

PELÍCULAS DE QUITOSANO CON SORBATO DE POTASIO UNIDO FÍSICA Y COVALENTEMENTE. ESTUDIOS DE APLICACIÓN.

A.J. Avila¹, V. Costamagna², E. Barrientos¹, G. Pucci¹, E. Sánchez¹, M. C Strumia^{2*}

1) Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (U.N.P.S.J.B), 9000 Comodoro Rivadavia, Argentina. Correo electrónico: aavila@unpata.edu.ar

2) Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (U.N.C), 5000 Córdoba, Argentina.

Recibido: Junio de 2009; Aceptado: Noviembre de 2009

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos usando sorbato de potasio (SK), un efectivo antifúngico de uso alimentario, unido físico o covalentemente a matrices de quitosano (CH). La unión covalente del SK al CH se realizó a través de la formación de una unión amida con el grupo amino del CH y el carboxilato del SK. Se encontró que en mezclas físicas de CH con 5% de SK se logra inhibir el crecimiento de hongos durante 7 días, liberando hasta el 40% del SK incorporado originalmente en un lapso de tiempo de 8 horas. Mientras que en aquellos preparados en donde el SK está covalentemente unido al CH, se inhibe el crecimiento de hongos durante 15 días sin liberación del antifúngico.

Palabras claves: Quitosano, sorbato de potasio, películas antimicrobianas, antifúngicos, película comestible.

ABSTRACT

In this work we present the results obtained using potassium sorbate (SK), an effective antimycotic used in food as antimicrobial, bound physically or covalently to patterns of chitosan (CH). The covalent bound of the SK to CH was made by the formation of an amide linkage with the CH amino group and the carboxylate ion of SK. It was found that in physical mixtures of 5% of SK you can inhibit the growth of fungi for 7 days, releasing up to 40% of SK originally added within 8 hours. On the other hand, in those samples where SK is covalently bound to CH, the growth of the fungi is inhibited during 15 days without antimycotic release.

Key words: Chitosan, potassium sorbate, antimicrobial films, antimycotic, edible films

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos son elementos perecederos, por lo tanto existen numerosos factores que deterioran su calidad. Dichos factores pueden ser categorizados como causas físicas, químicas o biológicas. Es por esa razón, que el revestimiento que cubre un producto cumple funciones muy importantes, ya que previene el deterioro del alimento y extiende su tiempo de vida media. Esto implica actuar como una excelente barrera frente a la invasión de agentes físico-químicos y microbiológicos, otorgar protección a la humedad, olores, gases, luz, etc. Además de otras funciones como resistencia al impacto y fácil eliminación después de haber sido usado.

Además de las funciones clásicas a cumplir por un revestimiento, éste puede tener funciones adicionales por la incorporación de aditivos funcionales activos dentro del material usado para la fabricación del mismo. Los envases con agentes antimicrobianos resultan ser activos contra el crecimiento microbiano.

Las películas para envases derivadas de biopolímeros naturales son preparadas usando materiales biológicos como polisacáridos, proteínas y sus derivados. Estas películas son completamente biodegradables, derivan de materiales renovables, no deterioran nuestro medio ambiente después de ser utilizados y son una alternativa efectiva a los plásticos sintéticos [1,2].

La quitina es un polisacárido natural de alto peso molecular, fácilmente extraíble del exoesqueleto de crustáceos, cuyas unidades repetitivas son la D-glucosamina y la N-acetil-D-glucosamina. Es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Su derivado más importante es el quitosano (quitina desacetilada), material más manejable, el cual puede ser procesado para formar escamas, polvos, esferas, membranas, esponjas, películas y geles.

El quitosano posee una superficie altamente hidrófila debido a su alta energía superficial. Estas propiedades le confieren características peculiares que lo hacen útil en muchas aplicaciones en el campo de la salud, cosmética, en tratamientos de aguas y otros. Como el pKa de los grupos amino presentes en el biopolímero está entre 6,0 y 7,0, éstos se protonan en medios ácidos diluidos, formando un polielectrolito con cargas positivas (catiónico). Además, se sabe por estudios realizados previamente [3,4], que el quitosano posee buenas propiedades antimicrobianas y antifúngicas.

En los últimos años, en la búsqueda de mejores propiedades en la conservación de los alimentos, comenzó el desarrollo de sistemas en los cuales el conservante es incorporado en matrices poliméricas. Una de las vías más económica y conveniente para lograr dichas transformaciones es usar medios acuosos, no tóxicos y muy reactivos. La formación de uniones amidas a través de las carbodiimidas solubles en medio acuoso, que tienen un amplio uso como agentes de condensación, se presenta como una vía de síntesis adecuada para la incorporación de moléculas orgánicas sobre una matriz. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la preparación y caracterización de películas de quitosano usados como matriz polimérica, en las cuales se ha incorporado sorbato de potasio, física y covalentemente. Este conocido aditivo de propiedades antifúngicas es incorporado a la matriz con la intención de potenciar la capacidad antimicrobiana y antifúngica de la matriz de quitosano y de conocer cómo influye en dicha actividad, dos diferentes tipos de quitosanos (peso molecular medio y bajo).

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y equipos. Los materiales y fármacos utilizados fueron: sorbato de potasio (SK, *Merck*); quitosano (CH, *Aldrich*, monómero: $C_{12}H_{24}N_2O_9$, FW: 161): Peso molecular medio (MW), Peso molecular bajo (LW); solución de ácido acético AcOH 0,33 M (2% m/v); disolución

tampón de ácido adípico (AdH, pH = 5,78); membrana de diálisis (Sigma dialysis tubing 12 kDa), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, *Sigma*), metanol (*Merck*), medio de cultivo de hongos y levaduras (*Britania*), *Sacharomyce* sp (ATCC 9763). Todos los reactivos fueron usados sin previa purificación y son de grado analítico.

