0.38 ^a
		Queso		
Días de almacenamiento		Ch	Ch_SLE10	Ch_SLE20
DPPH (%)	0	4.32 ± 1.00	5.73 ± 3.44	11.79 ± 1.56
	15	5.67 ± 2.04	7.77 ± 1.58	12.55 ± 5.17
	30	6.76 ± 0.54	7.94 ± 1.52	12.34 ± 0.72
	45	6.54 ± 0.55	7.72 ± 1.52	12.14 ± 0.72
ABTS* (%)	0	11.70 ± 1.28 ^a	12.55 ± 8.14	23.52 ± 0.64 ^a
	15	8.67 ± 0.21 ^b	12.85 ± 0.52	19.52 ± 4.40 ^b
	30	9.16 ± 0.54 ^{bc}	9.87 ± 0.31	27.05 ± 0.68 ^b
	45	8.23 ± 0.46 ^{bc}	9.74 ± 0.69	26.80 ± 0.28 ^{bc}

Ch es quitosano, SLE es extracto del alga *Saccharina latissima*.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las películas utilizadas como control (películas de quitosano), obtuvieron valores de DPPH que oscilaron entre 4.13 y 7.63 %. Mientras que los valores de ABTS* sufrieron un ligero incremento ($p < 0.05$) de 4.63 a 10.10 %.

La adición de SLE al 10 % a las películas provocó un ligero aumento de la capacidad antioxidante para los valores de DPPH (2.84 a 7.85 %) y un aumento más sustancial para los valores de ABTS* (7.01 a 14.40 %), con diferencias estadísticamente significativas en ambas propiedades ($p < 0.05$). Las propiedades antioxidantes de las películas de quitosano-SLE 20 % fueron significativamente mayores que aquellas con una concentración de SLE al 10 %, con valores de DPPH que alcanzaron hasta el 93.93 % y de ABTS* hasta el 99.52 %. Esto podría deberse a la distribución limitada del extracto dentro de la matriz cuando había una concentración al 20 %, como se ve claramente en las imágenes SEM comentadas previamente. Las películas que contienen una concentración al 20 % de SLE mantuvieron una alta capacidad antioxidante durante todo el período de estudio.

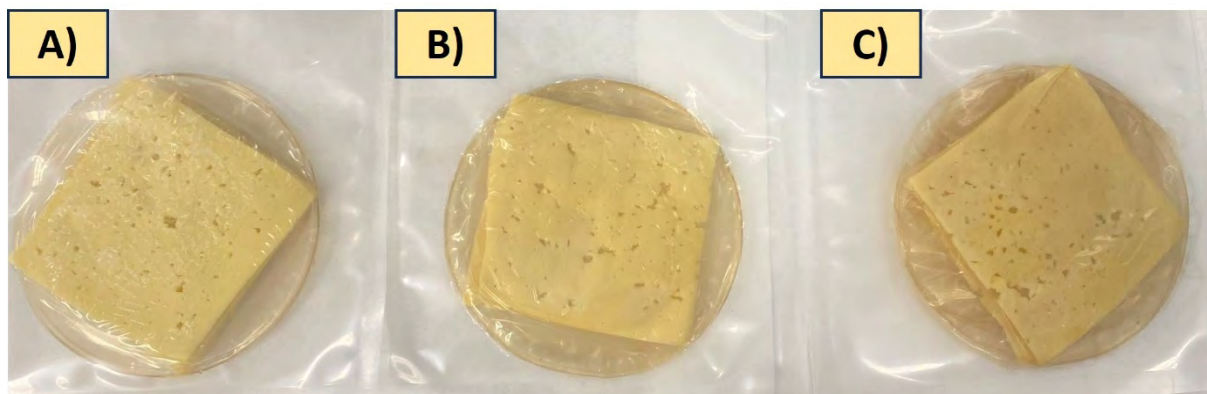


Figura 42. Lonchas de queso Havarti con separadores, selladas en bolsas al vacío y almacenadas a 5 °C durante 45 días: A) 1 % de quitosano, B) 1 % de quitosano y 10 % de extracto de alga marina, C) 1 % de quitosano y 20 % de extracto de alga marina. Elaboración propia.

En cuanto al queso envasado, los valores de DPPH oscilaron entre 4.32 y 6.76 %, mientras que los valores de ABTS* se encontraban entre 8.23 y 11.70 % (Tabla 39), mostrando diferencias no significativas en ambas propiedades. Las muestras de queso envasadas con películas enriquecidas con SLE mostraron valores antioxidantes mayores que las películas de

quitosano puro. El queso envasado con películas de quitosano – SLE 10 % obtuvo valores de DPPH de 5.73 a 7.94 %, y valores de ABTS* que oscilaron entre 9.74 y 12.85 % (Tabla 39), observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en este último. Por otro lado, las lonchas de queso en contacto con las películas de quitosano – SLE 20 % mostraron valores ligeramente superiores a las películas quitosano – SLE 10 %. En cuanto a los valores de DPPH, estos oscilaron entre 11.79 y 12.55 % (Tabla 39), mientras que los valores de ABTS* mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) oscilando entre 19.52 y 27.05 %. Con estos resultados, se puede concluir que hubo una liberación de compuestos antioxidantes de las películas al queso, demostrando el efecto de un envasado activo.

4.3.10 Oxidación lipídica del queso Havarti con películas activas como separadores

La Tabla 40 presenta los valores TBARS del queso Havarti según la influencia del tipo de película usada como separador durante un almacenamiento en refrigeración y durante 45 días. Los valores de TBARS para el queso Havarti separado con películas puras de quitosano oscilaron entre 7.20 y 19.98 mg de MDA/kg de queso. A partir del día 15 del estudio, estos valores se mantuvieron estables. Sin embargo, los valores más altos se obtuvieron cuando el queso fue envasado con película de quitosano puro durante 45 días (19.98 mg MDA/kg de queso).

Tabla 40. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las muestras de queso tipo Havarti. Ch es quitosano, SLE es extracto del alga *Saccharina latissima*. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Días de almacenamiento		Muestras queso		
		Ch	Ch_SLE10	Ch_SLE20
TBARS (mg MDA/kg queso)	0	7.20 ± 0.59 ^a	6.17 ± 0.51 ^a	6.00 ± 0.41 ^a
	15	18.22 ± 0.41 ^b	11.66 ± 0.49 ^b	10.55 ± 0.46 ^b
	30	19.55 ± 1.14 ^b	12.43 ± 0.20 ^b	10.85 ± 0.39 ^b
	45	19.98 ± 0.41 ^b	12.09 ± 0.34 ^b	10.55 ± 0.46 ^b

De hecho, al agregar SLE en una concentración del 10 %, los valores de TBARS variaron de 6.17 a 12.09 mg de MDA/kg de queso. Cuando la concentración de SLE aumentaba al 20 % se obtuvieron valores más bajos, de 6.00 a 10.84 mg de MDA/kg de queso. Esto implica una reducción del 52.8 % de la oxidación lipídica en las muestras de queso tras 45 días de almacenamiento refrigerado en comparación con las películas de quitosano puro. Este fenómeno puede explicarse debido a la alta capacidad antioxidante mostrada por el SLE, que posteriormente mejora su eficacia al mitigar la oxidación lipídica. Según los resultados obtenidos, ambos tipos de películas enriquecidas (al 10 y al 20 % de concentración) utilizadas como separadores influyeron significativamente en el grado de oxidación lipídica en las muestras de queso, lo que demuestra su utilidad como película activa.

4.4 DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDAS CON ACEITE ESENCIAL DE SÁNDALO *SANTALUM ALBUM*

Estos resultados responden al objetivo 4 y se publicaron en la siguiente revista Q1 con los datos bibliográficos de la Tabla 41:

Publicación V (PV): Flórez, M., Cazón, P., Vázquez, M. (2022). Active Packaging Film of Chitosan and *Santalum album* Essential Oil: Characterization and Application as Butter Sachet to Retard Lipid Oxidation. *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 100938. DOI: 10.1016/j.fpsl.2022.100938

Tabla 41. Datos publicación V.

Título		Active packaging film of chitosan and <i>Santalum album</i> essential oil: Characterization and application as butter sachet to retard lipid oxidation
Autores		María Flórez, Patricia Cazón, Manuel Vázquez
Afiliaciones		Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología; Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo
Año		2022
Revista		Food Packaging and Shelf Life
Volumen		34
Editorial		Elsevier
eISSN		2214-2894
DOI		https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100938
Contribución del doctorando		Desarrollo, análisis experimental y redacción del borrador del artículo
Indicadores de calidad 2022	Factor de impacto	8,80
	Ranking Revista	Q1 (37/310) Food Science
Licencia		CC BY
Copia íntegra		Anexo V

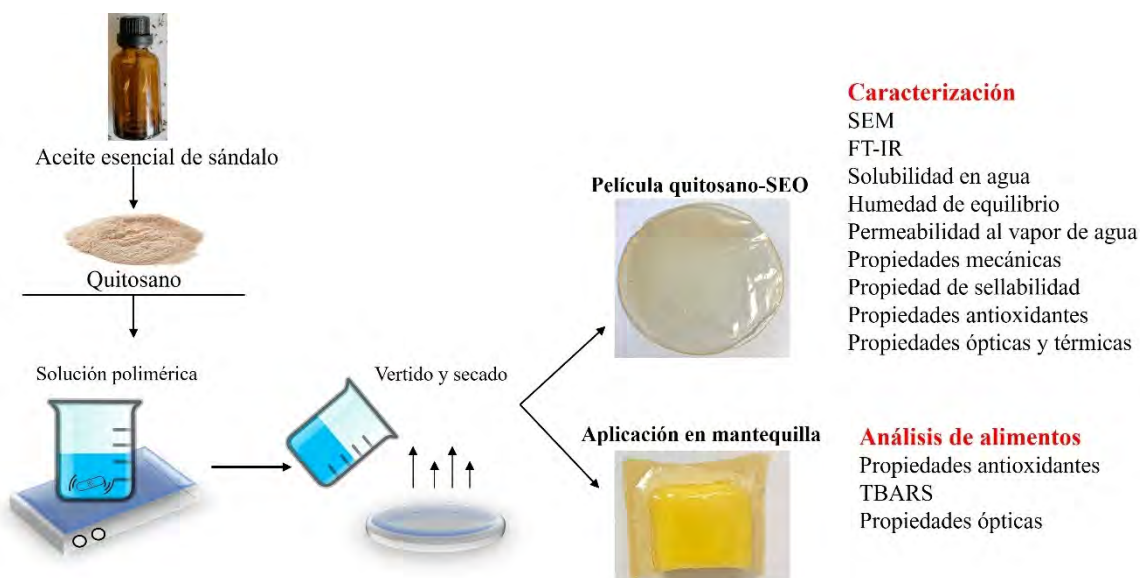


Figura 43. Resumen gráfico Publicación V. Elaboración propia.

Teniendo en cuenta la posible aplicación de aceite esencial de sándalo (SEO) en el envasado de alimentos y la idoneidad del quitosano como matriz para transportar agentes activos, se estudió las propiedades fisicoquímicas de una nueva película quitosano-SEO. El ácido málico se seleccionó como disolvente del quitosano para desarrollar películas solubles en agua y así poder eliminarlas de forma sencilla después de su uso sin dejar residuos. Se analizó el efecto del SEO en diferentes proporciones sobre las propiedades mecánicas, WVP, %W, de solubilidad, de sellabilidad (S) y antioxidantes de la película activa. Además, se evaluó la morfología superficial, la compatibilidad y la termoestabilidad, el espectro infrarrojo de absorción/emisión y las propiedades térmicas de las películas. Asimismo, se aplicó la película como envasado activo en mantequilla, donde se analizó las propiedades antioxidantes y ópticas de las películas, así como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico de las muestras de mantequilla tras 90 días de almacenamiento.

4.4.1 Microscopía electrónica de barrido

Las imágenes obtenidas del análisis SEM de la parte inferior, superior y transversal de la película de quitosano con aceite esencial de sándalo se muestran en la Figura 44.

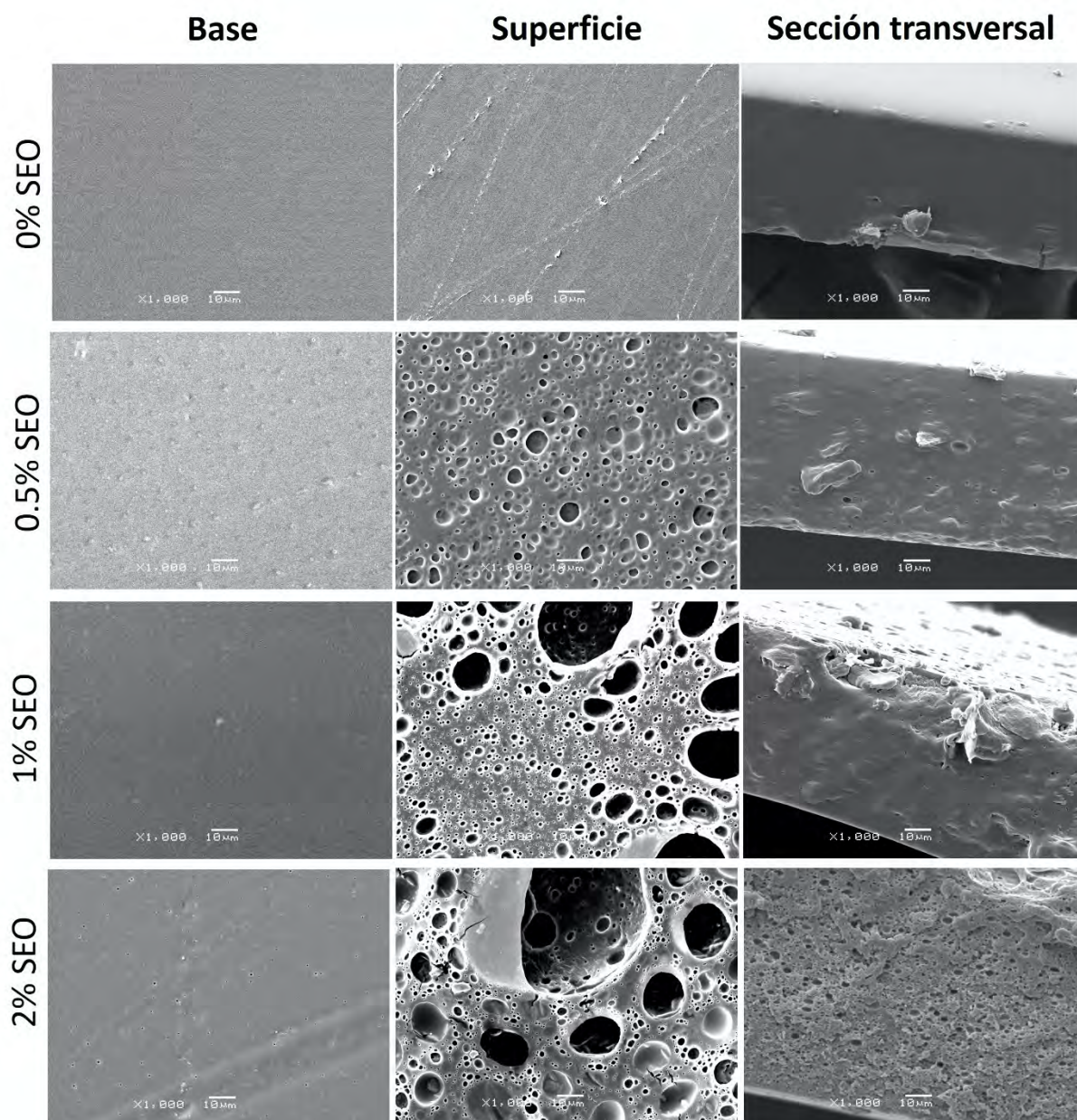


Figura 44. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de películas de quitosano con aceite esencial de sándalo (SEO). Elaboración propia.

Como se puede observar en las fotografías, las películas de quitosano puro mostraban una superficie lisa y plana. Sin embargo, en cuanto se adicionaba el SEO en concentraciones de 0.5 a 2 % a la matriz, se producía un cambio notable en la microestructura de las películas. Las imágenes referidas a la base nos confirman que la adición de la lecitina de soja a la composición permitió una distribución homogénea del aceite esencial en la matriz. Asimismo, se reafirmó la

eficacia del baño de ultrasonidos como método para eliminar las burbujas presentes en la mezcla, ya que no se presentó ni irregularidades ni roturas en las películas.

Las imágenes SEM relacionadas con la superficie mostraban que la uniformidad de la morfología de la película se veía comprometida cuando el SEO se añadía a la mezcla. De hecho, se puede observar la presencia de gotas de aceite atrapadas en la red de polisacáridos. A mayor concentración de SEO, las gotas resultaban ser más grandes. Esto podría deberse a que se producía colisiones entre las gotas de aceite con mayor frecuencia, dando lugar a una posible coalescencia (Peng & Li, 2014). Asimismo, estas gotas no eran totalmente esféricas, lo que puede deberse a las fuerzas de tracción que produce la red de quitosano cuando el disolvente se evapora (Hafsa et al., 2016).

