

Métodos modernos para la caracterización de películas y recubrimientos comestibles

Mónica García, Felipe Delgado, Monserrat Escamilla, Blanca García, Carlos Regalado*

Facultad de Química, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Cerro de las Campanas S/N, Col. Las Campanas, Querétaro 76010, México; autor corresponsal:

*regcarlos@gmail.com

Resumen

La búsqueda de nuevas alternativas para aumentar la vida de anaquel de productos alimenticios ha surgido debido a la creciente demanda de los consumidores por alimentos inocuos y mínimamente procesados, siendo el empaqueo de los alimentos uno de los más utilizados. Sin embargo, el impacto en el medio ambiente es muy alto, por lo cual se han desarrollado películas a partir de materiales biodegradables (proteínas, lípidos y polisacáridos) que puedan servir como material de embalaje. La efectividad de estas películas comestibles depende en gran parte de las propiedades mecánicas y de barrera que posean, por lo que se ha realizado varios estudios con el fin de relacionar la micro y nanoestructura de las películas con sus propiedades físicas. El objetivo del presente trabajo es presentar las diferentes técnicas utilizadas para el estudio de la estructura y de las interacciones entre los componentes de la matriz de las películas y el efecto de éstas en sus propiedades mecánicas y de barrera.

Palabras clave: Películas comestibles, Espectroscopía, Microscopía, Difracción de rayos x

Abstract

The search for new alternatives to increase the shelf life of food products has increased due to the growing demand of consumers for safe and minimally processed foods, where food packaging represents a commonly used approach. However, oil derived packaging materials create a high environmental impact, and trying to overcome this problem films have been developed from biodegradable materials (proteins, lipids and polysaccharides) that can be of use in food packaging. The effectiveness of these edible films is mainly dependent on the mechanical and barrier properties they possess leading to many studies focusing on the relationship between the micro and

nanostructure of the films and their physical properties. The objective of the present review is to show the techniques that are available to study the structure and interactions among the components of the matrix of the films and their effect on mechanical and barrier properties of the developed films and coatings.

Key words: Edible films, spectroscopy, microcopy, x-ray diffraction

Introducción.

Los biopolímeros como alternativas verdes y renovables recientemente se han utilizado para producir películas comestibles (PC) que se aplican en la industria de alimentos; una película comestible se define como una matriz preformada moldeada en láminas sólidas para posteriormente ser aplicada como envoltura en los alimentos (Falguera et al., 2011). Por otro lado, los recubrimientos comestibles se definen como una capa delgada de materiales comestibles aplicado como una dispersión líquida y se secan sobre la superficie de un alimento (Pérez-Gallardo et al., 2012). Las películas y recubrimientos comestibles permiten extender la vida útil de los alimentos y controlar el paso de algunos componentes entre los alimentos y su entorno como el agua, el oxígeno y los aromas, entre otros (Sánchez-Ortega et al., 2016; Salama, et al., 2018).

Se ha propuesto el uso de agentes antimicrobianos o nutraceuticos para obtener empaques activos (Arredondo-Ochoa et al., 2017a), así como el uso de cera de abeja para mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua (Arredondo-Ochoa, 2017b). Películas comestibles nanoestructuradas con

nanopartículas de sílice mesoporoso o sus derivados amino-funcionalizados, usando proteína de origen vegetal entrecruzada con transglutaminasa microbiana mejoraron sus propiedades mecánicas, aumentando a su vez las propiedades de barrera a gases y vapor de agua debido a una estructura más compacta y homogénea (Fernandez-Bats et al., 2018). La funcionalidad de las películas comestibles depende principalmente de su humectabilidad y propiedades de barrera y mecánicas; que a su vez dependen de la composición de la película, su proceso de formación y el método de aplicación en el producto. Por lo anterior, un gran número de investigaciones se ha dedicado a evaluar los efectos de diferentes factores en la permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono, así como en las propiedades mecánicas de las películas (Cerqueira et al., 2011). Actualmente diversos trabajos se han enfocado en el efecto que tienen la micro y nano estructura de las películas, así como las interacciones químicas de los componentes de la matriz de la película en las propiedades físicas de las mismas.

Para lo anterior se han utilizado técnicas modernas para la caracterización de las películas tales como microscopías

electrónica de barrido (SEM), de fuerza atómica (AFM), electrónica de transmisión (MET), así como espectroscopías Raman e infrarrojo (IR) y caracterización estructural mediante difracción de rayos X. En el presente trabajo se presentan las diferentes técnicas de microscopía y espectroscopía utilizadas en la caracterización de películas comestibles.

1. Parámetros de calidad de películas comestibles

1.1 Permeabilidad a vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es uno de los factores más importantes en la caracterización de PC, ya que de esta depende en gran medida conservar las propiedades de los alimentos, una PC tiene entre sus objetivos evitar o reducir al mínimo la transferencia de humedad entre el alimento y la atmósfera circundante. Por lo tanto, la PVA debe ser tan baja como sea posible con el fin de optimizar el entorno de los alimentos y potencialmente aumentar su vida útil. La transferencia de agua a través de la película (PVA) se produce en tres etapas: primero, el vapor de agua se condensa y se deposita en el lado de alta concentración de agua de la superficie de la película; segundo, las moléculas de agua se mueven a través de la película, impulsado por un gradiente de concentración o actividad; y tercero, el agua se evapora desde el otro lado de la película. Por lo tanto, los factores que describen el proceso de permeabilidad

incluyen la afinidad entre el agua y el material de película (adsorción / desorción) y la resistencia del movimiento del agua en la matriz polimérica tridimensional, expresada como difusividad efectiva y la humedad relativa del ambiente (Bilbao-Sáinz, 2010).