Los espectros de UV se realizaron en un espectrofotómetro *Shimadzu* UV 260 y *Hewlett Packard* HP 8452A con arreglo de diodo. Los espectros FTIR se midieron con un equipo *Nicolet 5 SXC FT-IR Spectrometer*.

2.2. Preparación de las películas.

2.2.1. CH (blancos). 30 mL de solución de quitosano (1% m/v) en ácido acético (AcOH 0,33 M) 2% m/v fue filtrada a través de un filtro de vidrio sinterizado para remover impurezas y colocada en un disco de *Petri*. Posteriormente se llevó a estufa a 60°C por 24 horas. Las películas obtenidas fueron mantenidas a temperatura ambiente (20°C, 30% HR) hasta su utilización.

2.2.2 Unión física de SK. Se prepararon muestras por incorporación de SK en matrices de CH MW y LW hasta obtener mezclas de 1, 5, 12,5 y 25% en masa de SK. Para ello, 0,3 g de CH se solubilizó en 30 mL de ácido acético (AcOH 0,33M), y a la solución se agregó posteriormente la cantidad de SK deseada, agitando durante cuatro horas más. Se toma una muestra de 30 mL de la mezcla y se procede de la misma manera que para la preparación de los blancos. Se obtuvieron las películas FSKLW1, FSKLW5, FSKLW12,5, FSKLW25 (películas de CH LW y SK), FSKMW1, FSKMW5, FSKMW12,5 y FSKMW25 (películas de CH MW y SK). En la Tabla 1 se dan detalles adicionales.

Tabla 1. Porcentaje masa de mezclas CH-SK usadas para preparar las películas.

% masa	SK (g)	CH (g)
1	0,003	0,3
5	0,015	0,3
12,5	0,0375	0,3
25	0,075	0,3

2.2.3 Unión covalente de SK. Se trabajó con los CH LW y MW. Se prepararon 10 mL de solución de CH en AcOH al 1% m/V, a esta solución se le agregan 8,5 mL de metanol. El SK se agregó en dos relaciones molares diferentes: 0,6 y 1,1 eq. SK/eq residuo glucosamino. Posteriormente, se agregaron 5 mL de una solución 0,064 M de EDC en metanol. En todos los casos la relación molar SK:EDC fue de 1:1.

La mezcla de reacción fue agitada durante 24 horas, luego se le agregó 20 mL de mezcla CH₃OH: NH₄OH (70:30 v/v) para precipitar. El precipitado obtenido fue filtrado y lavado con agua,

metanol y éter para eliminar los restos de SK que quedan sin unir a la matriz de quitosano; finalmente fue secado al vacío y dejado 24 horas a temperatura ambiente hasta su utilización. Los sólidos obtenidos fueron solubilizados en AcOH 0,33 M al 1% m/v y se procede de la misma manera explicada en el apartado 2.2.1. Las películas obtenidas se mantuvieron a 20°C, (30% HR) hasta su utilización. Se obtuvieron las películas: CSKLW0,6, CSKLW1,1, CSKMW0,6 y CSKMW1,1.

Para determinar la cantidad de SK incorporado a la matriz de quitosano se realizó un estudio gravimétrico de las muestras pesando las mismas antes y después de realizada la unión covalente del SK. El % SK incorporado se expresa como:

$$\% \text{ SK incorporado} = 100 \frac{\text{peso sólido con SK incorporado} - \text{peso CH}}{\text{peso CH}} \quad (1)$$

2.2. Caracterización de los productos.

2.3.1 Estudios de espectroscopia FT-IR.

Se mezcló 3 mg de muestra seca fue con 200 mg de KBr (grado IR) y usada para preparar discos. Los espectros de transmisión fueron tomados de 4.000 a 400 cm^{-1} , usando una resolución de 16 cm^{-1} y 32 scans.

2.3.2. Determinación de índice de hinchamiento en volumen de diferentes quitosanos (MW y LW) en agua y ácido adípico (AdH, pH 5,78). Se colocaron en tubos graduados y calibrados una cantidad de cada tipo de quitosano equivalente a 1 mL. Se colocó una cantidad de disolvente en exceso. Se mantuvo la muestra en agitación durante tres horas y en reposo durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se realizó una nueva lectura de volumen. El índice de hinchamiento fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{IH} = \frac{V_h - V_s}{V_s} \quad (2)$$

donde IH es el índice de hinchamiento, V_h el volumen ocupado por el quitosano hinchado y, V_s el volumen ocupado por el quitosano seco.

2.3.3 Estudios de liberación.

Pruebas de liberación de SK en las distintas películas (unión física). El equipo usado se muestra en la Figura 1. El mismo consiste en un tubo cilíndrico interno con una membrana de diálisis colocada en la parte inferior donde se deposita la muestra (0,3 g). Este sistema se coloca dentro de un vaso conteniendo 100 mL de solución tampón de AdH (pH 5,78). Se toman alícuotas de 3,0 mL del tampón a distintos intervalos de tiempo reponiendo el volumen extraído en cada caso

con agregado de buffer original. Las medidas de absorbancia de las alícuotas se realizaron a 254 nm con un espectrofotómetro UV/Vis con el objeto de detectar el SK liberado desde las matrices. Se realiza la experiencia con cada una de las películas obtenidas. La cantidad de SK liberada a tiempo t y el porcentaje de SK liberado se calcularon a partir de una curva de calibrado y representados en función del tiempo.

