



Rezzani, Guillermo Darío

# Desarrollo de nuevos materiales activos e inteligentes a base de biomasa de levadura y kéfir de agua con el agrega de extracto de yerba mate y humo líquido



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Rezzani, G. D. (2026). *Desarrollo de nuevos materiales activos e inteligentes a base de biomasa de levadura y kéfir de agua con el agrega de extracto de yerba mate y humo líquido. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/6198>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Desarrollo de nuevos materiales activos e inteligentes a base de biomasa de levadura y kéfir de agua con el agrega de extracto de yerba mate y humo líquido**

**TESIS DOCTORAL**

**Guillermo Darío Rezzani**

guillermorezzani@gmail.com

### **Resumen**

La creciente demanda de envases plásticos, si bien crucial para prolongar la vida útil de los alimentos, genera un modelo de producción y descarte lineal que compromete la sostenibilidad ambiental del sistema alimentario global. Para abordar este problema, este trabajo se orientó al desarrollo de materiales sustentables, alternativos a los polímeros de origen fósil, con funcionalidades mejoradas (activas e inteligentes) mediante la valorización de biomásas residuales, subproductos agroindustriales y extractos naturales, destinadas a aplicaciones en la industria alimentaria. Los extractos naturales utilizados fueron humo líquido refinado (HL), un conservante alimentario natural exento de sabor y aroma ahumado, y extracto acuoso de yerba mate residual (YM), obtenido a partir de los residuos posconsumo de la infusión. Los materiales en forma de película se obtuvieron mediante la técnica de *casting*, utilizando dos biomásas: pared celular de levadura residual cervecera (YCW-R), rico en  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas, y gránulos de kéfir de agua (K-5), compuesto por dextrano (polisacárido de glucosa). En ambas matrices se incorporaron los extractos (HL y YM) y se caracterizaron las propiedades funcionales de las películas resultantes. Los materiales desarrollados presentaron mejoras significativas en sus propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al vapor de agua, junto con una destacada actividad antioxidante y antimicrobiana. Además, en esta tesis se logró desarrollar un prototipo de etiquetas inteligentes, a partir de las películas K-5 con YM, capaces de monitorear en tiempo real la calidad de filetes de merluza, demostrando su potencial como herramienta práctica para el control de frescura. En conclusión, este trabajo demostró la posibilidad de desarrollar materiales innovadores y sustentables con funcionalidades mejoradas, posicionándolos como una alternativa viable para aplicaciones en la industria de envasado alimentario.

TESIS DOCTORAL  2025

**DESARROLLO DE NUEVOS MATERIALES  
ACTIVOS E INTELIGENTES A BASE  
DE BIOMASA DE LEVADURA Y KÉFIR  
DE AGUA CON EL AGREGADO DE EXTRACTO  
DE YERBA MATE Y HUMO LÍQUIDO**

AUTOR: ING. GUILLERMO DARÍO REZZANI

DIRECTORA: DRA. MERCEDES ANA PELTZER

CODIRECTOR: DR. ANDRÉS GERARDO SALVAY



DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA



Universidad  
Nacional  
de Quilmes



Bernal, 14 de octubre de 2025

Sres. Comisión de Doctorado en Ciencia y Tecnología  
Universidad Nacional de Quilmes

De mi mayor consideración,

En carácter de directora y co-director de la tesis de Doctorado del **Ing. Guillermo Darío Rezzani**, quien ha desarrollado su trabajo en el **Laboratorio de Obtención, Modificación, Caracterización y Evaluación de Materiales (LOMCEM)**, nos dirigimos a Ud. para hacerle llegar nuestro aval respecto a la defensa de tesis presentada ante ustedes, la cual se titula: "**Desarrollo de nuevos materiales activos e inteligentes a base de biomasa de levadura y kéfir de agua con el agregado de extracto de yerba mate y humo líquido**" y ya se encuentra finalizada.


