



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

**ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO E
INCORPORACIÓN EN PELÍCULAS DE QUITOSANO-QUÍNOA
(*Chenopodium quinoa* Willd.)**

Profesor Patrocinante: Cristián Tapia Villanueva
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química
Universidad de Chile

Directores de Memoria: Lilian Elizabeth Abugoch James
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química
Universidad de Chile

Cristián Tapia Villanueva
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química
Universidad de Chile

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

PAULA CAROLINA SAVÉ BERNALES

SANTIAGO-CHILE

2011

Para ti... la persona más importante e inolvidable de mi vida.

Mi adorada mamá,

Viviana del Rosario Bernales Leiva

(07-marzo-1949 - † 02-junio-2011)

Q.E.P.D.

Te extraño cada segundo...

AGRADECIMIENTOS

- Primero que todo, gracias a Dios por la excelente familia y grandes amigos que me ha dado.

- A mis queridos papás, Viviana y Salvador,

Mamá, gracias por absolutamente todo, me diste todo lo que una hija puede desear y más. Te extraño profundamente. Sé cuanto querías que terminara con esta etapa de mi vida y también sé cuantas de tus fuerzas pusiste para quedarte conmigo el mayor tiempo posible y la verdad es que sólo quiero que sepas que estoy profundamente agradecida por eso y por todo lo que durante tu vida hiciste por mí.

Papá, gracias por estar siempre ahí, en todo momento. Gracias por tu paciencia y por todo el amor que me entregas a diario. Gracias por practicar con el ejemplo y siempre poner a nuestra familia como prioridad uno a tu vida.

- A mis queridas tías, Irma y Ximena,

Gracias por quererme como una hija, por demostrarme a diario lo importante que soy para ustedes y darme la seguridad de que siempre estarán ahí para apoyarme. No todo el mundo tiene la suerte de tener unas tías incondicionales y yo estoy completamente agradecida de tenerlas a ustedes en mi vida.

- A mi querido Andrés,

Gracias por todo el apoyo que me das, gracias estar conmigo en los momentos más difíciles y en los más alegres, gracias por compartir tu vida conmigo y por amarme de verdad, TAM.

- A Rodrigo, Mauricio, Jaime, Laura, Carola, Agustín, Benjamín, Trinidad, Martín e Isabel,

Gracias por ser mi adorada familia, gracias por mantenernos unidos sin importar la adversidad o la distancia, gracias por darme la suerte de tener esta familia aclanada que tanto amo.

- A mi profesor patrocinante, Cristián Tapia,

Gracias por todos los recursos puestos para esta memoria, gracias por su paciencia y por todas sus recomendaciones para poder terminar con este proyecto.

- A mi profesora directora, Lilian Abugoch,

Gracias por ayudarme en todo lo que estuvo a su alcance, gracias por la confianza que me ha entregado en todo este proceso, gracias por preocuparse de mí verdaderamente, sus consejos, su paciencia, su cariño.

- A mis queridos amigos,

Matías, Estefanía, María Paz, Pato, Cristián y Daniela. Gracias por los mejores años, por los mejores carretes, por las noches hasta tarde, los paseos a la playa y por todo su cariño.

Rocío, mi amiga del día cero; Pía, mi amiga la cariñosa; Kattirant, mi amiga la conciliadora y Carola, mi amiga la transparente, mil gracias por ser ustedes, mis amigas del alma, por su cariño y apoyo en los momentos más difíciles y oscuros, por las alegrías vividas, los abrazos cariñosos y verdaderos, las conversaciones eternas y por una amistad interminable que me hace muy feliz y enorgullece profundamente, las quiero muchísimo.

Viviana, Juan Pablo, Nicolás, Tamara, Génesis e Izaskun, gracias por entregarme su amistad y cariño. Siempre estaré agradecida por ese excelente año en el laboratorio, los llevaré siempre en mi corazón.

Don Eduardo Ibáñez, gracias por hacer sentir a cada estudiante que entra al laboratorio de unitarias parte de una familia, usted es un ejemplo a seguir, siempre estaré agradecida de toda su ayuda y cariño.

Luis Pablo, gracias por entregarme tu amistad, gracias por trabajar siempre conmigo y por todo el apoyo que me diste durante todo este proceso. Eres un excelente amigo.

Juliette, Kamila, Carolina, María José y Cesarina, muchas gracias por su apoyo constante, su experiencia, paciencia y excelente disposición me ayudaron mucho, de verdad infinitas gracias.

JR de la Fuente, gracias por ser el primero que creyó en mí. Por abrirme las puertas de tu laboratorio y entregarme una profunda amistad. Gracias a tu hermosa familia, Cecilia, Pablo y Diego por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir parte de su familia.

- A mis profesores de Operaciones Unitarias,

Profesores Fernando, Carlos y Jaime, muchas gracias por todo el apoyo que me brindaron durante el tiempo de estadía en el laboratorio, fue muy grato para mí compartir con ustedes y siempre los recordaré con muchísimo cariño.

- Finalmente, gracias al Proyecto Innova-Corfo “Desarrollo y caracterización tecnológica de potencialidades estratégicas en berries de exportación: aumento de vida útil post-cosecha y calidad” (07CT9PUT-06), por el financiamiento de esta memoria.

RESUMEN

Desde que el hombre descubrió la necesidad de guardar alimentos en épocas de escasez, ha desarrollado técnicas para su conservación. Durante muchos años se han estudiado películas comestibles, capaces de aumentar la vida útil de alimentos perecederos ya cosechados.

El creciente interés de fomentar una tecnología más amigable con el medio ambiente ha hecho que en la actualidad el estudio de películas comestibles biodegradables se haya posicionado lo suficiente como para abrir paso a un sin fin de investigaciones ligadas al tema, todo esto debido al gran potencial que tienen éstas para poder prolongar la vida útil de los alimentos frescos o mínimamente procesados manteniendo óptimas características organolépticas y mejorando la calidad e inocuidad, todo esto gracias a la variedad de materiales naturales y biodegradables que son posibles utilizar para su composición, y así poder desplazar en un futuro a los materiales sintéticos.

Sin embargo, la naturaleza hidrofílica de estas películas se traduce en pérdida de propiedades de barrera. Una de las estrategias para disminuir la permeabilidad al vapor de agua de estas películas es la adición de nanopartículas.

El objetivo de este estudio fue el de evaluar el efecto de la adición de nanopartículas de quitosano tripolifosfato en la permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de películas de quitosano y quitosano-quínoa.

El efecto en la permeabilidad al vapor de agua se midió usando el método de la copa húmeda, se evaluaron las propiedades mecánicas y se determinaron los parámetros de secado. Se pudo concluir que la adición de nanopartículas de quitosano tripolifosfato en las películas de quitosano en una concentración al 1% es efectiva en disminuir la permeabilidad al vapor de agua y no se ven afectadas las propiedades mecánicas en relación al control. Además, la adición de nanopartículas de quitosano tripolifosfato en las películas de quitosano-quínoa en una concentración al 1% disminuye la permeabilidad al vapor de agua pero si se ven afectadas las propiedades mecánicas.

SUMMARY

Preparation of nanoparticles of chitosan and incorporation in chitosan-quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) edible films.

Ever since mankind discovered the need to store food in times of scarcity, it has developed techniques for food conservation. For many years, edible films have been studied, capable of increasing the shelf life of perishable foods already harvested.

The growing interest to promote environmentally friendly technologies has placed the study of biodegradable edible films in a position that allows endless research on the subject, all because of the great potential these films have to extend the shelf life of fresh foods and minimally-processed foods, maintaining optimal organoleptic characteristics and improving the quality and safety, all thanks to the variety of natural and biodegradable materials that are possible to use for their composition, with hopes of replacing synthetic materials in the future.

However, the hydrophilic nature of these films results in loss of barrier properties. One strategy to reduce water vapor permeability of these films is the addition of nanoparticles.

The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of chitosan tripolyphosphate nanoparticles on the water vapor permeability and mechanical properties of chitosan and chitosan-quinoa films.

The effect on water vapor permeability was measured using the wet cup method. We evaluated the mechanical properties and we determined the drying parameters. It was concluded that the addition of chitosan tripolyphosphate nanoparticles in the films of chitosan in a concentration of 1% is effective in decreasing the permeability to water vapor and did not affect the mechanical properties relative to control. Furthermore, the addition of chitosan tripolyphosphate nanoparticles in the films of chitosan-quinoa in a concentration of 1% decreases the permeability to water vapor but did affect the mechanical properties.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
INDICE	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. ANTECEDENTES GENERALES	5
1.2. DESCRIPCIÓN GENERAL Y PROPIEDADES DE LA QUÍNOA (<i>CHENOPODIUM QUINOA</i> WILLD.)	6
1.2.1. DESCRIPCIÓN GENERAL	6
1.2.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS DE QUÍNOA (<i>CHENOPODIUM QUÍNOA</i> WILLD.)	7
1.2.3. PROPIEDADES DE SOLUBILIDAD Y SU PUNTO ISOELÉCTRICO (PI)	7
1.3. DESCRIPCIÓN GENERAL Y PROPIEDADES DEL QUITOSANO	7
1.3.1. DESCRIPCIÓN GENERAL	7
1.3.2. FORMACIÓN DE PELÍCULAS	10
1.3.3. PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS	12
1.3.4. BIODEGRADACIÓN	12
1.3.5. <i>FILMS</i> COMESTIBLES	13
1.4. NANOPARTÍCULAS	15
1.4.1. NANOPARTÍCULAS CONSTITUIDAS POR QUITOSANO	15
1.4.2. PRINCIPIO DE GELIFICACIÓN IÓNICA DEL QUITOSANO UTILIZANDO TRIPOLIFOSFATO DE SODIO	15
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	16
3.1. OBJETIVO GENERAL	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16

4. MATERIALES	17
<hr/>	
4.1. MATERIALES	17
4.1.1. MATERIA PRIMA	17
4.1.2. INSUMOS Y UTENSILIOS	17
5. MÉTODOS	18
<hr/>	
5.1. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO DE QUÍNOA (<i>CHENOPODIUM QUÍNOA</i> WILLD.) (EAP)	18
5.2. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO-TRIPOLIFOSFATO (NQTPP)	18
5.3. MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)	18
5.4. DETERMINACIÓN DEL ESPESOR DE LOS <i>FILMS</i>	18
5.5. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO	19
5.6. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO-EXTRACTO ACUOSO PROTEICO DE QUÍNOA	19
5.7. PROCEDIMIENTO DE ADICIÓN DE NQTPP EN PELÍCULAS DE QUITOSANO-EXTRACTO ACUOSO PROTEICO DE QUÍNOA	19
5.8. OBTENCIÓN DE LA CURVA DE SECADO DE LOS <i>FILMS</i>	19
5.9. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE TRANSMISIÓN DE VAPOR DE AGUA (TVA)	24
5.10. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS	26
5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
<hr/>	
6.1. CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN EL EXTRACTO ACUOSO PROTEICO	29
6.2. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE TEM	29
6.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE SECADO DE LOS <i>FILMS</i>	30
6.4. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE TRANSMISIÓN DE VAPOR DE AGUA (TVA)	34
6.4.1. PELÍCULAS DE QUITOSANO CON Y SIN NQTPP	34
6.4.2. PELÍCULAS Q-EAP CON Y SIN NQTPP	37
6.5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS	42
6.5.1. PELÍCULAS DE QUITOSANO CON Y SIN NQTPP	42
6.5.2. PELÍCULAS Q-EAP CON Y SIN NQTPP	43
7. CONCLUSIONES	46
<hr/>	
8. BIBLIOGRAFÍA	47
<hr/>	

9. ANEXOS	57
ANEXO 1: COMPOSICIÓN PROXIMAL Y AMINOACÍDICA DE LA HARINA DE QUÍNOA.	57
ANEXO 2: CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN LA HARINA DE QUÍNOA.	58

1. INTRODUCCIÓN

El uso de biomateriales como películas de recubrimiento puede prolongar la vida útil de alimentos frescos o mínimamente procesados, al mantener sus características organolépticas, y mejorar su calidad e inocuidad. El éxito de los recubrimientos comestibles para satisfacer las necesidades específicas de frutos frescos depende de sus propiedades de barrera a la humedad, oxígeno y dióxido de carbono, las que a su vez dependen de la composición química y la estructura de los polímeros que forman el recubrimiento. Los biopolímeros como proteínas y quitosano han sido estudiados en forma creciente durante los últimos 10 años, varias investigaciones se han centrado en el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles en base a quitosano como herramienta para mejorar la calidad y vida útil de varios alimentos. Sin embargo, la naturaleza hidrofílica de estas películas se traduce en pérdida de propiedades de barrera o incluso la solubilización de ellas en alimentos con elevadas actividades de agua, lo que impide sus aplicaciones industriales, por ello actualmente se prueban nuevas técnicas para modificar las propiedades de películas basadas en biopolímeros, tales como la síntesis de películas híbridas y la incorporación de nanocompuestos en su formulación (De Moura y col., 2009).

En el caso particular de películas híbridas de proteínas de quínoa y quitosano, se ha comprobado su interacción y formación de un complejo interpolimérico con características que responden a los requerimientos de un recubrimiento comestible con aplicación en vegetales mínimamente procesados; las proteínas de quínoa son capaces de generar una interacción a través de puentes de hidrogeno con los grupos amino protonados del quitosano. La combinación de ambos polímeros produce un efecto sinérgico en las propiedades mecánicas y adhesivas de las películas (Abugoch y col., 2011).

1.1. Antecedentes Generales

Desde que el hombre descubrió la necesidad de guardar alimentos en épocas de escasez, ha desarrollado las técnicas para su conservación (Kröhling, 2007). Durante muchos años se han estudiado películas comestibles, capaces de aumentar la vida útil de alimentos.

El creciente interés, de fomentar una tecnología más amigable con el medio ambiente, ha hecho que en la actualidad el estudio de películas (*films*) comestibles biodegradables se haya posicionado lo suficiente, como para abrir paso a un sin fin de investigaciones ligadas al tema, todo esto debido al gran potencial que tienen éstas para poder prolongar la vida útil de los alimentos frescos o mínimamente procesados manteniendo óptimas características organolépticas y mejorando la calidad e inocuidad, todo esto gracias a la variedad de materiales naturales y biodegradables que son posibles utilizar para su composición, y así poder desplazar en un futuro a los materiales sintéticos (Gontard y Guilbert, 1992; Bourtoom, 2008).

Si bien, muchas de las funciones con las que debe cumplir una película comestible son las mismas que las de un material sintético, existen otros requerimientos adicionales para las películas comestibles tales como; ser comestibles y con características sensoriales aceptables, poseer propiedades de barrera apropiadas (O_2 , vapor de agua, gases), buenas propiedades mecánicas de rigidez, elongación y adhesión, una estabilidad microbiológica, bioquímica y fisicoquímica adecuada, que sea inocua, que sea un buen medio para distintos aditivos (antioxidantes, saborizantes, colorantes), que las materias primas sean de bajo costo y que su tecnología de elaboración sea simple, entre otros (Villamán, 2007).