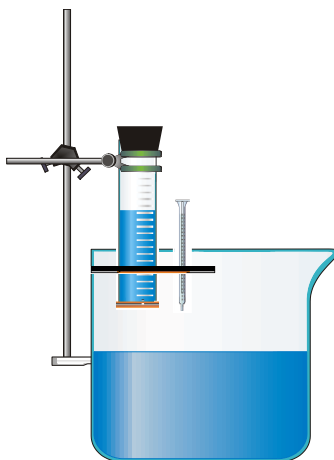


Figura 1. Esquema del equipo empleado.

2.3.4. Ensayos microbiológicos. Se realizaron experiencias de actividad antifúngica a películas de quitosano LW y MW con 5 y 10% de SK en masa (FSKMW5 y FSKMW10, FSKMW5, FSKMW10, mezclas físicas) y a películas de quitosano con SK unido covalentemente con 1,1 eq SK/eq residuo glucosamino (CSKMW1,1 y CSKMW1,1). El microorganismo usado fue *Sacharomyce* sp., el cual fue primero inoculado en un medio de cultivo de hongos y levaduras e incubado por 48 horas a 28°C. La suspensión del inóculo fue luego esparcida sobre cápsulas *Petri* conteniendo el medio de cultivo. Se cortaron discos de 1,5 cm de diámetro de las películas, y se colocaron sobre las cajas y fueron incubadas a 28°C por 7, 10 y 14 días. El efecto antifúngico de la película fue determinado observando la existencia de zona de inhibición debajo de los discos y alrededor de los mismos.

2.4 Estudios de aplicación en mariscos y frutas.

2.4.1 Uso del quitosano como inhibidor de la melanosis del langostino. Se probó en el langostino argentino *Pleoticus muelleri* libre de aditivo, el uso de soluciones acéticas (pH 4 y 6) de quitosano (CH), quitosano con 1% en masa de sorbato de potasio (FSKMW1, mezclas físicas) y mezclas químicas quitosano-sorbato de potasio (CSKMW1,1) como aditivo para luego valorar la prevención de la melanosis sensorialmente. Se trabajó con ejemplares de langostinos con peso promedio de $25,6 \pm 0,5$ g y largo total de $14,9 \pm 0,1$ cm con cabeza y $11,5 \pm 0,1$ cm sin cabeza; los cuales fueron sumergidos durante 2 minutos en dichas soluciones. Se prepararon bandejas con 15

langostinos. Se conservaron a 0°C durante 7 días para posteriormente realizar la evaluación sensorial de la carne del langostino con el aditivo y análisis microbiológico de la carne del langostino. Se empleó como testigo una muestra de langostinos frescos y otra de langostino sin aditivo. Se trabajó con un panel de jueces entrenados para el desarrollo de los descriptores [17]. Los descriptores fueron: aspecto general, olor, color del exoesqueleto, color del músculo, textura, mucosidad. Se elaboró una escala visual de melanosis de puntuación 1 a 4, (1: ausencia de manchas oscuras; 2: algunas manchas oscuras pequeñas; 3: gran cantidad de manchas en el caparazón; 4: manchas en todo el caparazón).

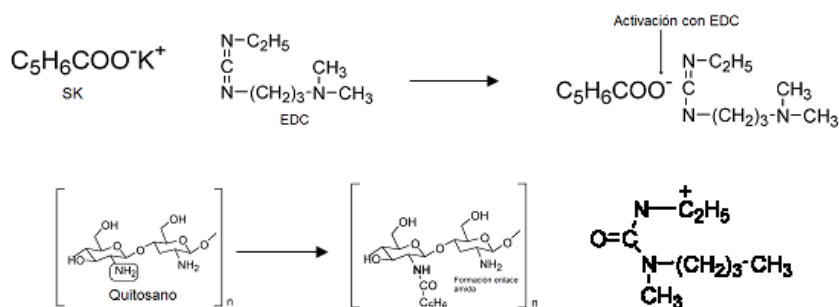
2.4.2. Uso de películas comestible de quitosano para conservar la calidad de frutillas.

Se utilizaron frutillas seleccionadas por su madurez, tamaño, libres de infección y defectos físicos. Fueron lavadas con abundante agua y secadas a temperatura ambiente. Se prepararon soluciones acéticas de CH, quitosano con 1% en masa de SK (FSKLW1, mezcla física) y CH-SK (CSKLW1,1, mezcla química) a pH 4. Las frutillas fueron rociadas con dichas soluciones, secando el exceso de líquido con servilletas de papel, se colocaron en bandejas de telgopor y fueron conservadas a 4°C durante 14 días. Se usaron frutillas sin películas de CH para control. Se evaluaron los parámetros de calidad (color e índice de deterioro) transcurridos 7 y 14 días. La calidad sensorial de las frutillas fue evaluada por su apariencia visual y su aceptabilidad a panelistas y calificadas con una escala hedónica de 1 a 9 (9: excelente; 7: muy bueno; 5: bueno; 3: regular y 1: malo) [18].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Unión física y covalente de SK a matrices de CH de diferentes pesos moleculares.

La unión covalente del SK al CH, se realizó según el procedimiento sintético que se muestra en el esquema 1. En este esquema se muestra que primeramente ocurre la activación del grupo carboxilo del SK a través de la carbodiimida soluble en agua (EDC) siguiendo el método de *Chen et al.* ([8]). Luego se produce la formación de un enlace amida entre SK y el grupo amino del CH.



Esquema 1: síntesis para la unión covalente de SK en matrices de CH vía EDC.

3.2. Caracterización

3.2.1. Espectros FT-IR. Las muestras CH-SK modificado (mezclas físicas y químicas) fueron estudiadas por FT-IR y se realizaron estudios comparativos con CH sin modificar y de SK.