Sin otro particular, saludo a Ud. muy atentamente,



Prof. Dr. Mercedes A. Peltzer  
Directora LOMCEM  
Investigadora independiente CONICET  
[mercedes.peltzer@unq.edu.ar](mailto:mercedes.peltzer@unq.edu.ar)

---

**Firma y Aclaración Director**



Dr. Andrés G. Salvay  
Profesor asociado  
Director en Laboratorio de Físicoquímica y  
Estudios Funcionales de Alimentos.  
Plataforma de Servicios Biotecnológicos  
LOMCEM  
E-mail: [asalvay@unq.edu.ar](mailto:asalvay@unq.edu.ar)

---

**Firma y Aclaración Co-Director**



*Dedicado a mis padres por su apoyo incondicional*



## *Agradecimientos*

A la Universidad Nacional de Quilmes, casa de altos estudios donde me gradué como Ingeniero en Alimentos, lo que me permitió ser la primera generación de universitarios en mi familia, y ahora finalizar este doctorado en Ciencia y Tecnología. Asimismo, le agradezco por el financiamiento recibido para desarrollar este trabajo: “Programa de Investigación UNQ: Investigaciones Aplicadas al Sector Alimentario II PUNQ 990/19; PUNQ 918/22” dirigido por la Dra. Ludemann y el Dr. Palazolo. También al financiamiento recibido a través de la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación: “PICT2015-3150 y PICT2021-92” dirigidos por la Dra. Peltzer. Asimismo, le agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral que se me ha otorgado (Res. N°154-2021) para realizar esta investigación.

Muchas gracias al jurado: Dra. Bertuzzi, Dra. López y Dra. Piermaria, por su tiempo, trabajo y buena predisposición al haber aceptado ser parte del jurado.

Mi más profundo agradecimiento a mis directores, Mercedes A. Peltzer y Andrés G. Salvay, por su guía, acompañamiento y enseñanzas desde mis comienzos en la investigación hasta este cierre de mi etapa doctoral. Gracias por confiar en mí, por la calidez y el espacio tan agradable para poder trabajar de la mejor manera. Sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Espero que la ciencia y el compañerismo nos sigan uniendo por siempre.

Gracias a mis compañeros y compañeras: Andrea, Celeste, Carla y Juan, por su compañerismo, ayuda y aportes. Deseo que sigamos compartiendo juntos muchos momentos lindos dentro y fuera del laboratorio.

Mi más sentido agradecimiento a mis padres, quienes me acompañaron siempre, dándome fuerzas y todo lo necesario para que lograra mis objetivos. Este trabajo se lo dedico a ellos.

A mi compañera de vida Natacha, quiero agradecerle con profundo amor por su apoyo en todo momento, su amor y contención. Gracias por formar parte de mi vida y sigamos construyendo juntos.

Por último, quiero agradecerle a la educación pública, gratuita y de calidad de nuestro país, así como, a la ciencia y tecnología que desarrollamos con tanto esfuerzo y dedicación. Gracias a Perón, Evita, Néstor y Cristina: por pensar en los que menos tienen, por permitir que los hijos de obreros vayan a las universidades, por apostar por un país con desarrollo científico y tecnológico. Sé que tiempos mejores vendrán.



## Publicaciones

Los resultados de este trabajo fueron presentados parcialmente en las siguientes revistas científicas:

- **Rezzani, G. D.**, Salvay, A. G., & Peltzer, M. A. (2025). Yerba Mate and Water Kefir Grain Films for Food Preservation and Freshness Indicators. *Food and Bioprocess Technology*, 18(3), 2781-2794. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03629-0>
- **Rezzani, G. D.**, Salvay, A. G., & Peltzer, M. A. (2024). Bioactive materials from brewery yeast cell wall residues with the addition of refined liquid smoke: development and study of functional properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 32(7), 3285-3297. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-03165-6>

Además, se trabajó colaborativamente para la publicación de los siguientes artículos científicos relacionados con materiales basados en las biomásas utilizadas en este trabajo:

- Ramírez Tapias, Y. A., **Rezzani, G. D.**, Delgado, J. F., Peltzer, M. A., & Salvay, A. G. (2024). New Materials from the Integral Milk Kefir Grain Biomass and the Purified Kefiran: The Role of Glycerol Content on the Film's Properties. *Polymers*, 16(22), 3106. <https://doi.org/10.3390/polym16223106>
- Lago, A., Delgado, J. F., **Rezzani, G. D.**, Cottet, C., Ramírez Tapias, Y. A., Peltzer, M. A., & Salvay, A. G. (2023). Multi-Component Biodegradable Materials Based on Water Kefir Grains and Yeast Biomasses: Effect of the Mixing Ratio on the Properties of the Films. *Polymers*, 15(12), 2594. <https://doi.org/10.3390/polym15122594>
- **Rezzani, G.D.**, Choque, E., Salvay, A. G., Mathieu, F., & Peltzer, M. A. (2022). New Antioxidant Active Packaging Films Based on Yeast Cell Wall and Naphtho- $\gamma$ -Pyrone Extract. *Polymers*, 14(10), 2066. <https://doi.org/10.3390/polym14102066>
- Choque E, **Rezzani G.D.**, Salvay AG, Mathieu F, Peltzer MA (2021). Impact of fungal extracts on the physical and antioxidant properties of bioactive films based on enzymatically hydrolyzed yeast cell wall. *J Polym Environ*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-020-02004-2>