En los últimos 10 años, muchos programas de investigación se han enfocado en desarrollar más y más sofisticadas películas comestibles y recubrimientos (Denavi y col., 2009; Sebtí y col., 2007). Entre ellos, polímeros de polisacáridos como hidroxipropilmetilcelulosa y quitosano han sido particularmente estudiados (Hernández-Muñoz y col., 2008; Pérez y col., 2008; Dogan y McHugh, 2007).

Sin embargo, todavía es necesario mejorar las propiedades de barrera de las películas comestibles hidrofílicas, de las alternativas posibles es la incorporación de nanopartículas a la matriz polimérica.

1.2. Descripción General y Propiedades de la Quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)

1.2.1. Descripción General

La quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd) pertenece a la familia *Chenopodiaceae*, es considerada un pseudocereal, porque no pertenece a las familias de las gramíneas, a diferencia de los verdaderos cereales, pero, al igual que estos últimos produce semillas harinosas. Esta semilla proviene del sector altiplánico andino y de algunos países tropicales. También es fuertemente cultivada en los sectores salinos del sur de Bolivia y del Norte de Chile. Uno de los factores importantes de la semilla de quínoa es su alto contenido proteico y una composición aminoacídica que es mejor balanceada, que la mayoría de los cereales (Ogungbenle, 2003).

Se ha observado que la mayoría de las variedades de la semilla de quínoa presentan sabor amargo y poseen un cierto grado de toxicidad, lo cual se debe a la presencia de saponinas (glucósido triterpenoide) en el pericarpio, sin embargo, se eliminan, por lavado y fricción. El contenido de saponinas en la quínoa puede variar entre un 0 a un 6% dependiendo de la variedad. Las saponinas se ubican en la capa externa de la semilla, lo cual facilita su eliminación (Albarran, 1993; Vilche, 2003; Ruales y Nair, 1992; Comai y col., 2007; Silva, 2006; Rivera, 2006).

Como se muestra en el Anexo 1 la harina de quínoa tiene un alto contenido de proteínas con un buen balance de aminoácidos como se muestra en el Anexo 2 donde se puede observar la presencia de 16 aminoácidos de los cuales 10 son aminoácidos esenciales (Araneda, 2005). La harina de quínoa contiene 11,2 % de humedad, 13,5 % de proteínas, 9,5 % de fibra, 58,3 % de carbohidratos y 1,2 % de minerales (Ogungbenle, 2003).

1.2.2. Características fisicoquímicas y estructurales de las proteínas de quínoa (*Chenopodium Quínoa* Willd.)

Las proteínas de quínoa pueden ser uno de los ingredientes alimenticios más prometedores, capaces de complementar el contenido proteico de cereales o legumbres. Las fracciones proteicas principales en la quínoa son las albúminas y globulinas. Brinegar y Goudan (1993) encontraron que tal como otras globulinas 11S, la molécula chenopodina está conformada por subunidades que consisten AS y BS enlazadas por un enlace disulfuro. Además las bandas de las subunidades ácidas y básicas, aparece una banda de aproximadamente 54.0 kDa y algunos péptidos con un PM menor a 15 kDa. Los péptidos con PM menores a 20 kDa corresponden a los componentes de albúmina, según lo señalado por Brinegar y col., (1996).

1.2.3. Propiedades de Solubilidad y su Punto Isoeléctrico (pI)

Uno de los factores que influye en la solubilidad de las proteínas es el pH, y tiene relación con las modificación de la carga neta de éstas y por lo tanto con su balance electrostático; en la zona cercana a su punto isoelectrico (pI) la carga neta de las proteínas tiende a 0 y la variación de la solubilidad es mínima debido al aumento de la atracción entre las moléculas (Rivera, 2006; Silva, 2006; Abugoch y col 2008). El pI de las proteínas de quínoa estaría entre los pH 3 y 4, menor que el punto isoelectrico reportado para harina de quínoa, el cual es pH 6 (Oshodi y col., 1999; Ogungbenle, 2003). Los resultados de solubilidad encontrados para un aislado proteico de quínoa extraído a pH 11 fue de 41,4% a pH 11 (Silva, 2006) y menor al informado por Rivera (2006), para un aislado proteico de quínoa extraído a pH 9 donde el resultado fue de 94,6% a pH 11, pero concuerdan en que a pH alcalino se obtiene la mayor solubilidad, de igual manera coinciden con los resultados reportados para harina de quínoa en donde se reportó una solubilidad máxima a pH 10 de 50% y 45% (Ogungbenle, 2003; Oshodi y col., 1999).

1.3. Descripción General y Propiedades del Quitosano

1.3.1. Descripción General

La quitina es el polímero natural más abundante luego de la celulosa, con la que guarda similitudes estructurales y como ella, funciona naturalmente como un

polisacárido estructural, encontrándose en los exoesqueletos de crustáceos como cangrejos y camarones y en menor cantidad en la pared celular de hongos, bacterias, levaduras y en las cutículas de insectos. Es un polisacárido blanco, duro, inelástico y nitrogenado y constituye la mayor fuente de contaminación en las zonas costeras (Majeti y Kumar, 2000).

El quitosano (Q_0) es el derivado N-desacetilado de la quitina, con un grado de desacetilación no menor al 65% (Majeti y Kumar, 2000). La definición de la ASTM F2103-01 define al Q_0 como “*un polisacárido lineal constituido por unidades de GlcNAc y de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (GlcN, Glucosamina) unidas por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$* ”. La Figura 1.1 muestra la estructura de la quitina, el Q_0 y la celulosa.

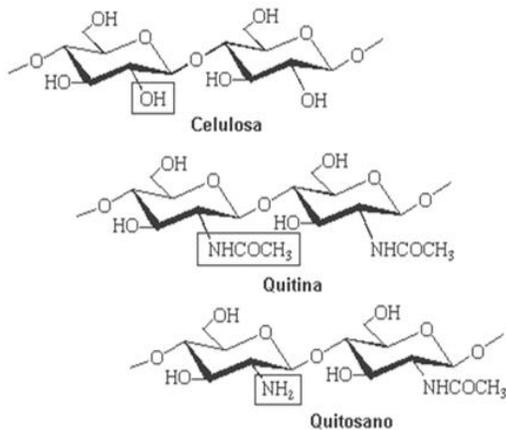


Figura 1.1. Estructura química de la celulosa, quitina y quitosano. En éste, las unidades desacetiladas se distribuyen azarosamente y deben estar presentes en un 65% como mínimo (Majeti y Kumar, 2000).

El Q_0 puede ser obtenido fácilmente a partir de la quitina Figura 1.2. En la Figura 1.3 se muestra un esquema simplificado de la obtención de quitina y Quitosano a partir de conchas de crustáceos.

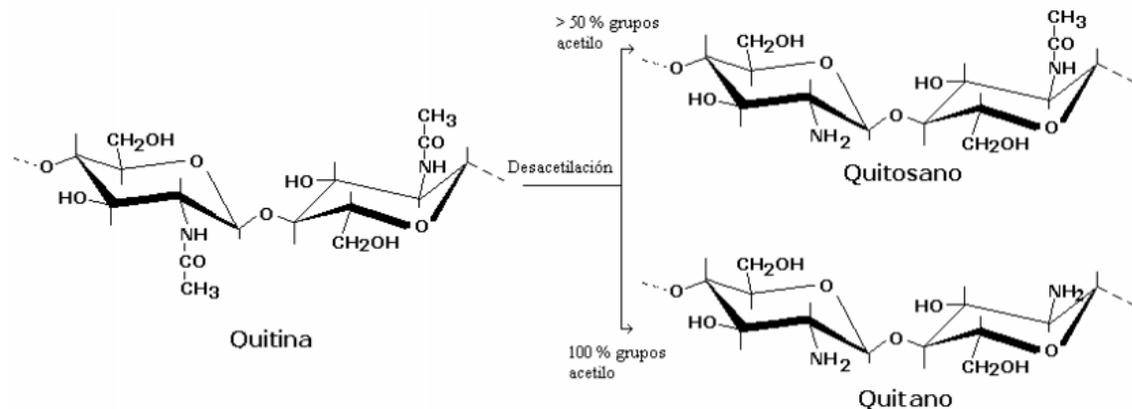


Figura 1.2. Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano.

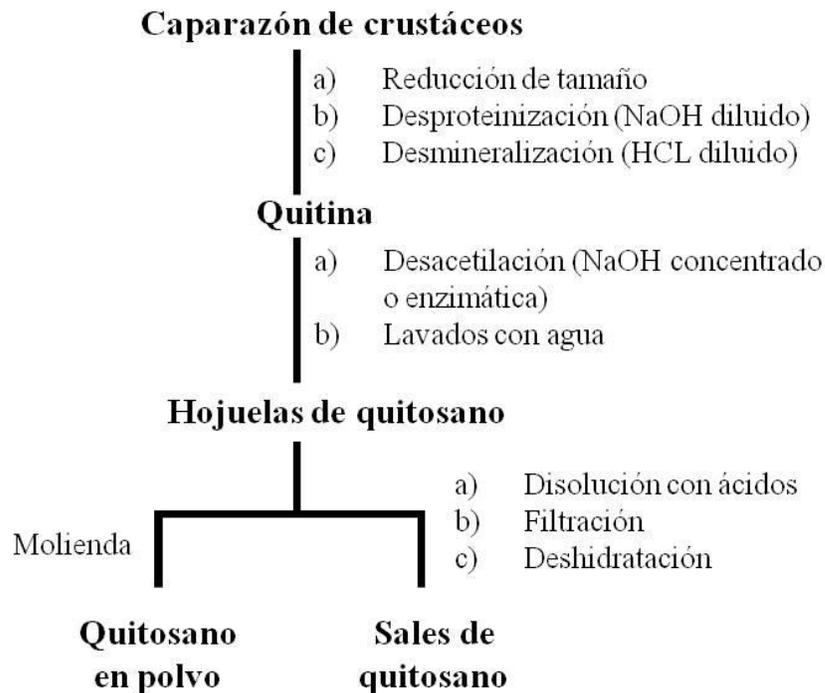


Figura 1.3. Esquema simplificado para la obtención de quitina y quitosano a partir de caparazón de crustáceo (Lárez, 2006).

El peso molecular del Q₀ varía entre 1×10^5 a $2,5 \times 10^6$ Da y es básico, con un pK_a aproximado de 6,3 (Majeti y Kumar, 2000). Es insoluble en agua, en ácidos concentrados, bases y los solventes orgánicos comunes, pero es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos. La solubilización del Q₀ se produce vía protonación de su grupo amino libre en ambientes ácidos y permanece en solución hasta un pH

cercano a 6,2 después del cual comienza a formar precipitados similares a geles hidratados (Chenite y col., 2000).

El Q_0 es un copolímero catiónico no ramificado que puede ser modificado químicamente con el fin de alterar sus propiedades físicas y químicas. Es posible la modificación química del grupo amino y de los hidroxilos primario y secundario.

Derivatizaciones posibles incluyen su entrecruzamiento, eterificación, esterificación y copolimerización (Lloyd, 1998) y debido a esta versatilidad ha encontrado muchas aplicaciones tecnológicas y biomédicas, y esto debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, biodegradación y bioactividad (Majeti y Kumar, 2000). Más aún, el Q_0 es un material abundante, renovable y su producción es de bajo costo y de interés ecológico (Berger y col., 2004).

El término Q_0 es en realidad una denominación general para la quitina desacetilada que difieren en el peso molecular y en el grado y sitios de desacetilación. Los métodos de producción y el origen son los principales responsables de estas diferencias y por tanto, la caracterización física y química del Q_0 es fundamental debido a que estos parámetros están relacionados con la funcionalidad (Chatelet y col., 2001).

1.3.2. Formación de películas

El Q_0 puede ser solubilizado en soluciones diluidas de ácidos minerales como el clorhídrico o ácidos orgánicos como el acético, láctico y cítrico. Una vez disueltos, los *films* de Q_0 se forman simplemente mediante la evaporación del solvente. Esta capacidad se debe a la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares en las cadenas de Q_0 (Ritthidej y col., 2002).

El quitosano posee actualmente un sin fin de aplicaciones en diversas áreas. En lo concerniente a la industria alimentaria, posee probados efectos antimicrobianos, por lo que se han realizado múltiples estudios en relación a esta propiedad (Lárez, 2003).

El quitosano, en su calidad de polímero formador de películas comestibles biodegradables, es mirado como una potencial alternativa para reemplazar al plástico como medio de empaque, lo que sin duda, se traduce en un mayor cuidado al medio ambiente (Hoyos, 1997).

Por otra parte, el quitosano es un biopolímero que forma películas con excelentes propiedades mecánicas, adhesivas y de permeabilidad, además de poseer propiedades antimicrobianas (Peh y col., 2000).

Las películas de quitosano son transparentes, firmes y algo flexibles y de buena barrera al oxígeno y se forman por moldeo de solución acuosa. Las películas basadas en quitosano protegen los alimentos de la degradación por hongos y modifican la atmósfera de frutos frescos (Sebti y col., 2005).

El quitosano ha sido muy utilizado en mezclas como coacervatos con otros polímeros como los hidrocoloides como el alginato, o con las proteínas como suero de leche, quínoa; las mezclas tienden a buscar otras propiedades mecánicas y de barrera para que sean adecuados para el uso en alimentos. Al combinar el quitosano con proteínas se ha visto que el porcentaje de elongación se ve fuertemente influenciado aumentando en más de un 100%. Estos diferentes comportamientos encontrados para quitosano en mezclas determinarán la forma en que se liga al agua lo que afectará el comportamiento mecánico y de permeabilidad de las películas. Con el objeto de formar un complejo polielectrolito, ambos polímeros tienen que estar ionizados y presentar sus cargas opuestas (Tapia, 2005; Tapia y col., 2005).

La aplicación de recubrimientos de quitosano se ha utilizado para aumentar la vida útil de diversas frutas como: peras, naranjas, melocotón y ciruelas como barrera para el CO₂ y O₂. Las coberturas de quitosano se han aplicado también en las semillas de trigo con el fin de incrementar la producción en el cultivo (Hoyos, 1997). Existen también estudios relacionados a la efectividad de las películas basadas en quitosano aplicadas a frambuesas, éstas son altamente perecibles debido a su alta tasa de respiración y su vulnerabilidad al ataque de hongos, el estudio fue desarrollado por Han y col. (2005)

quienes presentaron resultados favorables al aplicar películas de solución de quitosano al 1% en frambuesas.

