

# Aprovechamiento de materias primas regionales para el desarrollo de envases comestibles activos y biodegradables

## Use of regional raw materials for the development of active and biodegradable edible packaging

Presentación: 6 y 7 de octubre

Doctorando:

**María Gabriela Kupervaser**

Grupo de investigación en biotecnología y alimentos (BIOTEC), Facultad Regional Resistencia, Universidad Tecnológica Nacional-Argentina

[g\\_kupervaser@hotmail.com](mailto:g_kupervaser@hotmail.com)

Director/a:

**Silvia Karina Flores**

Co-director/a:

**Carola Andrea Sosa**

### Resumen

Entre las tecnologías emergentes para la optimización de la preservación de alimentos surge como novedosa alternativa el empleo de películas o recubrimientos comestibles autoportados que confieren propiedades funcionales específicas. Los trabajos desarrollados en este tema, conducen a incorporar agentes antimicrobianos de fuentes naturales en la formulación de películas, ya que la inclusión de aditivos podría considerarse como una nueva tendencia de envasado activo. Los films o recubrimientos comestibles son láminas delgadas elaboradas con materiales aptos para el consumo y que actúan como una barrera entre el alimento y el ambiente que los rodea, incrementando así la vida útil del producto. Los films obtenidos a partir de polisacáridos, especialmente de almidones, presentan un alto potencial ya que tienen un bajo costo, son transparentes, no confieren olor ni color, poseen una baja permeabilidad al O<sub>2</sub> y son biodegradables. Estos sistemas altamente prometedores son capaces de mejorar la calidad, vida útil, seguridad y funcionalidad de los alimentos, y además pueden actuar como carriers de ingredientes activos. En el presente trabajo, se expone la formulación de recubrimientos comestibles a base de almidón de mandioca y adicionados de aceites esenciales (AE), y su posterior evaluación del efecto antimicrobiano frente a la levadura *Zygosaccharomyces parabailii*, como antecedente de la investigación realizada en el marco de mi tesis de maestría. Sobre la

base de los resultados obtenidos en la misma, se propone el actual plan de tesis doctoral que consiste en desarrollar un envase comestible, activo y ecofriendly a base de almidón de mandioca, glicerol y agua, y analizar la viabilidad de la incorporación de pulpas o concentrados de frutas regionales del Nordeste Argentino (mango, guayaba y mamón), estudiando su influencia en las propiedades físicas, mecánicas, de barrera y como fuente natural de polifenoles, antimicrobianos y antioxidantes.

**Palabras clave:** antimicrobianos naturales, packaging comestible, extractos de frutas

## Abstract

Among the emerging technologies for the optimization of food preservation, the use of self-supporting edible films or coatings that confer specific functional properties emerges as a novel alternative. The work carried out on this topic leads to the incorporation of antimicrobial agents from natural sources in the formulation of films, since the inclusion of additives could be considered as a new trend in active packaging. Edible films or coatings are thin sheets made with materials suitable for consumption and that act as a barrier between food and the environment that surrounds them, thus increasing the useful life of the product. Films obtained from polysaccharides, especially starches, have a high potential since they have a low cost, are transparent, do not confer odour or color, have low permeability to O<sub>2</sub> and are biodegradable. These highly promising systems are capable of improving the quality, shelf life, safety and functionality of foods, and can also act as carriers of active ingredients. In the present work, the formulation of edible coatings based on cassava starch and the incorporation of essential oil (EO) is exposed, and its subsequent evaluation of the antimicrobial effect against the yeast *Zygosaccharomyces parvulus*, as a background to the research carried out in the framework from my master's thesis. On the basis of the results obtained in it, the current doctoral thesis plan is proposed, which consists of developing an edible, active and eco-friendly container based on cassava starch, glycerol and water, and analysing the feasibility of incorporating pulps or concentrates of regional fruits from the Northeast of Argentina (mango, guava and papaya), studying their influence on the physical, mechanical, barrier properties and as a natural source of polyphenols, antimicrobials and antioxidants.