Asimismo, se presentaron resultados de este trabajo en las siguientes reuniones científicas:

[2025]: Salta, Argentina

“Valorización de residuos en etiquetas inteligentes: indicadores de calidad alimentaria”. XVII Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2025).

[2025]: Bernal, Argentina

“Aplicación de subproductos en indicadores de frescura alimentaria”. VI Jornadas de investigadores e investigadoras en formación en ciencia y tecnología - UNQ.

[2024]: Argentina.

“Películas activas de residuos de levadura cervecera y yerba mate”. V Workshop virtual de polímeros biodegradables y biocompuestos (BIOPOLI).

[2023]: Mar del Plata, Argentina

*“Uso de humo líquido como agente activo en películas de kéfir de agua”*. XV Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2023).

[2023]: Bernal, Argentina

*“Películas de kéfir de agua con ácido cítrico como agente entrecruzante”*. V Jornadas de investigadores e investigadoras en formación en ciencia y tecnología - UNQ.

[2021]: Bahía Blanca, Argentina

*“Nuevos materiales activos a base de pared de levadura residual con adición de humo líquido”*. XV Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2021).

Parte de este trabajo fue publicado en los siguientes medios periodísticos:

[3 de julio de 2023]: “Científicos de la UNQ desarrollan envases inteligentes que detectan alimentos en mal estado.” Agencia de Noticias Científicas UNQ. Link: <https://agencia.unq.edu.ar/?p=13296>

[5 de julio de 2023]: “Desarrollan envases inteligentes que alertan si el alimento está en mal estado.” *Tiempo Argentino*. Link: <https://www.tiempoar.com.ar/informacion-general/desarrollan-envases-inteligentes-que-alertan-si-el-alimento-esta-en-mal-estado/>

[8 de julio de 2023]: “Desarrollan materiales para envases biodegradables”. *Página 12*. Link: <https://www.pagina12.com.ar/566081-desarrollan-materiales-para-envases-biodegradables>

[10 de julio de 2023] “Científicos de la UNQ desarrollan envases inteligentes para alimentos.” *Mestiza Radio FM 88.5*. Link: <https://radio.unaj.edu.ar/cientificos-de-la-unq-desarrollan-envases-inteligentes-para-alimentos/>

[11 de julio de 2023]: “Investigadores del CONICET desarrollan envases inteligentes que alertarán el estado del alimento.” *Estación Sur Digital*. Link: <https://www.estacionsur.ar/2023/07/11/investigadores-del-conicet-desarrollan-envases-inteligentes-que-alertaran-el-estado-del-alimento/>

# ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	23
1.1	Materiales biobasados .....	23
1.2	Uso de residuos industriales para el desarrollo de materiales.....	28
1.2.1	Biomasa de levadura residual cervecera .....	29
1.2.2	Biomasa de kéfir de agua .....	32
1.3	Materiales activos e inteligentes .....	35
1.4	Extracto de humo líquido refinado .....	38
1.5	Extracto de yerba mate residual.....	40
2	HIPÓTESIS.....	43
3	OBJETIVOS .....	45
3.1	Objetivo general.....	45
3.2	Objetivos específicos .....	45
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
4.1	Obtención de biomاسas y extractos.....	47
4.1.1	Biomasa de pared celular de levadura residual cervecera .....	47
4.1.2	Biomasa de kéfir de agua .....	47
4.1.3	Extracto de yerba mate residual.....	48
4.1.4	Extracto de humo líquido refinado .....	49
4.2	Preparación de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de humo líquido refinado (YCW-R con HL).....	49
4.3	Preparación de películas activas a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de humo líquido refinado (K-5 con HL).....	49
4.4	Preparación de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de yerba mate residual .....	50
4.5	Preparación de películas activas e inteligentes a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de yerba mate residual.....	50
4.6	Técnicas de caracterización .....	50