Por otro lado, las imágenes relacionadas con el corte transversal nos muestran claramente la presencia de una fase oleosa en la película. Esto se observa muy bien al ver que el corte en películas con SEO no es tan limpio como en comparación al de la película de quitosano puro. A su vez, a la hora de manipular las películas se apreciaba que, a mayor concentración de SEO, la adhesividad de estas era mayor.

4.4.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Este análisis nos permitió identificar las posibles interacciones moleculares entre los diversos grupos funcionales del quitosano, el ácido málico, la lecitina de soja y el SEO en la estructura de la película. Como se puede observar en la Figura 45, las muestras de películas de quitosano puro mostraron todas las bandas características.

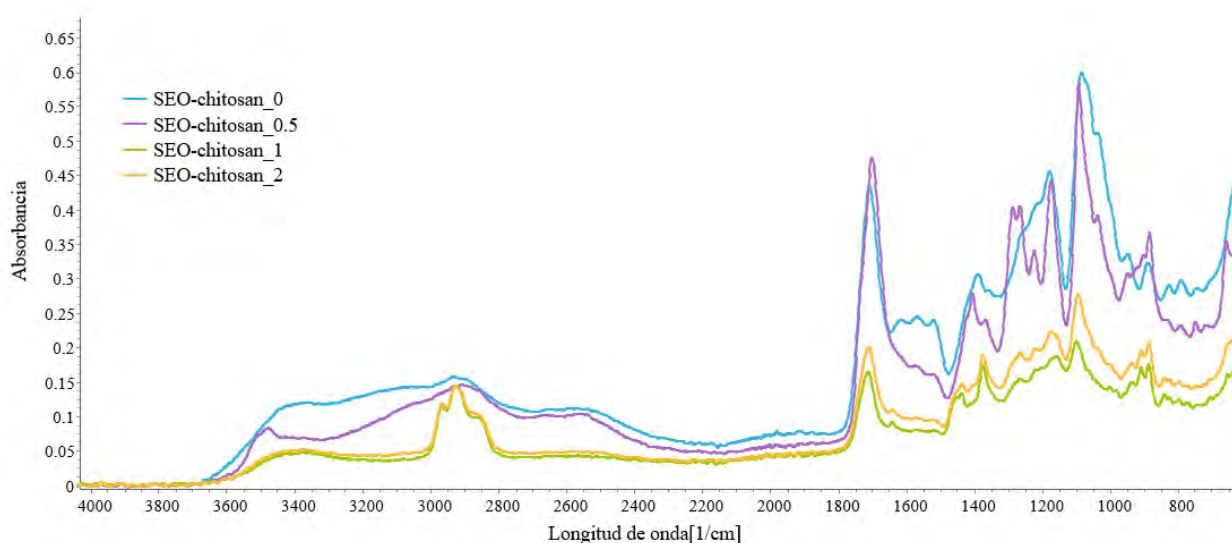


Figura 45. Espectro FT-IR de películas de quitosano con aceite de sándalo (SEO). Elaboración propia.

En las bandas de absorción de $3500\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$, se observan las vibraciones de estiramiento de -OH y -NH. El pico de absorción encontrado a 2928 cm^{-1} se relaciona con las vibraciones de estiramiento del enlace C-H en el grupo $-\text{CH}_2$, siendo más marcado cuanto más aceite se encontraba en la formulación (Kalaycıoğlu, Torlak, Akın-Evingür, Özen, & Erim, 2017). Mientras que las vibraciones amida-I de estiramiento C=O se aprecian claramente en el pico de absorción a 1700 cm^{-1} , las vibraciones amida-II de estiramiento NH_2 están representadas por el pico de absorción a 1554 cm^{-1} (Priyadarshi, Sauraj, et al., 2018). Las vibraciones observadas en las bandas de absorción entre $1200\text{ y }800\text{ cm}^{-1}$ se deben a los enlaces C-C y C-O y a la flexión de los enlaces C-H en la estructura del polisacárido (Liu et al., 2013).

En el pico de absorción a 1745 cm^{-1} , se observó un pico realmente llamativo, que se volvía más marcado cuando el SEO se encontraba en la formulación. Esto se explica porque su presencia produjo un aumento de la interacción entre el CH y el aceite esencial de sándalo. Esta banda distintiva de los aceites se debe a las vibraciones de estiramiento C=O en las estructuras de éster contenidas en los ácidos grasos (Priyadarshi, Sauraj, et al., 2018). Probablemente debido a las interacciones entre el quitosano, el aceite y la lecitina de soja, la intensidad del pico amida-II en las películas con aceite se ve reducido.

A partir de los resultados comentados, se puede determinar que la adición de SEO a las películas de quitosano produce modificaciones en los espectros. Estos cambios podrían atribuirse a una posible interacción y compatibilidad intermolecular entre los grupos funcionales del aceite esencial y los grupos hidroxilo y amino presentes en la matriz de quitosano.

4.4.3 Evaluación de la solubilidad en agua, el contenido de humedad de equilibrio y la permeabilidad al vapor de agua

Las propiedades de la matriz de quitosano dependen en gran medida del tipo de disolvente utilizado. En este caso, el ácido málico fue utilizado como disolvente ya que de esta manera se obtenían películas solubles en agua, además de que tenían la capacidad de retirarse con facilidad de los alimentos (Cazón et al., 2021). Esta propiedad de hidrosolubilidad de la película nos interesa para la aplicación en alimentos con alto contenido en grasa y bajo contenido en humedad como es la mantequilla.

Respecto a la solubilidad de las películas de quitosano-SEO, tras sumergirlas en agua su estructura desapareció, por lo que se puede determinar que eran totalmente solubles en agua. Esto se debe a que el ácido málico usado en la formulación no es un disolvente volátil, de manera que permaneció en la matriz y mejoró la solubilidad de las películas. Cuando el SEO se adicionó tampoco se disminuía la solubilidad de las películas.

En cuanto al contenido de humedad en equilibrio de las muestras, los resultados están representados en la Tabla 42 y como se observa este osciló entre el 0.60 y 0.78 %. Teniendo en cuenta al análisis estadístico a realizar, se puede concluir que la adición de SEO a las películas de quitosano no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de humedad de las muestras.

Tabla 42. Propiedades físicas y mecánicas de las películas de quitosano-SEO. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra película	%W	WVP	TS	%E
	%	g/m·s·Pa	MPa	%
SEO-chitosan_0	0.78 ± 0.13	6.70·10 ⁻¹¹ ± 7.09·10 ⁻¹² ^a	5.78 ± 2.62 ^a	27.68 ± 2.91 ^a
SEO-chitosan_0.5	0.60 ± 0.06	4.52·10 ⁻¹¹ ± 5.22·10 ⁻¹² ^b	11.40 ± 2.70 ^b	48.86 ± 6.38 ^b
SEO-chitosan_1	0.68 ± 0.11	4.26·10 ⁻¹¹ ± 1.56·10 ⁻¹² ^{bc}	2.20 ± 0.43 ^c	74.01 ± 10.9 ^c
SEO-chitosan_2	0.78 ± 0.20	3.34·10 ⁻¹¹ ± 8.28·10 ⁻¹² ^c	2.99 ± 0.43 ^c	94.53 ± 9.98 ^d

Muestra película	YM	BS	DB	S
	MPa	g	mm	N/m
SEO-chitosan_0	35.74 ± 12.07 ^a	3209.49 ± 1222.02	7.18 ± 0.78	195.20 ± 33.74 ^a
SEO-chitosan_0.5	68.43 ± 12.89 ^b	3147.06 ± 404.13	6.34 ± 0.67	80.88 ± 6.49 ^{bc}
SEO-chitosan_1	7.84 ± 0.74 ^c	2680.35 ± 543.72	6.36 ± 0.89	79.09 ± 1.72 ^b
SEO-chitosan_2	6.81 ± 0.80 ^c	2874.04 ± 380.04	6.19 ± 0.34	107.94 ± 8.45 ^c

SEO es aceite esencial de sándalo, %W es contenido de humedad en equilibrio, WVP es permeabilidad al vapor de agua, TS es resistencia a la tracción, %E es el porcentaje de alargamiento hasta la rotura, YM es módulo de Young, BS es resistencia al estallido, DB es distancia al estallido, S es sellabilidad.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Respecto a la permeabilidad al vapor de agua de las películas, este osciló entre $3.34 \cdot 10^{-11}$ – $6.70 \cdot 10^{-11}$ g/m·s·Pa (Tabla 42). En este caso, el análisis estadístico mostró que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) al adicionar SEO a la película de quitosano. La presencia de compuestos hidrofóbicos en el aceite esencial contribuyó a la disminución de los valores de WVP, que alcanzó una reducción de casi el 50 % en muestras con una concentración de SEO del 2 %.

Apoyándonos en el análisis SEM, las gotas de aceite que se observan, dificultaron la permeabilidad de las moléculas de agua a través de la matriz. A su vez, el gran número de

enlaces de hidrógeno entre los grupos funcionales del quitosano y el SEO, podrían disminuir la disponibilidad de grupos hidrófilos. Esto haría que hubiese menor interacción con las moléculas de agua, reduciendo los valores de WVP (Shen & Kamdem, 2015).

4.4.4 Evaluación de las propiedades mecánicas y sellabilidad

En cuanto a las propiedades mecánicas, el análisis mostró valores de TS que iban en un rango de 2.20 – 11.40 MPa, %E de 27.68 – 94.53 % y YM de 6.81 – 68.43 MPa (Tabla 42). El análisis estadístico demostró que la adición de SEO a la película de quitosano tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en las tres propiedades analizadas en los análisis de tracción.

Analizando los resultados de manera global, los valores de TS y YM disminuyeron mientras que los de %E aumentaron al adicionarse el aceite. Esto significa que la película es menos resistente a la rotura pero que aumenta la capacidad de deformación cuando el aceite está presente en la formulación. Estos cambios a nivel mecánico se podrían explicar por la clara disposición estructural de la fase lipídica en la matriz de quitosano, como nos mostró las imágenes del análisis SEM. Estas disposiciones generaron una matriz discontinua lo que daba lugar a interacciones físicas desiguales (Flórez et al., 2022b). Asimismo, la incorporación de SEO a las películas podría alterar las interacciones polímero-polímero. Esto resultaría en interacciones aceite esencial-polímero más débiles, lo que podría provocar un efecto plastificante de la película (Hosseini, Rezaei, Zandi, & Farahmandghavi, 2015).

Respecto a los análisis de punción, los valores de BS se encontraban en el rango de 2680.35 – 3209.49 g y de DB de 6.19 – 7.18 mm (Tabla 42). A pesar de la escasa variabilidad entre los resultados, los análisis estadísticos demostraron que había un efecto estadísticamente no significativo al añadirse el SEO a la película de quitosano. Se debe tener en cuenta que bajo fuerzas de deformación como puede ser las ejercidas en los análisis de tracción o punción, la matriz puede mostrar diferentes comportamientos de resistencia y deformación (Cazón et al., 2021)

Por otro lado, el análisis de sellabilidad de las películas mostraron valores representados en la Tabla 42 entre 79.09 y 195.20 N/m. El análisis estadístico mostró que la adición de SEO a las películas de quitosano tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en la sellabilidad de las muestras. Como se observa en los resultados, se produjo una disminución de esta propiedad a medida que aumentaba la concentración de SEO. De hecho, la película pura de quitosano mostró los valores más altos de sellabilidad. Este hecho podría deberse a los diferentes componentes activos presentes en el aceite esencial de sándalo, que podría ejercer una modificación en la red estructural de la película, disminuyen la capacidad de sellabilidad de la misma (Flórez et al., 2022a).

4.4.5 Evaluación de las propiedades antioxidantes

Los análisis antioxidantes nos permitieron obtener resultados a partir de dos métodos: DPPH y ABTS[•]. Los resultados de estos análisis se encuentran representados en la Tabla 43. Por un lado, el aceite esencial de sándalo mostró valores de DPPH de 78.23 % y de ABTS[•] de 15.65 %. Esto confirma la capacidad antioxidante del aceite esencial y lo hace idóneo para la aplicación en películas en contacto con alimentos. Por otro lado, las películas de quitosano adicionadas con SEO mostraron valores de DPPH en un rango del 7.34 al 23.69 %, mientras que la actividad de eliminación de ABTS[•] se situaba entre el 2.54 y el 19.22 %. El análisis estadístico determinó que en ambos casos, la actividad antioxidante aumentó significativamente ($p < 0.05$) con el incremento de la concentración de aceite (del 0.5 al 2 %).

Tabla 43. Propiedades antioxidantes de las películas desarrolladas a base de quitosano y SEO. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra	DPPH (%)	ABTS [•] (%)
SEO	78.23 ± 4.87	15.65 ± 0.86
SEO-chitosan_0.5	7.34 ± 1.64 ^a	2.54 ± 0.27 ^a
SEO-chitosan_1	12.74 ± 3.38 ^a	8.75 ± 0.10 ^b
SEO-chitosan_2	23.69 ± 6.03 ^b	19.22 ± 0.57 ^c

SEO es aceite esencial de sándalo, % DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y %ABTS' (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).

Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Es importante recalcar que el aceite esencial de sándalo cuenta con una gran variedad de alcoholes sesquiterpenoides denominados santaloles (Demole, Demole, & Enggist, 1976). El α -santalol es el principal principio bioactivo presente en el aceite, y al que se le atribuye la mayor parte de estas actividades antioxidantes (Misra & Dey, 2013).

4.4.6 Evaluación de las propiedades ópticas

Como se observa en la Tabla 44, las películas de quitosano-SEO mostraron valores de porcentaje medio de transmitancia comprendidos entre 6.01 - 0.16 %, 16.53 – 1.14 % y 35.88 – 3.50 % en las regiones UV-C, UV-B y UV-A respectivamente. Al analizar estadísticamente los resultados se concluyó que la adición de SEO a las películas de quitosano producía una disminución significativa ($p < 0.05$) de los valores de transmitancia. Esta reducción de la transmitancia se interpreta como una mejoría por parte de las películas de la capacidad de bloquear rayos UV. Los mejores resultados de transmitancia se obtuvieron en las películas enriquecidas con un 2 % de SEO, donde el %T fue inferior al 5 % en la región de longitud de onda de 200 – 400 nm. Estos resultados corroboraron que las películas de quitosano enriquecidas con el aceite esencial podían retardar la oxidación lipídica comúnmente inducida por los rayos UV.

La transparencia y opacidad de las películas son unas propiedades claves a analizar, ya que repercuten directamente en el aspecto visual del producto que va a recubrir. Como se observa en la Tabla 44, los valores de transparencia oscilaron entre 18.01 y 37.40, mientras que los de opacidad variaron entre 22.13 y 3.87. Observando los resultados, se puede determinar que la presencia del aceite esencial en la matriz de quitosano favoreció la disminución de la transparencia a la vez que aumentaba la opacidad de las películas.

Tabla 44. Propiedades ópticas y parámetros de color de las películas. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra película	UV-C %T	UV-B %T	UV-A %T	Transparencia	Opacidad
SEO-chitosan_0	6.01 ± 0.78	16.53 ± 1.28	35.88 ± 1.84	34.90	3.87
SEO-chitosan_0.5	1.59 ± 0.01	6.54 ± 0.04	19.73 ± 0.08	37.40	8.38
SEO-chitosan_1	0.33 ± 0.00	2.45 ± 0.01	7.87 ± 0.03	32.22	19.39
SEO-chitosan_2	0.16 ± 0.18	1.14 ± 0.95	3.50 ± 2.09	18.01	22.13
Muestra película	L*	a*	b*		
SEO-chitosan_0	84.73 ± 3.81 ^a	-0.48 ± 0.27 ^a	6.18 ± 0.45 ^a		
SEO-chitosan_0.5	66.62 ± 8.17 ^b	1.67 ± 1.01 ^b	15.1 ± 4.45 ^b		
SEO-chitosan_1	59.87 ± 11.14 ^a	1.21 ± 0.31 ^b	8.40 ± 1.27 ^a		
SEO-chitosan_2	33.88 ± 6.52 ^a	1.62 ± 0.71 ^b	8.15 ± 1.50 ^a		

SEO es aceite esencial de sándalo, UV-C (200-280 nm), UV-B (280-315 nm), UV-A (315-400 nm), %T es porcentaje de transmitancia, L* es luminosidad: negro = 0 y blanco = 100, a*: verde = -a* y rojo = +a*, b*: azul = -b* y amarillo = +b*.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las coordenadas CIE (Tabla 44) de las películas presentó unos valores de L* que variaron entre 33.88 y 84.73. En este caso, la presencia de SEO en la matriz tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con las películas de quitosano puro. Al aumentar la concentración de SEO, los valores de L* disminuyeron significativamente, lo que indica una tendencia a oscurecerse de la película (Zhang et al., 2018). Por otro lado, los valores de b* aumentaron de 6.18 a 15.1 y de a* de -0.48 a 1.67 cuando el aceite se encontraba en una concentración del 0.5 %. Este incremento de los valores de a* y b* nos explica que las muestras de las películas tenían una tendencia al enrojecimiento y al amarilleamiento en comparación con la película pura de quitosano.