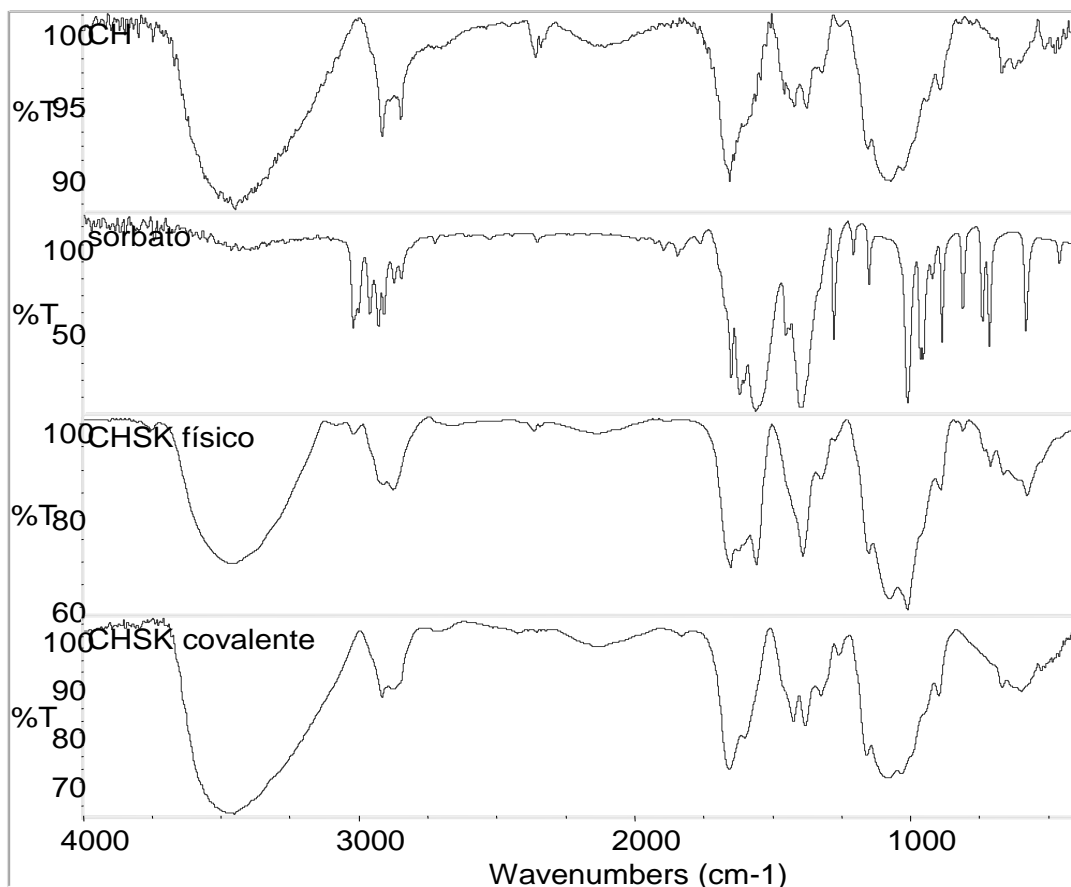


Figura 2. Espectro FT-IR A) CH LW, B) SK (Sorbato de potasio), C) CH-SK físico (FSKLW1), D) CH-SK covalente (CSKLW1.1).

En la Figura 2 se muestran los espectros correspondientes a las muestras sólidas CH (a), sorbato de potasio (b) y de CH-SK que son las muestras de quitosano en las cuales el SK se ha incluido en forma física (c) y covalente (d). En el espectro c, se puede observar que las bandas corresponden a la sumatoria de los espectros a y b, en este caso se observa un cambio en la banda a 1.638 cm^{-1} por la presencia de los grupos carboxílicos del SK. La banda se torna mas puntiaguda con el incremento de SK añadido indicando alguna interacción entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxílicos del sorbato, como lo han reportado antes *Chen et al.* [3]. Además la banda cercana a los 1.386 cm^{-1} podría ser atribuida al aumento de los grupos carboxílicos (-COO). Por otro lado, en el espectro d, se observan cambios importantes en la zona comprendida entre 1.650 a 1.550 cm^{-1} . En este último caso, se puede distinguir la banda I correspondiente a los grupos amida entre 1.681 a 1.641 cm^{-1} (-C=O, estiramiento) de la formación de amidas y la banda II (-N-H, estiramiento) entre 1.574 a 1.555 cm^{-1} . La presencia de estas bandas, pone en evidencia la

formación de uniones covalentes ente el quitosano y el SK (véase el esquema 1).

3.2.2. Determinación de índices de hinchamiento. El índice de hinchamiento de estos materiales es de gran importancia, dado su potencial aplicación en medios acuosos o fluidos fisiológicos lo que provocaría la absorción de agua con la consecuente alteración de sus propiedades físicas [9]. Se estudiaron los índices de hinchamiento de los diferentes CH (MW, LW), sin la incorporación de SK, en diferentes medios (agua y ácido adípico). Los mismos se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

En las Figuras 3 y 4 se puede observar que tanto el CH LW (peso molecular bajo), como el CH MW (peso molecular medio) presentaron altos índices de hinchamiento. El CH LW fue el que presentó los mayores valores; esto puede deberse a que por presentar el menor peso molecular es mas fácilmente solvatado por las moléculas de solvente y las cadenas poliméricas pueden alejarse unas de otras. Esto también favorece la formación de enlaces de hidrógeno con el disolvente, facilitando aún más su hinchamiento. Por lo general, los hidrogeles preparados con quitosano logran un grado de hinchamiento máximo a valores de pH ácidos, debido a que el máximo grado de hinchamiento de estos materiales surge de un compromiso entre la máxima repulsión que pueden experimentar los grupos cargados y el mínimo apantallamiento que genera la adición de un exceso del ácido. El CH de peso molecular medio, presentó un comportamiento similar al de bajo peso molecular, pero con menor grado de hinchamiento.