4.6.1	Contenido de sólidos totales .....	50
4.6.2	Medición de pH.....	51
4.6.3	Contenido de proteínas totales y $\beta$ -glucanos .....	51
4.6.4	Inspección visual, densidad y espesor de las películas .....	52
4.6.5	Determinación de color mediante coordenadas CIELab .....	52
4.6.6	Propiedades térmicas .....	53
4.6.7	Propiedades mecánicas .....	54
4.6.8	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	56
4.6.9	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	56
4.6.10	Actividad antioxidante .....	56
4.6.11	Contenido de fenoles totales: método Folin-Ciocalteu.....	58
4.6.12	Actividad antimicrobiana.....	58
4.6.13	Ensayo de migración en simulante alimentario .....	60
4.6.14	Isotermas de hidratación de agua .....	60
4.6.15	Permeabilidad al vapor de agua .....	61
4.6.16	Solubilidad efectiva del agua y difusión efectiva del agua.....	62
4.6.17	Evaluación de la sensibilidad al amoníaco y al ácido acético .....	62
4.6.18	Análisis estadístico.....	63
4.7	Aplicación de etiquetas inteligentes basadas en K-5 con YM para monitoreo de calidad en filetes de <i>Merluccius hubbsi</i> .....	64
4.7.1	Cambio de color.....	65
4.7.2	Determinación de pH .....	65
4.7.3	Determinación de nitrógeno básico volátil (NBV).....	66
4.7.4	Análisis comparativo de sensibilidad mediante velocidades relativas de cambio.....	67
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	69
5.1	Contenido de proteínas totales y $\beta$ -glucanos .....	69
5.2	Estudio de extracto de humo líquido refinado como agente activo .....	69

5.2.1	Contenido de sólidos totales, pH, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.....	70
5.2.2	Actividad antimicrobiana.....	71
5.2.3	Conclusiones parciales.....	72
5.3	Caracterización de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de humo líquido refinado.....	73
5.3.1	Examinación visual.....	73
5.3.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	73
5.3.3	Pruebas mecánicas.....	74
5.3.4	Análisis termogravimétrico (TGA).....	76
5.3.5	Calorimetría Diferencial de Barrido a Temperatura Modulada (MDSC)....	79
5.3.6	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	80
5.3.7	Isotermas de sorción de agua.....	81
5.3.8	Transporte de vapor de agua.....	84
5.3.9	Actividad antioxidante.....	85
5.3.10	Actividad antimicrobiana.....	86
5.3.11	Conclusiones parciales.....	86
5.4	Desarrollo y estudio de películas activas a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de humo líquido refinado.....	88
5.4.1	Examinación visual y colorimetría CIELab.....	88
5.4.2	Propiedades mecánicas.....	89
5.4.3	Análisis termogravimétrico (TGA).....	90
5.4.4	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	93
5.4.5	Hidratación y transporte de agua.....	94
5.4.6	Actividad antioxidante.....	96
5.4.7	Actividad antimicrobiana.....	98
5.4.8	Conclusiones parciales.....	98
5.5	Caracterización de extracto de yerba mate residual.....	99

5.5.1	Contenido de sólidos totales, pH, actividad antioxidante y contenido de fenoles totales.....	99
5.5.2	Actividad antimicrobiana.....	100
5.5.3	Conclusiones parciales.....	101
5.6	Desarrollo y estudio de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de yerba mate residual.....	103
5.6.1	Examinación visual y colorimetría CIELab.....	103
5.6.2	Propiedades mecánicas .....	104
5.6.3	Análisis termogravimétrico (TGA).....	105
5.6.4	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	107
5.6.5	Hidratación y transporte de agua .....	108
5.6.6	Actividad antioxidante .....	109
5.6.7	Actividad antimicrobiana.....	111
5.6.8	Estudio de migración en simulante alimentario graso .....	111
5.6.9	Conclusiones parciales.....	114
5.7	Desarrollo y estudio de películas activas e inteligentes a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de yerba mate residual .....	115
5.7.1	Examinación visual y colorimetría en el espacio CIELab.....	115
5.7.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	116
5.7.3	Propiedades mecánicas .....	117
5.7.4	Análisis termogravimétrico (TGA).....	117
5.7.5	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	120
5.7.6	Hidratación y transporte de agua. ....	121
5.7.7	Actividad antioxidante .....	123
5.7.8	Actividad antimicrobiana.....	123
5.7.9	Estudio de migración en simulante alimentario graso .....	124
5.7.10	Estudio de sensibilidad en amoníaco y ácido acético .....	126
5.7.11	Conclusiones parciales.....	128