4.4.7 Evaluación de las propiedades térmicas

El comportamiento térmico de las películas fue similar en todas las muestras, caracterizado por tres puntos característicos que se pueden observar en la Figura 46.

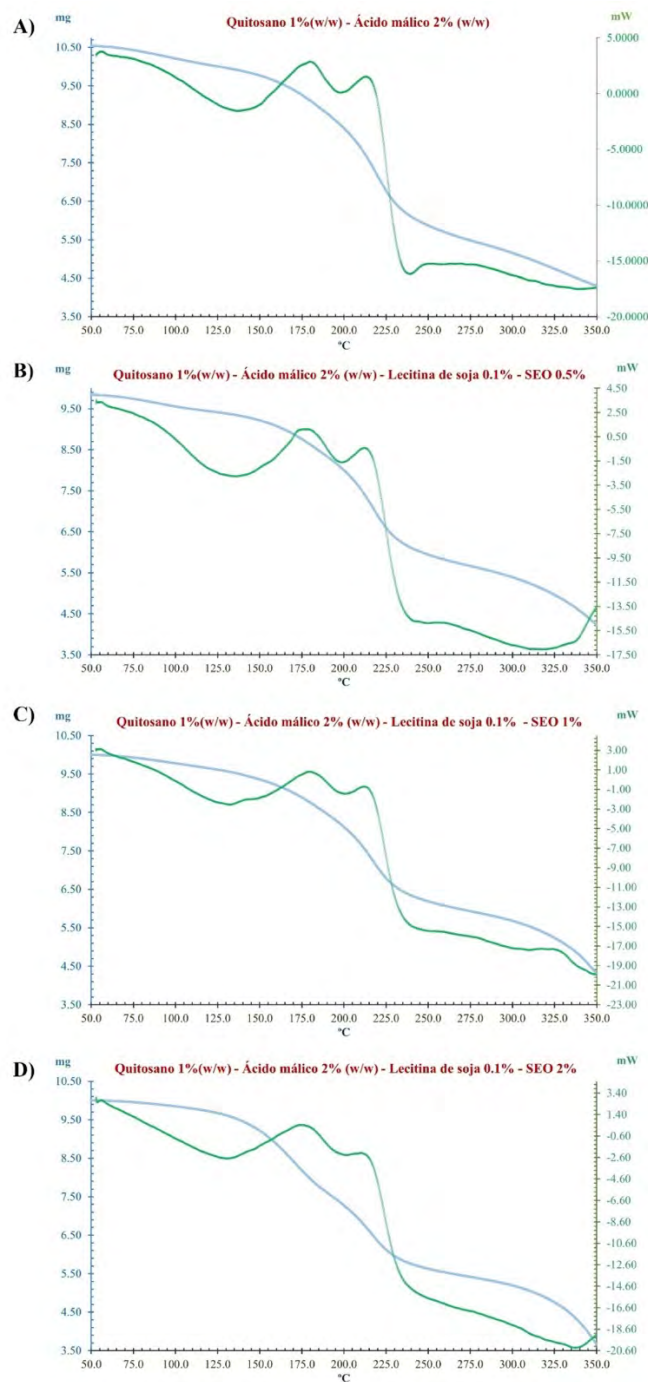


Figura 46. Termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido de películas de quitosano y SEO. SEO es aceite esencial de sándalo. Elaboración propia.

En primer lugar, hay una pérdida de peso significativa entre 50 y 150 °C, que se debe a la pérdida de agua ligada a la estructura interna de la película (Chu et al., 2019). Si se observa detenidamente, la pérdida de peso fue más lenta en aquellas películas que no tenían aceite en su formulación, lo que encaja con los datos obtenidos del contenido de humedad en equilibrio. A su vez, es importante recalcar que parte de esta agua presente en la película podría evaporarse antes de que se realizase el análisis (Cazón et al., 2021). El segundo paso a tener en cuenta es cuando se produce la degradación térmica del quitosano, allá por los 225 °C (Lewandowska, 2009). Y finalmente, el tercer paso se produce cuando se degrada el subproducto generado por el quitosano durante el proceso de degradación térmica.

Por otro lado, se encontraron picos endotérmicos entre los 140 y 240 °C. Estos picos se relacionan con el agua absorbida a través de enlaces de hidrógeno, además de la degradación del grupo amino del quitosano y del ácido málico (Bonilla et al., 2014). Como se observa en la Figura 46, a 225 °C las pérdidas de peso totales de las muestras aumentaron directamente con la concentración de SEO. Concretamente, las películas incorporadas con SEO hasta el 1.5 % sufrieron una menor pérdida de peso al compararlas con la película control, lo cual significa que poseen una mayor estabilidad térmica. Sin embargo, lo contrario ocurrió cuando el SEO se encontraba al 2 %, donde se producía una ligera disminución de esta propiedad. Esto podría deberse a que las altas concentraciones del aceite provocan un aumento de la discontinuidad de la matriz de la película. Generando una disminución de la compatibilidad del sistema multifásico, lo que hace que las películas pierdan más peso y tengan menor resistencia a la presencia de calor (Noshirvani et al., 2017).

En conclusión, los resultados obtenidos a partir del análisis TGA/DSC sugiere que las interacciones producidas entre el quitosano y el SEO (del 0.5 al 1 %) aumentan la estabilidad térmica de las películas, disminuyendo a su vez su peso. Otro hallazgo importante que se extrae de este estudio es el hecho de que las películas se mantenían estables hasta alcanzar los 120 °C. Es decir, esto significaría que las películas de quitosano y SEO podrían aplicarse en tratamientos a altas temperaturas como puede ser la pasteurización.

4.4.8 Estabilidad de almacenamiento de la mantequilla envasada en bolsitas de quitosano y SEO

En la Figura 47 se puede apreciar las muestras de mantequilla envasadas con películas de quitosano-SEO en el día 90 de almacenamiento. Se analizaron las propiedades antioxidantes de las películas de quitosano que se usaron como envase activo.



Figura 47. Muestras de mantequilla envueltas en películas de quitosano-SEO almacenadas a 4 °C durante 90 días. CH es quitosano, SEO es aceite esencial de sándalo. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto. Elaboración propia.

En la Tabla 45 se presentan los valores de los análisis antioxidantes y ópticos de las películas, y el análisis TBARS de la mantequilla a los 90 días. En cuanto a los valores de actividad de eliminación de radicales DPPH, se produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) de los valores del 10.70 al 23.14 % para las películas de quitosano con un 1 % y un 2 % de SEO, respectivamente. A su vez, los valores de %ABTS* oscilaron entre el 6.68 y el 19.34 %, produciéndose un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al adicionarse cualquier concentración de SEO. A partir de los resultados presentados, se puede sugerir que las películas mantuvieron con éxito sus propiedades antioxidantes tras 3 meses de almacenamiento en refrigeración.

Tabla 45. Propiedades antioxidantes y ópticas de películas de quitosano aplicadas sobre mantequilla tras 3 meses de almacenamiento. TBARS de la mantequilla tras 3 meses de almacenamiento. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.

Muestra	DPPH (%)	ABTS [*] (%)	TBARS mg MDA / kg mantequilla
Mantequilla sin película	-	-	616.90 ± 9.58 ^a
Mantequilla CH_SEO_0	10.70 ± 2.46 ^a	6.68 ± 0.31 ^a	417.91 ± 4.43 ^b
Mantequilla CH_SEO_0.5	6.68 ± 1.65 ^a	11.42 ± 0.72 ^b	414.66 ± 5.60 ^b
Mantequilla CH_SEO_1	12.11 ± 3.40 ^a	11.87 ± 0.38 ^b	410.77 ± 8.27 ^b
Mantequilla CH_SEO_2	23.14 ± 6.07 ^b	19.34 ± 0.12 ^c	393.25 ± 6.22 ^c

Muestra	L [*]	a [*]	b [*]
Mantequilla sin película	83.74 ± 0.29	-1.03 ± 0.07 ^{bc}	36.26 ± 0.64
Mantequilla CH_SEO_0	80.28 ± 2.22	1.54 ± 1.01 ^a	38.81 ± 4.73
Mantequilla CH_SEO_0.5	81.83 ± 0.99	1.09 ± 0.55 ^{ac}	37.14 ± 2.71
Mantequilla CH_SEO_1	78.17 ± 2.19	1.96 ± 0.72 ^a	45.17 ± 2.24
Mantequilla CH_SEO_2	78.47 ± 1.51	1.13 ± 0.39 ^a	44.01 ± 1.49

SEO es aceite esencial de sándalo, TBARS son las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Los valores se expresan como media ± desviación estándar.

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Para analizar la autooxidación lipídica del alimento, se realizó el análisis TBARS. La muestra control (aquella que no estaba envasada con la película activa) mostró al finalizar el estudio unos valores de TBARS de 616.90 mg MDA/kg de mantequilla. Por otro lado, la mantequilla envasada con la película mostró unos valores que se encontraban en un rango de 417.91 a 393.25 mg MDA/kg de mantequilla. Al realizar el análisis estadístico se concluyó que los valores de TBARS mostraron un efecto significativo de las muestras envasadas ($p < 0.05$) en comparación con la muestra control. El principal hallazgo fue que la oxidación lipídica de la mantequilla disminuyó en un 36 % tras tres meses de almacenamiento gracias a la aplicación de las películas de quitosano-SEO. Este hecho se respalda con otros estudios, como el de la aplicación de un envase de quitosano al que se le incorporó óxido de grafeno que consiguió prolongar la vida útil de la margarina durante 30 días (Han Lyn, Tan, Zawawi, & Nur Hanani, 2021). A partir de este resultado, se determina que la presencia de aceite esencial de sándalo disminuye la oxidación de este producto alimentario.

4.4.9 Propiedades ópticas de las películas para envolver mantequilla

Las coordenadas CIE de las muestras de mantequilla envueltas con películas de quitosano-SEO se encuentran representadas en la Tabla 45. Los valores de luminosidad (L^*) variaron de 80.28 a 78.47, mientras que los valores de b^* fueron de 38.81 a 44.01. En este caso, los valores no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). No obstante, los valores de a^* variaron de 38.81 a 44.01, ejerciendo un efecto significativo ($p < 0.05$) al compararlo con la mantequilla control. Estos resultados nos indica que el brillo de las películas y el amarilleo de las muestras no se vieron afectadas por la aplicación de la película. Únicamente se modificó ligeramente el color de enrojecimiento de las películas, pero este hecho era imperceptible al ojo humano. Como se observa en la Figura 47, las películas tenían suficiente transparencia como para mantener el aspecto visual de la mantequilla a lo largo del tiempo, permitiendo que el consumidor pueda observarla sin alteraciones significativas.

5. DISCUSIÓN GENERAL

En este apartado se presenta una discusión general de los resultados obtenidos en las diferentes fases de la investigación. Se establece una relación entre los artículos que conforman esta tesis con el objetivo de unificar el conocimiento y la información adquirida. Aunque el método de elaboración de las películas a lo largo de este trabajo siempre ha sido el mismo (método de evaporación del solvente), el comportamiento de las películas y los resultados obtenidos de las diversas propiedades analizadas fueron diferentes entre sí.

Capacidad antioxidante de los extractos y el aceite esencial adicionados a las películas

El extracto de ortiga es el que mostró una mayor capacidad antioxidante al compararlo con el extracto del alga kelp de azúcar y el aceite esencial de sándalo. Las hojas de ortiga presentaron valores de DPPH de 85 %, de ABTS[•] de 91.8 % y de TPC de 27 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca. El segundo extracto con los valores antioxidantes más altos fue el del alga kelp de azúcar a una dilución de 1/10, donde se obtuvieron valores de DPPH de 85.70 % y de ABTS[•] de 85.88 %. Finalmente, el aceite esencial de sándalo es el tercer y último extracto con valores de capacidad de eliminación de radicales DPPH de 78.23 % y de ABTS[•] de 15.65 %.

Los diferentes tratamientos y disolventes empleados para la extracción de compuestos activos de las hojas de ortiga mostraron resultados con diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad de eliminación de radicales DPPH y ABTS[•].

Respecto a las técnicas de extracción con las que se obtienen mejores resultados, la capacidad de eliminación de radicales ABTS[•] y la determinación de TPC siguen la misma tendencia. En primer lugar, el método de ultrasonidos permite obtener resultados de ABTS[•] de 91.8 % y de TPC de 27.0 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca. El segundo método con mejores resultados es sin agitación obteniéndose valores de ABTS[•] de 90.8 % y de TPC de 15.3 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca. La agitación es el tercer método con el que se obtiene mejores

resultados de ABTS[•] (86.6 %) y de TPC (13.3 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca). Sin embargo, esta tendencia cambia completamente en la capacidad de eliminación de radicales DPPH. En este caso, el método con el que se obtienen mejores resultados es la agitación (90.2 %), seguido del baño de ultrasonidos (90.2 %), y finalmente del método sin agitación, donde se obtienen valores de DPPH de 87.7 %.

En cuanto a los disolventes utilizados para obtener los extractos de ortiga, el agua es disolvente con el que se obtuvo mejores resultados en las tres propiedades analizadas. En el caso de la capacidad de eliminación de radicales ABTS[•] y DPPH se obtienen valores de 91.8 % y 91.1 %, respectivamente. En cuanto al contenido de compuestos fenólicos totales se consiguen valores de 27.0 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca cuando el agua se usa como disolvente. Esto se puede deber a que el agua es un buen solvente para la liberación de posibles ácidos fenólicos y glucósidos que podrían estar presentes en la ortiga. El segundo disolvente con el que se obtienen mejores resultados es el metanol, donde se obtiene valores de ABTS[•], DPPH y TPC de 90.4 %, 90.2 % y de 13.2 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca. Finalmente, el etanol es el tercer disolvente con los valores más altos de ABTS[•] (42.2 %), DPPH (66.5 %) y TPC (9.3 mg eq de ácido gálico/g de ortiga seca).

Microscopía electrónica de barrido de las películas enriquecidas

A partir de las fotografías obtenidas por SEM se ha hecho una comparación entre las tres formulaciones de películas. Se debe tener en cuenta que hay una diferencia en la composición del agente antioxidante adicionado a las películas. Se adicionaron dos extractos acuosos (ortiga y alga kelp de azúcar) y un aceite esencial (sándalo) a la matriz de quitosano. Este hecho hace que las películas muestren una estructura muy diferente entre ellas.

En cuanto a las imágenes obtenidas de la superficie, la película de quitosano puro generalmente presenta una superficie lisa y plana. Sin embargo, cuando se compara la adición de aceite esencial con la agregación de extractos acuosos de ortiga y alga kelp de azúcar a la matriz, se observa que el comportamiento de los extractos acuosos sigue una tendencia similar. Cuando se adiciona el extracto acuoso de ortiga, se observa una matriz ordenada y homogénea,

lo que nos indica que hay una correcta coexistencia entre el quitosano y el extracto acuoso de ortiga a la hora de crear las películas. Algo similar ocurre cuando se añade extracto acuoso de del alga kelp de azúcar a la matriz de quitosano. Como muestran las imágenes, estas películas presentan una estructura superficial compacta y sin poros que nos permite determinar que la solución se mezcla adecuadamente. Sin embargo, cuando la concentración del extracto acuoso del alga kelp de azúcar es del 20 %, se observa una cierta aglomeración de partículas en la superficie. Esto nos indica que una concentración tan alta no permite la correcta distribución del extracto en la matriz. Sin embargo, la adición de aceite esencial de sándalo provoca un comportamiento totalmente diferente. En las imágenes se aprecia de manera muy clara la presencia de gotas de aceite atrapadas en la red de quitosano. Además, estas gotas aumentan de tamaño al aumentar la concentración del aceite esencial.

Respecto a las imágenes asociadas a la base de la película, existe un comportamiento similar cuando los extractos son añadidos a la formulación. La presencia de estos da lugar a una morfología de la base de las películas aparentemente lisa, compacta y sin poros. Esto reafirma lo comentado anteriormente sobre una distribución homogénea en la matriz. Se confirma que la concentración de extracto acuoso del alga kelp de azúcar al 20 % no se disuelve correctamente. Esto se manifiesta por la presencia de pequeñas partículas en la base de la película con esta formulación. Sin embargo y al contrario que en la superficie, las imágenes de la base de las películas de quitosano con aceite esencial de sándalo demuestran que la adición de la lecitina de soja favorece la correcta distribución del aceite esencial en la matriz. Asimismo, esta ausencia de irregularidades generalizada en las tres formulaciones desarrolladas, indica que el baño de ultrasonidos aplicado en el proceso de elaboración de las películas ejerce un efecto positivo en la eliminación de cualquier burbuja de aire.