En el Cuadro 1 se presenta valores de permeabilidad de vapor de agua de algunos recubrimientos comestibles.

1.2 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas usualmente evaluadas para caracterizar las PC son la resistencia a la tensión, que es la fuerza requerida para romper la película por estiramiento; elongación que implica el grado al cual la película puede estirarse antes de romperse; módulo de Young que mide la rigidez y la compresibilidad de un material estructural (Porta et al., 2016). Estas propiedades dependen en gran medida de sus propiedades a nanoescala, por lo cual en las últimas décadas se desarrollaron nuevas técnicas de caracterización con resolución espacial submicrónica. Entre éstas se encuentran una gran variedad de herramientas para probar las propiedades elásticas y viscoelásticas locales de los materiales, tales como la nanoindentación y AFM (Zlotnikov et al., 2017). En el Cuadro 2, se muestran algunas de las propiedades mecánicas de películas comestibles.

Artículos

Cuadro 1. Permeabilidad de vapor de agua de películas comestibles

Material de empaque	PVAx10 ⁸ (g m ⁻¹ h ⁻¹ Pa ⁻¹)	Referencia
Mucílago de <i>Opuntia ficus-indica</i>	0.93	Gheribi et al., (2018)
Proteína de ajonjolí (3%)	3.35	Sharma & Singh (2016)
Goma de Cassia	26.64	Cao et al. (2018)
Gelatina de piel de pollo	0.02	Soo & Sarbon (2018)
Colágeno hidrolizado-mantequilla de cacao	0.32	Fadini et al. (2013)
Quitosano	1.67	Mohammadi et al. (2018)
Quitosano-Gelatina membrana de cáscara de huevo	2.06	Mohammadi et al. (2018)
Mucílago de semilla de <i>Dracocephalum moldavica</i>	0.47	Beigomi et al. (2018)

Cuadro 2. Propiedades mecánicas de películas comestibles

Material de empaque	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación a la ruptura (%)	Referencia
Mucílago de <i>Opuntia ficus-indica</i>	0.95	14.99	Gheribi et al. (2018)
Proteína de ajonjolí (3%)	0.98	-----	Sharma & Singh (2016)
Goma de Cassia	12.69	7.90	Cao et al. (2018)
Gelatina de piel de pollo	1.54	48.33	Soo & Sarbon (2018)
Colágeno hidrolizado-mantequilla de cacao	2.17	22.08	Fadini et al. (2013)
Quitosano	18.25	39.82	Mohammadi et al. (2018)
Quitosano-gelatina membrana de cáscara de huevo	20.77	25.92	Mohammadi et al. (2018)
Mucílago de semilla de <i>Dracocephalum moldavica</i>	22.72	18.53	Beigomi et al. (2018)

1. Métodos de caracterización de películas comestibles

2.1 Microscopía electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (MET) consiste en la irradiación de un espécimen delgado empleando un haz de electrones con una densidad de corriente uniforme. Después de irradiar la muestra, la distribución de la intensidad de electrones detrás de la muestra se proyecta con un sistema compuesto por tres a ocho lentes, sobre una pantalla fluorescente, lo cual permite generar una imagen. La imagen puede ser grabada por la exposición directa de una emulsión fotográfica, mediante la exposición de la imagen en una placa al vacío, o digitalmente a través de una pantalla fluorescente acoplada a una placa de fibra óptica mediante una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) (Reimer, 2013). La dispersión inelástica de electrones rápidos incidentes ocurre como resultado de interacciones con electrones atómicos en la muestra. Estas interacciones incluyen la excitación de oscilaciones colectivas tales como cuantos de oscilación del plasma (plasmones) o cuantizaciones de ondas electromagnéticas y mecánicas (fonones), así como la promoción de un electrón atómico de un estado electrónico ocupado a uno desocupado (Goode et al., 2017). TEM es una técnica que permite determinar morfología, estructura (por difracción de electrones de un área seleccionada, SAED), imagen por celdas mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), y composición química por fluorescencia de

rayos X mediante energía dispersiva (EDXRF); esta información se puede obtener en partículas individuales, dominios de un área seleccionada o agregados, dependiendo de la naturaleza del material estudiado y el objetivo de la investigación (Elsass, 2006).

Debido a que el MET requiere secciones fijas muy delgadas (alrededor de 50 nm), solo una pequeña parte de las muestras puede observarse en cualquier sección. La generación de la imagen depende de dispersiones diferenciales de los electrones incidentes a través de las moléculas de la preparación. Sin tinción, el haz de electrones pasa uniformemente a través de una muestra, y así, toda la muestra parece brillante con poca diferenciación de los componentes. Por lo general, para obtener imágenes válidas para el MET los cortes se tiñen con metales pesados, como el oro o el osmio. Las áreas teñidas con metal aparecen oscuras en una microfotografía porque los metales dispersan (difractan) la mayor parte de los electrones incidentes; los electrones dispersados no son enfocados por las lentes electromagnéticas y no contribuyen a la imagen. Es posible detectar proteínas de forma específica utilizando partículas de oro, que se vuelven densas al recubrir las proteínas (Lodish, 2005).