1.3.3. Propiedades Antimicrobianas

El Q_o inhibe el crecimiento de una gran variedad de hongos, levaduras y bacterias. En soluciones diluidas de ácidos las cargas positivas del Q_o interactúan con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas de la superficie celular de los microorganismos presumiblemente en competencia con el Ca²⁺ por los sitios electronegativos de la membrana, pero sin conferir estabilidad dimensional, lo que compromete la integridad de la membrana produciendo entonces su debilitamiento (Bégin y Van Calsteren, 1999). Debido a esta habilidad de formar *films* comestibles o biodegradables activos (Arai y col., 1968), se puede esperar que el recubrimiento con Q_o limite la contaminación en la superficie de los alimentos (Sebti y col., 2005).

Según un estudio sobre la influencia del Q_o como recubrimiento bioactivo sobre la contaminación con *Aspergillus niger*, demuestra que los *films* y recubrimientos en base a Q_o ofrecen grandes ventajas en la prevención del crecimiento de *A. niger* en la superficie de los alimentos, incluso a muy bajas concentraciones de Q_o (Sebti y col., 2005). En este estudio evaluó la actividad antimicrobiana en medio de Agar Sabouraud y en medio líquido sabouraud donde demostró que una solución de quitosano al 1% obtuvo un 100% de inhibición sobre *Aspergillus niger*, el que fue previamente inoculado en medio de Agar sabouraud en diferentes concentraciones desde 100 a 10.000 esporas e incubado 5 días a 30°C.

1.3.4. Biodegradación

Es deseable que los biopolímeros sean biodegradables y que no generen productos dañinos como resultado de su degradación (Jagur-grodzinski, 1999). Varios estudios han demostrado que la quitina y el Q_o son polímeros que se biodegradan in vivo debido a su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática de los enlaces β(1→4) mediada por lisosima, enzima omnipresente en el organismo humano. Sus productos de degradación son oligosacáridos o monosacáridos, metabolitos naturales que son luego

absorbidos y pueden ser incorporados a las rutas metabólicas de glicosaminoglicanos o glicoaminoproteínas, o bien, excretados (Chatelet y col., 2001).

1.3.5. Films Comestibles

Los recubrimientos y *films* han sido usados por muchas décadas para proteger a los alimentos del ataque microbiológico y para prevenir la pérdida de agua durante el almacenamiento. El gran interés que han mostrado los consumidores de esta generación por la calidad de los alimentos que están consumiendo ha intensificado la investigación en esta área. El desarrollo de envases sintéticos se justifica debido a su eficiencia para reducir la transferencia de masa entre el alimento y el medio donde se encuentra almacenado, para esto ha sido necesaria la determinación de la permeabilidad. El constante mejoramiento de los envases sintéticos, tales como la resina, celulosa y *films* plásticos, han permitido el uso del composite (copolímero) y/o envases de *films* multilaminados, los que son capaces de reducir en forma selectiva la transferencia tanto de gases como de solutos (Debeaufort, 1998).

Sin embargo, la conveniencia del uso de *films* plásticos no es universal. La combinación de envases sintéticos y comestibles fue propuesta para así incrementar la eficiencia en la preservación de la calidad de los alimentos en el envasado. Por otro lado, los envases comestibles no contaminan ya que están compuestos por sustancias biodegradables naturales. Por lo tanto, contribuyen a la protección del medio ambiente (Debeaufort, 1998).

Muchas materias primas de origen biológico, incluyendo polisacáridos, proteínas, y lípidos, solos o en mezclas, han sido propuestas para la preparación de *films* comestibles o recubrimientos (Viroben y col., 2000).

Los polisacáridos (almidón, carragenatos, pectina, quitosano), son capaces de formar una matriz estructural, algunos de estos también funcionan como plastificantes y en cuanto a la permeabilidad, las películas elaboradas con polisacáridos generalmente presentan buenas barreras a la humedad y propiedades mecánicas moderadas. Las proteínas (colágeno, gelatina, gluten de trigo, aislados proteicos de soya, proteínas de

la leche), presentan barreras más débiles que los polisacáridos al vapor de agua pero por otro lado desarrollan muy buenas propiedades de barrera al oxígeno y propiedades mecánicas que son muy favorables para recubrir alimentos. Por último, los lípidos (acetoglicéridos, ceras, surfactantes) son de gran ayuda para proteger al alimento.

Algunos pocos estudios recientes se han enfocado en optimizar las condiciones bajo las cuales se elaboran los *films* para así mejorar sus propiedades mecánicas (deformación, resistencia a la ruptura, adhesividad) y de barrera. Para las aplicaciones tanto de envasado como de recubrimiento, el control de la permeabilidad al agua y al gas (oxígeno y dióxido de carbono) ha sido una característica que tiene mucha influencia en la estabilidad de los alimentos durante el almacenamiento (Viroben y col., 2000).

Siendo las recién mencionadas unas de las principales propiedades con las que debe cumplir un *film* o recubrimiento, existen otras características funcionales de suma importancia con las que también debiera cumplir este tipo de envase tales como: características sensoriales aceptables, estabilidad microbiológica, bioquímica y fisicoquímica adecuadas, que sea inocua, que sea un buen medio para la adición de distintos aditivos (antioxidantes, saborizantes, colorantes) si fuese necesario. Y en lo técnico-económico, que las materias primas sean de bajo costo y que su tecnología de elaboración sea simple, entre otras.

Como ya se sabe, los materiales elaborados en base a quitosano, pueden ser utilizados en la elaboración de *films* comestibles debido a su propiedad única de aumentar significativamente su viscosidad a medida que se va hidratando. Además, los *films* de quitosano son firmes, elásticos, flexibles y muy difíciles de romper. La mayoría de las propiedades mecánicas son comparables a aquellas correspondientes a muchos de los polímeros comerciales de fuerza media (Jeon y col., 2002).

Se ha demostrado que los *films* de quitosano tienen una permeabilidad moderada al vapor de agua y ayuda a incrementar la vida útil de productos alimenticios frescos que tienen una alta actividad de agua (*aw*) (Kittur y col., 1998).

En cuanto a los *films* comestibles elaborados en base a proteínas de la quínoa se espera que sean un aporte en la elaboración de *films* comestibles ya que películas hechas con proteínas enriquecidas con globulinas principalmente del tipo 11S como las que posee la quínoa, estabilizadas por puentes disulfuro, permite que las proteínas, al momento de evaporar el solvente polimericen y formen películas con mejores propiedades mecánicas debido a los enlaces covalentes de mayor energía que se pueden establecer en este tipo de proteínas al aplicar temperatura y permitir su polimerización (Gennadiós, 1990; Castimpolas, 1971; Cao y Chang, 2002; Choi y Han, 2002).

1.4. Nanopartículas

1.4.1. Nanopartículas constituidas por quitosano

El estudio de nanopartículas es completamente multidisciplinario y los resultados de cada investigación pueden ser aplicados rápidamente para mejorar productos existentes (Weitz y col., 2008; Clapper y col., 2008; Kowalczyk y Holyst, 2008).

Se ha descrito la formación de nanopartículas de quitosano, dado que posee la habilidad de gelificar espontáneamente al contacto de polianiones polivalentes mediante la formación de entrecruzamientos intramoleculares mediante estos polianiones. Entre alguno de los polianiones investigados el tripolifosfato es el más popular debido a que no es tóxico y su capacidad de gelificar rápidamente (De Moura y col., 2009). Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo *bottom-up* como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente (Goycoolea y col., 2009).

1.4.2. Principio de gelificación iónica del quitosano utilizando tripolifosfato de sodio

El mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas de quitosano-TPP plantea que la gelificación ionotrópica del quitosano ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), con los grupos $-NH_3^+$ del quitosano. Las nanopartículas Q-TPP son de gran

atractivo ya que son promisorios transportadores para la entrega de macromoléculas (Goycoolea y col., 2009).

2. HIPÓTESIS

Es posible obtener nanopartículas de quitosano-tripolifosfato e incorporarlas en una película comestible de quitosano-quínoa y formar una matriz que genere películas comestibles con propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua que permitan su posterior aplicación a la conservación de alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Obtener nanopartículas de quitosano-tripolifosfato, para luego poder incorporarlas en películas de quitosano-quínoa y generar nanopelículas comestibles.

3.2. Objetivos específicos

Incluir las nanopartículas de quitosano-tripolifosfato en la matriz de las películas comestibles definidas por Villamán (2007) con algunas modificaciones.

Determinar cuál es la concentración adecuada de nanopartículas para incluir dentro de la matriz de las películas comestibles.

Evaluar las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua y condiciones de secado en las distintas películas.

4. MATERIALES

4.1. Materiales

4.1.1. Materia Prima

- Harina de quínoa proveniente de la VI Región Chile, Cooperativa Las Nieves Paredones
- Quitosano Sigma, 637 kDa, 77,2% GA (películas)
- Quitosano Aldrich de bajo peso molecular 269 kDa, 78% GA (nanopartículas)
- Tripolifosfato Merck
- Ácido cítrico anhidro

4.1.2. Insumos y Utensilios

- Agua destilada
- Cápsulas de aluminio
- Copas de vidrio
- Cubetas de plástico
- Espátulas
- Frascos de vidrio
- Gradilla
- Magnetos
- Material de vidrio de laboratorio
- Micropipetas
- Papel filtro Whatman n°1
- Parafilm
- Pinzas
- Placas de polietileno de baja densidad (13,7 cm diámetro)
- Potes plásticos
- Tubos Ependorf
- Tubos para centrífuga

5. MÉTODOS

5.1. Preparación del extracto proteico de quínoa (*Chenopodium Quínoa* Willd.) (EAP)

Harina de quínoa sin desgrasar fue suspendida en agua en una proporción de 1:7,5, la cual fue llevada a pH 11 con NaOH 5M y agitada durante 1 hora, posteriormente esta suspensión fue centrifugada a 21.000 x g por 30 minutos a 15°C. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas en este extracto a través de Bradford (Bradford, 1976).

5.2. Preparación de nanopartículas de quitosano-tripolifosfato (nQTPP)

Se usó el método de Calvo (Calvo y col., 1997) con ciertas modificaciones. Se prepararon soluciones de quitosano al 1,5% p/v (Aldrich) en una solución de ácido acético glacial a 3,0 mg/mL. Se prepara una solución de tripolifosfato de sodio a 1,0 mg/mL con una jeringa se gotea la solución de quitosano en la solución de TPP (5 mL de Q/2 mL de TPP). Separar la suspensión por centrifugación a 21.000 x g a 14°C por 30 min (centrifuga Hermle modelo Z32K). Se liofilizan las nanopartículas durante 48 h. (Liofilizador modelo liph lock 4.5, T° de trabajo -55 °C) y se almacenan a una temperatura de 4-8° C para luego moler en mortero y tamizar por malla 100 (Früfsigb DNI 4188).

5.3. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Para la determinación del tamaño de nanopartícula de quitosano obtenido, se utilizó TEM, para ello se analizaron suspensiones de nQTPP en una grilla de cobre en un equipo Philips Tecnai 12 Bio Twin.

5.4. Determinación del espesor de los *films*

El espesor de los *films* [mm] fue determinado usando 10 repeticiones para cada mezcla, promediando los resultados de 9 puntos medidos en cada *film* utilizando un micrómetro digital (Micrómetro modelo E5010109, VETO &Co.).

5.5. Preparación de películas de quitosano

Soluciones de quitosano (Sigma) al 2% se mezclaron en volúmenes iguales con soluciones de ácido cítrico 0,1 M cargada con nQTPP. Las nQTPP se agregaron en polvo en la solución de ácido cítrico. La cantidad agregada de nQTPP (0,1 y 8 % p/p) se basó en la cantidad de quitosano en la mezcla. Luego la mezcla así preparada se moldeó en placas de petri las que se secaron hasta peso constante a 50°C, siendo posteriormente acondicionadas a 23 °C y 60% de humedad relativa previas a su uso.

5.6. Preparación de películas de quitosano-extracto acuoso proteico de quínoa

Soluciones de quitosano (Sigma) al 2% se mezclaron en volúmenes iguales con EAP y esta mezcla fue llevada a pH 4 con NaOH 1M en agitación constante. La cantidad agregada de nQTPP (0 y 1 % p/p) se basó en la cantidad de quitosano en la mezcla. Luego la mezcla así preparada se moldeó en placas de petri las que se secaron hasta peso constante a 50°C, siendo posteriormente acondicionadas a 23 °C y 60% de humedad relativa previas a su uso. (Abugoch y col.; 2011)

5.7. Procedimiento de adición de nQTPP en películas de quitosano-extracto acuoso proteico de quínoa

Para la adición en polvo, se incorporaron las nQTPP directamente sobre la mezcla quitosano-EAP. Mientras que para la adición en solución por cada 100 mL de solución quitosano-EAP se disolvieron previamente las nQTPP en 2 mL de ácido cítrico 0,1 M las cuales se agregaron a la solución quitosano-EAP.

5.8. Obtención de la curva de secado de los *films*

La determinación de la cinética de secado, se realizó por duplicado a las soluciones formadoras de *films*. Éstas se dispusieron en placas circulares de polietileno de baja densidad de diámetro 13,7 cm y se sometieron a secado constante a 50°C, determinando el peso de las placas cada 10 minutos hasta peso constante, tiempo en el cual se sacaron los *films* de la estufa (Estufa Heraeus modelo UT6200). Las humedades iniciales (X_0) y de equilibrio (X_{eq}) se determinaron según el método

descrito por la AOAC, 1995. Los parámetros de la cinética de secado, se muestran en la siguiente Tabla 5.1.

TABLA 5.1. Descripción de los parámetros en la cinética de secado de las soluciones formadoras de *films*.

Parámetro	Descripción	Unidad
X ₀ (b.s)	Humedad inicial en base seca	[g H ₂ O/g ss]**
X _c (b.s)	Humedad crítica en base seca	[g H ₂ O/g ss]
X _{eq} (b.s)	Humedad de equilibrio en base seca	[g H ₂ O/g ss]
N	Velocidad de secado	[g/(min × cm ²)]
N _c	Velocidad de secado constante	[g/(min × cm ²)]
Θ	Tiempo de secado	[min]
Θ _c	Tiempo de secado a N _c	[min]
Def	Difusividad efectiva	[cm ² /min]

** g ss = gramos sólido seco

Se procedió a construir curvas de secado $\left(\frac{\partial X}{\partial \theta}\right)$ y $\left(\frac{\partial N}{\partial X}\right)$ para así observar como es la cinética de secado de los *films* y poder compararlas. Se utilizó para graficar el programa Origin Pro 8®.

La ecuación que determina la velocidad de secado N [g /min x cm2] es la siguiente:

$N = \frac{-Ls}{A} \left(\frac{\partial X}{\partial \theta} \right)$	Ls = Masa de Sólido Seco	Ecuación 5.1.
	A = Área de Secado	
	∂X = Pérdida de Humedad	
	∂θ = Tiempo	

Una cinética de secado está conformada por distintos períodos y se comporta según lo demuestra la Figura 5.1.