**Keywords:** natural antimicrobials, edible packaging, fruit extracts

## Introducción

Según datos publicados por la Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, en Argentina aproximadamente el 21% de los residuos sólidos urbanos están constituidos por plásticos, papel y cartón. Muchos de ellos, son bandejas, sobres, bolsas y films, provenientes de los embalajes de alimentos, y su tiempo de degradación varía entre algunos meses hasta varios años. En este contexto, el desarrollo de una metodología que permita la obtención de materiales de envases de naturaleza biodegradable, contribuirá positivamente con el medio ambiente, disminuyendo la utilización de plásticos sintéticos que promueven la contaminación (Abdul Khalil *et al.*, 2018).

En el sector de industrias de alimentos, es constante la demanda de tecnologías que permitan el desarrollo de productos seguros y de alta calidad nutricional y organoléptica. La tecnología de envasado comestible (films y recubrimientos) surge como una alternativa innovadora para mejorar la calidad y la conservación durante el procesamiento y/o almacenamiento de los alimentos (Bastarrachea *et al.*, 2015). Las películas o recubrimientos comestibles autosoportados, pueden conferir ventajas específicas al alimento como prevenir la pérdida o ganancia de humedad, lo cual evita cambios texturales y retarda los cambios químicos, nutricionales y microbiológicos, actuando como una barrera contra el intercambio de gases y evitando daños mecánicos por la manipulación (McHugh, 2000). Asimismo, los envases comestibles se pueden utilizar como portadores de antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizante, etc., contribuyendo a la calidad nutricional y funcional de los productos alimenticios (Atarés & Chiralt, 2016).

La obtención de films comestibles, activos y biodegradables permitirá el desarrollo de nuevas matrices, de alto potencial de transferencia, que contribuya a la competitividad de la industria provincial y regional. Los conocimientos y resultados que se generen servirán de base para la industria para desarrollar productos técnica y económicamente viables, facilitando la ampliación a nuevos mercados.

El objetivo del plan de tesis doctoral consiste en desarrollar un envase comestible, activo y “ecofriendly” a base de almidones nativos o modificados, glicerol y agua, adicionados con agentes antimicrobianos naturales como aceites esenciales. A su vez, se propone analizar la viabilidad de la incorporación de pulpas o concentrados de frutas regionales del Nordeste Argentino en forma de purés y polvos deshidratados, estudiando su influencia en las propiedades físicas, mecánicas y de barrera antimicrobiana. Los films elaborados a partir de polisacáridos, especialmente de almidones, presentan un alto potencial ya que tienen un bajo costo, son transparentes, no confieren olor ni color, poseen una baja permeabilidad al O<sub>2</sub> y son biodegradables (McHugh, 2000). Estos sistemas altamente prometedores son capaces de mejorar la calidad, vida útil, seguridad y funcionalidad de los alimentos, y además pueden actuar como soporte de ingredientes activos.

## Desarrollo

Se describe la preparación de recubrimientos comestibles adicionados de aceites esenciales. Se utilizaron un total de 9 AE (pureza=100%) de origen natural: orégano, canela, albahaca, tomillo, raíz de jengibre, nuez moscada, naranja dulce, menta y pomelo rosado, proporcionados por la empresa Plant Gurú (Estados Unidos). Los mismos fueron seleccionados sobre la base de resultados obtenidos por otros autores en relación a su efecto inhibitorio (Mamani *et al.*, 2017; Alves-Silva *et al.*, 2013; Preedy, 2015; Prakash *et al.*, 2015; Rivera Calo *et al.*, 2015).

La elaboración de los recubrimientos comestibles consistió en mezclar cantidades correspondientes de fécula de mandioca y agua (Tabla 1.), acompañado de agitación y calentamiento uniforme hasta gelificación completa del almidón (69 ±2°C). Por otra parte, se preparó una solución de lecitina de soja, AE y agua, y se homogeneizó a 24.000 rpm con un dispersor ULTRA-TURRAX. Una vez adicionada la solución de almidón gelificado, se agregó la cantidad correspondiente de glicerol (plastificante). Se obtuvieron recubrimientos conteniendo 5.0 % de AE, y se preparó además una muestra control (0.0% AE).