Las imágenes relacionadas con el corte transversal nos demuestran una estructura más densa y uniforme en las películas enriquecidas con los extractos acuosos del alga kelp de azúcar y ortiga. Con respecto a las películas enriquecidas con aceite esencial de sándalo, el corte transversal es totalmente diferente. En las imágenes transversales se observa claramente la existencia de una fase oleosa en la película.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de las películas enriquecidas

El análisis de los espectros de infrarrojo permite determinar la interacción que hay entre los extractos acuosos (ortiga y alga kelp de azúcar) y el aceite esencial de sándalo con la matriz de quitosano. Hay unos puntos en común entre todas las películas desarrolladas. En primer lugar, el intervalo de $3256 - 3800\text{ cm}^{-1}$ donde se produce la vibración de estiramiento de los grupos -NH_2 y -OH del quitosano. Seguidamente, se percibe los tres picos característicos del quitosano (amida I: 1650 cm^{-1} , amida II: 1541 cm^{-1} y amida III: 1407 cm^{-1}) que se producen por la desacetilación de la quitina (Bilican et al., 2020). Finalmente, hay unas vibraciones presentes en las bandas de absorción entre 1200 y 800 cm^{-1} que se debe a los enlaces C-C y C-O, además de a la flexión de los enlaces C-H en la estructura del quitosano (Liu et al., 2013).

En cuanto a las películas de quitosano con extracto de ortiga, estas presentan un pico característico a los 1600 cm^{-1} y a los 1347 cm^{-1} relacionados con los anillos bencénicos y los compuestos fenólicos de la ortiga, respectivamente. El espectro de la película de quitosano con el extracto del alga kelp de azúcar, no muestra picos diferenciales, únicamente se aprecia una menor absorbancia si se compara con las muestras control (película pura de quitosano). Por último, la película enriquecida con aceite esencial de sándalo muestra un pico distintivo a los 1745 cm^{-1} , que se vuelve más marcado cuanto mayor es la concentración del aceite. Esta banda se relaciona con las vibraciones de estiramiento C=O en las estructuras de éster contenidas en los ácidos grasos del aceite (Priyadarshi et al., 2018).

Si observamos los espectros FT-IR de las películas de manera conjunta, cuando los extractos acuosos de extracto de ortiga y de alga kelp de azúcar se añaden a la matriz, las bandas de absorción se muestran similares entre sí, lo que indica que hay una buena miscibilidad de los extractos con la matriz polimérica. Sin embargo, cuando el aceite esencial de sándalo se adiciona, el comportamiento de las bandas de absorción presenta más variaciones. Esto podría atribuirse a que el aceite esencial de sándalo ejerce interacciones entre los grupos funcionales del aceite y los grupos hidroxilo/amino presentes en la matriz de quitosano.

Propiedades hídricas de las películas enriquecidas

El quitosano es soluble en medio acuoso ácido. La solubilidad de las películas depende en gran medida del tipo de ácido utilizado, y este hecho se corrobora al comparar los resultados de las películas desarrolladas. En esta tesis, se ha demostrado que la aplicación de dos ácidos diferentes (ácido acético y ácido málico) para la disolución de quitosano permite desarrollar películas con aplicaciones totalmente diferentes. En el caso de la película enriquecida con extracto de ortiga utilizando ácido acético como ácido, los valores de solubilidad de las películas se encontraron en un intervalo entre 0.64 y 1.26 %. Estos bajos valores de solubilidad permiten la aplicación de estas películas en alimentos con alto contenido de humedad. Sin embargo, el ácido málico se ha utilizado como disolvente en las películas de quitosano con aceite esencial de sándalo, lo que permitió obtener películas completamente solubles en agua. Esto se debe a que el ácido málico no es volátil y por tanto permanece en la matriz facilitando la solubilidad de las películas si entran en contacto con el agua. Esta hidrosolubilidad de las películas las hace interesantes para su aplicación en alimentos con un alto contenido en grasa y bajo contenido en humedad, como la mantequilla, obteniendo así películas fácilmente desechables después de su uso como envase alimentario.

El contenido de humedad de equilibrio fue otra de las principales propiedades hídricas analizadas. Es interesante recalcar que en las películas de quitosano en las que se añadió un extracto acuoso de ortiga o alga kelp de azúcar se observaron diferencias significativas de los valores de esta propiedad. Mientras que cuando se le añadió aceite esencial de sándalo, no se producen diferencias significativas. Cuando se añadió extracto de ortiga a la matriz de quitosano se obtuvo una estructura más compacta, produciendo una disminución significativa del contenido de humedad de equilibrio. También es importante recalcar que en las películas de quitosano con extracto de ortiga se analizó el comportamiento usando diferentes concentraciones de glicerol. Observando valores mayores de contenido de humedad de equilibrio con la mayor concentración de glicerol utilizada (0.5 %).

Esto se debe a que el glicerol tiene un carácter hidrófilo, lo que implica que la película adquiere una mayor capacidad de absorción de agua a medida que aumenta su concentración. También, cuando a la película de quitosano se añadió el extracto de alga kelp de azúcar a la máxima concentración (20 %) se produjo un incremento significativo del contenido de humedad

de equilibrio. Esto se debe a que las algas tienen una naturaleza higroscópica, por lo que a mayor concentración se produce un incremento de los valores del contenido de humedad de equilibrio.

Por otro lado, la permeabilidad al vapor de agua es una de las características más importantes a analizar en una película que pretende aplicarse en alimentos. Al analizar los resultados de manera global, se observa valores similares de permeabilidad al vapor de agua en todas las películas, encontrándose en un intervalo de $2.22 \cdot 10^{-11}$ hasta $6.70 \cdot 10^{-11}$ g/m·s·Pa. Sin embargo, el comportamiento de la película es diferente según la concentración y el tipo de extracto añadido. Cuando el extracto de ortiga se añade a la matriz en concentraciones elevadas (25 %) se produce una disminución significativa de la permeabilidad. Esto se puede atribuir que se produce una disminución de los grupos hidrófilos del quitosano y consecuentemente se disminuye la interacción con el agua (Wang et al., 2019). Un comportamiento similar se observó cuando se añadió extracto de alga kelp de azúcar a la película. La permeabilidad aumenta significativamente en las concentraciones más altas del extracto de alga (20 %). Este comportamiento es coherente con la naturaleza hidrófila de las algas. Además, se observa que a estas concentraciones se produce una aglomeración de las partículas del extracto en la matriz, lo que también favorece el incremento de la permeabilidad al vapor de agua. Un comportamiento opuesto se observó cuando el aceite esencial de sándalo se añadió a la matriz. Este comportamiento se explica debido a la presencia de compuestos hidrofóbicos típicos del aceite, que producen una clara reducción de la permeabilidad al vapor de agua.

Propiedades mecánicas de las películas enriquecidas

Los valores del ensayo a la tracción mostraron una disminución generalizada en todas las películas analizadas. Aunque en el caso de las películas de quitosano con extracto de ortiga esta disminución se le atribuye a la presencia de glicerol, en el resto de las películas esta disminución se relaciona con el incremento de concentración del extracto natural. En el caso del extracto de alga kelp de azúcar y del aceite esencial de sándalo esta tendencia se puede deber a una dispersión heterogénea del extracto en la matriz, dando lugar a una película menos resistente a la rotura.

En cuanto a la extensividad, los comportamientos de las películas son muy desiguales. En el caso de las películas de quitosano con extracto de ortiga se produce un incremento significativo de los valores de esta propiedad, atribuido tanto al aumento de glicerol como del propio extracto. Sin embargo, en la película con extracto de alga kelp de azúcar ni el glicerol ni el extracto ejercen diferencias significativas en este valor.

Por otro lado, el módulo de Young sufre un descenso de sus valores en todas las películas formuladas, aunque el motivo de esta reducción es diferente en función de la película a analizar. En las películas de quitosano con extracto de ortiga esta reducción se atribuye al efecto plastificante del glicerol presente en la matriz. Mientras que en el caso de las películas de quitosano con extracto de kelp de azúcar y aceite esencial de sándalo sufren este descenso en los valores de módulo de Young por una distribución heterogénea de los componentes en la matriz.

En cuanto a las propiedades de punción, la película con aceite esencial de sándalo en su composición no sufre diferencias significativas en las propiedades de distancia al estallido y resistencia a la ruptura. Sin embargo, cuando los extractos acuosos naturales se añaden a la matriz de quitosano, se producen comportamientos muy contrarios al comparar las composiciones. Cuando el extracto de ortiga se añade a la película disminuye la resistencia al estallido y cuando aumenta la concentración de glicerol aumenta la distancia al estallido. Sin embargo, cuando el extracto de kelp de azúcar se adiciona a la matriz se produce un aumento simultáneo de la distancia al estallido y la resistencia a la ruptura, lo que indica que este extracto sí favorece las interacciones intermoleculares a diferencia del extracto de ortiga.

Propiedades ópticas de las películas enriquecidas

Por un lado, las propiedades ópticas se analizan en función del porcentaje de transmitancia obtenido al someter a las películas a regiones de luz UV-C, UV-B y UV-A. Al analizar los resultados obtenidos conjuntamente, se puede determinar que los diversos extractos naturales adicionados a la matriz han reducido significativamente el porcentaje de transmitancia de las muestras de películas. Sin embargo, la película que presenta una mayor disminución del porcentaje de transmitancia es la película de quitosano con extracto de ortiga. Esto quiere decir

que es la película que ejerce una mayor protección frente a los rayos UV, muy probablemente relacionado con el color tan oscuro propio del extracto de ortiga. No obstante, el extracto de alga kelp de azúcar adicionado a la matriz es el segundo extracto con mejores propiedades ópticas, seguido del aceite esencial de sándalo. En conclusión, todas las películas enriquecidas desarrolladas tienen unas propiedades ópticas suficientemente buenas que podrían proteger a los alimentos de la oxidación lipídica típicamente inducida por los rayos UV.

Respecto a la transparencia de las películas, todas siguen una tendencia clara, y es que al añadir el extracto natural a la matriz se ejerce una disminución de esta propiedad. Siendo la película de quitosano con aceite esencial de sándalo la que presenta valores más bajos de transparencia (18.01). Sin embargo, lo contrario ocurre al analizar la opacidad de las películas. Cuando se añade cualquier extracto a la formulación, la opacidad aumenta. De hecho, la película de quitosano con aceite esencial de sándalo presenta los valores más altos de esta propiedad (22.13). Esto se puede deber a la naturaleza lipídica del aceite esencial y a una distribución no homogénea en la matriz.

En cuanto al brillo de las películas, se observa una predisposición al oscurecimiento de las muestras, es decir un descenso de los valores de L^* , cuando los extractos se añaden a la matriz. Concretamente, el mayor oscurecimiento ocurre cuando el extracto de ortiga se añade a la película de quitosano ($L^* = 91.39$). Esto se debe al color verde oscuro propio del extracto de ortiga. A continuación, le sigue el extracto de kelp de azúcar (89.19) y el aceite esencial de sándalo (84.73). En cuanto a los valores de b^* , se produce una tendencia contraria a la propiedad anterior. Al añadirse el extracto a la matriz, se genera un incremento de los valores de b^* lo que se traduce en una tendencia al amarilleamiento de la película. La película de quitosano con extracto de ortiga tiene los valores más altos (26.20), seguido de las películas con aceite esencial de sándalo (15.1) y extracto de alga kelp de azúcar (6.55). Finalmente, los valores de a^* presentan variaciones dependiendo del extracto añadido. En el caso del extracto de ortiga (de -0.22 a -4.41) y extracto de alga kelp de azúcar (de -0.13 a -0.65) se produce un descenso de a^* lo que significa una tendencia al verdor de las películas. Sin embargo, cuando el aceite esencial de sándalo se adiciona a la matriz, los valores de a^* aumentan ligeramente de -0.48 a 1.67, lo que implica que la película tiene una tendencia al enrojecimiento en comparación a la película de quitosano puro.

Propiedades térmicas de las películas enriquecidas

Las curvas termogravimétricas analizadas en las diferentes películas desarrolladas muestran tres picos en común. El primero a los 50 - 150 °C se relaciona con la evaporación del agua presente en la formulación. El segundo pico tiene lugar únicamente en las películas de quitosano con extracto de ortiga y de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar ya que estas tienen glicerol en su composición. Esta zona es a los 150 – 285 °C, donde esta pérdida de peso en las películas se debe a la evaporación del plastificante. Por último, el tercer pico se produce en el intervalo de 240 – 350 °C, donde se lleva a cabo la desnaturalización polimérica del quitosano y de los extractos acuosos en el caso de las películas con extracto de ortiga y extracto de alga kelp de azúcar.

En cuanto a la pérdida de peso asociada a las películas, ésta es mayor en las películas de quitosano con extracto de ortiga donde se llega a producir una pérdida de hasta el 46.59 %. Por otro lado, las películas de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar sufren pérdidas de peso en un rango de entorno al 30 %, mientras que las películas quitosano con aceite esencial de sándalo experimentan una pérdida de peso entorno al 20 % a lo largo del análisis TGA/DSC.

En relación con los picos endotérmicos analizados en las películas, nuevamente existen unos puntos que tienen en común todas las películas formuladas. Entorno a los 140 –150 °C se produce una pérdida de la estructura de las cadenas de quitosano, y a los 290 – 295 °C tiene lugar la descomposición del polisacárido.

Respecto a la influencia del extracto adicionado en la estabilidad térmica de la película, el extracto de ortiga altera ligeramente la estabilidad térmica, mientras que el extracto de alga kelp de azúcar no ejerce una influencia significativa en esta propiedad. Por otro lado, cuanto el aceite esencial de sándalo se adiciona a la matriz, ésta interacciona con el extracto incrementando la estabilidad térmica de las películas. De igual modo, la estructura de todas las películas desarrolladas no se ve alterada a 120 °C. Esto implica que todas las películas formuladas tienen

una estabilidad térmica para resistir los tratamientos térmicos industriales típicos como es la pasteurización o esterilización.

Propiedades antioxidantes de las películas enriquecidas

En primer lugar, la capacidad de eliminación de radicales DPPH se analiza para determinar las propiedades antioxidantes de las películas. La película que consigue valores más altos es la enriquecida con extracto de ortiga (95.48 %), seguida de aceite esencial de sándalo (23.69 %) y finalmente de extracto de alga kelp de azúcar (18.80 %). Estos resultados son coherentes con los que muestran que el extracto de ortiga es el que tiene la mayor capacidad antioxidante.

En cuanto a la capacidad de eliminación de radicales ABTS[•], nuevamente la película con extracto de ortiga es la que consigue valores más altos (98.71 %). Sin embargo, la película con extracto de alga kelp de azúcar adicionado es la segunda con valores más altos en este caso (90.81 %), siguiéndole la enriquecida con aceite esencial de sándalo (19.22 %).

Respecto al contenido de compuestos fenólicos totales de las películas, aquellas enriquecidas con extracto de alga kelp de azúcar y aceite esencial de sándalo muestran valores residuales. Por lo que solamente se tiene en cuenta los valores de las películas con extracto de ortiga. Películas de quitosano enriquecidas con extracto de ortiga muestran valores de TPC hasta 1.57 mg GAE/g película.

Estabilidad antioxidante de las películas enriquecidas a lo largo del estudio

Según los resultados obtenidos, la capacidad antioxidante de todas las películas se mantiene o incluso se incrementa durante el tiempo que duraron los estudios. Sin embargo, la película que obtiene los valores más altos al final de la investigación es la de quitosano con extracto de ortiga. En este caso, a los 45 días de almacenamiento en refrigeración se muestran una capacidad de eliminación del radical DPPH del 93.22 % y del 95.40 % para el radical ABTS[•]. Debido a la gran capacidad antioxidante del extracto de ortiga, es de esperar que aun con el paso del tiempo las películas mantengan unas propiedades antioxidantes óptimas. Asimismo, la

película de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar al 20 % mantiene una alta capacidad antioxidante a lo largo de los 45 días de estudio, con valores de DPPH que alcanzan hasta el 16.45 % y de ABTS* hasta el 80.61 %.

Por otro lado, la película de quitosano con aceite esencial de sándalo es la que muestra unas capacidades antioxidantes más bajas una vez el estudio llega a su fin. Tras 3 meses de almacenamiento, las películas presentan una capacidad de eliminación de radicales DPPH del 23.14 % y de ABTS del 19.34 %. De hecho, los valores de DPPH son mayores que los de la película de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar al 10%, teniendo en cuenta que esta película estuvo almacenada durante más tiempo. En base a estos resultados, se puede sugerir que todas las películas mantuvieron con éxito sus propiedades antioxidantes a lo largo del tiempo del estudio.