Zhang-Hui et al. (2017), utilizaron MET para evaluar el efecto de la dispersión de

montmorillonitas modificadas orgánicamente en nanocompuestos de almidón, las imágenes obtenidas revelaron la presencia de estructuras intercaladas, exfoliadas y mixtas formadas entre almidón y las montmorillonitas. Estos resultados proporcionan detalles sobre los cambios en las propiedades mecánicas y de barrera de las películas la cuales presentaron una mayor resistencia y mejor propiedad de barrera al vapor de agua.

2.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM), es una técnica que permite generar imágenes de una superficie con alta resolución y una apariencia tridimensional dentro de un intervalo amplio de aumentos, lo cual facilita el estudio topográfico y la realización de microanálisis para determinar la presencia cualitativa y/o cuantitativa de elementos en detalles microscópicos. Para la construcción de imágenes se aprovecha la emisión de electrones (secundarios) de una muestra, cuando sobre ella incide un haz enfocado de electrones de alta energía. Los electrones emitidos por la interacción del haz incidente y la muestra son colectados por los correspondientes detectores para producir una señal eléctrica, la cual produce la imagen de la muestra en la pantalla de un tubo de rayos catódicos (Hernández & Espejo, 2002).

La microestructura de películas comestibles se puede evaluar por medio de

SEM; Antoniou et al. (2015), produjeron películas a partir de goma de tara adicionadas con nanopartículas de quitosano a varias concentraciones. Se observó que la incorporación de las nanopartículas de quitosano permitió crear una estructura más homogénea, así como mejorar las propiedades mecánicas, físicoquímicas y de barrera de las películas de goma de tara.

Acevedo et al. (2015), evaluaron las propiedades de películas de alginato de sodio adicionadas con nanoemulsiones de aceites esenciales de tomillo, citronela o salvia utilizando SEM. Al analizar la microestructura de la superficie de las películas se observó que la presencia de aceites esenciales incrementaba la rugosidad de las superficies de las películas de alginato, pero el grado de rugosidad y la forma de las protuberancias variaron dependiendo el aceite esencial añadido, observándose que con pequeñas gotas de la nanoemulsión de tomillo y salvia se visualizó una superficie más lisa, lo cual confirió una mayor estabilidad a la película.

Gutiérrez (2017), estudió los efectos en la morfología de películas comestibles a base de almidón, al añadir pulpa de zarzamora. Todas las superficies de las películas fueron no porosas, pero aquellas sin la pulpa de zarzamora presentaron algunas partículas granulares. Microestructuras más compactas y cerradas se observaron en las películas con pulpa de zarzamora, estas

características fueron resultado de una menor absorción de agua y una disminución de las interacciones entre el almidón y glicerol, lo cual reduce el carácter polar de estos compuestos; por lo que se concluyó que la pulpa de zarzamora produce un decremento en el carácter hidrofílico de las películas, lo que se pudo relacionar con su bajo grado de digestibilidad.

El quitosano es un material prometedor utilizado en la elaboración de películas comestibles. Homez et al. (2018), evaluaron las propiedades morfológicas de las superficies de este tipo de películas, utilizando diferentes temperaturas de secado. Mediante un microscopio electrónico de barrido, la morfología de las películas reflejó el nivel de interacción entre sus componentes, por lo que su microestructura puede estar asociada con las propiedades ópticas, mecánicas y de barrera. Con un aumento de 200X todas las películas de quitosano presentaron una estructura limpia, lisa y uniforme, aunque con algunas partículas sólidas en la superficie. Al aumentar a 20,000X las películas secadas a 2 °C se observaron con poros profundos. Sin embargo, las películas secadas a 25 °C presentaron una estructura homogénea, sugiriendo la presencia de una matriz cohesiva que se debe a las interacciones entre el quitosano y el glicerol. Las películas secadas a 40 °C mostraron grietas e irregularidades en su superficie, debido a la

falta de glicerol en la matriz y a la interacción quitosano-quitosano en la estructura.

Películas comestibles a base de nanofibrillas de proteína de suero de leche, adicionadas con plastificantes como el glicerol y la trehalosa, fueron estudiadas por Feng et al. (2018). La superficie de las películas de aislado de proteína de suero de leche adicionadas con glicerol resultaron rugosas (promedio de rugosidad de 191 nm), densas y quebradizas en apariencia, con algunas partículas distribuidas uniformemente. Las películas de nanofibrillas de proteína de suero de leche presentaron una superficie lisa (promedio de rugosidad de 72.3 nm) y continua, además de un interior homogéneo y compacto, sin la presencia de poros. La película de nanofibrillas de suero de leche adicionada con glicerol y trehalosa fue la que presentó la superficie más suave (promedio de rugosidad de 27.8 nm) y homogénea, lo cual sugiere que en presencia de trehalosa, la microestructura de las películas es más fina.

2.3 Microscopía de Fuerza Atómica

En 1986 se desarrolló un nuevo tipo de microscopía que permite el análisis de superficies por medio de un barrido mecánico. Debido a que esta microscopía utiliza fuerzas atómicas, se le denominó microscopía de fuerza atómica (AFM) (Uchihashi et al., 2015). La AFM recolecta información de imágenes más que por visualización, por sensación, a través de tres modos de operación: contacto,

no contacto y contacto intermitente, que pueden ser utilizados para el análisis de diferentes tipos de materiales. Las imágenes de AFM son obtenidas a través de la medición de los cambios de magnitud de la interacción entre la sonda y la superficie de la muestra (comúnmente fuerzas de van der Waal's) (Yang et al., 2007). En el área de los alimentos, la AFM es una técnica muy útil que provee información cualitativa y cuantitativa a nanoescala para el análisis de la morfología de la superficie de películas comestibles (Zou, 2018). En el Cuadro 3 se presentan algunas de las aplicaciones de la AFM en el área de alimentos.