Tabla 1. Composición porcentual de recubrimientos comestibles adicionados de diferentes AE

Componente	Cantidades (%)
Aceite esencial (AE)	5,0
Lecitina de soja (L)	5,0
Almidón de mandioca	2,5
Agua	85
Glicerol	2,5

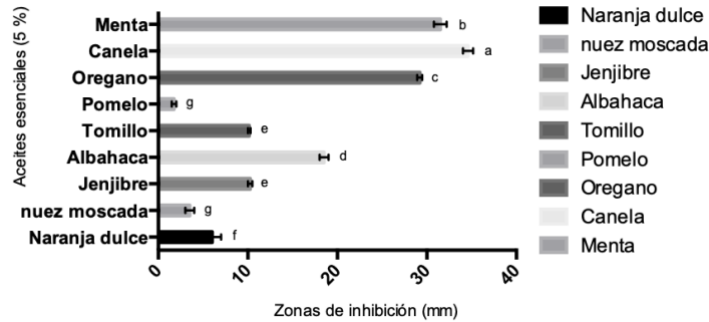
Se aplicó la técnica microbiológica de difusión en agar (cualitativa) que permitió realizar una selección de los AE más efectivos considerando el tamaño de halos de inhibición desarrollados, después de un periodo de incubación determinado. El inóculo de la cepa *Z. parabailii* (DMic031766) fue preparado caldo saboureaud, incubando a 28°C durante 48 horas, resultando dicho tiempo suficiente para que el cultivo alcance la fase exponencial de crecimiento. El recuento de colonias desarrolladas en presencia de AE se comparó con un control (0.00% AE).

El método de difusión en agar se realizó siguiendo el protocolo descrito por Miramont (2012) con algunas modificaciones, y en las Normas del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Se inoculó una placa de Petri con *Z. parabailii* (concentración=1x10<sup>6</sup> UFC/ml), con 15.0 ml de Agar Saboureaud Glucosado estéril. Sobre cada placa, se colocó 0.14 ml del inóculo con ayuda de un hisopo estéril, y se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo sólido, retirando luego el excedente y dejando secar. Posteriormente, se colocaron sobre el agar inoculado, discos de papel de filtro (ASHLESS FILTER PAPER 201 FAST) de 10 mm de diámetro, esterilizado durante 2 horas a 180°C e impregnados con recubrimiento comestible. Las placas se sellaron y se incubaron a 28°C por 48 hs. Cada ensayo se realizó por duplicado y el efecto antimicrobiano se determinó por medio del desarrollo de zonas de inhibición (halos) en el área de contacto, y alrededor de los discos. Los resultados se expresaron como el diámetro medio del halo de inhibición (mm) ± desviación estándar (SD). Para mantener la similitud de las condiciones de ensayo, los recubrimientos fueron probados en el mismo día frente al mismo inóculo (Solarte Portilla, 2015).

## Resultados

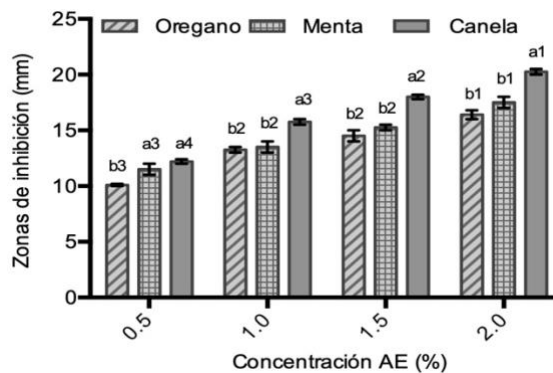
El screening de aceites esenciales permitió evaluar la capacidad de migración de los antimicrobianos, en este caso, aceites esenciales (AE) contenidos en los recubrimientos comestibles (que posteriormente serán aplicados a un alimento) hacia el agar sólido, en relación al control del crecimiento de la levadura *Z. parabailii*.

La actividad inhibitoria de cada uno de los AE, se cuantificó a través del diámetro de la zona de inhibición, la cual se desarrolló de manera uniforme y circular en una capa homogénea de crecimiento de la levadura *Z. parvabailii*. En la Fig.1., se informan los diámetros de las zonas o halos de inhibición obtenidos en cada caso. Es importante remarcar que los resultados se compararon con un control, que consistió en el recubrimiento comestible sin adición de AE, el cual no desarrolló halo de inhibición.