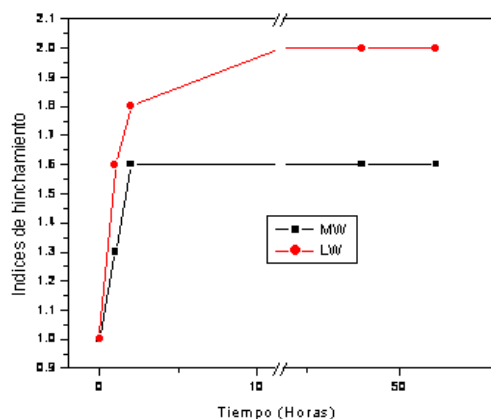


Figura 3. Índices de hinchamiento en agua.

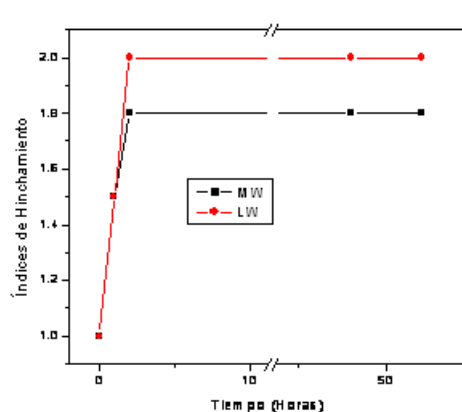


Figura 4. Índice de hinchamiento en HAd (pH 5,78).

3.2.3. Estudios de liberación de SK.

3.2.3.1. Liberación de SK en mezclas físicas de CH-SK. Las primeras experiencias de trabajo fueron realizadas mediante la incorporación física del SK a matrices de CH de diferentes pesos moleculares con las cuales se prepararon películas. Las experiencias fueron realizadas a pH 5,7 porque se sabe que a este valor de pH los grupos aminos del CH se encuentran cargados

positivamente (pKa 6,3), mientras que los COOH (grupos carboxilos) del SK, están negativos. Una vez preparadas las películas se realizaron experiencias de liberación de SK en las mismas, obteniéndose los resultados mostrados en las Figuras 5 y 6, donde se ha graficado el porcentaje de SK liberado en función del tiempo para los quitosanos LW y MW. El mayor porcentaje de liberación se observó para las películas de CH con 5% de SK en el quitosano LW (Figura 6). Sin embargo, tanto para el quitosano MW (Figura 5) como el LW (Figura 6), se observa que el porcentaje de liberación de SK no supera el 20% del SK colocado originalmente. Esto pone en evidencia que la interacción entre el CH y el SK juega un rol importante, pero la cinética de liberación no presenta valores proporcionales a la concentración. El tiempo de liberación total ensayado fue de cuatro días, siendo la velocidad de liberación superior en las películas con 5% de SK en el quitosano LW. El “plateau” se alcanzó en general después de la cuarta hora de realizada la experiencia. Posiblemente, dado que en este caso la interacción entre SK y CH es de tipo electrostática, la concentración en la que el SK se libera más rápidamente, sea aquella que se encuentre más impedida para establecer el par iónico con los grupos funcionales del quitosano, y esto a su vez, dependerá del peso molecular y el grado de hinchamiento de cada tipo de quitosano utilizado.

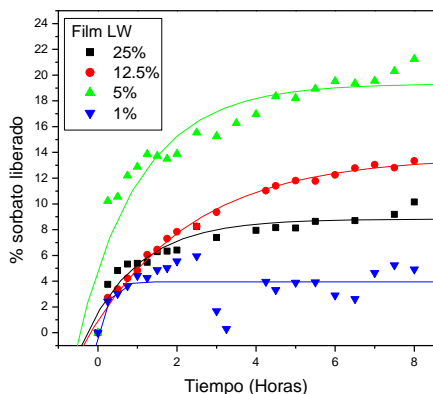


Fig 6: Gráfico de % de sorbato de potasio liberado para films de quitosano peso bajo con diferentes % de sorbato de potasio en función de tiempo

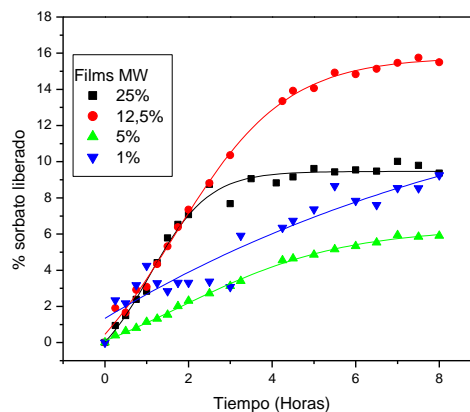


Fig 5: Gráfico de % de sorbato de potasio liberado versus tiempo para films de quitosano peso medio (MW) con diferentes % sorbato

3.2.4. Ensayos microbiológicos con películas de CH con SK incorporado física y covalentemente. En la Tabla 2 se muestran los resultados de los estudios microbiológicos a las películas de CH en los cuales el SK se ha incorporado física y químicamente. Los estudios microbiológicos fueron realizados utilizando dos tipos del CH (de bajo y medio peso molecular), con un 5 y 10% de SK (mezclas físicas) y con 1,1 eq. SK/eq residuo glucosamino (mezclas químicas). Observando la tabla podemos notar que, en todas las experiencias realizadas, no se observó zona o halo de inhibición del crecimiento de hongos. Solamente se inhibió el crecimiento

de los mismos debajo de los discos de las películas.