La AFM se ha utilizado en la caracterización de PC, como en el estudio de Rindlav-Westling & Gatenholm (2003), quienes examinaron superficies de películas de almidón mediante el modo de operación de contacto intermitente con punta de silicón; para ello se utilizaron distintas amplitudes medias cuadráticas y puntos fijos y se evaluaron los parámetros de rugosidad de las superficies como el promedio de los valores de elevación de la superficie relativos al centro plano. Este análisis mostró que las partes externas de estas superficies estaban cubiertas con pequeñas protuberancias de 15-35 nm de ancho y 1-4 nm de altura.

Thiré et al. (2003), observaron mediante AFM la morfología de películas de almidón de maíz con y sin glicerol, utilizado

como plastificante. El escrutinio se realizó con una frecuencia libre de oscilación de la viga voladiza (cantilever) y a diferentes amplitudes; dependiendo la estabilidad y contrastes obtenidos, se presentaron como imágenes de fase. Dichas imágenes de la topografía de las películas plastificadas y no plastificadas revelaron diferencias entre ambas en cuanto a morfología (dominios lisos y ásperos), asociadas con el efecto de retraso del glicerol en el proceso de gelatinización.

George & Siddaramaiah (2012), caracterizaron películas comestibles a base de nanocristales de celulosa bacteriana analizando su morfología, los resultados obtenidos de este estudio sugieren que la incorporación de nanocristales de celulosa bacteriana refuerzan la matriz de la película comestible, al formar redes que mejoran sus propiedades mecánicas.

Para la caracterización de películas comestibles a base de pectina y nanocristales de celulosa Chaichi et al. (2017) estudiaron las dimensiones de estos nanocristales y la morfología de la superficie de la película. El AFM se operó con el modo de no contacto utilizando una punta de silicón, las imágenes de AFM obtenidas confirmaron que los nanocristales de celulosa tenían escala nanométrica con un diámetro y longitud de 1.43 nm y 1500 nm, respectivamente. Estas imágenes también revelaron una buena dispersión de los nanocristales en la matriz de

pectina y una correcta interacción, lo cual favorece las propiedades mecánicas.

Cuadro 3. Aplicaciones de microscopía de fuerza atómica en el área de alimentos

Aplicación	Descripción	Referencia
Escaneo cualitativo	AFM se usa para el análisis cualitativo de la estructura de macromoléculas de importancia alimentaria, principalmente para el estudio de las asociaciones intermoleculares de y formación de redes de proteínas y carbohidratos.	Morris (1997)
Análisis estructural cuantitativo	Encontrar parámetros característicos de las imágenes resultantes de AFM relacionadas con las propiedades de los alimentos y sus cambios durante el procesado y almacenamiento	Deleu (2001)
Interacciones moleculares	AFM permite investigar los procesos y mecanismos de estas interacciones; por ejemplo, en entender las interacciones entre las proteínas y los surfactantes en una película comestible	Woodward (2004)
Manipulación macromolecular de alimentos	AFM permite observar directamente las reacciones entre macromoléculas	Yang et al. (2006)
Topología de superficies	propiedades físicas sutiles (rugosidad, homogeneidad, morfología, análisis fractal) de las superficies de los alimentos son caracterizadas por AFM	Lent et al. (1998)
Herramientas para nano ingredientes para alimentos	AFM es una útil técnica para la optimización en la producción de nano ingredientes para alimentos	Yang et al. (2007)

Películas a base de un concentrado proteico de yero (*Vicia ervilia*) entrecruzadas con transglutaminasa y nanoestructuradas con nanopartículas de sílice mesoporoso o sus derivados amino-funcionalizados, fueron

evaluadas morfológicamente mediante AFM en modo de contacto con puntas de baja frecuencia resonante. Las películas mostraron una menor rugosidad (31.65 nm) que las que no contenían nanopartículas (61.42 nm), lo

cual se atribuyó a una mayor homogeneidad de las películas debido a la inclusión de las nanopartículas en la red de la proteína de yero produciendo una superficie más lisa en las matrices obtenidas (Fernandez-Bats et al., 2018).

2.4 Microscopía confocal

La microscopía confocal láser de barrido (CLSM) es una técnica que permite incrementar el contraste en las imágenes microscópicas de muestras (Webb, 1996). Esta microscopía se desarrolló a finales de la década de los 80's presentando como gran ventaja su habilidad de capturar imágenes digitales en tres dimensiones de muestras marcadas con fluorocromos que antes sólo podían ser observadas con un microscopio de epifluorescencia. La CLSM produce imágenes más precisas (secciones ópticas) al hacer un escrutinio de la muestra punto por punto con un rayo láser direccionado hacia ella y utilizando un filtro espacial para remover la fluorescencia no deseada por arriba o por debajo del plano focal. Los microscopios confocales están diseñados para que cuando el rayo láser incida sobre la muestra, ésta sea confocal con el punto de luz enfocado hacia la rendija frente al fotodetector, por lo que sólo la información del plano focal alcanza al fotodetector. El poder de esta técnica se encuentra en su habilidad de realizar escrutinios de estructuras a niveles discretos manteniendo intacta la muestra, con una resolución lateral de 0.14 μm y resolución vertical de 0.23 μm , con apertura numérica del lente de 1.4 (Paddock, 1999).