**Fig. 1.** Halos de inhibición (mm) obtenidos para 5.0% v/v de AE. Barras con letras diferentes indican que hay diferencia significativa entre diferentes aceites esenciales para la misma concentración.

Como se puede observar, los AE de canela, menta y orégano exhibieron un mayor efecto inhibitorio en comparación a los demás aceites ( $p < 0.05$ ), puesto que se obtuvieron zonas de 35.00±0.00, 32.00±0.50 y 29.00±1.00 mm de diámetro, respectivamente. Por su parte, el AE de albahaca demostró tener un efecto intermedio, con halos de 19.00±0.50 mm de diámetro. Para los AE de tomillo, jengibre y pomelo rosado se obtuvieron halos de 10.00±0.00 mm, y para naranja dulce y nuez moscada los mismos fueron de 6.00±1.00 y 3.50±0.50 mm, respectivamente, menores a las obtenidas con los demás AE. Sobre la base de los resultados del screening, se seleccionaron los AE de mayor poder de inhibición y se aplicó el ensayo de difusión en agar, en un rango más acotado de concentraciones 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% (v/v). Los resultados de las pruebas se muestran en la Fig. 2.



**Fig. 2.** Halos de inhibición (mm) desarrollados en placas inoculadas con *Z. parvabailii*, en contacto con discos impregnados de recubrimiento comestible + AE de canela, orégano y menta (0,5; 1,0; 1,5; 2,0% v/v). Barras con letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre diferentes aceites esenciales para iguales concentraciones; números iguales indican que no hay diferencia significativa para un mismo aceite esencial a diferentes concentraciones.

En general, el tamaño de las zonas de inhibición, entre la concentración mínima y máxima de AE (0.5 y 2.0% (v/v)), estuvieron en un rango de 10.0±0.0-17.0±1.0 mm para orégano, 11.5±0.5- 17.5±0.5 mm para menta y 12.2±0.2-20.0±0.0 mm para canela, observándose una mayor inhibición con la máxima concentración de antimicrobiano.

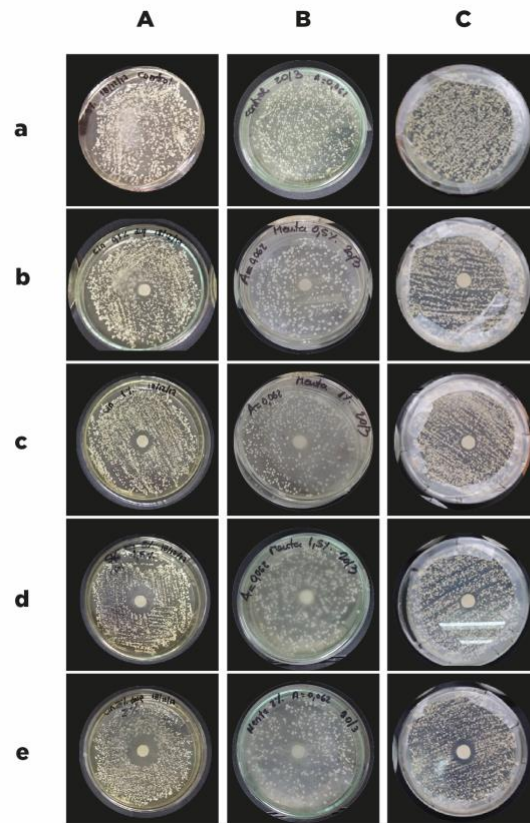
Para una cantidad correspondiente a 0.5% (v/v), el AE de canela produjo un mayor halo de inhibición que orégano ( $p = 0.033$ ), mientras que con menta no hubieron diferencias ( $p > 0.05$ ).

Por otro lado, para 1.0% (v/v) de AE, se observó un comportamiento similar al anterior ( $p = 0.027$ ), pero en este caso, no se encontraron diferencias entre los AE de menta y orégano ( $p > 0.05$ ).

Por su parte, para 1.5% (v/v) de AE se obtuvo el mismo comportamiento que para una concentración de 0.5% (v/v) ( $p = 0.021$ ).

Finalmente, y al 2.0% (v/v) de AE, no se encontraron diferencias significativas entre los AE de orégano y menta ( $p > 0.05$ ), mientras que con el AE de canela hubo diferencias significativas respecto de los AE ensayados.