En los ensayos microbiológicos se observó que el crecimiento de hongos comienza luego de las 48 horas en los blancos (películas de CH), mientras que en las películas de quitosano con un 5% de SK, el efecto inhibitor se prolonga inclusive hasta los 10 días. En el caso de las películas de CH con 10% de SK, el efecto inhibitor desaparece antes de los 7 días. Para el caso del CH de peso molecular medio, con un 5% de SK, el efecto inhibitor se prolonga hasta los 7 días. Una alta velocidad inicial de liberación del conservante en la película (Figuras 5 y 6) puede inhibir el crecimiento de hongos al principio del envasado, pero esto también resulta en una alta concentración del conservante en la superficie del alimento e incrementaría la velocidad de difusión de la superficie al interior, provocado por un alto gradiente de concentración. Esta alta velocidad de difusión podría reducir el efecto antifúngico de la película a largo plazo [8]. Se apreció en los estudios microbiológicos que al superar el 5% de sorbato de potasio en las películas de quitosano se perdía el efecto inhibitor del SK.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de las películas de CH y CH-SK (unión física y química).

Tipo de películas	Características	Zona de inhibición	Área debajo de los discos		
			2 días	7 días	14 días
FMWB	Blanco, CH MW	-	+	-	-
FLWB	Blanco, CH LW	-	+	-	-
FSK LW5	5% SK, unión física, CH LW	-	+	+	-
FSK LW10	10% SK, unión física, CH LW	-	+	-	-
FSK MW5	5% SK, unión física, CH MW	-	+	+	-
FSK MW10	10% SK, unión física, CH MW	-	+	+	-
CMMWB	Blanco, CH MW	-	+	-	-
CMLWB	Blanco, CH LW	-	+	-	-
CSKMW1,1	1,1 eq SK, union qca, CH MW	-	+	+	+
CSKLW1,1	1,1 eq SK, union qca, CH LW	-	+	+	-

El símbolo + representa un efecto inhibitor; y el símbolo - un efecto no inhibitorio

Analizando los ensayos microbiológicos de las películas de CH-SK en los cuales el SK está unido químicamente (Tabla 2), se observó que el crecimiento de hongos comienza a los 14 días en el CH MW pero en el CH LW se aprecia a los 10 días. No se observó en ninguno de los casos halo de inhibición del crecimiento de hongos, lo que presupone que no se liberaría sorbato, lo que sería beneficioso porque no habría sorbato en el alimento, lo cual sería bueno para que el consumidor no lo ingiera. En estas últimas películas se conservan las propiedades antifúngicas del SK, a pesar de estar este unido covalentemente a la matriz de CH; de esta manera se prolongaría el tiempo de conservación del alimento, evitando el crecimiento de hongos y sin la liberación del antifúngico al

alimento dado que los porcentajes de liberación, en las películas en donde el SK fue covalentemente unido, son despreciables en comparación a las películas en donde el SK está físicamente incorporado. Además, se observa que el efecto inhibitor del quitosano de peso molecular medio fue superior al de bajo peso molecular.

3.3. Estudios de aplicación en mariscos y frutas. *Langostino:* El langostino es un marisco de gran aceptación en el mercado. Dada su importancia económica, resulta interesante la investigación del empleo de aditivos para evitar la melanosis. La melanosis o pardeamiento del langostino es una reacción química causada por una enzima endógena polifenoloxidasas [16] que forma pigmentos coloreados insolubles (ennegrecimiento de la carne). Esto tiene un impacto negativo en su valor comercial y en la aceptación del producto por parte del consumidor [18], pero no en su sabor. Con el conservante (metabisulfito de sodio) usado actualmente en la industria alimentaria, la melanosis aparece en los langostinos a los 3 días cuando son conservados a 0°C. El metabisulfito de sodio es un compuesto que causa reacciones adversas en la salud humana, este hecho ha originado que se siga estudiando otros aditivos para la prevención de la melanosis.

Se trabajó con lotes de 15 langostinos con un peso promedio de $25,6 \pm 0,5$ g y un largo total de $14,9 \pm 0,1$ cm con cabeza y $11,5 \pm 0,1$ cm sin cabeza; los cuales fueron sumergidos durante 2 minutos en soluciones acéticas (pH 4,0 y 6,0) de CH-SK con 1% en masa de sorbato de potasio (FSKMW1, unión física) y CH-SK (unión química, CSKLW1,1), se guardaron a 0°C durante 7 días para posteriormente realizar la evaluación sensorial de la carne con el aditivo. Se empleó como testigo una muestra de langostinos enteros frescos y sin aditivo. La evaluación sensorial determinó que los langostinos sumergidos en soluciones acéticas de CH, CH-SK 1% masa (unión física) y CH-SK unión covalente a pH 4 y luego de 7 días se observó en las patas y parte de la cola, una leve presencia de manchas oscuras. El aspecto general de la carne fue bueno, el músculo presentó un ligero color amarillo y se apreció la presencia de una mucosidad blanquecina alrededor del mismo y el olor que desprendieron las muestras fue amoniacal. Debido a la presencia de manchas en las patas y cola se le asignó la valoración 2 en el langostino sumergido en CH SK físico y covalente y valoración 3 en el CH por presentar gran cantidad de manchas en el caparazón. Por el contrario, en la experiencia realizada a pH 6 los langostinos presentaron un aspecto general agradable, la textura inicial se conservó luego de los 7 días, no presentaron mucosidad ni líquido en el músculo, se mantuvo el color rosado-anaranjado y el olor fue a pescado y choclo, típico de langostino (Manual *Boski*, ilustrado de crustáceos, 1992). Se observó una coloración más rosada en los langostinos sumergidos en soluciones acéticas de CH-SK físico y CH-SK covalente y se le asignó en la escala visual la valoración 1 (ausencia de manchas oscuras), en cambio a los langostinos sumergidos en

CH se le asignó la valoración 2 (Tabla 3) por presentar algunas manchas oscuras en el caparazón y parte de la cola [17]. No se observaron grandes diferencias entre el aspecto general de los langostinos en el caso que el SK esté unido física o químicamente al CH. La ventaja en la unión química del SK al CH sería la no liberación del conservante al langostino. Mediante estas experiencias se pudo comprobar la eficiencia del uso del CH con SK unido físico y covalentemente para evitar la melanosis del langostino durante 7 días.