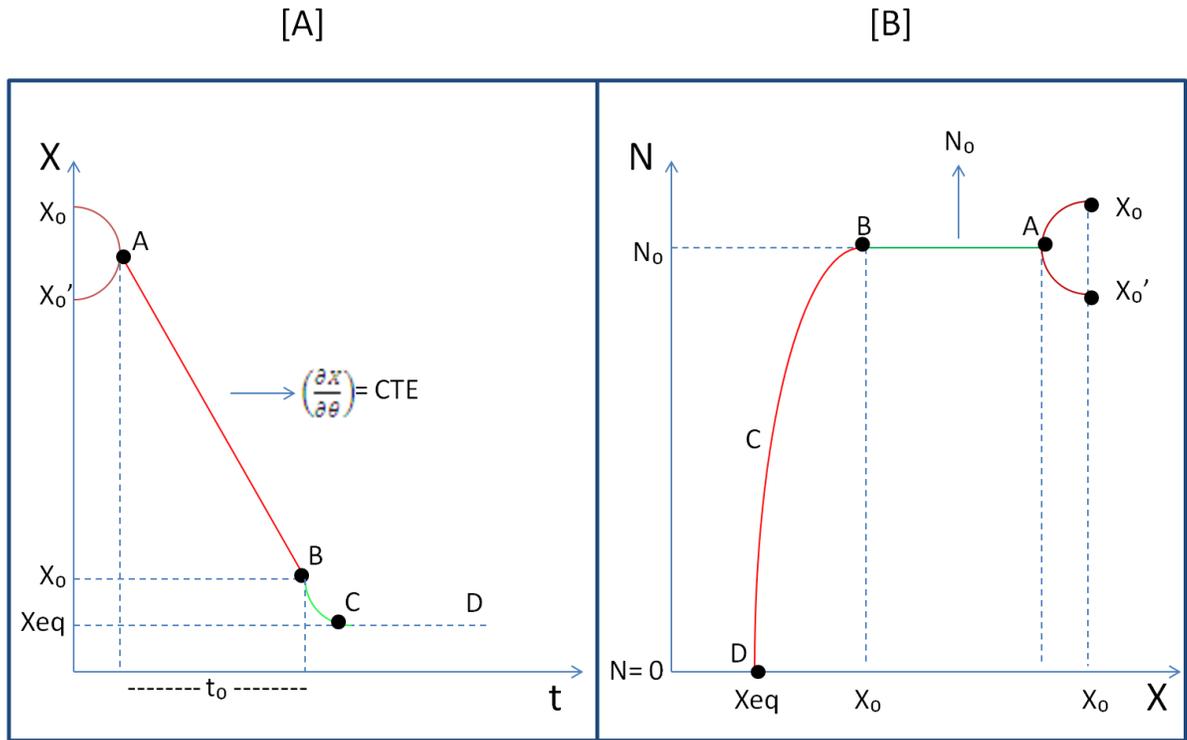


Figura 5.1. Gráfico [A] $\left(\frac{\partial X}{\partial \theta}\right)$ y [B] $\left(\frac{\partial N}{\partial X}\right)$ de la cinética de secado.

Donde el periodo $X_0, X_0'-A$, es el período de “estabilización”, donde las condiciones de la superficie del sólido se equilibran con las del aire de secado. Con frecuencia esta fase constituye una proporción despreciable del ciclo total de secado, pero en algunos casos puede ser significativa.

Periodo A-B, este período se denomina de velocidad constante ya que su gradiente $N = \left(\frac{\partial X}{\partial \theta}\right) = \text{Cte}$, durante esta fase la superficie del sólido se mantiene saturada de agua líquida debido a que el movimiento del agua desde el interior del sólido a la superficie ocurre a la misma velocidad que la de evaporación en la superficie. El secado tiene lugar por movimiento del vapor de agua desde la superficie saturada, a través de una delgada capa de aire estático, hasta la corriente principal de aire de secado. Durante esta fase la velocidad de secado es dependiente de la velocidad de transferencia de

calor a la superficie de secado. La velocidad de transferencia de masa se equilibra con la velocidad de transferencia de calor de forma que la temperatura de la superficie de secado se mantiene constante.

Periodo B-D, al avanzar el secado se alcanza un punto en el que la velocidad de movimiento de la humedad desde el interior del producto hasta la superficie se reduce en grado tal que la superficie comienza a secarse. En dicho punto (B), la velocidad de secado comienza a descender, iniciándose el período de velocidad decreciente. El contenido de humedad del producto en el punto B se denomina contenido crítico de humedad (X_c). A partir del punto B la temperatura de la superficie comienza a elevarse, elevación que persiste durante el secado, hasta aproximarse a la temperatura de bulbo seco del aire cuando el producto se ha desecado casi totalmente. El secado se interrumpe al llegar al punto D que es cuando alcanza X_{eq} . Este período de velocidad decreciente puede dividirse en dos partes (B-C y C-D), con diferentes comportamientos de la velocidad de secado, la cual decrece cada vez más al disminuir la humedad del sólido. Esto implica dos modelos de secado diferente en dicha zona.

Es en esta etapa (período decreciente de secado), donde se puede realizar el cálculo de Difusividad efectiva (D_{ef}), ya que se asume que la humedad fluye por difusión a través del sólido.

La siguiente ecuación muestra la segunda Ley de Fick, donde es posible obtener modelos semi-empíricos para determinar el coeficiente de difusión efectivo (D_{ef}).

$\frac{dX}{dt} = D_{ef} \frac{\partial^2 X}{\partial x^2}$	Ecuación 5.2.
--	----------------------

Considerando que la distribución inicial de humedad es uniforme ($X = X_o$ en $t = 0$) y que la superficie está en equilibrio con el medio de secado, ($X = X_e$ en $X = \pm L/2$) la ecuación 5.2 se integra:

$\frac{X - X_e}{X_o - X_e} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{2n + 1} e^{\left(- (2n+1)^2 \frac{\pi^2 D_{ef} t}{L^2}\right)}$	Ecuación 5.3.
---	----------------------

Una simplificación usual es utilizar una solución asintótica de la ecuación anterior (5.3), que consiste en reducir la serie infinita al primer término, debido a que los términos superiores se hacen muy pequeños para tiempos largos:

$\frac{X - X_e}{X_o - X_e} = \frac{8}{\pi^2} e^{\left(- \frac{\pi^2 D_{ef} t}{L^2}\right)}$	X = Contenido de humedad [kg de agua/kg de sólido seco, base seca]	Ecuación 5.4.
	Xe = Contenido de humedad de equilibrio [kg de agua/kg de sólido seco, base seca]	
	Xo = Contenido de humedad inicial [kg de agua/kg de sólido seco, base seca]	
	D _{ef} = Difusividad efectiva [m ² /s]	
	t = Tiempo [s]	
	L = Espesor de la placa [m]	

Luego, el valor de D_{ef} fue calculado por la pendiente de la curva ln((X - X_e)/(X_o - X_e)) versus tiempo (t) (Mc Cabe y col, 1985).

5.9. Determinación del grado de transmisión de vapor de agua (TVA)

El ensayo se realizó de acuerdo con la Norma Chilena Oficial NCh2098.Of2000, equivalente a las normas ASTM D1653-93 y DIN 52615, utilizando el método de la copa húmeda.

Las copas se llenaron con agua destilada hasta alcanzar una distancia de 6 mm medidos desde el borde superior, sobre el cual se montó el *film* de igual diámetro. Finalmente se sellaron con silicona los bordes de contacto entre el *film* y la copa (Fig. 5.2).

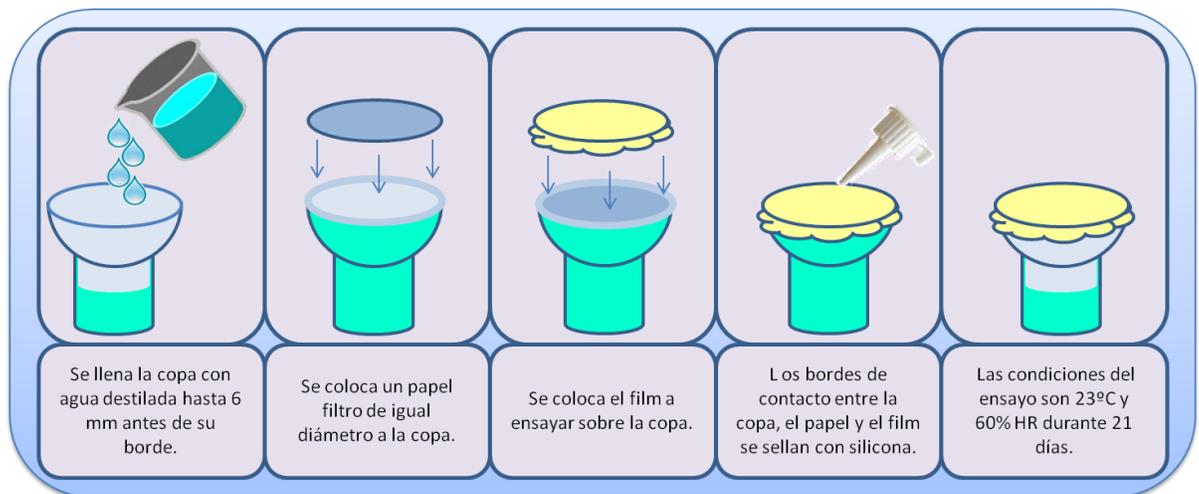


Figura 5.2. Sistema de medición del TVA.

Las copas se colocaron en una cámara de temperatura y humedad (LabTech, modelo LHT-0150E) a 60% HR y 23°C y por un periodo de 21 días se registró cada 24 horas su cambio de peso utilizando una balanza electrónica (Radwag, modelo WTB 3000).

Para el cálculo del TVA se graficó la pérdida de masa de las copas en función del tiempo transcurrido. La pendiente de la porción lineal de este gráfico que mejor se ajustó a una recta (coeficiente de regresión, r^2 cercano a 1) representó la estabilización de la difusión de vapor de agua a través de los *films* por unidad de tiempo (g/hr), que luego se normalizó por el área de los *films* utilizados. El valor obtenido es el TVA de

los *films* ensayados, que se expresó entonces como los gramos de agua evaporados por hora y por unidad de área del *film* (ecuación 5.5).

$TVA = \frac{\Delta m}{t \times \dot{A}}$	$TVA = \text{Grado de transmisión de vapor de agua}$ $[g/(m^2 \times h)]$	Ecuación 5.5.
	$\Delta m = \text{Cambio de masa ocurrido en el tiempo } [g]$	
	$t = \text{Tiempo entre lecturas } [h]$	
	$\dot{A} = \text{Área de ensayo de la muestra } [m^2]$	

Estudios realizados por Hu y col. (2001) relacionados con el método de la copa húmeda demostraron que el TVA de *films* poliméricos de pequeño espesor y con TVA moderados a altos depende del espesor y del área expuesta de los *films* en estudio. Debido a que el área de los *films* ya se considera dentro de la fórmula para el cálculo del TVA, sólo se necesita corregir multiplicándolo por el espesor, obteniendo entonces el Grado de Transmisión de Vapor de Agua Específico, TVA_{ε} , con unidades de $(mmgm^2hr^{-1})$ (ecuación 5.6).

$TVA_{\varepsilon} = \frac{\Delta m}{t \times \dot{A}} \times \varepsilon$	$TVA_{\varepsilon} = \text{Grado de transmisión de vapor de agua}$ $[(mm \times g)/(m^2 \times h)]$	Ecuación 5.6.
	$\Delta m = \text{Cambio de masa ocurrido en el tiempo } [g]$	
	$t = \text{Tiempo entre lecturas } [h]$	
	$\dot{A} = \text{Área de ensayo de la muestra } [m^2]$	
	$\varepsilon = \text{Espesor de los } \textit{films} [mm]$	

Además se calculó la Permeabilidad al vapor de agua que es la cantidad de vapor (g) que pasa por una unidad de superficie (m^2) de un *film* con cierto espesor (mm) por unidad de tiempo (día=d) cuando entre sus paredes existe una diferencia de presión unitaria (kPa) (ecuación 5.7).

$PVA = \frac{TVA\varepsilon}{\Delta p}$	$PVA = \text{Permeabilidad al vapor de agua}$ $[(mm \times g)/(kPa \times d \times m^2)]$	Ecuación 5.7.
	$\Delta p = S (R_1 - R_2)$	
	$S = \text{Presión de saturación de vapor de agua a la}$ $\text{temperatura del ensayo [kPa]}$	
	$R_1 = \text{Humedad relativa \% de la parte con mayor presión}$ de vapor.	
	$R_2 = \text{Humedad relativa \% de la parte con menor presión}$ de vapor.	

5.10. Determinación de las propiedades mecánicas

Se evaluaron el alargamiento porcentual (A%) y el esfuerzo de tracción en el corte (ETR) en Nmm^{-2} , de acuerdo con la Norma Oficial Chilena NCh1151.Of1976, equivalente a la norma internacional ISO R1184-1970, con algunas modificaciones que se detallarán a continuación.

Se utilizaron al menos 4 *films* de cada material con dimensiones de 10 mm de ancho y 50 mm de largo. Las mediciones se realizaron en la máquina universal de ensayo de materiales (Lloyd Instruments Limited, Lloyd LR- 5K. Hampshire, England), con una celda de 5 kN.

Los *films* fueron puestos entre dos mordazas de aluminio separadas por una distancia de 3 cm, diseñadas para las mediciones de acuerdo a la norma ASTM, instaladas en la máquina universal de ensayo de materiales. Se apretaron las mordazas firme y uniformemente para evitar que los *films* se deslizaran durante los ensayos. Los *films* fueron traccionados por la mordaza superior a una velocidad de 20 mm/min. Se registró la curva Carga vs. Alargamiento hasta el punto de ruptura de los *films* (Fig. 5.3).