Estabilidad antioxidante del queso Havarti a lo largo del estudio

La capacidad antioxidante del queso envasado con separadores a base de películas de quitosano enriquecidas se analizó durante 45 días. El queso envasado con separadores de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar al 20 % es el que presenta una mayor capacidad antioxidante a lo largo del estudio, obteniendo valores de DPPH entre 14.50 y 16.20 %, y de ABTS* en un rango de 22.12. a 32.37 %. Seguidamente, el queso envasado con películas enriquecidas con extracto de ortiga y extracto de alga kelp de azúcar al 10 % aportan valores muy similares de capacidad antioxidante, con valores de DPPH entre 11.79 y 12.55 %, y entre 10.80 y 12.29 % para ABTS*. Estos hallazgos llevan a la conclusión de que los compuestos antioxidantes se liberaron de las películas al queso, demostrando el efecto propio de un envasado activo.

Como cabe esperar, los quesos envasados con las películas separadoras de control (quitosano puro y PA/PE) son los que obtienen una capacidad antioxidante menor. El queso separado por películas de quitosano presenta valores de DPPH entre 5.73 y 8.01 %, mientras que de ABTS* valores entre 11.67 y 18.87 %. Los valores de DPPH del queso separado por películas de PA/PE oscilan entre 4.23 y 6.76 %, mientras que los valores de ABTS* oscilan entre 8.23 y 11.70 %.

Estabilidad de la oxidación lipídica de las matrices alimentarias a lo largo del estudio

La oxidación lipídica del queso envasado con separadores a base de quitosano se midió a lo largo de 45 días. Las muestras de queso separadas con película de quitosano puro, quitosano con extracto de ortiga y quitosano con extracto de alga kelp de azúcar, muestran un aumento de los valores de TBARS hasta el día 15 de almacenamiento. Este incremento de los valores puede ser un indicador de que los lípidos se oxidan continuamente, dando lugar a subproductos oxidativos. No obstante, a partir del día 15 los valores de TBARS se mantienen estables.

Si se comparan únicamente las películas de quitosano enriquecidas, se puede determinar que el extracto de ortiga es mucho más efectivo para luchar frente a la oxidación de los lípidos del alimento. El queso separado con la película de quitosano con extracto de ortiga obtiene los valores más bajos de TBARS (3.38 mg MDA/kg de queso) al final del estudio. De hecho, logra una disminución del 56 % en la oxidación lipídica del queso al compararla con el resto de las películas del estudio. Sin embargo, el queso separado por películas de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar al 20 % también muestra valores bajos de TBARS a los 45 días de estudio (10.55 mg MDA/kg de queso). En comparación con las películas de quitosano puro, la oxidación lipídica en las muestras de queso tras 45 días de almacenamiento refrigerado disminuye un 52.8 %. Asimismo, el queso envasado con películas de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar al 10 % también obtiene valores interesantes de TBARS, con un máximo de 12.09 mg de MDA/kg de queso al finalizar el estudio. La diferencia de valores entre el queso envasado por películas de quitosano con extracto de alga kelp de azúcar al 10 y al 20 % nos demuestra que, a mayor concentración de extracto natural, se ejerce una mayor inhibición del proceso de oxidación lipídica.

Las películas utilizadas como control (PA/PE y quitosano puro) nos presenta los valores más altos de TBARS, siendo de 11.57 y de 19.98 mg MDA/kg de queso, respectivamente. Esto demuestra que la adición de compuestos antioxidantes a la matriz de quitosano reduce significativamente la oxidación de los lípidos presentes en el alimento.

Por otro lado, la oxidación lipídica de la mantequilla envasada con películas a base de quitosano y aceite esencial de sándalo se midió tras 90 días. Si se compara la muestra de mantequilla sin envasar con aquellas envasadas, se aprecia un efecto significativo por parte de la película enriquecida en el descenso de los valores de TBARS. De hecho, los valores de TBARS más altos medidos durante toda la investigación se encontraron en la muestra sin envasar: 616 mg MDA/kg de mantequilla. Si se realiza una comparación entre las películas enriquecidas con aceite esencial de sándalo, aquella que tiene una concentración al 2 % del aceite esencial es la que proporciona valores más bajos de TBARS: 393.25 mg MDA/kg de mantequilla. Es más, la oxidación lipídica de las películas de mantequillas disminuyó un 36 % al aplicar la película quitosano con aceite esencial de sándalo como envasado.

Al comparar los resultados de TBARS de los alimentos de manera conjunta se puede determinar que la película de quitosano con extracto de ortiga ejerce el mejor efecto protector en el queso, mientras que la película de quitosano con aceite esencial de sándalo al 2 % es la que tiene más capacidad de inhibir la oxidación lipídica de la mantequilla.

Evolución de las propiedades ópticas del queso Havarti a lo largo del estudio

Las variaciones de color de las muestras de queso se estudian para determinar si hay una posible migración de componentes coloreados a la matriz alimentaria. En este caso el queso estaba envasado con separadores de PA/PE, quitosano y quitosano con extracto de ortiga.

En cuanto a la propiedad de L^* , el queso separado por las películas de quitosano sufre un aumento de los valores del brillo, de 74.69 hasta 79.13. Sin embargo, cuando el queso es separado por películas de PA/PE o quitosano con extracto de ortiga esta propiedad disminuye de 80.03 a 79.64 y de 84.41 a 71.12, respectivamente. Esto nos indica que el queso envasado con esta película sufre un cierto oscurecimiento.

Respecto a la propiedad de a^* , el queso separado con las películas de PA/PE experimenta un descenso de sus valores de -0.43 a -1.10, lo que reafirma el oscurecimiento anteriormente comentado. Por otro lado, el queso separado por películas de quitosano (de -1.27 a -1.16) y

quitosano con extracto de ortiga (de -1.53 a -1.18) sigue la misma tendencia, produciéndose un aumento de los valores de a^* , produciéndose un descenso en el verdor de las muestras.

La propiedad b^* sigue la misma tendencia que la propiedad a^* . Los valores de b^* del queso que es separado por las películas PA/PE aumenta ligeramente a lo largo del estudio de 22.95 a 24.05, lo que implica que el queso tiene una mayor tendencia al amarillo en comparación a las otras muestras. Esto podría deberse a que la película de PA/PE es transparente y por tanto no ejerce un efecto protector en el color del queso. Las muestras de queso envasadas con películas de quitosano y quitosano con extracto de ortiga sufren un descenso sustancial de los valores de b^* , de 25.31 a 20.89 y de 31.42 a 18.54, respectivamente. Esto significa que las muestras de queso pierden su característico color amarillo. Este descenso de la propiedad b^* es más acentuado en el queso separado con la película de quitosano con extracto de ortiga, probablemente relacionado con el color oscuro de la película y su capacidad para inhibir la incidencia de la luz en la muestra.

Evolución de las propiedades ópticas de las películas a lo largo del estudio

Se ha comparado la evolución de las propiedades ópticas a lo largo del estudio entre la película quitosano con extracto de ortiga (tras 45 días de almacenamiento) y la película quitosano con aceite esencial de sándalo (tras 90 días de almacenamiento).

En cuanto al brillo, los resultados de L^* al finalizar el estudio son mayores en las películas de quitosano con aceite esencial de sándalo, alcanzando valores de hasta 81.83. Sin embargo, en el caso de la película de quitosano con extracto de ortiga presenta valores de 70.44 tras 45 días de almacenamiento. Estos resultados más bajos y que consecuentemente implica un oscurecimiento en la película con extracto de ortiga, tienen sentido debido al color verde oscuro tan característico de la película enriquecida con extracto de ortiga.

En cuanto a los valores de a^* , los resultados obtenidos en ambas películas son muy similares. Al compararlas, la película de quitosano con aceite esencial de sándalo al 1 % obtiene valores ligeramente más altos (1.96) que la película de quitosano con extracto de ortiga (1.08) al final del estudio. Esto explica que cuando el estudio llega a su fin, la película enriquecida

con extracto de ortiga tiene una tendencia ligeramente mayor al verde, mientras que la enriquecida con aceite esencial de sándalo tiene una leve predisposición al rojo. Sin embargo, estos cambios tan sutiles no son perceptibles al ojo humano.

Respecto a los valores de b^* , hay una gran diferencia entre la película de quitosano con extracto de ortiga y de quitosano con aceite esencial de sándalo. Al final del estudio, la película enriquecida con aceite esencial de sándalo al 1 % tiene valores de b^* de 45.17. Mientras que la película con extracto de ortiga en su composición presenta resultados de b^* de 10.89. Esta disparidad en los resultados se atribuye al respectivo color que presenta cada película. Es decir, la película con aceite esencial de sándalo tiene valores tan altos de b^* porque éstas tienen un característico color amarillo y consecuentemente sufren una tendencia al amarilleo. Sin embargo, es de esperar que los valores de b^* sean más bajos en las películas enriquecidas con extracto de ortiga ya que éstas se caracterizan por tener un color verde intenso.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha comprobado que los extractos de ortiga y del alga kelp de azúcar, así como el aceite esencial de sándalo, incrementan la actividad antioxidante de las películas de quitosano.
2. En el caso de ortiga, el extracto acuoso comparado con el extracto metanólico y etanólico, es el que posee una mayor capacidad antioxidante, con valores de eliminación de radical DPPH de hasta el 86.6 %.
3. El método de extracción con ultrasonidos, comparado con estático y agitación, es el método con el que se consigue extractos con mayor capacidad antioxidante.
4. Las películas a base de quitosano y enriquecidas con extracto de ortiga ejercen protección frente a la radiación ultravioleta.
5. La adición de extracto de ortiga a las películas disminuyó las propiedades mecánicas, lo que facilita su manipulación y aplicación como separador de lonchas de productos como queso.
6. Las películas a base de quitosano con extracto de ortiga muestran una estabilidad térmica a temperaturas habituales de procesamiento de alimentos.
7. La capacidad antioxidante de películas de quitosano con extracto de ortiga se mantiene alta tras 45 días de aplicación como separador de lonchas de queso.
8. El separador de lonchas de quitosano con extracto de ortiga disminuyó en un 56 % la oxidación lipídica del queso en comparación con el control de queso envasado con película de quitosano puro tras 45 días de almacenamiento en refrigeración.
9. La adición de extractos acuosos del alga kelp de azúcar a películas de quitosano permitió el desarrollo de películas más flexibles y adecuadas para alimentos resistentes al desgarro, además de una buena protección frente a los rayos ultravioletas.
10. Cuando las películas de quitosano con extractos acuosos del alga kelp de azúcar se aplicaron como separadores de lonchas de queso, se consiguió una reducción del 52.8 % en la oxidación lipídica del queso tras 45 días de almacenamiento en refrigeración.

11. Las películas de quitosano con aceite esencial de sándalo elaboradas con ácido málico como disolvente se pueden termosellar, aumentando sus aplicaciones para el envasado alimentario.
12. Las películas de quitosano con aceite esencial de sándalo elaboradas con ácido málico son completamente solubles en agua y pueden desecharse fácilmente sin dejar restos contaminantes.
13. El aceite esencial de sándalo adicionado en las películas de quitosano permite la elaboración de envases con una transparencia suficiente para no afectar a la apreciación del alimento envasado.
14. La presencia de aceite esencial de sándalo en la matriz de quitosano dio lugar a películas con mejores propiedades antioxidantes.
15. La mantequilla envasada en películas de quitosano con aceite esencial de sándalo mostró una disminución del 36 % en la oxidación lipídica en comparación a las muestras sin envasar tras 3 meses de almacenamiento en refrigeración.
16. Se ha comprobado que la oxidación lipídica de alimentos grasos se reduce con la aplicación de cualquiera de las películas activas desarrolladas.
17. Se ha desarrollado con éxito una alternativa sostenible a los separadores plásticos de lonchas de queso y envases plásticos de mantequilla elaborando películas activas de quitosano con aceite esencial de sándalo, extractos de ortiga y extractos del alga kelp de azúcar.

7. CONCLUSIONS

1. It has been proven that nettle and sugar kelp extracts, as well as sandalwood essential oil, increase the antioxidant activity of chitosan films.
2. In the case of nettle, the aqueous extract, compared to the methanolic and ethanolic extracts, is the one that has a greater antioxidant capacity, with DPPH radical elimination values of up to 86.6%.
3. The ultrasonic extraction method, compared to static and shaking, is the method by which extracts with greater antioxidant capacity are obtained.
4. Films based on chitosan and enriched with nettle extract provide protection against ultraviolet radiation.
5. The addition of nettle extract to the films decreased the mechanical properties, facilitating their handling and application as a separator for slices of products such as cheese.
6. Films based on chitosan with nettle extract show thermal stability at common food processing temperatures.
7. The antioxidant capacity of chitosan films with nettle extract remains high after 45 days of application as a cheese slice separator.
8. The chitosan slice separator with nettle extract decreased the lipid oxidation of the cheese by 56% compared to the control cheese packaged with pure chitosan film after 45 days of refrigerated storage.
9. The addition of aqueous extracts of sugar kelp algae to chitosan films allowed the development of more flexible and tear-resistant films suitable for food, as well as good protection against ultraviolet rays.
10. When chitosan films with aqueous extracts of sugar kelp algae were applied as separators for cheese slices, a 52.8% reduction in lipid oxidation of the cheese was achieved after 45 days of refrigerated storage.
11. Chitosan films with sandalwood essential oil made with malic acid as a solvent can be heat-sealed, increasing their applications for food packaging.

12. Chitosan films with sandalwood essential oil made with malic acid are completely soluble in water and can be easily discarded without leaving contaminating residues.
13. The sandalwood essential oil added to the chitosan films allows the production of containers with sufficient transparency so as not to affect the appreciation of the packaged food.
14. The presence of sandalwood essential oil in the chitosan matrix led to films with better antioxidant properties.
15. Butter packaged in chitosan films with sandalwood essential oil showed a 36% decrease in lipid oxidation compared to unpackaged samples after 3 months of refrigerated storage.
16. It has been proven that lipid oxidation of fatty foods is reduced with the application of any of the active films developed.
17. A sustainable alternative to plastic cheese slice separators and plastic butter containers has been successfully developed by making active chitosan films with sandalwood essential oil, nettle extracts and sugar kelp extracts.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaliya, B., Sunooj, K. V., & Lackner, M. (2021). Biopolymer composites: a review. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 40–84. <https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1881214>
- Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Zabermawi, N. M., Arif, M., Batiha, G. E., ... Al-Sagheer, A. A. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2726–2744. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>
- Abdou, E. S., Galhoum, G. F., & Mohamed, E. N. (2018). Curcumin loaded nanoemulsions/pectin coatings for refrigerated chicken fillets. *Food Hydrocolloids*, 83(May), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.026>
- Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., & Albertengo, L. (2003). Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 521–530. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300010>
- Ahmed, J., Mulla, M., Arfat, Y. A., & Thai T, L. A. (2017). Mechanical, thermal, structural and barrier properties of crab shell chitosan/graphene oxide composite films. *Food Hydrocolloids*, 71, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.013>
- Alak, G., Aras Hisar, S., Hisar, O., Kaban, G., & Kaya, M. (2009). Palamut (Sarda sarda) Filetolarının Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Kitosan Film ile Kaplama, Modifiye Atmosfer ve Vakum Ambalajlamanın Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 73–80. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2009.1475>
- Albertos, I., Martin-Diana, A. B., Burón, M., & Rico, D. (2019). Development of functional bio-based seaweed (*Himanthalia elongata* and *Palmaria palmata*) edible films for extending the shelflife of fresh fish burgers. *Food Packaging and Shelf Life*, 22(December 2018), 100382. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100382>
- Almasi, H., Zandi, M., Beigzadeh, S., Haghju, S., & Mehrnow, N. (2016). Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica Dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: II. Antioxidant activity and release properties. *Journal of Microencapsulation*, 33(5), 449–459. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1208295>
- Alparslan, Y., & Baygar, T. (2017). Effect of Chitosan Film Coating Combined with Orange Peel Essential Oil on the Shelf Life of Deepwater Pink Shrimp. *Food and Bioprocess*

- Technology*, 10(5), 842–853. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1862-y>
- Amankwaah, C., Li, J., Lee, J., & Pascall, M. A. (2020). Antimicrobial Activity of Chitosan-Based Films Enriched with Green Tea Extracts on Murine Norovirus, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Science*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/3941924>
- Andrade, M. A., Barbosa, C. H., Souza, V. G. L., Coelho, I. M., Reboleira, J., Bernardino, S., ... Ramos, F. (2021). Novel active food packaging films based on whey protein incorporated with seaweed extract: Development, characterization, and application in fresh poultry meat. *Coatings*, 11(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/coatings11020229>
- Andrade, M. A., Ribeiro-Santos, R., Guerra, M., & Sanches-Silva, A. (2019). Evaluation of the oxidative status of salami packaged with an active whey protein film. *Foods*, 8(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods8090387>
- Araújo, R., Vázquez Calderón, F., Sánchez López, J., Azevedo, I. C., Bruhn, A., Fluch, S., ... Ullmann, J. (2021). Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 7(January), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
- Axel, C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3528–3542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>
- Azevedo, I. C., Marinho, G. S., Silva, D. M., & Sousa-Pinto, I. (2016). Pilot scale land-based cultivation of *Saccharina latissima* Linnaeus at southern European climate conditions: Growth and nutrient uptake at high temperatures. *Aquaculture*, 459, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.038>
- Bagheri-Khoulenjani, S., Taghizadeh, S. M., & Mirzadeh, H. (2009). An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 773–778. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.020>
- Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>