Lo explicado anteriormente, se puede observar en la Fig. 3., donde se muestra la relación lineal entre los diámetros de los halos de inhibición con la concentración de antimicrobiano utilizado. El AE de orégano y menta tuvieron un comportamiento similar, mientras que el AE de canela mostró el mayor poder inhibitorio a partir de una concentración del 1.0 % (v/v).



**Fig. 3.** Placas inoculadas con *Z. parvabailii*, en contacto con discos impregnados de recubrimiento comestible adicionados de diferentes AE: Canela (A), Menta(B) y Orégano (C) a diferentes concentraciones: 0% (a), 0.5%(b), 1.0%(c), 1.5%(d) y 2.0% (e).

Las fotografías muestran las placas inoculadas con levadura, en contacto con discos impregnados con recubrimiento comestible adicionado de AE de canela, menta y orégano (A, B y C). Los halos de inhibición desarrollados por el AE de canela, para todas las concentraciones utilizadas, fue mucho mayor a los exhibidos por los AE de orégano y menta, corroborando lo explicado en la Fig.2.

## Conclusiones

El screening de los 9 aceites esenciales, arrojó el siguiente ordenamiento con respecto a su poder inhibitorio, frente a *Z.parvabailii*: canela > menta > orégano > albahaca > (tomillo, pomelo rosado, jengibre) > naranja > nuez. Entre los AE de mayor poder inhibitorio, se observó un mejor comportamiento con el 2.0% (v/v) de canela, demostrando su factibilidad de aplicarlo como antimicrobiano en un recubrimiento comestible.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se pretende aplicar la técnica microbiológica descrita para determinar el efecto antimicrobiano de extractos de frutas regionales, frente a microorganismos deteriorativos y patógenos de alimentos, previo a la incorporación de los mismos a un film de almidón. Esto permitirá la obtención de un envase comestible, activo y biodegradable permitiendo la conservación natural de alimentos. Asimismo, contribuirá a disminuir la contaminación ambiental, reduciendo el uso de materiales plásticos derivados del petróleo. La utilización de materias primas regionales para llevar a cabo este proyecto de tesis, generará productos con mayor valor agregado, incrementando la competitividad de la industria regional y nacional.

## Referencias

- Alves-Silva, J. M., dos Santos, S. M. D., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2), 371-378.
- Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in food science & technology*, 48, 51-62.
- Bastarrechea, L. J., Wong, D. E., Roman, M. J., Lin, Z., & Goddard, J. M. (2015). Active packaging coatings. *Coatings*, 5(4), 771-791.
- Bhavaniramya, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49-55.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food control*, 54, 111-119.
- Kaczmarek, M., Avery, S. V., & Singleton, I. (2019). Microbes associated with fresh produce: Sources, types and methods to reduce spoilage and contamination. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 107, pp. 29-82). Academic Press.
- Khalil, H. A., Banerjee, A., Saurabh, C. K., Tye, Y. Y., Suriani, A. B., Mohamed, A., ... & Paridah, M. T. (2018). Biodegradable films for fruits and vegetables packaging application: preparation and properties. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 139-153.
- Lee, S., Kim, H., Beuchat, L. R., Kim, Y., & Ryu, J. H. (2020). Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. *Food Microbiology*, 103489.
- Mamani, J. Z. (2017). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA "IN VITRO" DEL ACEITE ESENCIAL DE MENTA (*Mentha piperita* L.) FRENTE A *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA (EPEC). *Revista de Investigaciones de la Escuela de Posgrado de la UNA PUNO*, 6(3), 244-254.
- McHugh, T. H. (2000). Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Food/Nahrung*, 44(3), 148-151.
- Miramont, S. (2012). Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos. *Director Lía Noemí Gerschenson.[Tesis de Maestría]. Universidad Tecnológica Nacional de Buenos Aires. Tecnología de Alimentos.*
- Solarte Portilla, A. L. (2016). Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella Typhimurium* aislada de casos clínicos en diferentes especies animales.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities—Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391.
- Preedy, V. R. (Ed.). (2015). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press.
- Alves-Silva, J. M., dos Santos, S. M. D., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2), 371-378.