La CLSM es una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de películas comestibles. Jin et al. (2009), desarrollaron una película comestible a base de pectina, ácido poliláctico y nisina para inhibir a *Listeria monocytogenes*. Las películas de ácido poliláctico presentaron superficies lisas y continuas, mientras que aquellas elaboradas con este ácido y pectina mostraron una morfología rugosa con una capa irregular de 20-30 μm de grosor sobre la superficie; estas características sugieren que la pectina favorece el acceso y absorción de la nisina.

Bourbon et al. (2011), caracterizaron películas comestibles a base de quitosano adicionadas con compuestos bioactivos consistentes en la fracción peptídica de un hidrolizado de proteína de suero de leche, glucomacropéptido y lactoferrina. Las imágenes obtenidas permitieron concluir que el glucomacropéptido y la lactoferrina se distribuyeron homogéneamente en las películas de quitosano, mientras que la fracción peptídica de proteína de suero de leche no presentó esta distribución uniforme.

Ma et al. (2012), prepararon películas a base de gelatina y aceite de oliva por medio de la técnica de emulsiones con microfluidos. Las muestras fueron teñidas con colorante fluorescente azul de nilo A. Se observó que el tamaño de gota de los lípidos presentó un incremento a bajas concentraciones de aceite, pero al aumentarlas el tamaño de gota de los lípidos disminuyó. Esto indicó que la

microestructura de las películas está relacionada con la estabilidad de los lípidos, los cuales, si forman grandes aglomeraciones, pueden debilitar las propiedades estructurales de las películas comestibles.

La elaboración de películas comestibles a partir de la técnica de extrusión de película soplada permite una mayor productividad en menor tiempo comparada con las técnicas convencionales. Dang & Yoksan (2018), produjeron una película comestible a base de almidón y quitosano. Las micrografías mostraron que la superficie de las películas de almidón eran lisas con un color neutro, mientras que con quitosano estas superficies se volvieron rugosas, confirmando su deposición en la parte exterior de las superficies de las películas, lo cual mejora sus propiedades de barrera a los gases y al vapor de agua y reduce su sensibilidad a la humedad.

Montes de Oca et al. (2018) examinaron la relación entre la estructura y las propiedades físicas de películas elaboradas a partir de emulsiones, nanoemulsiones o sus geles de caseinato de sodio, glicerol, glucono-delta-lactona y óxido de titanio. Las películas de caseinato de sodio formaron conglomerados de gotas de aceite, lo que indicó que éste no se distribuyó homogéneamente en la matriz; las películas de geles de emulsiones fueron más homogéneas, ya que las gotas aparecieron mejor distribuidas y menos agregadas. Las películas de nanoemulsiones mostraron

pequeñas gotas, ya que debido a sus dimensiones no formaron conglomerados, mientras que las películas de geles de nanoemulsiones fueron altamente homogéneas. Al adicionar óxido de titanio, en todos los casos, la homogeneidad aumentó, lo que mejora las propiedades elásticas y mecánicas de las películas.

2.4 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una herramienta valiosa para la caracterización cualitativa y cuantitativa de polímeros, esta técnica brinda información acerca de interacciones entre grupos funcionales, orientación de cadena, cambios estructurales en el tratamiento y modificación química de los biopolímeros, así como propiedades interfaciales de los compuestos (Goh et al., 2017).

La espectroscopía Raman es una técnica de dispersión, la cual se basa en medir la diferencia entre la frecuencia de radiación dispersa y la monocromática incidente (efecto Raman). En esta técnica la muestra se ilumina con un rayo láser monocromático que interactúa con las moléculas de la muestra y origina una luz dispersa. La luz dispersa que tiene una frecuencia diferente de la de la luz incidente (dispersión inelástica) se usa para construir un espectro Raman (Bumrah & Sharma, 2016). Durante este proceso, la energía se transfiere entre los fotones incidentes y las moléculas de muestra, en donde la cantidad de energía corresponde a vibraciones de moléculas específicas. El

hecho de que el espectro Raman muestre la composición molecular de la muestra investigada con especificidad única hace que esta técnica espectroscópica sea muy atractiva para varios analitos (Pahlow et al., 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación de las películas y recubrimientos comestibles depende de sus propiedades mecánicas y de barrera, las cuales de acuerdo a lo reportado por varios estudios dependen de las interacciones presentes entre los compuestos que los conforman. Escamilla-García et al. (2013), evaluaron el efecto de las interacciones presentes en una película elaborada a base de zeína y quitosano mediante espectroscopía Raman, demostrando que la presencia de zeína en las películas daba como resultado asociaciones entre ésta y el quitosano. Se identificaron reacciones entre la glutamina de la zeína con los grupos hidroxilo del quitosano, se formaron grupos O=S=O y C-O-S, además la reacción de los grupos funcionales ϵ -amino de la lisina cambiaron la estructura de la película comestible, dichas interacciones promovieron la formación de estructuras de película más rugosas, más elásticas y menos duras con mejores propiedades de barrera al vapor de agua así como sus propiedades mecánicas y de barrera.