- Baldovini, N., Delasalle, C., & Joulain, D. (2011). Phytochemistry of the heartwood from fragrant *Santalum* species: A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(1), 7–26. <https://doi.org/10.1002/ffj.2025>
- Baliño Zuazo, L. (2016). *Nuevas Metodologías Para La Evaluación De La Calidad De Productos Pesqueros*.
- Balti, R., Mansour, M. Ben, Sayari, N., Yacoubi, L., Rabaoui, L., Brodu, N., & Massé, A. (2017). Development and characterization of bioactive edible films from spider crab (*Maja crispata*) chitosan incorporated with *Spirulina* extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1464–1472. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.046>
- Baranwal, J., Barse, B., Fais, A., Delogu, G. L., & Kumar, A. (2022). Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. *Polymers*, 14(5), 1–22. <https://doi.org/10.3390/polym14050983>
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Bilican, I., Pekdemir, S., Onses, M. S., Akyuz, L., Altuner, E. M., Koc-Bilican, B., ... Kaya, M. (2020). Chitosan Loses Innate Beneficial Properties after Being Dissolved in Acetic Acid: Supported by Detailed Molecular Modeling. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(49), 18083–18093. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c06373>
- Blanco-Pascual, N., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.021>
- Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., & Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.002>
- Bonilla, Jeannine, Vargas, M., Atarés, L., & Chiralt, A. (2014). Effect of Chitosan Essential Oil Films on the Storage-Keeping Quality of Pork Meat Products. *Food and Bioprocess Technology*, 7(8), 2443–2450. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1329-3>
- Bourtoom, T., & Chinnan, M. S. (2008). Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1633–1641.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.014>

- Brand, J. E., Fox, J. E. D., Pronk, G., & Cornwell, C. (2007). Comparison of oil concentration and oil quality from *Santalum spicatum* and *S. album* plantations, 8–25 years old, with those from mature *S. spicatum* natural stands. *Australian Forestry*, 70(4), 235–241. <https://doi.org/10.1080/00049158.2007.10675025>
- Bratovic, A., Odobasic, A., Catic, S., & Sestan, I. (2015). Application of polymer nanocomposite materials in food packaging. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 7(2), 86–94. <https://doi.org/10.17508/cjfst.2015.7.2.06>
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2394–2401. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2008.01876.X>
- Burdock, G. A., & Carabin, I. G. (2008). Safety assessment of sandalwood oil (*Santalum album* L.). *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.092>
- Cano Embuena, A. I., Cháfer Nácher, M., Chiralt Boix, A., Molina Pons, M. P., Borrás Llopis, M., Beltran Martínez, M. C., & González Martínez, C. (2017). Quality of goat's milk cheese as affected by coating with edible chitosan-essential oil films. *International Journal of Dairy Technology*, 70(1), 68–76. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12306>
- Carson, H. S., Nerheim, M. S., Carroll, K. A., & Eriksen, M. (2013). The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 75(1–2), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.07.054>
- Castro Marín, A., Culcasi, M., Cassien, M., Stocker, P., Thétiot-Laurent, S., Robillard, B., ... Pietri, S. (2019). Chitosan as an antioxidant alternative to sulphites in oenology: EPR investigation of inhibitory mechanisms. *Food Chemistry*, 285, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.155>
- Cazón, P., Antoniewska, A., Rutkowska, J., & Vázquez, M. (2021). Evaluation of easy-removing antioxidant films of chitosan with *Melaleuca alternifolia* oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 365–376. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.035>
- Cazón, P., Morales-Sanchez, E., Velazquez, G., & Vázquez, M. (2022). Measurement of the Water Vapor Permeability of Chitosan Films: A Laboratory Experiment on Food

- Packaging Materials. *Journal of Chemical Education*, 99(6), 2403–2408. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.2c00449>
- Cazón, P., & Vázquez, M. (2019). Applications of Chitosan as Food Packaging Materials. In G. Crini & E. Lichtfouse (Eds.), *Sustainable Agriculture Reviews 36: Chitin and Chitosan: Applications in Food, Agriculture, Pharmacy, Medicine and Wastewater Treatment* (pp. 81–123). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9_3
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- Cegledi, E., Garofulić, I. E., Zorić, Z., Roje, M., & Dragović-Uzelac, V. (2022). Effect of Spray Drying Encapsulation on Nettle Leaf Extract Powder Properties, Polyphenols and Their Bioavailability. *Foods*, 11(18), 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods11182852>
- Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2012). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.07.007>
- Ćetković, G. S., Čanadanović-Brunet, J. M., Djilas, S. M., Tumbas, V. T., Markov, S. L., & Cvetković, D. D. (2007). Antioxidant potential, lipid peroxidation inhibition and antimicrobial activities of *satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(10), 1013–1027. <https://doi.org/10.3390/i8101013>
- Chu, Y., Xu, T., Gao, C. C., Liu, X., Zhang, N., Feng, X., ... Tang, X. (2019). Evaluations of physicochemical and biological properties of pullulan-based films incorporated with cinnamon essential oil and Tween 80. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.194>
- Clark, S., Jung, S., & Lamsal, B. (2014). Food Packaging. In *Food Processing: Principles and Applications* (pp. 249–273). <https://doi.org/Clark, Stephanie; Jung, Stephanie; Lamsal, Buddhi> (2014). Food Processing (Principles and Applications) || Food Packaging. , 10.1002/9781118846315(), 249–273. doi:10.1002/9781118846315.ch11
- Costa, E. M., Silva, S., Pina, C., Tavaría, F. K., & Pintado, M. M. (2012). Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. *Anaerobe*, 18(3), 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.009>
- Cotas, J., Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M. M., ...

- Pereira, L. (2020). Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications. *Marine Drugs*, 18(8), 1–47.
- Cruz, R. S., Ferrerira Soares, N. de F., & de Andrade, N. J. (2007). EFFICIENCY OF OXYGEN - CRUZ , ABSORBING R . S . et al . SACHETS IN DIFFERENT. *Ciência e Agrotecnologia*, 31, 1800–1804.
- da Silva, C. J. G., de Medeiros, A. D. M., de Amorim, J. D. P., do Nascimento, H. A., Converti, A., Costa, A. F. S., & Sarubbo, L. A. (2021). Bacterial cellulose biotextiles for the future of sustainable fashion: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 2967–2980. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01214-x>
- De Pilli, T. (2020). Development of a vegetable oil and egg proteins edible film to replace preservatives and primary packaging of sweet baked goods. *Food Control*, 114(December 2019), 107273. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107273>
- Dehghani, S., Hosseini, S. V., & Regenstien, J. M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chemistry*, 240(July), 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.034>
- Demole, E., Demole, C., & Enggist, P. (1976). A Chemical Investigation of the Volatile Constituents of East Indian Sandalwood Oil (Santalum album L.). *Helvetica Chimica Acta*, 59(3), 737–747. <https://doi.org/10.1002/hlca.19760590304>
- Deshmukh, A. R., Aloui, H., Khomlaem, C., Negi, A., Yun, J. H., Kim, H. S., & Kim, B. S. (2021). Biodegradable films based on chitosan and defatted Chlorella biomass: Functional and physical characterization. *Food Chemistry*, 337(August 2020), 127777. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127777>
- Dey, A., & Neogi, S. (2019). Oxygen scavengers for food packaging applications: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 90, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.013>
- Dicharry, R. M., Ye, P., Saha, G., Waxman, E., Asandei, A. D., & Parnas, R. S. (2006). Wheat Gluten–Thiolated Poly(vinyl alcohol) Blends with Improved Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, 7(10), 2837–2844. <https://doi.org/10.1021/bm060432n>
- Dobrucka, R., & Cierpiszewski, R. (2014). Active and Intelligent Packaging Food – Research and Development – A Review Renata Dobrucka *, Ryszard Cierpiszewski Department of Industrial Products Quality and Ecology , Faculty of Commodity Science , *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 64(1), 7–15. <https://doi.org/10.2478/v10222>

- Dobrucka, R., & Przekop, R. (2019). New perspectives in active and intelligent food packaging. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(11), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14194>
- Doğan, G., & İzci, L. (2017). Effects on quality properties of smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.12757>
- Dou, B., Dupont, V., Williams, P. T., Chen, H., & Ding, Y. (2009). Thermogravimetric kinetics of crude glycerol. *Bioresource Technology*, 100(9), 2613–2620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.037>
- Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Tassin, B., Laforsch, C., ... Galgani, F. (2015). Beyond the ocean : Contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles To cite this version : HAL Id : hal-01136690. *Environmental Chemistry*, pp.32.
- Duncan, E. M., Broderick, A. C., Fuller, W. J., Galloway, T. S., Godfrey, M. H., Hamann, M., ... Godley, B. J. (2019). Microplastic ingestion ubiquitous in marine turtles. *Global Change Biology*, 25(2), 744–752. <https://doi.org/10.1111/gcb.14519>
- Duran, M., Aday, M. S., Zorba, N. N. D., Temizkan, R., Büyükcan, M. B., & Caner, C. (2016). Potential of antimicrobial active packaging “containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating” to extend shelf life of fresh strawberry. *Food and Bioproducts Processing* (Vol. 98). <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.007>
- Đurović, S., Pavlić, B., Šorgić, S., Popov, S., Savić, S., Pertonić, M., ... Zeković, Z. (2017). Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *Journal of Functional Foods*, 32, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.019>
- Europe, P. (2022). *Plásticos – Situación en 2022*.
- European Commission. (2004). Regulation (EC) No 1935/2004 “on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC.” *Official Journal of the European Union*, L338/4(1935), 4–17.
- EUROPEAN COMMISSION. (2011). *Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011. Official Journal of the European Union*. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:EN:PDF>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2009). Opinion of the Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF) Guidelines on submission of a

- dossier for safety evaluation by the EFSA of active or intelligent substances present in active and intelligent materials and arti. *The EFSA Journal*, 1208(March), 1–11.
- Ezeoha, S. L. (2013). Production of Biodegradable Plastic Packaging Film from Cassava Starch. *IOSR Journal of Engineering*, 3(10), 14–20. <https://doi.org/10.9790/3021-031051420>
- Fariman, G. A., Shastan, S. J., & Zahedi, M. M. (2016). Seasonal variation of total lipid, fatty acids, fucoxanthin content, and antioxidant properties of two tropical brown algae (*Nizamuddinina zanardinii* and *Cystoseira indica*) from Iran. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1323–1331. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0645-y>
- Farsanipour, A., Khodanazary, A., & Hosseini, S. M. (2020). Effect of chitosan-whey protein isolated coatings incorporated with tarragon *Artemisia dracunculus* essential oil on the quality of *Scomberoides commersonnianus* fillets at refrigerated condition. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 766–771. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.228>
- Feng, T., Du, Y., Li, J., Hu, Y., & Kennedy, J. F. (2008). Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.003>
- Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J. M., & Ocio, M. J. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control*, 34(1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.047>
- Flores, Y., Pelegrín, C. J., Ramos, M., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2021). Use of herbs and their bioactive compounds in active food packaging. In *Aromatic Herbs in Food: Bioactive Compounds, Processing, and Applications* (pp. 323–365). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822716-9.00009-3>
- Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022a). Active packaging film of chitosan and *Santalum album* essential oil: Characterization and application as butter sachet to retard lipid oxidation. *Food Packaging and Shelf Life*, 34(August), 100938. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100938>
- Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022b). Antioxidant Extracts of Nettle (*Urtica dioica*) Leaves: Evaluation of Extraction Techniques and Solvents. *Molecules*, 27(18), 6015. <https://doi.org/10.3390/molecules27186015>
- Flórez, M., Guerra-Rodríguez, E., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022). Chitosan for food

- packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloids*, 124, 107328. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.107328>
- Gaikwad, K. K., Singh, S., & Negi, Y. S. (2020). Ethylene scavengers for active packaging of fresh food produce. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 269–284. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00938-1>
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Popović Perković, Z. (2019). Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. *Biomolecules*, 9(6), 244. <https://doi.org/10.3390/biom9060244>
- Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernandez-Lopez, J., Muñoz, L. A., & Viuda-Martos, M. (2015). Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*). *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1057–1062. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.026>
- Güder, A., & Korkmaz, H. (2012). Evaluation of in-vitro antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and their mixture. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(3), 913–923.
- Gupta, R. K., & Dudeja, P. (2017). Food packaging. In *Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective* (pp. 547–553). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801773-9.00046-7>
- Hafsa, J., Smach, M. ali, Ben Khedher, M. R., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., & Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.050>
- Haghju, S., Beigzadeh, S., Almasi, H., & Hamishehkar, H. (2016). Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: I. Physicochemical characterisation and antimicrobial properties. *Journal of Microencapsulation*, 33(5), 438–448. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1208294>
- Han Lyn, F., Tan, C. P., Zawawi, R. M., & Nur Hanani, Z. A. (2021). Physicochemical properties of chitosan/ graphene oxide composite films and their effects on storage stability of palm-oil based margarine. *Food Hydrocolloids*, 117(February), 106707. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106707>
- Hassan, A. H. A., Korany, A. M., Zeinhom, M. M. A., Mohamed, D. S., & Abdel-Atty, N. S.

- (2022). Effect of chitosan-gelatin coating fortified with papaya leaves and thyme extract on quality and shelf life of chicken breast fillet and Kareish cheese during chilled storage. *International Journal of Food Microbiology*, 371(April), 109667. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109667>
- Hermawan, D., Lai, T. K., Jafarzadeh, S., Gopakumar, D. A., Hasan, M., Owolabi, F. A. T., ... Khalil, H. P. S. A. (2019). Development of seaweed-based bamboo microcrystalline cellulose films intended for sustainable food packaging applications. *BioResources*, 14(2), 3389–3410. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.3389-3410>
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Hoppe-Seyler, F. (1894). Ueber Chitin und Cellulose. <https://doi.org/10.1002/cber.189402703135>
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403–413. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.062>
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016, April 1). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
- Hromiš, N. M., Lazić, V. L., Markov, S. L., Vaštag, Ž. G., Popović, S. Z., Šuput, D. Z., ... Popović, L. M. (2015). Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. *Journal of Food Engineering*, 158, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.001>
- Ibrahim, H. M., & El-Zairy, E. M. R. (2015). Chitosan as a Biomaterial — Structure, Properties, and Electrospun Nanofibers. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. <https://doi.org/10.5772/61300>
- Imre, B., & Pukánszky, B. (2013). Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. *European Polymer Journal*, 49(6), 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.01.019>
- Jacobsen, C., Sørensen, A. D. M., Holdt, S. L., Akoh, C. C., & Hermund, D. B. (2019). Source, Extraction, Characterization, and Applications of Novel Antioxidants from Seaweed. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 541–568.