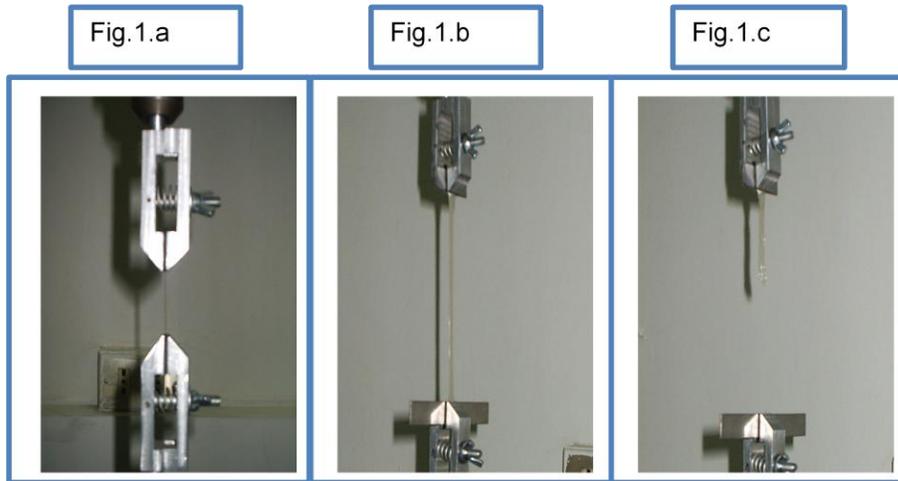


Figura 5.3. (a) Secuencia del análisis al comienzo de la medición (a), antes de su ruptura (b) y una vez provocada la ruptura (c).

Se calcularon el A% y el ETR de acuerdo con las ecuaciones 5.8, 5.9 y 5.10 al momento de producirse el corte del *film* con los datos entregados por el software de control del analizador de textura. Los *films* para los cuales la ruptura se produjo en las mordazas o se originó por un defecto evidente se descartaron y fueron reemplazados por otros.

$A\% = \frac{Df - Di}{Di} \times 100$	$A\%$ = Alargamiento porcentual	Ecuación 5.8.
	Df = Distancia de alargamiento hasta la ruptura [mm]	
	Di = Distancia inicial entre las líneas de referencia [mm]	

$ETR = \frac{C}{A_R}$	ETR = Esfuerzo de tracción en la ruptura [N/mm^2]	Ecuación 5.9.
	C = Carga máxima en la ruptura del <i>film</i> [N]	
	A_R = Área transversal inicial del <i>film</i> [mm^2]	

$A_R = \varepsilon \times A$	$A_R = \text{Área transversal inicial del } film \ [mm^2]$	Ecuación 5.10.
	$\varepsilon = \text{Espesor del } film \ [mm^2]$	
	$A = \text{Ancho del } film \ [mm^2]$	

En la Figura 5.4 se diagraman aquellos puntos importantes en el cálculo de las propiedades mecánicas descritas en este trabajo. El ETR se calcula dividiendo la fuerza máxima en el corte por el área de la sección transversal inicial de los *films*. El A% se calcula dividiendo el alargamiento máximo en la ruptura por el largo inicial del *film*.

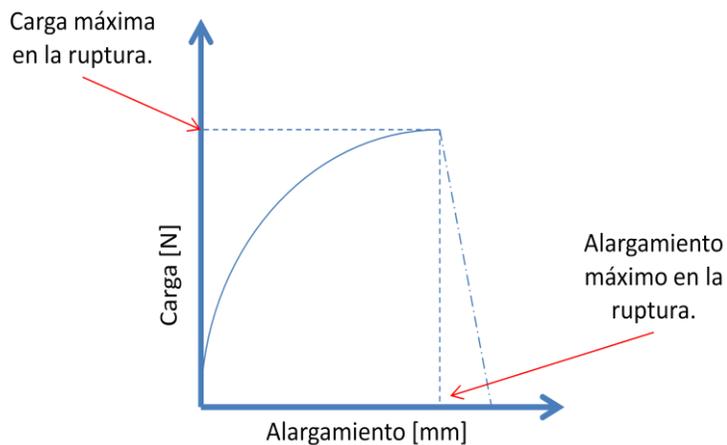


Figura 5.4. Diagrama del gráfico Carga vs. Alargamiento, del que se obtuvieron los datos de las propiedades mecánicas de los *films*.

5.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza ($P < 0.05$) y se empleó la prueba de Tuckey para la comparación de medias. Se utilizó el programa estadístico Origin Pro 8®.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Contenido de proteínas en el extracto acuoso proteico

El contenido proteico obtenido para los extractos acuosos a pH 11 fue de $6,3 \pm 0,1$ mg/mL, valor que fue mayor al obtenido por Abugoch y col. (2011) cuando obtienen los extractos a pH 9. Este resultado está señalando que el pH es un factor determinante en la cantidad de proteínas que se extrae, aumenta su rendimiento, lo cual es positivo ya que permitiría hacer más eficiente la extracción de las proteínas.

6.2. Caracterización de nanopartículas mediante TEM

Una vez obtenidas las nanopartículas de quitosano de acuerdo a lo descrito en el ítem 5.2 se procedió a determinar su tamaño a través de TEM. Como se puede observar en la Figura 6.1 Se formaron nanopartículas de 73 ± 9 nm. La forma que presentaron las nQTPP fue esférica. Los resultados obtenidos son similares a los descritos por Calvo (1997) y De Moura y col. (2009). Por lo tanto estas nanopartículas son las que se incorporaron en las películas que se describen más adelante.

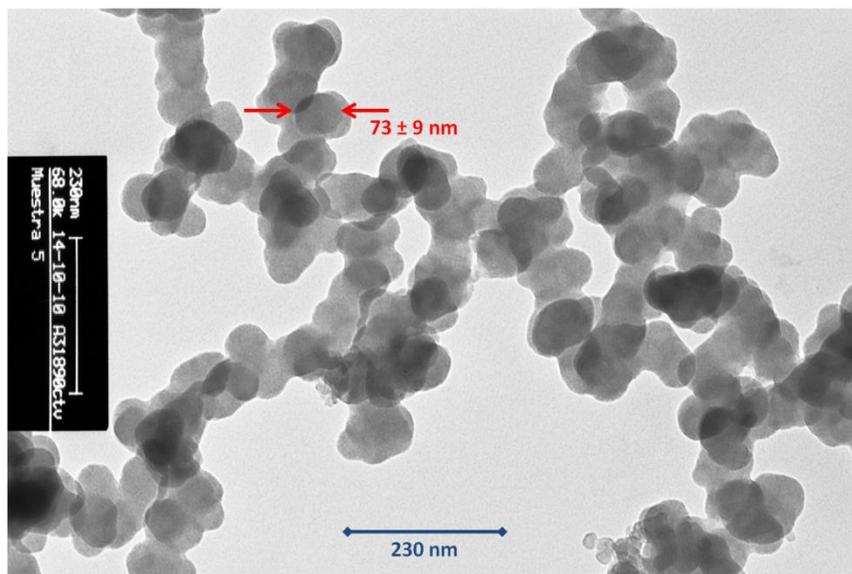


Figura 6.1. TEM de nanopartículas de quitosano-tripolifosfato. (quitosano [1,5% p/v] ; tripolifosfato [5 mL quitosano/ 2mL tripolifosfato])

6.3. Determinación de los parámetros de secado de los *films*

La Figura 6.2 muestra curvas de secado $\left(\frac{\partial X}{\partial \theta}\right)$ para la adición de nTPP1% tanto en la película monocomponente como en la binaria, se puede observar que tanto las películas monocomponente como las binarias presentaron un comportamiento típico de una cinética de secado.

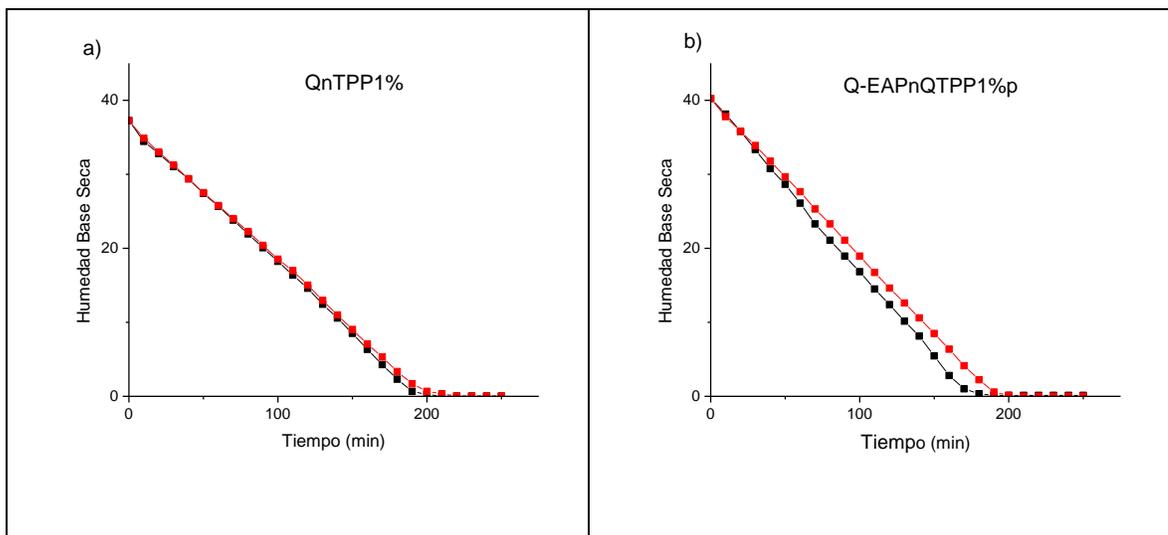


Figura 6.2. (a) Curva de Secado $\left(\frac{\partial X}{\partial \theta}\right)$ en duplicado para la película de quitosano con la adición de nTPP1%. (b) Curva de Secado $\left(\frac{\partial X}{\partial \theta}\right)$ en duplicado para la película de quitosano y extracto acuoso proteico con la adición de nTPP1%.

Tal como se explica en la sección 5.8 se diferenciaron las diferentes etapas de secado, como lo son el período constante y decreciente de secado, siendo este último el que se tomó en cuenta para calcular el coeficiente de difusividad efectiva (D_{ef}), ya que es en esta etapa donde el agua difunde a través del sólido y deja de evaporarse desde la superficie como ocurre en la etapa constante de secado (Mc Cabe y col., 1985).

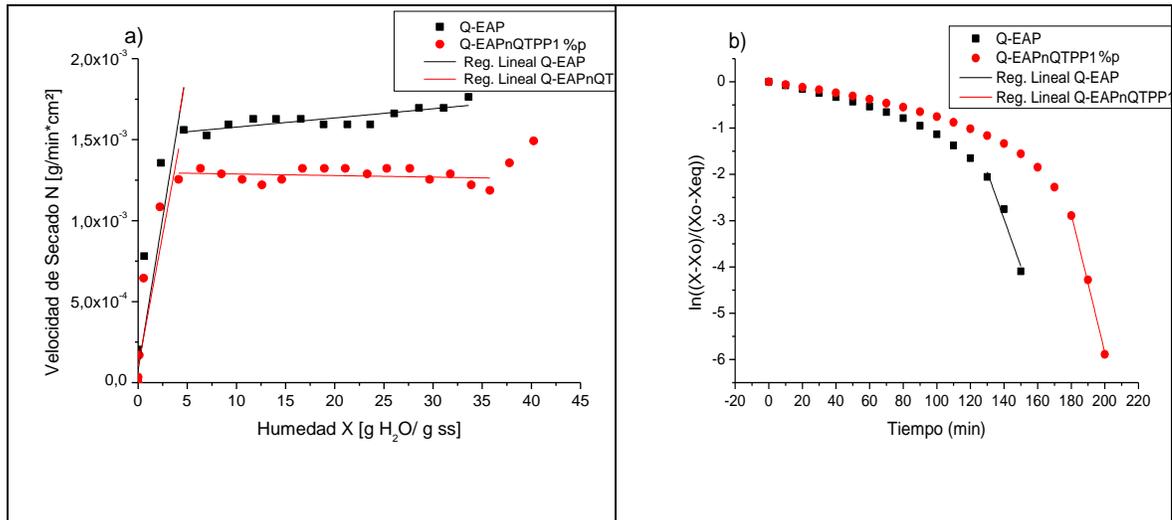


Figura 6.3. (a) Curva de velocidad de secado $\left(\frac{\partial N}{\partial \theta}\right)$ versus el contenido de humedad en base seca para las películas Q-EAP y Q-EAPnQTPP1%p. (b) Regresión lineal de $\ln((X - X_e)/(X_o - X_e))$ versus tiempo de los valores correspondientes al periodo decreciente de secado de las películas Q-EAP y Q-EAPnQTPP1%p.

Se eligieron los gráficos correspondientes a la Figura 6.2 para analizar lo sucedido con todas las combinaciones de películas. En cada uno de los casos se presentó un buen ajuste al modelo de secado.

Tabla 6.6. Parámetros determinados en la cinética de secado de las soluciones formadoras de películas de quitosano con y sin nanopartículas.

Parámetro	Unidad	Q	QnTPP1%	QnTPP8%
X_o b.s.	[g H ₂ O/ g ss]	39,2 ± 0	37,2 ± 7,78x10 ⁻¹⁵	36,3 ± 0
X_c b.s.	[g H ₂ O/ g ss]	3,4 ± 0,2	2,8 ± 0,4	3,8 ± 0,8
X_{eq} b.s.	[g H ₂ O/ g ss]	0,088 ± 0	0,033 ± 0	0,008 ± 0
N_c	[g/(min*cm ²)]	1,36x10 ⁻³ ± 9,19x10 ⁻⁵	1,24x10 ⁻³ ± 1,13x10 ⁻⁴	1,31x10 ⁻³ ± 1,27x10 ⁻⁴
Θ	[min]	200 ± 0	207 ± 10	218 ± 13
Θ_c	[min]	170 ± 0	163 ± 15	178 ± 5
Def	[cm ² /min]	8,76x10 ⁻⁴ ± 4,03x10 ⁻⁵	8,36x10 ⁻⁴ ± 1,03x10 ⁻⁴	9,56x10 ⁻⁴ ± 1,78x10 ⁻⁴

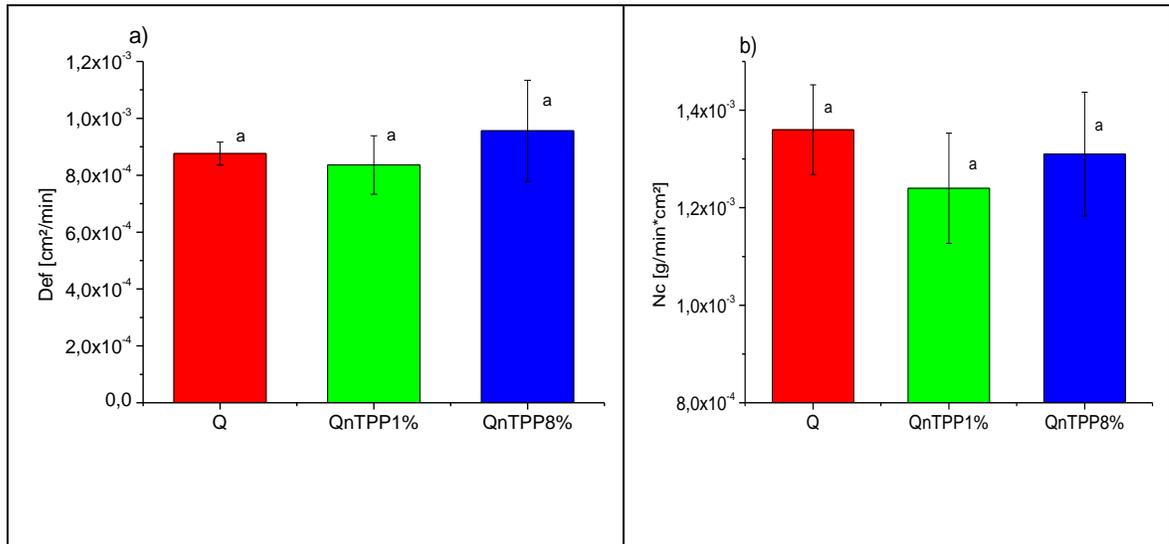


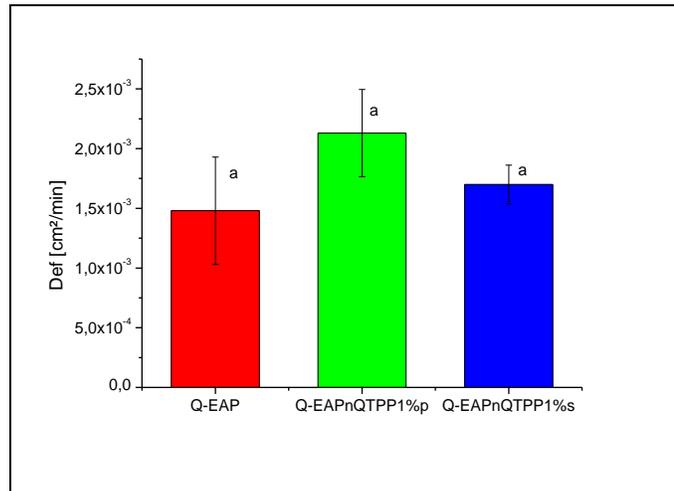
Figura 6.4. (a) Valores de D_{ef} [cm²/min] y (b) N_c [g/min*cm²] de los *films* Q, QnQTPP1% y QnQTPP8%, superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p < 0,05$).