Esta técnica se ha utilizado para demostrar la conservación del ácido fólico en películas de alginato-quitosano, la cual

demonstró una distribución homogénea de la vitamina en la matriz de alginato-quitosano, permitiendo proteger el ácido fólico de la degradación por la irradiación UV, además mostró una liberación controlada mediante cambios de pH. Estos resultados demostraron que las películas comestibles podrían proponerse como candidatos prometedores para la entrega de nutraceuticos con posibles aplicaciones como recubrimientos comestibles activos en el sector alimentario (Acevedo-Fani et al., 2018).

2.5 Difracción de rayos X

Técnicas como difracción de rayos X (XRD), utilizan la intensidad dispersada de un haz de rayos X sobre la muestra, revelando información sobre la estructura cristalográfica, la composición química y las propiedades físicas del material estudiado (Espitia et al., 2014). Esta técnica se basa en el hecho de que la longitud de onda de los rayos X es comparable a las distancias entre los átomos en la materia condensada. Cuando un material que exhibe un orden atómico periódico de largo alcance como un cristal, se irradia con rayos X, actúa como una rejilla extendida y bien definida y produce un patrón de difracción que muestra numerosos puntos agudos, llamados picos de difracción de Bragg. Al medir y analizar las posiciones e intensidades de estos picos, es posible determinar las características espaciales de la rejilla, es decir, determinar la disposición tridimensional de los átomos en el material cristalino que se estudia (Petkov, 2008)

Liang et al., 2017 estudiaron el efecto de la incorporación de galato de epigallocatequina (EGCG) nanoencapsulado en películas de hidrocloreto de quitosano (HQ)-zeína (Z), dicha incorporación dio como resultado interacciones entre EGCG con HQ durante la formación de la película que promovió la formación de estructuras de la película más rugosas, más elásticas y más duras con buenas propiedades ópticas. La adición de EGCG cambió la estructura cristalina del quitosano, destruyendo los enlaces de hidrógeno intermoleculares originales del quitosano y posteriormente las moléculas de quitosano y zeína se entrelazaron para formar una estructura compleja más estable, dando como resultado una disminución en la cristalinidad.

Esta técnica se ha utilizado para explicar el efecto de las interacciones sinérgicas de diferentes combinaciones de xantano (XG) y goma de algarrobo (LBG) en la preparación de PC. La difracción de rayos x permitió caracterizar la miscibilidad de los polisacáridos, ya que si los polímeros mezclados tienen baja compatibilidad cada polímero exhibiría su propia región de cristal, en el caso de la mezcla XG-LBG se presentó un pico ancho a $2\theta = 20^\circ$ indicando que la película está en la fase amorfa, y una excelente miscibilidad de los polisacáridos (Kurt et al., 2017)

Como alternativa a muchos empaques de alimentos que están hechos de productos derivador se la industria

petroquímica y que no son biodegradables, se desarrolló una película compuesta de gelatina de piel de pollo adicionada con harina de arroz; dichas películas mostraron una estructura amorfa y al adicionar la harina de arroz aumentó su grado de cristalinidad. Las redes fuertes formadas entre los dominios aniónicos de los polisacáridos y los dominios catiónicos de la gelatina pueden producir una región semicristalina, Las concentraciones variables de harina de arroz influyeron en las propiedades físicas y mecánicas de las películas de gelatina, mejorando la permeabilidad al vapor de agua (Soo & Sarbon, 2018).

Conclusiones

La aplicación de las películas comestibles depende principalmente de las propiedades mecánicas y de barrera a vapor de agua, ya que de esto depende la integridad de los alimentos durante su almacenamiento y transporte. Dichas propiedades dependen directamente de la estructura, el tipo de compuestos utilizados y las interacciones de los compuestos que integran la matriz de la película comestibles, por lo que técnicas de espectroscopía y microscopía de alta resolución han resultado ser herramientas eficientes para el estudio del efecto de los diferentes componentes y condiciones de elaboración de las películas comestibles, ya que han permitido establecer los tipos de enlaces, grado de cristalinidad y cambios estructurales que se presentan durante la elaboración de las películas. Actualmente se tiene la tendencia a reforzar la estructura y

homogeneidad de las películas mediante la nanoestructuración de las películas usando nanopartículas de diferentes materiales, así como la inserción de compuestos bioactivos de manera que puedan ser liberados de manera controlada.