<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121401>

- Jafarzadeh, S., Jafari, S. M., Salehabadi, A., Nafchi, A. M., Uthaya Kumar, U. S., & Khalil, H. P. S. A. (2020). Biodegradable green packaging with antimicrobial functions based on the bioactive compounds from tropical plants and their by-products. *Trends in Food Science and Technology*, 100(April), 262–277. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.017>
- Jan, K. N., Zarafshan, K., & Singh, S. (2017). Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 423–433. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9410-4>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2000). *Modern Food Microbiology*. *Modern Food Microbiology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4427-2_9
- Jung, J., & Zhao, Y. (2012). Comparison in antioxidant action between α -chitosan and β -chitosan at a wide range of molecular weight and chitosan concentration. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(9), 2905–2911. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.020>
- Kadam, A. A., Singh, S., & Gaikwad, K. K. (2021). Chitosan based antioxidant films incorporated with pine needles (*Cedrus deodara*) extract for active food packaging applications. *Food Control*, 124, 107877. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107877>
- Kadam, D., & Lele, S. S. (2018). Cross-linking effect of polyphenolic extracts of *Lepidium sativum* seedcake on physicochemical properties of chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.018>
- Kalaycıoğlu, Z., Torlak, E., Akın-Evingür, G., Özen, İ., & Erim, F. B. (2017). Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.174>
- Kaya, M., Khadem, S., Cakmak, Y. S., Mujtaba, M., İlk, S., Akyuz, L., ... Deligöz, E. (2018). Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *RSC Advances*, 8(8), 3941–3950. <https://doi.org/10.1039/C7RA12070B>
- Kaya, M., Ravikumar, P., İlk, S., Mujtaba, M., Akyuz, L., Labidi, J., ... Erkul, S. K. (2018). Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina*'s fruit extract and seed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*,

- 45(November 2017), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.013>
- Khalil, A., Khalil, H. P. S. A., Yap, S. W., Tye, Y. Y., Tahir, P. M., Rizal, S., & Nurul Fazita, M. R. (2018). Effects of Corn Starch and *Kappaphycus alvarezii* Seaweed Blend Concentration on the Optical, Mechanical, and Water Vapor Barrier Properties of Composite Films. *BioResources*, 13(1), 1157–1173. Retrieved from https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_13_1_1157_Abdul_Khalil_Corn_Starch_Seaweed_Composite_Films
- Khoushab, F., & Yamabhai, M. (2010). Chitin research revisited. *Marine Drugs*, 8(7), 1988–2012. <https://doi.org/10.3390/md8071988>
- Kowalska, G., Baj, T., Kowalski, R., & Szymańska, J. (2021). Optimization of Glycerol–Water Extraction of Selected Bioactive Compounds from Peppermint and Common Nettle. *Antioxidants*, 10(5), 817. <https://doi.org/10.3390/antiox10050817>
- Laurence Cánepa Ivazeta, J. (2018). *Obtención de quitosanas con alto grado de desacetilación*.
- Leceta, I., Peñalba, M., Arana, P., Guerrero, P., & De La Caba, K. (2015). Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. *European Polymer Journal*, 66, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.02.015>
- Lee, D. S. (2016). Carbon dioxide absorbers for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.014>
- Lee, D. S., Wang, H. J., Jaisan, C., & An, D. S. (2022). Active food packaging to control carbon dioxide. *Packaging Technology and Science*, 35(3), 213–227. <https://doi.org/10.1002/pts.2627>
- Lee, H. G., Jeong, S., & Yoo, S. R. (2019). Development of food packaging materials containing calcium hydroxide and porous medium with carbon dioxide-adsorptive function. *Food Packaging and Shelf Life*, 21(February), 100352. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100352>
- Lewandowska, K. (2009). Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochimica Acta*, 493(1–2), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.04.003>
- Li, Y., Rokayya, S., Jia, F., Nie, X., Xu, J., Elhakem, A., ... Helal, M. (2021). Shelf-life, quality, safety evaluations of blueberry fruits coated with chitosan nano-material films. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80056-z>

- Liu, H., Adhikari, R., Guo, Q., & Adhikari, B. (2013). Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 588–597. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2012.12.037>
- Lu, M., & Wang, N. S. (2017). Spoilage of Milk and Dairy Products. In *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers* (pp. 151–178). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00010-8>
- Lunkov, A. P., Ilyina, A. V., & Varlamov, V. P. (2018). Antioxidant, Antimicrobial, and Fungicidal Properties of Chitosan Based Films (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(5), 449–458. <https://doi.org/10.1134/S0003683818050125>
- Mahdavi, V., Hosseini, S. E., & Sharifan, A. (2018). Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food Science and Nutrition*, 6(2), 269–279. <https://doi.org/10.1002/fsn3.544>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.04.069>
- Martínez-Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillén, F., Valverde, J. M., Zapata, P., ... Valero, D. (2007). Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of ethylene action: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(6), 543–560. <https://doi.org/10.1080/10408390600846390>
- Mathew, S., Brahmakumar, M., & Abraham, T. E. (2007). Microstructural Imaging and Characterization of the Mechanical, Chemical, Thermal, and Swelling Properties of Starch-Chitosan Blend Films. *Biopolymers*, 82(2), 176–187. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Mei, J., Yuan, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.003>
- Merino, D., & Alvarez, V. A. (2020). Green Microcomposites from Renewable Resources: Effect of Seaweed (*Undaria pinnatifida*) as Filler on Corn Starch–Chitosan Film Properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(2), 500–516. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01622-9>
- Merlo, T. C., Contreras-Castillo, C. J., Saldaña, E., Barancelli, G. V., Dargelio, M. D. B.,

- Yoshida, C. M. P., ... Venturini, A. C. (2019). Incorporation of pink pepper residue extract into chitosan film combined with a modified atmosphere packaging: Effects on the shelf life of salmon fillets. *Food Research International*, 125(August), 108633. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108633>
- Mildenberger, J., Stangeland, J. K., & Rebours, C. (2022). Antioxidative activities, phenolic compounds and marine food allergens in the macroalgae *Saccharina latissima* produced in integrated multi-trophic aquaculture systems. *Aquaculture*, 546, 737386. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737386>
- Mir, S. A., Dar, B. N., Wani, A. A., & Shah, M. A. (2018). Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. *Trends in Food Science and Technology*, 80(February), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.004>
- Misra, B. B., & Dey, S. (2013). Evaluation of in vivo anti-hyperglycemic and antioxidant potentials of α -santalol and sandalwood oil. *Phytomedicine*, 20(5), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.017>
- Moalla, S., Ammar, I., Fauconnier, M.-L., Danthine, S., Blecker, C., Besbes, S., & Attia, H. (2021). Development and characterization of chitosan films carrying *Artemisia campestris* antioxidants for potential use as active food packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.113>
- Moran, H. B. T., Turley, J. L., Andersson, M., & Lavelle, E. C. (2018). Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials*, 184, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.054>
- Moura, J. M., Farias, B. S., Rodrigues, D. A. S., Moura, C. M., Dotto, G. L., & Pinto, L. A. A. (2015). Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(4), 470–477. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0730-y>
- Moy, R. L., & Levenson, C. (2017). Sandalwood album oil as a botanical therapeutic in dermatology. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 10(10), 34–39.
- Müller, P., & Schmid, M. (2019). Intelligent packaging in the food sector: A brief overview. *Foods*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.3390/foods8010016>
- Mzid, M., Ben Khedir, S., Bardaa, S., Sahnoun, Z., & Rebai, T. (2017). Chemical composition, phytochemical constituents, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Urtica urens*

- L. leaves. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 123(2), 93–104. <https://doi.org/10.1080/13813455.2016.1255899>
- Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Gardrat, C., Rezaei, M. R., Hashemi, M., Le Coz, C., & Coma, V. (2017). Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. *Food Hydrocolloids*, 70, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.015>
- Obbard, R. W., Sadri, S., Wong, Y. Q., Khitun, A. A., Baker, I., & Richard, C. (2014). Who Where Why - wordpress blog - Community mapping examples. *Earth's Future*, 2, 315–320. <https://doi.org/10.1002/2014EF000240>.Abstract
- Oladzadabbasabadi, N., Mohammadi Nafchi, A., Ariffin, F., Wijekoon, M. M. J. O., Al-Hassan, A. A., Dheyab, M. A., & Ghasemlou, M. (2022). Recent advances in extraction, modification, and application of chitosan in packaging industry. *Carbohydrate Polymers*, 277(September 2021), 118876. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118876>
- Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3), 185–193. <https://doi.org/10.1080/10408690490441578>
- Özer, B. (2014). Microbiology and biochemistry of yogurt and other fermented milk products. *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*, (July 2014), 167–213. <https://doi.org/10.1201/b17297-11>
- Park, S. Il, & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933–1939. <https://doi.org/10.1021/jf034612p>
- Peng, Y., & Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.013>
- Peng, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2013). Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.019>
- Peniche-Covas, C., Argüelles-Monal, W., & San Román, J. (1993). A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 39(1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(93\)90120-8](https://doi.org/10.1016/0141-3910(93)90120-8)
- Peula, M. R. (2017). *Envasado y empaquetado de productos alimentarios*. INAD0108. IC

- Editorial. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=3EspEAAAQBAJ>
- Pirsa, S., Karimi Sani, I., Pirouzifard, M. K., & Erfani, A. (2020). Smart film based on chitosan/Melissa officinalis essences/ pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37(4), 634–648. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1716079>
- PlasticsEurope. (2020). *Plásticos – Situación en 2020*. PlasticsEurope.
- Prateepchanachai, S., Thakhiew, W., Devahastin, S., & Soponronnarit, S. (2019). Improvement of mechanical and heat-sealing properties of edible chitosan films via addition of gelatin and CO₂ treatment of film-forming solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.067>
- Priyadarshi, R., Sauraj, Kumar, B., Deebe, F., Kulshreshtha, A., & Negi, Y. S. (2018). Chitosan films incorporated with Apricot (Prunus armeniaca) kernel essential oil as active food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 85, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.003>
- Priyadarshi, R., Sauraj Kumar, B., & Negi, Y. S. (2018). Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydrate Polymers*, 195(December 2017), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.089>
- Qiao, C., Ma, X., Zhang, J., & Yao, J. (2017). Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chemistry*, 235, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.045>
- Qin, Y., Liu, Y., Yuan, L., Yong, H., & Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant, antimicrobial and pH-sensitive films based on chitosan, silver nanoparticles and purple corn extract. *Food Hydrocolloids*, 96, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.017>
- Qin, Y. Y., Yang, J. Y., Lu, H. B., Wang, S. S., Yang, J., Yang, X. C., ... Cao, J. X. (2013). Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.018>
- Quesada, J., Sendra, E., Navarro, C., & Sayas-Barberá, E. (2016). Antimicrobial Active Packaging including Chitosan Films with Thymus vulgaris L. Essential Oil for Ready-to-

- Eat Meat. *Foods*, 5(57), 1–13. <https://doi.org/10.3390/foods5030057>
- R. Kanatt, S., Lahare, P., P. Chawla, S., & Sharma, A. (2015). Kappaphycus alvarezii : Its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.5.1.1-6>
- Rahman, P. M., Mujeeb, V. M. A., & Muraleedharan, K. (2017). Flexible chitosan-nano ZnO antimicrobial pouches as a new material for extending the shelf life of raw meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.052>
- Rai, S., Dutta, P. K., & Mehrotra, G. K. (2017). Lignin incorporated antimicrobial chitosan film for food packaging application. *Journal of Polymer Materials*, 34(1), 171–183.
- Ramos, M., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2017). *Active Nanocomposites in Food Contact Materials*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53112-0_1
- Rayas, J. A., Rodríguez-Vera, R., & Martínez, A. (2003). Medición del modulo de Young en el hule látex usando ESPI. *Revista Mexicana de Fisica*, 49(6), 555–564.
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., ... Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425–1435. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.028>
- Rey, F., Lopes, D., Maciel, E., Monteiro, J., Skjermo, J., Funderud, J., ... Domingues, M. R. (2019). Polar lipid profile of Saccharina latissima, a functional food from the sea. *Algal Research*, 39(March), 101473. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101473>
- Riaz, A., Lagnika, C., Luo, H., Dai, Z., Nie, M., Hashim, M. M., ... Li, D. (2020). Chitosan-based biodegradable active food packaging film containing Chinese chive (Allium tuberosum) root extract for food application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.078>
- Riaz, A., Lei, S., Akhtar, H. M. S., Wan, P., Chen, D., Jabbar, S., ... Zeng, X. (2018). Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.126>
- Rillig, M. C., Ingraffia, R., & De Souza Machado, A. A. (2017). Microplastic incorporation into soil in agroecosystems. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 8–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01805>

- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M. A., & López-Hernández, J. (2010). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chemistry*, 121(2), 634–638. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.078>
- Rooney, M. L. (1995). Active packaging in polymer films. In *Active Food Packaging* (pp. 74–110). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2175-4_4
- Saedi, S., Kim, J. T., Shokri, M., Kim, J. H., & Shin, G. H. (2023). Green seaweed (*Ulva ohnoi*) as a new eco-friendly source for preparing transparent and functional regenerated cellulose composite films. *Cellulose*, 30(5), 3041–3059. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05055-5>
- Sakurai, K., Maegawa, T., & Takahashi, T. (2000). Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, 41(19), 7051–7056. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00067-7)
- Salem, A., Jridi, M., Abdelhedi, O., Fakhfakh, N., Nasri, M., Debeaufort, F., & Zouari, N. (2021). Development and characterization of fish gelatin-based biodegradable film enriched with *Lepidium sativum* extract as active packaging for cheese preservation. *Heliyon*, 7(April), e08099. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08099>
- Salinas, R., González, G., & Ulín, F. (2007). Modelling deterioration of fresh-cut vegetables. *Universidad y Ciencia*, 23(2), 183–196. Retrieved from www.ujat.mx/publicaciones/uciencia
- Sangsuwan, J., Rattanapanone, N., & Pongsirikul, I. (2015). Development of active chitosan films incorporating potassium sorbate or vanillin to extend the shelf life of butter cake. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(2), 323–330. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12631>
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177–187. <https://doi.org/10.1080/10715760290006411>
- Schreiber, S. B., Bozell, J. J., Hayes, D. G., & Zivanovic, S. (2013). Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.006>
- Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1), 13–25.

<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>

Ścieszka, S., & Klewicka, E. (2019). Algae in food: a general review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3538–3547.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>

Serrano-León, J. S., Bergamaschi, K. B., Yoshida, C. M. P., Saldaña, E., Selani, M. M., Rios-Mera, J. D., ... Contreras-Castillo, C. J. (2018). Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. *Food Research International*, 108, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.031>

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2009). Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1879–1885. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3667>

Shanmuganathan, R., Edison, T. N. J. I., LewisOscar, F., Kumar, P., Shanmugam, S., & Pugazhendhi, A. (2019). Chitosan nanopolymers: An overview of drug delivery against cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.060>

Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046>

Simopoulos, A. P. (2003). Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum of Nutrition*, 56, 67–70.

Singh, P., Saengerlaub, S., Wani, A. A., & Langowski, H. C. (2012). Role of plastics additives for food packaging. *Pigment and Resin Technology*, 41(6), 368–379. <https://doi.org/10.1108/03699421211274306>

Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.011>

Souza, R., Peruch, G., & Santos Pires, A. C. dos. (2012). Oxygen Scavengers: An Approach on Food Preservation. In *Structure and Function of Food Engineering* (pp. 21–42). <https://doi.org/10.5772/48453>

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.10.021>

- Spotti, M. L., Cecchini, J. P., Spotti, M. J., & Carrara, C. R. (2016). Brea Gum (from *Cercidium praecox*) as a structural support for emulsion-based edible films. *Lwt*, 68, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.018>
- Subasinghe, U., Gamage, M., & Hettiarachchi, D. S. (2013). Essential oil content and composition of Indian sandalwood (*Santalum album*) in Sri Lanka. *Journal of Forestry Research*, 24(1), 127–130. <https://doi.org/10.1007/s11676-013-0331-3>
- Tan, Y. M., Lim, S. H., Tay, B. Y., Lee, M. W., & Thian, E. S. (2015). Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology. *Materials Research Bulletin*, 69, 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2014.11.041>
- Thakhiew, W., Devahastin, S., & Soponronnarit, S. (2010). Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 99(2), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.025>
- Ummat, V., Tiwari, B. K., Jaiswal, A. K., Condon, K., Garcia-Vaquero, M., O'Doherty, J., ... Rajauria, G. (2020). Optimisation of ultrasound frequency, extraction time and solvent for the recovery of polyphenols, phlorotannins and associated antioxidant activity from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/md18050250>
- Valdés, A., & Garrigós, M. C. (2016). Carbohydrate-based advanced biomaterials for food sustainability: A review. *Materials Science Forum*, 842, 182–195. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.842.182>
- Valentin, R., Bonelli, B., Garrone, E., Di Renzo, F., & Quidnard, F. (2007). Accessibility of the functional group of chitosan aerogel probed by FT-IR-monitored deuteration. *Biomacromolecules*, 8(11), 3646–3650. <https://doi.org/10.1021/bm070391a>
- Valenzuela, C., & Pérez, P. (2016). Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos cárneos. *Revista Chilena de Nutricion*, 43(2), 188–195. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000200012>
- Vázquez, M., Velazquez, G., & Cazón, P. (2021). UV-Shielding films of bacterial cellulose with glycerol and chitosan. Part 1: equilibrium moisture content and mechanical properties. *CyTA - Journal of Food*, 19(1), 105–114. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1870566>

- Verma, D., & Fortunati, E. (2019). Biopolymer processing and its composites. In *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy* (pp. 3–23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00001-1>
- Vermeiren, L., Heirlings, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2003). Oxygen, ethylene and other scavengers. In *Novel Food Packaging Techniques* (pp. 22–49). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781855737020.1.22>
- Vieira, D. M., Pereira, C., Calhelha, R. C., Barros, L., Petrovic, J., Sokovic, M., ... Machado, A. V. (2022). Evaluation of plant extracts as an efficient source of additives for active food packaging. *Food Frontiers*, 3(3), 480–488. <https://doi.org/10.1002/fft2.141>
- Vilela, C., Kurek, M., Hayouka, Z., Röcker, B., Yildirim, S., Antunes, M. D. C., ... Freire, C. S. R. (2018). A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 80, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>
- Wang, L., Guo, H., Wang, J., Jiang, G., Du, F., & Liu, X. (2019). Effects of Herba Lophatheri extract on the physicochemical properties and biological activities of the chitosan film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.067>
- Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., & Lim, L. T. (2012). Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food Research International*, 49(1), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.023>
- Wu, T., Ge, Y., Li, Y., Xiang, Y., Jiang, Y., & Hu, Y. (2018). Quality enhancement of large yellow croaker treated with edible coatings based on chitosan and lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1072–1079. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.188>
- Xu, T., Gao, C. C., Feng, X., Huang, M., Yang, Y., Shen, X., & Tang, X. (2019). Cinnamon and clove essential oils to improve physical, thermal and antimicrobial properties of chitosan-gum arabic polyelectrolyte film:///C:/Users/usuario/Downloads/1-s2.0-S0268005X1100316X-main.pdfcomplexed films. *Carbohydrate Polymers*, 217(April), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.084>
- Yam K.L., T., & P.T., M. J. (2006). Intelligent Packaging : Concepts and Applications. *Journal of Food Science*, 70(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09052.x>
- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., ... Coma, V. (2018). Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in*