Se pudo observar que el *film* de Q presentó una velocidad constante de secado de $1,36 \times 10^{-3} \pm 9,19 \times 10^{-5}$ y no existen diferencias significativas para ninguna de las combinaciones con la adición de nanopartículas QnTPP1% ($1,24 \times 10^{-3} \pm 1,13 \times 10^{-4}$) y QnTPP8% ($1,31 \times 10^{-3} \pm 1,27 \times 10^{-4}$) (Ver Figura 6.4), de igual forma ocurrió para el caso de la difusividad efectiva (D_{ef}), donde no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre la película Q y las con adición de nanopartículas.

Este parámetro es el determinante en la cinética durante el periodo decreciente de la curva de secado, ya que en la primera etapa constante de secado es cuando se produce la evaporación de la humedad desde la superficie saturada. En el caso de sólidos no porosos, como lo es el de las películas, la remoción de agua es prácticamente sólo superficial. Diferente es el comportamiento cuando se llega en el tiempo crítico (Θ_c) a la humedad crítica de secado (X_c), donde comienza el periodo decreciente, instante donde el agua líquida de la superficie no es suficiente para seguir formando una película continua en toda la superficie de secado. Entonces sería el periodo decreciente de secado el que describiría mayormente las propiedades de la película que es el sólido en este caso ya que el agua estaría difundiendo a través de éste (Mc Cabe y col., 1985).

Tabla 6.7. Parámetros determinados en la cinética de secado de las soluciones formadoras de películas binarias.

Parámetro	Unidad	Q-EAP	Q-EAPnQTPP1%p	Q-EAPnQTPP1%s
Xo	[g H ₂ O/ g ss]	37,4 ± 1	40,2 ± 0	36,1 ± 0,25545
Xc	[g H ₂ O/ g ss]	7,2 ± 2,2	0,8 ± 0,2	3,8 ± 0,5
Xeq	[g H ₂ O/ g ss]	0,039 ± 0	0,003 ± 0	0,094 ± 0,00321
Nc	[g/min*cm ²]	1,64x10 ⁻³ ± 1,10x10 ⁻⁴	1,03x10 ⁻³ ± 3,44x10 ⁻⁴	1,24x10 ⁻³ ± 6,70x10 ⁻⁵
Θ	[min]	180 ± 0	215 ± 13	175 ± 6
Θc	[min]	110 ± 0	188 ± 13	135 ± 6
Def	[cm ² /min]	1,48x10 ⁻³ ± 4,50x10 ⁻⁴	2,13x10 ⁻³ ± 3,65x10 ⁻⁴	1,70x10 ⁻³ ± 1,62x10 ⁻⁴



6.5. Valores de D_{ef} [cm²/min] de los *films* Q-EAP, Q-EAPnQTPP1%p y Q-EAPnQTPP1%s, superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p < 0,05$).

El *film* de Q-EAP presentó una velocidad constante de secado de $1,64 \times 10^{-3} \pm 1,10 \times 10^{-4}$ mientras que las películas con adición de nanopartículas tipo polvo y solución obtuvieron valores de $1,03 \times 10^{-3} \pm 3,44 \times 10^{-4}$ y $1,24 \times 10^{-3} \pm 6,70 \times 10^{-5}$ respectivamente. Para el caso de la difusividad efectiva (D_{ef}) no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre la película Q-EAP y las con adición de nanopartículas al 1% en formato polvo o solución ($p > 0,05$).

6.4. Determinación del grado de transmisión de vapor de agua (TVA)

6.4.1. Películas de quitosano con y sin nQTPP

La TVA para los *films* se determina de acuerdo a la norma NCh2098.Of2000 y ello implica determinar la pérdida de agua en el tiempo (21 días), la TVA se analizó en etapas, ya que las curvas obtenidas presentaron un punto de inflexión, lo cual amerita análisis por periodos de tiempo. La cinética de pérdida de agua de los *films* correspondientes a películas monocomponentes con y sin carga de nQTPP se representa en un gráfico promedio. A modo de comparación se presentan resultados utilizando tanto el tiempo completo de realización del ensayo como para los dos periodos que presentan un buen ajuste a una línea recta, siendo el primer periodo los iniciales 12 días de ensayo y el segundo periodo los últimos 10 días de ensayo. En la Tabla 6.1 se puede apreciar los ajustes obtenidos para cada etapa en la cual se analizó, todos los r^2 obtenidos fueron mayores a 0,98.

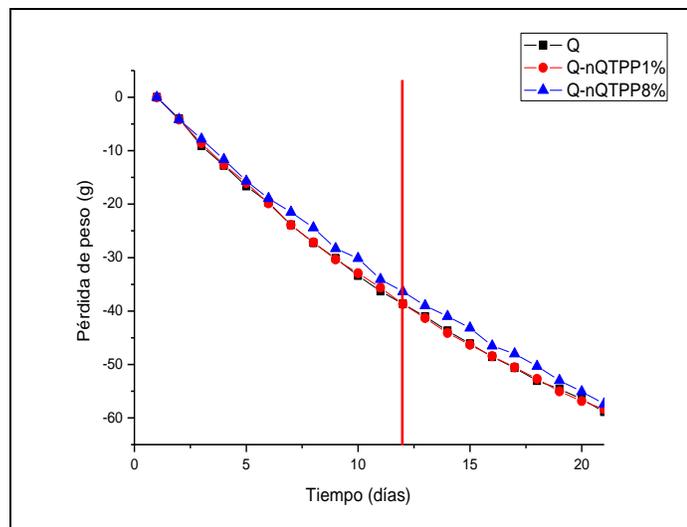


Figura 6.2. Cinética de evaporación de agua a través de los *films* de quitosano cargados y no con nQTPP. La línea roja marca el fin del primer periodo de evaluación y el comienzo del segundo.

Se puede apreciar que las curvas correspondientes a Q y QnQTPP 1% se comportan de manera muy similar, mientras que Q-nQTPP 8% presenta un decaimiento algo más lento. Para continuar con la comparación se incorporó a los cálculos el espesor de cada *film* para estandarizar así los resultados.

Tabla 6.1. Valores de R^2 , Intercepto y Pendiente para los *films* Q, Q-nQTPP1% y Q-nQTPP8% en los diferentes periodos.

Periodo	Muestra	R^2	Intercepto	Pendiente
Completo 21 días	Q	0,9830	-1,8418 ± 1,0650	-2,8842 ± 0,0848
	Q-nQTPP1%	0,9832	-1,6875 ± 1,0607	-2,8932 ± 0,0845
	Q-nQTPP8%	0,9902	-0,8737 ± 0,7856	-2,8058 ± 0,0626
1er Periodo primeros 12 días	Q	0,9932	1,9446 ± 0,6476	-3,5278 ± 0,0880
	Q-nQTPP1%	0,9933	2,0002 ± 0,6407	-3,5134 ± 0,0871
	Q-nQTPP8%	0,9947	1,9020 ± 0,5328	-3,2800 ± 0,0724
2do Periodo últimos 10 días	Q	0,9959	-12,4560 ± 0,7957	-2,2255 ± 0,0475
	Q-nQTPP1%	0,9954	-13,0556 ± 0,8281	-2,1931 ± 0,0494
	Q-nQTPP8%	0,9980	-8,5547 ± 0,5807	-2,3292 ± 0,0347

Como se puede observar en la Tabla 6.1, el separar el comportamiento en dos etapas (12 y 10 días) indican un buen ajuste al comportamiento lineal. Para el 1er periodo para el Q, Q-nQTPP1% y Q-nQTPP8% se obtienen valores de R^2 de 0,9932; 0,9933 y 0,9947 respectivamente, mientras que para el 2do periodo para el Q, Q-nQTPP1% y Q-nQTPP8% se obtienen valores de R^2 de 0,9959; 0,9954 y 0,9980 respectivamente. Las pendientes resultantes para cada periodo son diferentes, siendo mayores las del 1er periodo ($m = 3,5278; 3,5134$ y $3,2800$ [$gH_2O/días$] Q, Q-nQTPP1% y Q-nQTPP8% respectivamente) en comparación a las del 2do periodo ($m = 2,2255; 2,1931$ y $2,3292$ [$gH_2O/días$] Q, Q-nQTPP1% y Q-nQTPP8% respectivamente). Esto significa que la transferencia de vapor de agua a través del *film* es mayor durante los 12 días iniciales. La disminución que sufre en la segunda etapa se puede deber a que se favorezca la formación de gel que presenta el Q_0 (Chenite y col., 2000) dado que, si fuera así y se formase una capa de gel, evidentemente ésta actuaría como barrera al vapor de agua por lo que disminuiría la permeabilidad a éste en la última etapa, tal como sucede en este caso.

Tabla 6.2. Valores de ϵ , TVA, TVA ϵ y PVA para los *films* Q, Q-nQTPP1% y Q-nQTPP8% en los diferentes periodos, superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p < 0,05$).

PELÍCULAS		ϵ (mm)	TVA (g/m ² *h)	TVA ϵ (g.mm/m ² *h)	PVA (g*mm/kPa*d*m ²)
Completo 21 días	Q	0,049 ± 0,004	28,70 ± 1,71 ^a	1,40 ± 0,08 ^a	0,298 ± 0,016 ^a
	QnTPP1%	0,041 ± 0,003	28,18 ± 0,82 ^a	1,17 ± 0,10 ^b	0,249 ± 0,021 ^b
	QnTPP8%	0,047 ± 0,003	29,78 ± 0,70 ^a	1,37 ± 0,10 ^a	0,293 ± 0,022 ^a
1er Periodo primeros 12 días	Q	0,049 ± 0,004	35,02 ± 1,89 ^a	1,70 ± 0,10 ^a	0,365 ± 0,022 ^a
	QnTPP1%	0,041 ± 0,003	33,91 ± 0,49 ^a	1,40 ± 0,08 ^b	0,300 ± 0,016 ^b
	QnTPP8%	0,047 ± 0,003	34,62 ± 0,84 ^a	1,59 ± 0,12 ^a	0,341 ± 0,026 ^a
2do Periodo últimos 10 días	Q	0,049 ± 0,004	21,84 ± 2,04 ^a	1,06 ± 0,08 ^a	0,227 ± 0,017 ^a
	QnTPP1%	0,041 ± 0,003	21,69 ± 1,90 ^a	0,90 ± 0,12 ^b	0,192 ± 0,027 ^b
	QnTPP8%	0,047 ± 0,003	24,66 ± 0,83 ^b	1,14 ± 0,10 ^a	0,242 ± 0,021 ^a

En la Tabla 6.2 se observa que para todos los periodos considerados en el cálculo, la adición de nQTPP 1% sobre la película monocomponente presenta una disminución en valor de TVA ϵ (1,17 ± 0,10; 1,40 ± 0,08 y 0,90 ± 0,12) respectivamente en comparación a la película Q (1,40 ± 0,08; 1,7 ± 0,1 y 1,06 ± 0,08). Para el caso de PVA el comportamiento es el mismo, una disminución del valor ante la adición de nQTPP 1% (0,249 ± 0,021; 0,300 ± 0,016 y 0,192 ± 0,027) respectivamente en comparación a la película Q (0,298 ± 0,016; 0,365 ± 0,022 y 0,227 ± 0,017). La disminución en los valores de TVA ϵ y PVA presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado ante la adición de nQTPP 8% sobre la película monocomponente se aprecia que no existe un resultado positivo, ya que si bien los resultados en los periodos Completo y 1er periodo disminuyen la TVA ϵ y PVA no lo hace de forma significativa. Chang y col. (2010) reportaron que una adición de más de un 6% de

nQTPP tiende a ligeramente aumentar los valores de PVA, esto debido a que a menores niveles, las nQTPP pueden dispersarse mejor en la matriz de la película y probablemente provocar un paso más tortuoso de las moléculas de agua.

Es por lo anterior que se decide que al experimentar con las películas binarias se hará con la combinación nQTPP1%, pero se evaluará la forma de adición de las Nanopartículas en solución y polvo a la película de Quitosano-EAP (Q-EAP).

6.4.2. Películas Q-EAP con y sin nQTPP

La cinética de pérdida de agua de los *films* correspondientes a películas binarias cargadas y no con nQTPP se muestra en la Figura 6.3. Se puede apreciar (Fig. 6.3.) que la tendencia para el trío de curvas es polinómico de igual forma como la película monocomponente. Para efectos de cálculo la NCh2098.Of2000 indica que para la determinación de la transmisión de vapor de agua en películas de recubrimiento orgánico, se deben tomar a lo menos cuatro puntos que se ajusten a una línea recta, representando la pendiente el grado de transmisión del vapor de agua. Para este caso también se presenta a modo de comparación, resultados utilizando tanto el tiempo completo de realización del ensayo como para los dos periodos que presentan un buen ajuste a una línea recta, siendo el primer periodo los iniciales 12 días de ensayo y el segundo periodo los últimos 10 días de ensayo.