Referencias

- Acevedo A, Salvia L, Rojas MA & Martín O (2015) Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloid*. 47: 168-177.
- Acevedo-Fani A, Soliva-Fortuny R & Martín-Belloso O (2018) Photo-protection and controlled release of folic acid using edible alginate/chitosan nanolaminates. *Food Structure Design: Innovation in Food Structure-Properties Relationships*. 229, 72-82.
- Antoniou J, Liu F, Majeed H & Zhong F (2015) Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: a comparative study. *Food Hydrocolloid*. 44: 309-319.
- Arredondo-Ochoa T, García Almendárez BE, Amaro Reyes A, Rivera Pastrana DM, Gutiérrez-López GF, Martín-Belloso O, & Regalado-González C (2017a) Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food Bioprocess Tech* 10:103-114.
- Arredondo-Ochoa T, García-Almendárez BE, Escamilla-García M, Martín-Belloso O, Rossi-Márquez G, Medina-Torres L & Regalado-González C (2017b). Physicochemical and antimicrobial characterization of beeswax–starch food-grade nanoemulsions incorporating natural antimicrobials. *Int. J. Mol. Sci*. 18: 2712
- Beigomi M., Mohsenzadeh M., & Salari A (2018) Characterization of a novel biodegradable edible film obtained from *Dracocephalum moldavica* seed mucilage. *Int. J. Biol. Macromol*. 108:874-883.
- Bilbao-Sáinz C, Avena-Bustillos RJ, Wood DF, Williams TG & McHugh TH (2010) Composite edible films based on hydroxypropyl methylcellulose reinforced with microcrystalline cellulose nanoparticles. *J. Agric. Food Chem*. 58:3753-3760.
- Bourbon A, Pinheiro A, Cerqueira M, Rocha C, Avides M, Quintas M & Vicente A (2011) Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *J. Food Eng*. 106:111-118.
- Bumrah GS & Sharma RM (2016) Raman spectroscopy– Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egypt J. Forensic Sci*. 6:209-215.
- Cao L, Liu W & Wang L (2018) Developing a green and edible film from cassia gum:

- The effects of glycerol and sorbitol. *J. Clean Prod.* 175, 276-282.
- Cerqueira, MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Souza BW, Teixeira JA & Vicente AA (2011) Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Int. J. Food Sci. Japan.* 22:662-671.
- Chaichi M, Hashemi M, Badii F & Mohammadi A (2017) Preparation and characterization of a novel bionanocomposite edible film based on pectin and crystalline nanocellulose. *Carbohydr Polym.* 157:167-175.
- Dang KM & Yoksan R (2018) Morphological characteristics and barrier properties of thermoplastic starch/chitosan blown film. *Carbohydr Polym.* 150:40-47.
- Deleu M, Nott K, Basseur R, Jacques P, Thonart P & Dufrêne Y (2001) Imaging mixed lipid monolayers by dynamic atomic force microscopy. *BBA-Biomembranes.* 1513:55-62.
- Di Pierro P, Mariniello L, Giosafatto CVL, Masi P & Porta R (2005) Solubility and permeability properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Food Biotech.* 19 (1): 37-49
- Elsass, F (2006) Transmission Electron Microscopy. In: *Developments in Clay Science* En Bergaya F, Theng BKG, & Lagaly G. (Eds.), New York. pp 939-963.
- Escamilla M, Calderón-Domínguez G, Chanona-Pérez JJ, Farrera-Rebollo RR, Andraca-Adame J, Arzate-Vázquez I, Mendez-Mendez JV & Moreno- Ruíz LA (2013) Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. *Int J Biol Macromol.* 61:196-203.
- Espitia PJP, Du WX, Avena-Bustillos R, Soares NFF & McHugh TH (2014) Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties- A review. *Food Hydrocolloid.* 35:287-296.
- Fadini AL, Rocha FS, Alvim ID, Sadahira MS, Queiroz MB, Alves RMV & Silva LB (2013) Mechanical properties and water vapour permeability of hydrolysed collagen-cocoa butter edible films plasticised with sucrose. *Food Hydrocolloid.* 30:625-631.
- Falguera V, Quintero JP, Jiménez A, Muñoz JA & Ibarz A (2011) Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends Food Sci. Technol.* 22:292-303.
- Feng Z, Wu G, Liu C, Li D, Jiang B & Zhang X (2018) Edible coating based on whey protein isolate nanofibrils for antioxidation and inhibition of product browning. *Food Hydrocolloid.* 79:179-188.
- Fernandez-Bats I, Di Pierro P, Villalonga-Santana R, García-Almendárez B & Porta R (2018) Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-

- crosslinked bitter vetch proteins. *Food Hydrocolloid*. 82:106-115.
- George J & Siddaramaiah (2012) High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. *Carbohydr Polym*. 87:2031–2037.
- Gheribi R, Puchot L, Verge P, Jaoued-Grayaa N, Mezni M, Habibi Y & Khwaldia K (2018) Development of plasticized edible films from *Opuntia ficus-indica* mucilage: A comparative study of various polyol plasticizers. *Carbohydr Polym*, 190:204-211.
- Goh PS, Ismail AF & Ng BC (2017) Raman Spectroscopy. En: Membrane Characterization. Elsevier, Nueva York. pp. 31-46.
- Goode AE, Porter AE, Kłosowski MM, Ryan MP, Heutz S & McComb DW (2017) Analytical transmission electron microscopy at organic interfaces. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci*. 21:55-67.
- Gutiérrez J (2017) Surface and nutraceutical properties of edible films made from starchy sources with and without added blackberry pulp. *Carbohydr Polym*. 165:169-179.
- Hernández H & Espejo E (2002) Mecánica de fractura y análisis de falla. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Homez A, Daza LD, Aguirre DM, Aldemar J, Solanilla JF & Váquiro H (2018) Characterization of chitosan edible films obtained with various polymer concentrations and drying temperatures. *Int. J. Biol. Macromol*. 113:1233-1240.
- Jin T, Liu L, Zhang H & Hicks K (2009) Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Sci*. 44: 322-329.
- Kurt A, Toker OS & Tornuk F (2017) Effect of xanthan and locust bean gum synergistic interaction on characteristics of biodegradable edible film. *Int. J. Biol. Macromol*. 102:1035-1044.
- Lent LE, Vanasupa LS & Tong PS (1998) Whey protein edible film structures determined by atomic force microscope. *J. Food Sci*. 63:824-827.
- Liang J, Yan H, Zhang J, Dai W, Gao X, Zhou Y & Puligundla P (2017). Preparation and characterization of antioxidant edible chitosan films incorporated with epigallocatechin gallate nanocapsules. *Carbohydr. Polym*. 171:300-306.
- Lodish, H. (2005). Biología celular y molecular. Argentina: Médica panamericana
- Ma W, Tang C, Yin S, Yang X, Wang Q, Liu F & Wei Z (2012) Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. *Food Res. Int*. 49:572-579.
- Mohammadi R, Mohammadifar MA, Rouhi M, Kariminejad M, Mortazavian AM, Sadeghi E & Hasanvand S (2018) Physico-mechanical and structural properties of eggshell membrane