Tabla 3. Valoración asignada en la evaluación sensorial de langostinos tratados con soluciones acéticas de CH, CH SK físico (FSKLW1) y CH SK covalente (CSKLW1.1) después de siete días.

<i>Langostinos pH 4</i>	<i>Blanco</i>	<i>CH</i>	<i>CH-SK físico</i>	<i>CH-SK covalente</i>
Características	Descripción			
Aspecto general	Regular	Bueno	Bueno	Bueno
Color del músculo	Amarillo	Ligero color amarillo	Ligero color amarillo	Ligero color amarillo
Mucosidad	Blanca	Blanquecina	Blanquecina	Blanquecina
Olor	Amoniactal	Amoniactal	Amoniactal	Amoniactal
Valoración	4	3	2	2

<i>Langostinos pH 6</i>	<i>Blanco</i>	<i>CH</i>	<i>CH-SK físico</i>	<i>CH-SK covalente</i>
Características	Descripción			
Aspecto General	Regular	Agradable	Agradable	Agradable
Color del músculo	Amarillo	Blanco, traslúcido, brillante	Blanco, traslúcido, manchas nacaradas	Blanco, traslúcido, manchas nacaradas
Mucosidad	Blanca	No presenta	No presenta	No presenta
Olor	Amoniactal	Pescado y choclo	Pescado y choclo	Pescado y choclo
Valoración	4	2	1	1

Valoración: 1: ausencia de manchas oscuras, 2: algunas manchas oscuras pequeñas, 3: gran cantidad de manchas en el caparazón, 4: manchas en todo el caparazón

Frutillas: Para esta experiencia las frutillas fueron sumergidas en soluciones acéticas (pH 4,0) de CH, CH-SK con 1% de SK (FSKLW1, unión física) y CH-SK (CSKLW1.1, unión química) y conservadas a 4°C. El color y el brillo de las frutillas son factores importantes porque involucran la aceptabilidad del consumidor y se observó que ninguno de los dos se vio modificado por el rociado con las soluciones de CH. La capa de CH retarda la caída en las cualidades sensoriales, por lo tanto, prolonga la vida útil. Las frutillas cubiertas con quitosano tuvieron una aceptabilidad visual mayor que las no tratadas [19]. Tanto el control como las frutillas rociadas con CH fueron atractivas para los panelistas luego de dos días. Se observó que después de siete días las muestras presentaban un

tono rojo intenso, la piel mas firme y presentaban una pérdida de peso menor que el control, debido a que la cubierta con quitosano [19] retardaría la velocidad de respiración y los procesos enzimáticos propios de la fruta. Al finalizar el séptimo día el control no era atractivo comercialmente (valoración 3, regular), a las frutillas cubiertas con la solución de CH se les asignó la valoración 5. Las frutillas cubiertas con CH SK conservaban su calidad; en el caso de las recubiertas con CH SK físico con 1% SK (FSKLW1, unión física) se les asignó la valoración 7, y las cubiertas con CH SK covalente (CSKLW1,1, unión química) 9, excelente (Tabla 4).

Tabla 4. Valoración asignada en la evaluación sensorial de frutillas tratados con soluciones acéticas de CH, CH SK físico (FSKLW1) y CH SK covalente (CSKLW1.1) después de 7 días

<i>Frutillas</i>	<i>Control</i>	<i>CH</i>	<i>CH-SK físico</i>	<i>CH-SK covalente</i>
<i>Características</i>	Descripción			
<i>Color</i>	Rojo oscuro	Rojo	Rojo oscuro	Rojo oscuro
<i>Brillo</i>	Opaco	Bueno	bueno	Bueno
<i>Valoración</i>	3	5	7	9

Valoración: 9, excelente; 7, muy bueno; 5, bueno; 3, regular y 1, malo.

CONCLUSIONES

Analizando la eficiencia para inhibir el crecimiento de hongos de los diferentes CH estudiados, los que presentaron el mejor comportamiento fueron los CH de peso molecular medio. A su vez, ambos CH presentaron altos valores de índice de hinchamiento, lo cual permitiría una mayor liberación del SK cuando está físicamente incorporado a la matriz. Si los resultados se analizan desde el punto de vista microbiológico, es también el CH de peso molecular medio, quién demostró ser más efectivo para inhibir el crecimiento de hongos con SK covalentemente unido.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, permiten concluir que la incorporación covalente del SK permite que las películas de CH SK conserven sus propiedades antimicrobianas, lográndose de esa manera un mayor tiempo de inhibición, con la ventaja de que el aditivo estaría incorporado en el revestimiento y no en el alimento. Los estudios de liberación controlada, demostraron que los porcentajes de liberación, en las películas en donde el SK fue covalentemente unido, son despreciables en comparación a las películas en donde el SK está físicamente incorporado. Es importante destacar que la unión covalente del SK a matrices de CH se realiza a través de un procedimiento sencillo, rápido e inocuo, lo cual trae como consecuencias, interesantes propiedades de aplicación de estas películas en el área de alimentos. Por otro lado, es importante denotar que, en aquellos casos en donde el tipo de aplicación lo demande, estas películas pueden ser comestibles dado que la concentración de SK está dentro de los valores permitidos por el código

alimentario y la modificación química realizada no posee riesgos de toxicidad.