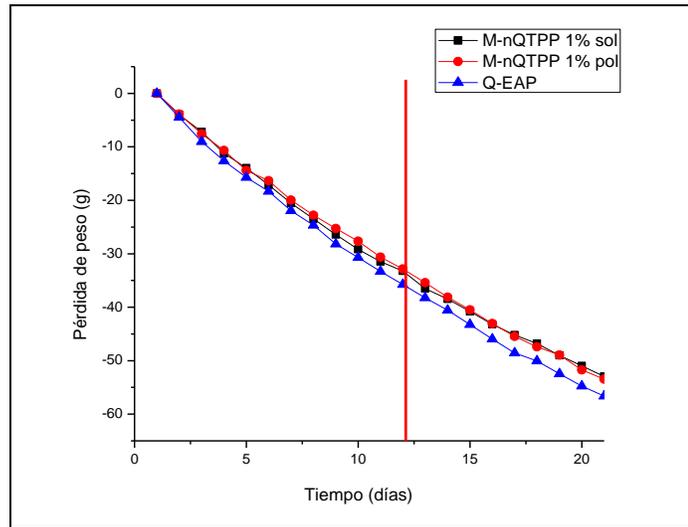


Figura 6.3. Cinética de evaporación de agua a través de los *films* de quitosano y extracto acuoso proteico con y sin nQTPP al 1%. La línea roja marca el fin del primer periodo de evaluación y el comienzo del segundo.

Se puede apreciar que las curvas correspondientes a M-nQTPP 1% sol y M-nQTPP 1% pol se comportan de manera muy similar y ambas pierden menos peso que la película Q-EAP, la cual presenta una mayor pérdida de agua.

Tabla 6.3. Valores de R^2 , Intercepto y Pendiente para los *films* Q-EAP, M-nQTPP1%pol y M-nQTPP1%sol en los diferentes periodos.

Periodo	Muestra	R^2	Intercepto	Pendiente
Completo 21 días	Q-EAP	0,9906	-1,3761 ± 0,7548	-2,7548 ± 0,0601
	M-nQTPPpol1%	0,9936	-0,3879 ± 0,5927	-2,6319 ± 0,0472
	M-nQTPPsol1%	0,9885	-0,9765 ± 0,7897	-2,6028 ± 0,0629
1er Periodo primeros 12 días	Q-EAP	0,9921	1,1741 ± 0,6300	-3,1907 ± 0,0856
	M-nQTPPpol1%	0,9943	1,5163 ± 0,4981	-2,9518 ± 0,0677
	M-nQTPPsol1%	0,9935	1,7359 ± 0,5480	-3,0600 ± 0,0745
2do Periodo últimos 10 días	Q-EAP	0,9967	-8,0150 ± 0,7542	-2,3398 ± 0,0450
	M-nQTPPpol1%	0,9955	-5,9750 ± 0,8592	-2,2857 ± 0,0513
	M-nQTPPsol1%	0,9954	-8,5404 ± 0,8122	-2,1317 ± 0,0485

Como se puede observar en la Tabla 6.3, para la película binaria también se encuentra un buen ajuste al comportamiento lineal los periodos anteriormente señalados (12 y 10 días). Para el 1er periodo para el Q-EAP, M-nQTPPol1% y M-nQTPSol1% se obtienen valores de R^2 de 0,9921; 0,9943 y 0,9935 respectivamente, mientras que para el 2do periodo para el Q-EAP, M-nQTPPol1% y M-nQTPSol1 se obtienen valores de R^2 de 0,9967; 0,9955 Y 0,9954 respectivamente. Las pendientes resultantes para cada periodo son diferentes, siendo mayores las del 1er periodo ($m= 3,1907; 2,9518$ y $3,0600 [gH_2O/días]$ Q-EAP, M-nQTPPol1% y M-nQTPSol1% respectivamente) en comparación a las del 2do periodo ($m= 2,3398; 2,2857$ y $2,1317 [gH_2O/días]$ Q-EAP, M-nQTPPol1% y M-nQTPSol1% respectivamente). Esto significa que análogamente a la película monocomponente la transferencia de vapor de agua a través del *film* es mayor durante los 12 días iniciales.

Tabla 6.4. Valores de ϵ , $TVA\epsilon$ y PVA para los *films* Q-EAP, M-nQTPPol1% y M-nQTPSol1% en los diferentes periodos, superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p<0,05$).

PELÍCULAS		ϵ (mm)	$TVA\epsilon$ (g.mm/m ² *h)	PVA (g*mm/kPa*d*m ²)
Completo 21 días	Q-EAP	0,055 ± 0,002	1,62 ± 0,07 ^a	0,346 ± 0,015 ^a
	M-nQTPPol1%	0,052 ± 0,001	1,47 ± 0,03 ^b	0,315 ± 0,006 ^b
	M-nQTPSol1%	0,056 ± 0,002	1,49 ± 0,11 ^b	0,317 ± 0,024 ^b
1er Periodo primeros 12 días	Q-EAP	0,055 ± 0,002	1,88 ± 0,08 ^a	0,401 ± 0,017 ^a
	M-nQTPPol1%	0,052 ± 0,001	1,67 ± 0,03 ^b	0,355 ± 0,007 ^b
	M-nQTPSol1%	0,056 ± 0,002	1,76 ± 0,14 ^b	0,377 ± 0,030 ^b
2do Periodo últimos 10 días	Q-EAP	0,055 ± 0,002	1,37 ± 0,05 ^a	0,293 ± 0,11 ^a
	M-nQTPPol1%	0,052 ± 0,001	1,27 ± 0,03 ^b	0,271 ± 0,006 ^b
	M-nQTPSol1%	0,056 ± 0,002	1,21 ± 0,08 ^b	0,257 ± 0,017 ^b

En la Tabla 6.4 se observa que para todos los periodos considerados en el cálculo, la adición de nTPPQ1% tanto en forma de polvo como solución presentan una disminución en el valor de TVAε y PVAε de forma significativa ($p < 0,05$) y que no existe diferencias entre la aplicación de nanopartículas dispersas en polvo o en solución.

La adición de nanopartículas en películas comestibles ha sido estudiado en diferentes matrices de películas, obteniendo resultados positivos en cuanto a la disminución de PVA (De Moura y col., 2009 y Henriette y col., 2009).

La adición de nanopartículas es sólo una de las formas de contrarrestar la transmisión y permeabilidad al vapor de agua, también se han realizado estudios donde se adicionan aceites buscando disminuir estos parámetros (Colla y col., 2006; Vargas y col., 2009; Sánchez-González y col., 2010, INNOVA-CORFO 2008-2012 y Valenzuela 2011).

La ventaja de la adición de nQTPP en comparación a los aceites, es que la película obtenida no se ve afectada ni en su espesor ni en su apariencia, la que en caso de los aceites provoca una película oleosa y esto afecta las características sensoriales del producto.

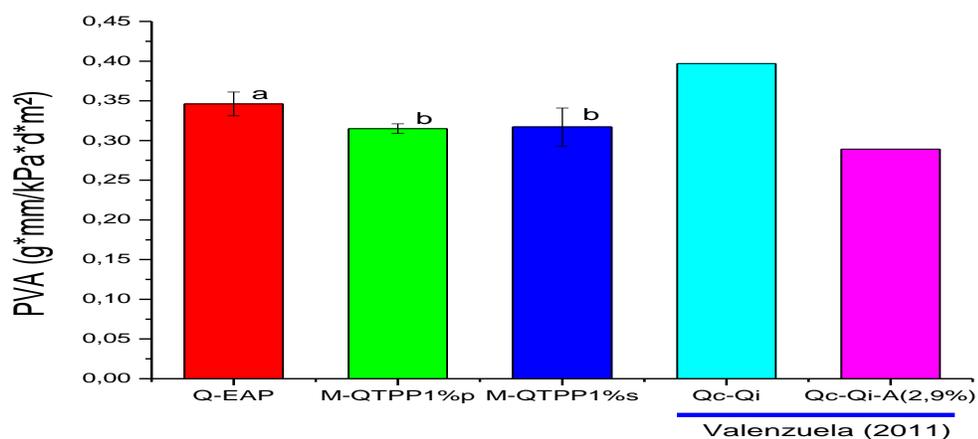


Figura 6.4. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las Películas de Q-EAP, M-QTPP1%p, M-QTPP1%s, Qc-Qi (Quitano-Proteína de Quínoa) y Qc-Qi-A (Quitano-Proteína de Quínoa-Aceite). Superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p < 0,05$).

Debido a la similitud de la películas obtenida por Valenzuela (2011), quien obtuvo una película de quitosano en similares características a la de este trabajo (origen de quitosano, solvente) en ácido cítrico 0,1M con extracción de proteínas a pH 9 y solución *casting* a pH 3 (Qc-Qi) y una de iguales características y con adición de aceite de maravilla alto oleico en una proporción 2,9% p/v, se compararon sus resultados con los obtenidos en este estudio.

En la Figura 6.4 se aprecia que existen diferencias significativas entre la película Q-EAP y Qc-Qi, lo que indica que la diferencia en el pH de extracción de las proteínas así como el pH final de la mezcla afectan a la PVA. Sin embargo al comparar los experimentos por separado se aprecia que la adición de nQTPP1% tanto en polvo como solución a la película Q-EAP disminuye la PVA en un 8,96 y 8,38%, respectivamente siendo los resultados estadísticamente significativos. Mientras que la adición de aceite en la película Qc-Qi disminuye la PVA en un 27,2%.

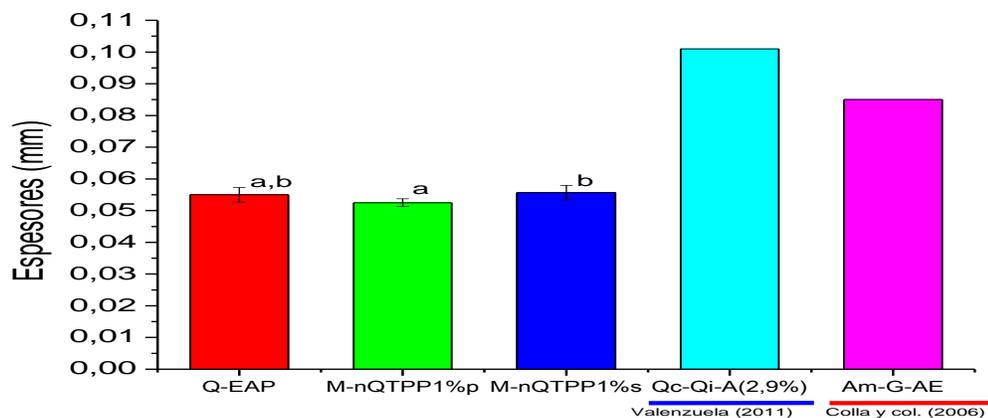


Figura 6.5. Espesor en mm de las Películas de Q-EAP, M-QTPP1%p, M-QTPP1%s, Qc-Qi (Quitosano-Proteína de Quínoa) y Qc-Qi-A (Quitosano-Proteína de Quínoa-Aceite). Superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p < 0,05$).

En la Figura 6.5 se muestra el espesor de las películas binarias. Las películas de Q-EAP presentaron un espesor de $0,055 \pm 0,002$ mm, las películas de M-nQTPP1%p $0,053 \pm 0,001$ mm y las películas de M-nQTPP1%s $0,056 \pm 0,002$ mm. No existen diferencia significativas entre la película Q-EAP y las con adición en forma polvo o solución ($p > 0,05$). En ésta Figura también se presentan espesores de películas para

otros estudios con adición de aceite, como lo son la película de Valenzuela (2011) Qc-Qi-A(2,9%) que presentó un espesor 0,101 mm y la película de Colla y col. (2006) que está formada por amaranto-glicerol-ácido esteárico, ambas superan ampliamente los valores de espesor de las películas binarias de este estudio, es decir la incorporación de nanopartículas a la matriz del *film* no tiene incidencia en su espesor, mientras que la adición de aceite sí. Esto ocurre ya que el aceite reemplaza al agua y esta la que se evapora en el secado de las películas, lo que afecta su espesor (Di pierro y col., 2006; Sebti y col., 2007). Park y Chinnan (1995) y Gennadios y col. (1994), encontraron una relación dependiente positiva entre la PVA y el espesor de las películas. A razón que aumenta el espesor de las películas se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella, y por esto la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la película incrementa (McHugh y col., 1993).

6.5. Determinación de las propiedades mecánicas

6.5.1. Películas de quitosano con y sin nQTPP

En la Tabla 6.8, se muestran los valores de alargamiento porcentual (A) en % y del esfuerzo de tracción en la ruptura (ETR) en $[N/mm^2]$ con sus respectivas desviaciones estándar para las películas Q, Q-nQTPP1% Y Q-nQTPP8%.

Tabla 6.6. Efecto de la adición de nQTPP a 1 y 8 % en sobre las propiedades mecánicas de películas de quitosano.

Mezcla	Alargamiento porcentual (A%)	Esfuerzo de la tracción en la ruptura (ETR) $[N/mm^2]$
Q	104,6 ± 8,9 ^a	4,2 ± 1,2 ^a
Q-nQTPP1%	96,8 ± 10,6 ^a	3,4 ± 1,2 ^a
Q-nQTPP8%	84,5 ± 15,8 ^a	2,9 ± 0,2 ^a

Superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p < 0,05$).

Como se puede apreciar en la Tabla 6.6 tanto A% como ETR disminuyen levemente con la incorporación de nanopartículas pero no significativamente ($p > 0,05$). Cuando existe un aumento en la fracción de agua adsorbida en las películas se encuentra que existe un favorecimiento en el efecto plastificante, lo que se caracteriza también en una disminución del ETR (Galieta y col, 1998).

Como se puede observar en la Tabla 6.7, los valores obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los valores obtenidos por otros autores en condiciones similares.

Tabla 6.7. Comparaciones de las propiedades mecánicas de esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) y Alargamiento porcentual (A%) de películas monocomponentes de quitosano para esta presente Memoria y otros estudios con películas de similares características.

Autor	Películas	ETR [N/mm ²]	A [%]
Este trabajo	Q	3 a 5	96 a 114
	QnTPP1%	2 a 5	86 a 107
	QnTPP8%	3	69 a 100
INNOVA-CORFO (2008-2012)	Q:Ác. Cítrico	2	78 a 94
Park y col. (2002)	Q:Ác. Cítrico	7 a 17	42 a 118

6.5.2. Películas Q-EAP con y sin nQTPP

Debido a que en la determinación de los parámetros de secado y de permeabilidad se apreció que la películas binarias con adición de nQTPP1% en polvo y solución se comportan de manera muy similar, no existiendo diferencias significativas entre ellas, para la determinación de las propiedades mecánicas de la película binaria se procedió solo a evaluar la combinación M-nQTPP1%pol ya que su obtención es más simple, y de manera de obtener buenos resultados se utilizaron muchas películas para este ensayo.