- gelatin- chitosan blend edible films. *Int. J. Biol. Macromol.* 107:406-412.
- Montes de Oca JM, Altamura D, Candal RJ, Scattarella F, Siliqi D, Giannini C & Herrera ML (2018) Relationship between nano/micro structure and physical properties of TiO₂-sodium caseinate composite films. *Food Res. Int.* 105:129-139.
- Morris VJ, Gunning AP, Kirby AR, Round A, Waldron RK & Ng A (1997) Atomic force microscopy of plant cell walls, plant cell wall polysaccharides and gels. *Intl J Biol Macromol.* 21:61–6
- Uchihashi T, Kodera N & Ando T (2015) High-Speed Atomic Force Microscopy. En: *Noncontact Atomic Force Microscopy*, Vol. 3. Morita S, Giessibl FJ, Meyer E & Wiesendanger R (eds). Springer, Switzerland. pp 481-514.
- Paddock S (1999) Confocal Laser Scanning Microscopy. *BioTechniques.* 27:992-1004.
- Pahlow S, Meisel S, Cialla-May D, Weber K, Rösch P & Popp J (2015) Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Adv Drug Deliv. Rev.* 15:105-120
- Pérez-Gallardo A, Mattinson SD, Lazcano-Peralta A, Fellman JK, García-Almendárez B, Barbosa-Cánovas G & Regalado C (2012) Effect of native and acetylated-crosslinked waxy corn starch-beeswax coatings on quality attributes of raspberries during storage. *Starch/Starke.* 64:665-673.
- Petkov, V. (2008). Nanostructure by high-energy X-ray diffraction. *Materials Today.* 11:28-38.
- Porta R, Di Pierro P, Sabbah M, Regalado-González C, Mariniello L, Kadivar M & Arabestani A (2016). Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. *Innov. Food Sci. Emerg.* 36:245-251.
- Quirós-Sauceda AE, Ayala-Zavala JF, Olivas GI & González-Aguilar GA (2014) Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: A review. *J Food Sci Technol*, 51:1674-1685.
- Reimer L & Kohl H (2013). Transmission electron microscopy. Physics of image formation and microanalysis. Springer-Verlag, New York, NY. pp 590.
- Rindlav-Westling A & Gatenholm P (2003) Surface composition and morphology of starch, amylose, and amylopectin films. *Biomacromolecules.* 4:166–72.
- Salama HE, Abdel-Aziz MS, & Sabaa MW (2018) Novel biodegradable and antibacterial edible films based on alginate and chitosan biguanidine hydrochloride. *Int. J. Biol. Macromol.* 116:443-450.
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B.E., Santos-López, E.M., Reyes-González, L.R. & Regalado, C. (2016). Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. *Food Hydrocolloid.* 52:906-913

Artículos

- Sharma L & Singh C (2016) Sesame protein based edible films: Development and characterization. *Food Hydrocolloid.* 61:139-147.
- Soo PY & Sarbon NM (2018) Preparation and characterization of edible chicken skin gelatin film incorporated with rice flour. *Food Pack. Shelf Life.* 15:1-8.
- Thiré RM, Simao RA & Andrade CT (2003) High resolution imaging of the microstructure of maize starch films. *Carbohydr Polym.* 54:149–58.
- Webb R (1996) Confocal optical microscopy. *Rep. Prog. Phys.* 59:427-471.
- Woodward NC, Wilde PJ, Mackie AR, Gunning AP, Gunning PA & Morris VJ (2004) Effect of processing on the displacement of whey proteins: applying the orogenic model to a real system. *J Agric Food Chem.* 52:1287–92.
- Yang H, Feng G, An H & Li Y (2006) Microstructure changes of sodium carbonate soluble pectin of peach by AFM during controlled atmosphere storage. *Food Chem.* 94:179–92.
- Yang H, Wang Y, Lai S, An H, Li Y & Chen F (2007) Application of atomic force microscopy as a nanotechnology tool in food science. *J. Food Sci.* 72:65-75.
- Zhang H, Zhang J, Gao Y, Wang W, Dong H, Hou H & Liu X (2017) Effect of modification extent of montmorillonite on the performance of starch nanocomposite films. *Starch-Stärke,* 69:1700088 (1-10).
- Zlotnikov I, Zolotoyabko E & Fratzl P (2017) Nano-scale modulus mapping of biological composite materials: Theory and practice. *Prog. Mater. Sci.,* 87:292-320.
- Zou G, Song X, Shen Z & Chen F (2018) Physical and structural characterization of edible bilayer films made with zein and corn-wheat starch. *J. Saudi Soc. Agr. Sci.* En prensa.