El análisis sensorial revela que el recubrimiento con una capa de solución acética de quitosano a pH 6 en los langostinos y a pH 4 en las frutillas permite conservar la buena calidad de los mismos sin afectar sus características como brillo, olor y sabor. Los productos recubiertos con la capa de CH SK covalentemente unido tuvieron una menor caída en la pérdida del color y crecimiento de hongos en el caso de las frutillas y una mejora notable en el tiempo de conservación en el caso de los langostinos, evitando la aparición de la melanosis durante 7 días, lo que permite considerar a la presente propuesta de revestimiento como apropiada para una aplicación comercial durante el almacenaje y posterior comercialización de dichos productos de alta importancia económica para su exportación.

Agradecimientos. Se agradece a la Secretaría de Ambiente y Desarrollo sustentable del Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación por el subsidio otorgado al proyecto PNUD ARG 02/018. A Rubén Rondini propietario de la *Chacra N°5, Establecimiento San Cayetano (Sarmiento, Chubut)* por la donación de las frutillas utilizadas en este trabajo. A Roque Silva patrón del barco pesquero *Juan Manuel* quien colaboró con los ejemplares de langostinos empleados en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coma V, Martial A “Edible Antimicrobial films based on chitosan matrix”, *J. Food Microbiology*, **67**, 162 (2002).
2. Dhamvithee, P “Study on properties of chitosan film incorporated with potassium sorbate and application”, *Advances in chitin science* **5**, 231 (2002)
3. Campaniello A, Bevilacqua D, Sinigaglia M, Corbo MR “Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative”, *Food Microbiology* **25**, 992 (2008)
4. Sevel S, İkinci G, Kas S “Chitosan films and hidrogeles of clorhexidine gluconate for oral mucosal delivery”, *Int. J. of Pharm.*, **193**, 197 (2000)
5. Moller H, Grelier S “Antimicrobial and Physicochemical properties of chitosan-HPMC based films”, *J. Agric Food Chem.*, **52**, 6585 (2004)
6. Srinivasa PC, Ramesh MN “Properties of chitosan films prepared under different drying conditions”, *J. Food Eng.*, **63**, 79 (2004).
7. Ozdemir M, Floros JD “Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films”, *J. Food Eng.*, **47**, 149 (2001)
8. Chen XG, Lee CM, Park HJ “Emulsification for the self aggregation and nanoparticle formation of linoleic acid modified chitosan in the aqueous system”, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3135 (2003)
9. Liu CG, Desal, KG, Chen X “Preparation and characterization of nanoparticles containing tripsin”, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1728 (2005)
10. Santos C, Seabra B, Veleirinho I “Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes”, *Eur. Polym. J.*, **42**, 3277 (2006)
11. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM “Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, ps and nisin”, *LWT*, **38**, 859 (2005)
12. Srinivasa PC, Kumar KR, Ramesh MN, Tharanathan RN “Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films”, *Carbohydrate Polymers*, **53**, 431 (2003)
13. Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., Kumar, K. R., Tharanathan, R. N., Properties of chitosan films prepared under diferent drying conditions. *Journal of Food Engineering*, **63**, 79 (2003)
14. Srinivasa PC, Revathy B, Ramesh MN, Harish Prashanth KV, Tharanathan RN “Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan films”, *European Food Research & Technology*, **215**, 504 (2002)
15. Srinivasa PC, Susheelamma NS, Ravi R, Tharanathan RN “Quality of mango fruits during storage.

- Effect of synthetic and eco-friendly films” *J. Science of Food and Agriculture*, **84**, 818 (2004)
16. Risso S, Cerda R, Giannini D, Yeannes M “Efectividad del aditivo 4-Hexilresorcinol en la inhibición de melanosis del langostino (*Pleoticus Muelleri*; Bate, 1888)”, *Revista FABICIB* **9**, 225 (2005)
17. Chien PJ, Sheu F, Yang F “Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit”, *J. food Eng.*, **78**, 225 (2007)
18. Tharanathan RN, Srinivasa PC, Ramesh MN “A process for production of biodegradable films from polysaccharides”, *Indian patent* 85/DEL/2002.
19. Hernández-Muñoz P, Almenar E, Del Valle V, Velez D, Gavara R “Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage”, *Food Chemistry* **110** 428 (2008)
20. Krajewska B “Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials”, *Sep Purif Technol.*, **41**, 305 (2005)
21. Chatelet C, Damour O, Domard A “Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films”, *Biomaterials* **22**, 261 (2001)
22. Kofuji K, Qian C-J, Nishimura M, Sugiyama I, Murata Y, Kawashima S “Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan”, *Eur Polym J.*, **41**, 2784 (2005)
23. Hwang KT, Kim JT, Jung ST, Cho GS, Park HJ “Properties of chitosan-based biopolymer films with various degrees of deacetylation and molecular weights”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **89**, 3476 (2003)
24. Chen XG, Zheng L, Wang Z, Lee CY, Park HJ “Molecular affinity and permeability of diferent molecular weight chitosan membranes”, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5915 (2002)
25. Kasaai MR, Arul J, Charlet G “Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan”, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **38**, 2591 (2000)
26. Chien Po-Jung, Sheu Fuu, Yang Feng-Hsu “Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit”, *J Food Engineering*, **78**, 225 (2007)
27. Dong H, Cheng L, Tan J “Effect of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit”, *J. Food Engineering*, **64**, 355 (2004)