En la Tabla 6.8 se muestran los valores de alargamiento porcentual (A) en % y del esfuerzo de tracción en la ruptura (ETR) en $[N/mm^2]$ con sus respectivas desviaciones estándar para las películas Q-EAP y M-nQTPPpol1%.

Tabla 6.8. Efecto de la adición de nQTPP 1% en la película de quitosano y extracto acuoso proteico.

Ensayo	Alargamiento porcentual (A%)	Esfuerzo de tracción en la ruptura (ETR) $[N/mm^2]$
Q-EAP	15,0 ± 3,8 ^a	5,9 ± 1,7 ^a
M-nQTPPpol1%	7,4 ± 3,1 ^b	5,0 ± 1,0 ^a

Superíndices distintos en cada columna indica diferencias significativa ($p < 0,05$).

Se observa una disminución del 50% en el A% con diferencias significativas ($p < 0,05$). Y que la adición de nQTPP no afecta al ETR ya que no existen diferencias estadísticamente significativas para este caso. Lo anterior indica que la proteína podría verse afectada a este nivel con la adición de nQTPP, dado que por los resultados obtenidos se ve que el quitosano interacciona más con la proteína cuando no hay adición de nQTPP. Está descrito en la literatura que la adición de nanopartículas a *films* de hidrocoloides afectan las propiedades mecánicas (De Moura y col., 2009 y Chang y col., 2010).

Tabla 6.9. Comparaciones de las propiedades mecánicas de esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) y Alargamiento porcentual (A%) de películas de quitosano y extracto acuoso proteico.

Autor	Película	ETR [N/mm ²]	A [%]
Este trabajo	Q-EAP	6	15
	Q-EAPnQTPP1%p	5	8
Villamán (2009)	Q-EAP	2	273
INNOVA-CORFO (2008-2012)	Q-EAP	13	16
	Q-EAP-A(3%)	2	24
Valenzuela (2011)	Qc-Qi	3	178
	Qc-Qi-A(2,9%)	1	136

Se puede ver que las películas obtenidas en el presente trabajo, presentan similares ETR y A% a la película descrita por INNOVA-CORFO (2008-2012) mientras que difieren completamente a las de Villamán (2009) y Valenzuela (2011); esto se debe a las diferencias en las características de elaboración, donde el pH de extracción de las proteínas, solvente ácido utilizado y el pH de *casting* difiere. En este trabajo se utilizó pH de extracción de proteínas de 11 y pH de *casting* de 4 con ácido cítrico como medio ácido a diferencia de Villamán (2009) y Valenzuela (2011) que trabajaron a un pH de extracción de proteínas de 9 y un pH de *casting* de 3 y utilizando ácido láctico como solvente ácido (Villamán, 2009) y ácido cítrico (Valenzuela, 2011).

7. CONCLUSIONES

- Se comprobó la hipótesis de trabajo ya que es posible obtener nanopartículas de quitosano-tripolifosfato (nQTPP) e incorporarlas en una película comestible de quitosano y quitosano-quínoa y formar una matriz que genere con propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua que permitan su posterior aplicación a la conservación de alimentos.
- Respeto a los parámetros de secado para las películas de Q con y sin nQTPP y para las películas de Q-EAP con y sin nQTPP lo relevante fue que no se encontraron diferencias significativas para el parámetro D_{ef} lo que indica que no hay un cambio en como la humedad difunde a través del sólido.
- Se determinó que la adición de nQTPP al 1% en películas de quitosano y la de quitosano-quínoa disminuye significativamente la PVA, con lo cual se logró el objetivo buscado de disminuir la PVA, con lo que se podría predecir un mejor efecto protector al vapor de agua cuando éstas se aplicaran a alimentos.
- Por otra parte, la adición de nQTPP 1% en la película de quitosano no afecta las propiedades mecánicas, mientras que la adición de nQTPP 1% en la película de quitosano-quínoa afecta el porcentaje de alargamiento (A%).
- Como conclusión global se propone realizar un barrido de pH más alejados al punto isoeléctrico de la proteína, ya que de esta forma es posible que se mejoren las propiedades mecánicas de las películas no en desmedro de la mejora del PVA.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J., & Rivera, M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quínoa (*chenopodium quinoa* Willd) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4745-4750.
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., & Díaz-Dosque, M. (2011). Food Hydrocolloids Characterization of quínoa proteinechitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 879-886.
- Albarran C. R. (1993). Estudio de algunos componentes químicos, caracteres morfoanatomicos y patrones proteicos en semillas de dos ecotipos de quinua (*Chenopodium quinua* Willd). Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Concepción.
- AOAC .(1995) Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis, ed. 16; Ed.Williams, S.; Arlington, VA.
- Arai, K.; Kinumaki, T. y Fujita, T. Toxicity of chitosan. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab*, 56:89-92. 1968.
- Araneda, G. (2005). Obtención, caracterización y estudio de vida útil de la harina integral de quinua. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos, Universidad de Chile.
- Bégin, A., & Van Calsteren, M. R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 63-67.

- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*, 57(1), 19-34.
- Bourtoom, T., & Chinnan, M. (2008). Preparation and properties of rice starch–chitosan blend biodegradable film. *LWT Food Science and Technology*, 41(9), 1633-1641.
- Bradford, M. M. A (1976) “Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Micrograms Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*”. 72, 248- 254.
- Brinegar, C., Sine, B. and Nwokocho, L. (1996). High-cysteine 2S seed storage proteins from quínoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 1621–1623.
- Brinegar, C., & Goundan, S. (1993). Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quínoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(2), 182-185. American Chemical Society.
- Calvo, P., Remunán-López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1997). Novel hydrophilic chitosan–polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal Applied Polymer Science* 63 (1), 125–132.
- Cao, Y. M., & Chang, K. C. (2002). Edible Films Prepared from Water Extract of Soybeans. *Journal of Food Science*, 67(4), 1449-1454.

- Castimpolas, N. (1971). A note on dissimilar subunits present in dissociated globulins. *Cereal Chem.*, (36):1086-1089.
- Chang, P. R., Jian, R., Yu, J., & Ma, X. (2010). Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starch composites. *Food Chemistry*, 120(3), 736-740.
- Chatelet, C., Damour, O., & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22(3), 261-268.
- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., Leroux, J. C., Atkinson, B., Binette, F., Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21(21), 2155-2161.
- Choi, W. Y Han, J. Film-forming Mechanism and Heat Denaturation Effects on the Physical and Chemical Properties of Pea-Protein-Isolate Edible Films. *Journal of Food Science*, 67(4):1399-1406, 2002.
- Clapper, J. D., Pearce, M. E., Guymon, C. A., & Salem, A. K. (2008). Biotinylated biodegradable nanotemplated hydrogel networks for cell interactive applications. *Biomacromolecules*, 9(4), 1188-1194.
- Colla, P., Sobral, P and Menegalli, F. (2006). *Amaranthus cruentus* flour edible films: influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 6645–6653.

- Comai, S., Bertazzo, A., Bailoni, L., Zancato, M., Costa, C. V. L., & Allegri, G. (2007). The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quínoa and cereal flours. *Food Chemistry*, 100(4), 1350-1355.
- De Moura, M. R., Aouada, F. A., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 448-453.
- Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J. Y Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packings: A Review. *Critical Reviews. In Food Science*. 38(4):299-313.
- Denavi, G., Tapia-Blácido, D., Añón, M., Sobral, P., Mauri, A., and Menegalli, F. (2009). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*. 90, 341–349.
- Dogan, N., & McHugh, T. H. (2007). Effects of microcrystalline cellulose on functional properties of hydroxy propyl methyl cellulose microcomposite films. *Journal of Food Science*, 72(1), E016-E022.
- Gennadios, A. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44(10), 63-69.
- Gontard, N., Guilbert, S., and Cuq, J. (1992). Edible wheat gluten films influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*. 57(1), 190–198.

- Goycoolea Valencia F.M., Remuñán López C., Alonso M.J. (2009) Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En: (Vila Jato, J.L. ed.) Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pag. 103-113.
- Han, C., Lederer, C., McDaniel, M., & Zhao, Y. (2005). Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. *Journal of Food Science*, 70(3), S172-S178.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Del valle, V., Velez, D., and Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 110, 428–435.
- Hoyos, R. M., Urrego, L. (1997) Empaques y/o películas comestibles y biodegradables. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. 8-107.
- Hu, Y., Topolkaev, V., Hiltner, A. and Baer, E. (2001), Measurement of water vapor transmission rate in highly permeable films. *Journal of Applied Polymer Science*, 81: 1624–1633.
- INNOVA-CORFO (2008-2012), Desarrollo y caracterización tecnológica de potencialidades estratégicas en berries de exportación: aumento de vida útil post-cosecha y calidad” (07CT9PUT-06).
- Jagur-Grodzinski, J. (1999). Biomedical application of functional polymers. *Reactive and Functional Polymers*, 39(2), 99-138.

- Jeon, Y.-J., Kamil, J. Y. V. A., & Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5167-5178.
- Kittur, F. S., Kumar, K. R., & Tharanathan, R. N. (1998). Functional packaging properties of chitosan films. *Zeitschrift fuer LebensmittelUntersuchung undForschung AFood Research and Technology*, 206(1), 44-47.
- Kowalczyk, P., & Holyst, R. (2008). Efficient adsorption of super greenhouse gas (tetrafluoromethane) in carbon nanotubes. *Environmental science technology*, 42(8), 2931-2936.
- Kröhling, M. (2007) ¿Cómo extender la vida útil?. <http://www.alimentacion.enfasis.com/notas/7779-como-extender-la-vida-util> 03/10
- Lárez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(91).
- Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21.
- Lloyd, L. (1998). Carbohydrate polymers as wound management aids. *Carbohydrate Polymers*, 37(3), 315-322.
- Majeti, N.V., Kumar, R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1):1-27.

- McCabe, W.L.; Smith, J.C. y Harriot, P. Drying of solids. (1993). Unit operations of chemical engineering.5a ed. USA, Mc Graw-Hill, 782-785.
- Mohammadpourounghi, N., Behfar, A., Ezabadi, A., Zolfagharian, H., & Heydari, M. (2010). Preparation of chitosan nanoparticles containing Naja naja oxiana snake venom. Nanomedicine nanotechnology biology and medicine,6(1), 137-143.
- NORMA CHILENA OFICIAL NCh1151.Of1976. (1990). Láminas y películas plásticas – Determinación de las propiedades de tracción. 13p.
- NORMA CHILENA OFICIAL NCh2098.Of2000. (2000). Películas de recubrimiento orgánico – Determinación de la transmisión de vapor de agua. 13p.
- Ogungbenle, H. N. (2003). Nutritional evaluation and functional properties of quínoa (*Chenopodium quinoa*) flour. International journal of food sciences and nutrition, 54(2), 153-158.
- Oshodi, A. A., Ogungbenle, H. N., & Oladimeji, M. O. (1999). Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamum radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quínoa (*Chenopodium quinoa*) flours. International journal of food sciences and nutrition, 50(5), 325-331.
- Peh, K., Khan, T., & Ch'ng, H. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. Journal of pharmacy pharmaceutical sciences a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences Societe canadienne des sciences pharmaceutiques,3(3), 303-311.

- Pérez, O.E., Sánchez, C.C., Pilosof, A.M.R., Patino, J.M.R. (2008). Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air–water interface. *Food Hydrocolloids* 22 (3), 387–402.
- Ritthidej, G. C., Phaechamud, T., & Koizumi, T. (2002). Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, 232(1-2), 11-22.
- Rivera, M. (2006). Obtención, caracterización estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de Quinoa orgánica (*Chenopodium Quínoa*). Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Ruales Y Nair. (1992). Nutricional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*. Jan; 42(1): 1-11.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 277-283.
- Sebti, I., Martial-Gros, A., Carnet-Pantiez, A., Grelier, S. and Coma, V. (2005), Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film against *Aspergillus niger* Contamination. *Journal of Food Science*, 70: M100–M104.
- Sebti, I., Chollet, E., Degraeve, P., Noel, C., & Peyrol, E. (2007). Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on

HPMC and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 693-699.

- Silva, J. (2006) Obtención, caracterización y relación estructura - funcionalidad de un aislado proteico de quinua (*Chenopodium Quinoa*) orgánica proveniente de la VI región de Chile. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Tapia, C. (2005). Estudio de matrices hidrofílicas basadas en mezclas y complejos interpoliméricos como sistemas de liberación prolongada de fármaco. Tesis de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Chile. 73 pp.
- Tapia, C.; Corbalán, V.; Costa, E.; Gai, M. Yazdani-Pedram, M. Study of the release mechanism of diltiazem hydrochloride from matrices based on chitosan-alginate and chitosan- carrageenan mixtures. *Biomacromolecules*. 6(5):2389-2395.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., and González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*. 23, 536-547.
- Valenzuela, C. (2011), Bio-películas comestibles en base a mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano: elaboración, caracterización y su aplicación en frutillas. Segundo avance de Tesis Doctoral. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Vilche, C. (2003). Physical Properties of Quínoa Seeds. *Biosystems Engineering*, 86(1), 59-65.

- Villamán, M. (2007). Elaboración y caracterización de films comestibles basadas en mezclas entre proteínas de quinua y quitosano. Memoria para optar al título de Ingeniera en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

- Viroben, G., Barbot, J., Mouloungui, Z., & Guéguen, J. (2000). Preparation and characterization of films from pea protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1064-1069.

- Weitz, R. T., Harnau, L., Rauschenbach, S., Burghard, M., & Kern, K. (2008). Polymer nanofibers via nozzle-free centrifugal spinning. *Nano Letters*, 8(4), 1187-1191.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Composición proximal y aminoacídica de la harina de quínoa.

Tabla 9.1 Análisis proximal harina de quínoa.

Componente	% (p/p)
Grasa	5,2
Humedad	11,7
Cenizas	1,4
Proteínas	14,7
Carbohidratos totales	64,2

Fuente Araneda: 2005.

ANEXO 2: Contenido de aminoácidos en la harina de quínoa.

Tabla 9.2. Contenido de aminoácidos en la harina de quínoa.

Aminoácidos	%
Ac. Aspártico	1,3
Ac. Glutámico	3
Serina	0,7
Histidina*	0,4
Glicina	1,2
Treonina*	0,8
Arginina*	1,6
Alanina	0,7
Tirosina	0,6
Valina*	0,9
Metionina*	0,4
Cistina	0,1
Isoleucina*	0,8
Leucina*	1,2
Fenilalanina*	0,8
Lisina*	1

* Aminoácidos esenciales, Fuente: Araneda 2005.