- Food Science and Food Safety*, 17(1), 165–199. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>
- Yong, H., Wang, X., Zhang, X., Liu, Y., Qin, Y., & Liu, J. (2019). Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. *Food Hydrocolloids*, 94, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.012>
- Yuan, G., Lv, H., Yang, B., Chen, X., & Sun, H. (2015). Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract. *Molecules*, 20, 11034–11045. <https://doi.org/10.3390/molecules200611034>
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
- Zawadzki, J., & Kaczmarek, H. (2010). Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.037>
- Zhang, L., Zhang, Z., Chen, Y., Ma, X., & Xia, M. (2021). Chitosan and procyanidin composite films with high antioxidant activity and pH responsivity for cheese packaging. *Food Chemistry*, 338, 128013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128013>
- Zhang, M., Biesold, G. M., Choi, W., Yu, J., Deng, Y., Silvestre, C., & Lin, Z. (2022). Recent advances in polymers and polymer composites for food packaging. *Materials Today*, 53(March), 134–161. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2022.01.022>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhang, W., Li, X., & Jiang, W. (2020). Development of antioxidant chitosan film with banana peels extract and its application as coating in maintaining the storage quality of apple. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 1205–1214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.275>
- Zhang, X., Lian, H., Shi, J., Meng, W., & Peng, Y. (2020). Plant extracts such as pine nut shell, peanut shell and jujube leaf improved the antioxidant ability and gas permeability of chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1242–1250. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.108>
- Zhang, Z.-J., Li, N., Li, H.-Z., Li, X.-J., Cao, J.-M., Zhang, G.-P., & He, D.-L. (2018). Preparation and characterization of biocomposite chitosan film containing Perilla

- frutescens (L.) Britt. essential oil. *Industrial Crops & Products*, 112, 660–667. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.073>
- Zhang, Z. H., Qin, Y. Y., Fan, J., Zhao, T. R., & Cheng, C. S. (2013). Physical properties and antibacterial activity of a chitosan film incorporated with lavender essential oil. *Advanced Materials Research*, 706–708, 197–200. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.706-708.197>
- Zhao, H., Wang, L., Belwal, T., Jiang, Y., Li, D., Xu, Y., ... Li, L. (2020). Chitosan-based melatonin bilayer coating for maintaining quality of fresh-cut products. *Carbohydrate Polymers*, 235(November 2019), 115973. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115973>
- Zhu, Z., Zhang, Y., Zhang, Y., Shang, Y., Zhang, X., & Wen, Y. (2019). Preparation of PANatTiO₂ Nanofibers for fruit packaging materials with efficient photocatalytic degradation of ethylene. *Materials*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/ma12060896>
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V., & Maté, J. I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *Lwt*, 41(10), 2159–2165. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.023>
- Zolcer Skačánová, K., & Battesti, M. (2019). Global market and policy trends for CO₂ in refrigeration. *International Journal of Refrigeration*, 107, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2019.08.010>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen gráfico de la tesis. P indica el número de artículo donde se publicaron los resultados.....	10
Figura 2. Comparación entre envasado activo e inteligente.....	16
Figura 3. Objetivos de la Estrategia Española de Economía Circular para el año 2030. Adaptación de (Flores et al., 2021).	27
Figura 4. Tipos de polímeros en función de su origen y biodegradabilidad. Adaptación de (Flores et al., 2021).	28
Figura 5. Capacidad de producción global (%) de biopolímeros en 2024 en función del sector del mercado. Adaptación de (Flores et al., 2021).	29
Figura 6. Esquema del proceso de obtención de quitosano. Adaptación de (Zargar et al., 2015).	31
Figura 7. Tras el ensayo, a la izquierda solución de radicales DPPH y a la derecha extracto de ortiga.	54
Figura 8. Cambio de color en las muestras durante el ensayo ABTS*.....	55
Figura 9. Ensayo de tracción en las películas a analizar.	62
Figura 10. Ensayo de perforación en las películas a analizar.	63
Figura 11. Ensayo de fuerza de sellado en las películas a analizar.	64
Figura 12. Medición de una muestra envasada de mantequilla con el equipo ColorStriker. ...	70
Figura 13. Resumen gráfico Publicación I.	74
Figura 14. Estudio del proceso de extracción de las hojas de ortiga Urtica dioica.	75
Figura 15. Dependencia experimental y prevista del contenido fenólico total (TPC) en función del tiempo, con diferente métodos y disolventes en ortigas.....	81
Figura 16. Dependencia experimental y prevista de la actividad de neutralización DPPH en función del tiempo, con diferente métodos y disolventes en ortigas.	83
Figura 17. Dependencia experimental y prevista de la actividad de neutralización ABTS* en función del tiempo, con diferente métodos y disolventes en ortigas.	85

Figura 18. Resumen gráfico Publicación II.	88
Figura 19. Resumen gráfico Publicación III.	89
Figura 20. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la parte superior, transversal e inferior de las películas de quitosano y quitosano-extracto de ortiga.	91
Figura 21. Espectros FT-IR de películas de quitosano (Ch) a diferentes concentraciones de glicerol (Gly) (0, 0.25 y 0.5 %) y extracto de ortiga (NE) (0, 12.5 y 25 %). I) Solo quitosano; II) con 12.5% de NE; III) con 25% de NE.....	93
Figura 22. Predicción de los modelos de las propiedades hídricas de las películas: I) S es solubilidad, II) %W es contenido de humedad de equilibrio y III) WVP es permeabilidad al vapor de agua. NE es extracto de ortiga.	97
Figura 23. Predicción de los modelos de propiedades antioxidantes: I) DPPH (%), II) ABTS• y III) Contenido total fenólico (mg GAE/g de muestra de película). NE es el extracto de ortiga.	102
Figura 24. Perfil de los espectros UV de películas de quitosano (Ch) con diferentes concentraciones de glicerol (Gly) (0, 0.25 y 0.5 %) y extracto de ortiga (NE) (0, 12.5 y 25 %).	105
Figura 25. Predicción de los modelos para la transmitancia UV: I) UV-C (%T), II) UV-B (%T) y III) UV-A (%T). NE es extracto de ortiga.....	108
Figura 26. Predicción del modelo para la opacidad de las películas. NE es extracto de ortiga.	110
Figura 27. Predicción de los modelos para las coordenadas CIE: I) L*, II) a* y III) b*. NE es extracto de ortiga.	112
Figura 28. Predicción de los modelos para las propiedades mecánicas: TS es la resistencia a la tracción, %E es el porcentaje de alargamiento a la rotura, YM es el módulo de Young. NE es extracto de ortiga.....	116
Figura 29. Predicción de los modelos para las propiedades mecánicas: I) BS es la resistencia a la rotura, II) DB es la distancia a la rotura. NE es extracto de ortiga.	120
Figura 30. Termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido de películas de quitosano-NE.	123
Figura 31. Queso Havarti con separador de lonchas de película de poliamida/polietileno (PA/PE), película de quitosano puro (Ch) y película de quitosano-NE (NE es extracto de ortiga).....	124

Figura 32. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las muestras de queso tipo Havarti. PA/PE es poliamida/polietileno, Ch es quitosano, Ch_NE es quitosano (1 % p/v) enriquecido con extracto de ortiga (18.1 % v/v) y glicerol (0.1 % p/v).....	127
Figura 33. Resumen gráfico Publicación IV.	133
Figura 34. Proceso de extracción del alga Saccharina latissima.	134
Figura 35. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la parte inferior, superior y transversal de películas de quitosano con glicerol (0.1 %) y SLE (0, 10 y 20 %). SLE es extracto del alga Saccharina latissima.....	135
Figura 36. Espectro FT-IR de películas de quitosano con glicerol (0.1 %) y SLE (0, 10 y 20 %). SLE es extracto del alga Saccharina latissima.	137
Figura 37. Efecto previsto de la concentración de extracto de Saccharina latissima (SLE) en I) Resistencia a la tracción (TS), II) Módulo de Young (YM).	141
Figura 38. Gráfico de respuesta del efecto previsto de la concentración de SLE en I) DPPH y II) ABTS•. SLE es extracto del alga Saccharina latissima.....	146
Figura 39. Perfil de espectros UV de películas de quitosano (Ch) con glicerol (0.1 %) y SLE (0, 10 y 20 %). SLE es extracto del alga Saccharina latissima.	150
Figura 40. Gráfico de respuesta del efecto previsto de la concentración de SLE en los valores de I) Transparencia, II) Opacidad, III) a* y IV) b*. SLE es el extracto de alga Saccharina latissima.....	151
Figura 41. Termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido de películas de quitosano con glicerol (0.1 %) y extracto de alga Saccharina latissima: I) 1% de quitosano, II) 1% de quitosano y 10 % de extracto de alga marina, III) 1% de quitosano y 20% de extracto de alga marina.	154
Figura 42. Lonchas de queso Havarti con separadores, selladas en bolsas al vacío y almacenadas a 5 °C durante 45 días: A) 1 % de quitosano, B) 1 % de quitosano y 10 % de extracto de alga marina, C) 1 % de quitosano y 20 % de extracto de alga marina.....	156
Figura 43. Resumen gráfico Publicación V.....	160
Figura 44. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de películas de quitosano con aceite esencial de sándalo (SEO).....	161
Figura 45. Espectro FT-IR de películas de quitosano con aceite de sándalo (SEO).	163
Figura 46. Termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido de películas de quitosano y SEO. SEO es aceite esencial de sándalo.	170

Figura 47. Muestras de mantequilla envueltas en películas de quitosano-SEO almacenadas a 4 °C durante 90 días. CH es quitosano, SEO es aceite esencial de sándalo. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto. 172

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las películas de quitosano y extracto de <i>Urtica dioica</i> . Ch es quitosano; Gly es glicerol; NE es extracto de ortiga. El número en la muestra de película muestra el % de ese compuesto.	58
Tabla 2. Composición de las películas de quitosano y extracto de <i>Saccharina latissima</i> . Ch es quitosano; SLE es extracto de alga. El número en la muestra de película muestra el % de ese compuesto.	59
Tabla 3. Composición de las películas de quitosano y aceite esencial de <i>Santalum album</i> . Chitosan es quitosano; SEO es aceite esencial de sándalo. El número en la muestra de película muestra el % de ese compuesto.	60
Tabla 4. Datos publicación I.	73
Tabla 5. Resumen de las condiciones de los procesos de extracción.	75
Tabla 6. Diseño experimental y resultados de las variables antioxidantes de los extractos secos de ortiga. TPC es el contenido fenólico total, DPPH es el ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo y ABTS* es el ensayo de ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico.	76
Tabla 7. Análisis de varianza y estadísticas de ajuste para el análisis antioxidante de ortigas. Contenido fenólico total (TPC), % DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y %ABTS* (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico).	77
Tabla 8. Modelos matemáticos para la predicción de la capacidad antioxidante de ortigas. Contenido fenólico total (TPC), % DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y %ABTS* (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) en función del tiempo de extracción, para cada método y disolvente utilizado.	78
Tabla 9. Datos publicación II	87
Tabla 10. Datos publicación III.	88
Tabla 11. Propiedades hídras de las películas de quitosano (Ch) con glicerol (Gly) y extracto de ortiga (NE). El número en la muestra de película muestra el % (p/p) de ese compuesto.	94

Tabla 12. Análisis de varianza para las propiedades hídricas de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.....	95
Tabla 13. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades hídricas de las películas de quitosano.....	95
Tabla 14. Propiedades antioxidantes de películas de quitosano (Ch) con glicerol (Gly) y extracto de ortiga (NE). El número de la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	100
Tabla 15. Análisis de varianza de las propiedades antioxidantes de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.....	101
Tabla 16. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades antioxidantes de las películas de quitosano.....	101
Tabla 17. Propiedades ópticas de las películas de quitosano (Ch) con glicerol (Gly) y extracto de ortiga (NE). El número en la muestra de película muestra el % (p/p) de ese compuesto.	105
Tabla 18. Análisis de varianza de las propiedades ópticas de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.	106
Tabla 19. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades ópticas de las películas de quitosano.	106
Tabla 20. Parámetros de color de las películas a base de quitosano. Ch es quitosano, Gly es glicerol, NE es extracto de ortiga. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	111
Tabla 21. Propiedades de tracción de las películas de quitosano. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.....	113
Tabla 22. Análisis de varianza para las propiedades mecánicas de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y extracto de ortiga (% v/v), respectivamente.....	114
Tabla 23. Estadístico de ajuste del modelo obtenido para las propiedades mecánicas de las películas de quitosano.....	115
Tabla 24. Propiedades de punción de las películas de quitosano. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.....	118
Tabla 25. Análisis de varianza para las propiedades de punción de las películas de quitosano. A y B se refieren a glicerol (% p/v) y NE (% v/v), respectivamente.	119

Tabla 26. Estadístico de ajuste del modelo obtenido para las propiedades de punción de las películas de quitosano.	119
Tabla 27. Propiedades antioxidantes medidas en las películas utilizadas como separadores de lonchas y en las muestras de queso Havarti envasado.	125
Tabla 28. Parámetros ópticos de las películas a base de quitosano utilizadas como separadores de lonchas.	129
Tabla 29. Parámetros ópticos de las muestras de queso tipo Havarti.	131
Tabla 30. Datos publicación IV.	132
Tabla 31. Propiedades de punción y mecánicas de películas de quitosano con extracto de Saccharina latissima. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	138
Tabla 32. Análisis de varianza para propiedades de punción y mecánicas de películas de quitosano con extracto de Saccharina latissima. A es la concentración de SLE.	138
Tabla 33. Estadística de ajuste del modelo obtenido para las propiedades de función y mecánicas de las películas de quitosano con extracto de Saccharina latissima.	139
Tabla 34. Propiedades antioxidantes de las películas desarrolladas a base de quitosano con extracto de Saccharina latissima. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	144
Tabla 35. Propiedades antioxidantes de las películas desarrolladas a base de quitosano con extracto de Saccharina latissima. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	145
Tabla 36. Propiedades ópticas y parámetros de color de las películas a base de quitosano. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	147
Tabla 37. Análisis de varianza para las propiedades ópticas de películas de quitosano con extracto del alga Saccharina latissima (A).	149
Tabla 38. Estadísticas de ajuste del modelo obtenido para las propiedades ópticas de películas de quitosano con extracto del alga Saccharina latissima.	149
Tabla 39. Propiedades antioxidantes de las películas utilizadas como separadores y de las muestras de queso Havarti envasadas. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	155

Tabla 40. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las muestras de queso tipo Havarti. Ch es quitosano, SLE es extracto del alga Saccharina latissima. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	157
Tabla 41. Datos publicación V.....	159
Tabla 42. Propiedades físicas y mecánicas de las películas de quitosano-SEO. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	165
Tabla 43. Propiedades antioxidantes de las películas desarrolladas a base de quitosano y SEO. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.....	167
Tabla 44. Propiedades ópticas y parámetros de color de las películas. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.....	169
Tabla 45. Propiedades antioxidantes y ópticas de películas de quitosano aplicadas sobre mantequilla tras 3 meses de almacenamiento. TBARS de la mantequilla tras 3 meses de almacenamiento. El número en la muestra de película indica el % (p/p) de ese compuesto.	173



El quitosano es un biopolímero con interesantes propiedades como material biodegradable utilizable en el envasado de alimentos. En esta tesis doctoral se han desarrollado películas a base de quitosano con extracto naturales antioxidantes (ortiga *Urtica dioica* L. y alga parda *Saccharina latissima*) y aceite esencial de sándalo *Santalum album*, estudiando sus propiedades y aplicaciones como envase activo antioxidante de alimentos. Se ha optimizado la extracción del extracto de ortiga y se han obtenido modelos matemáticos para predecir sus propiedades. Se ha estudiado la aplicación de las películas desarrolladas para el envasado de mantequilla o como láminas separadores de queso. Se ha observado una disminución de la oxidación lipídica de las matrices alimentarias (mantequilla y queso), mostrando un efecto antioxidante.