5.8	Aplicación de etiquetas inteligentes basadas en K-5 con YM para monitoreo de calidad en filetes de <i>Merluccius hubbsi</i> .....	129
5.8.1	Conclusiones parciales .....	136
6	CONCLUSIONES .....	137
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	141
8	BIBLIOGRAFÍA .....	143



## Glosario

- **%RSA:** porcentaje de inhibición radicalaria.
- **$\Delta H_{end}$ :** cambio de entalpía asociado a una transición endotérmica.
- **A:** área de las películas ( $m^2$ ).
- **$a_w$ :** actividad de agua
- **b.s:** base seca.
- **c:** fuerza de unión de las moléculas de agua a la monocapa.
- **CIELab:** coordenadas del espacio de color tridimensional.
- **$D_w^{eff}$ :** coeficiente de difusión efectiva del agua ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ).
- **GAE:** equivalente de ácido gálico.
- **h.r:** humedad relativa.
- **h:** contenido de agua o hidratación (gramos de agua por gramo de materia seca).
- **HL:** extracto de humo líquido refinado.
- **IC<sub>50</sub>:** concentración de extracto necesaria para estabilizar el 50% de los radicales ABTS y DPPH (mg/L).
- **k:** capacidad del agua para unirse en capas múltiples.
- **K-5:** películas a base de gránulos de kéfir de agua.
- **L:** espesor de las películas (m).
- **m.s.:** materia seca.
- **MIC:** concentración mínima inhibitoria.
- **N:** contenido de agua en la monocapa (gramos de agua por gramo de materia seca).
- **NBV:** nitrógeno básico volátil.
- **N<sub>T</sub>:** nitrógeno total (% p/p).
- **P+YM:** matriz de papel impregnado con 5% extracto de yerba mate.
- **P<sub>B</sub>:** proteína bruta (% p/p).
- **$P_w^{exp}$ :** permeabilidad al vapor de agua ( $g \cdot s^{-1} \cdot m^{-1} \cdot Pa^{-1}$ ).
- **Resd.<sub>600°C</sub>:** porcentaje de residuos remanente a 600 °C.
- **$S_w^{eff}$ :** coeficiente de solubilidad efectiva del agua ( $g \cdot m^{-3} \cdot Pa^{-1}$ ).
- **T<sub>0</sub>:** temperatura inicial de degradación.
- **T<sub>end</sub>:** temperatura de la transición endotérmica.
- **T<sub>g</sub>:** temperatura de transición vítrea.
- **T<sub>max</sub>:** temperatura máxima de degradación.

- **TPC:** contenido de fenoles totales.
- **YCW-R:** películas a base de pared celular de levadura residual cervecera.
- **YM:** extracto de yerba mate residual.
- **$\Delta E$ :** cambio de color expresado en coordenadas CIELab.
- **$v_{\Delta E}$ :** velocidad de cambio de color en un intervalo determinado.
- **$v_{NBV}$ :** velocidad de incremento del NBV en un intervalo determinado.
- **$v_r$ :** parámetro de sensibilidad obtenida por el cociente entre la velocidad de cambio de color ( $v_{\Delta E}$ ) y del NBV ( $v_{NBV}$ ) en el mismo intervalo de tiempo.
- **$\rho_{d,f}$ :** densidad de las películas secas. ( $\text{g m}^{-3}$ ).

## RESUMEN

La creciente demanda de envases plásticos, si bien crucial para prolongar la vida útil de los alimentos, genera un modelo de producción y descarte lineal que compromete la sostenibilidad ambiental del sistema alimentario global. Para abordar este problema, este trabajo se orientó al desarrollo de materiales sustentables, alternativos a los polímeros de origen fósil, con funcionalidades mejoradas (activas e inteligentes) mediante la valorización de biomásas residuales, subproductos agroindustriales y extractos naturales, destinadas a aplicaciones en la industria alimentaria. Los extractos naturales utilizados fueron humo líquido refinado (HL), un conservante alimentario natural exento de sabor y aroma ahumado, y extracto acuoso de yerba mate residual (YM), obtenido a partir de los residuos posconsumo de la infusión. En ambos extractos se determinó el contenido de fenoles totales, la actividad antioxidante ( $IC_{50}$ ) y antimicrobiana (MIC). Asimismo, se evaluó la respuesta cromática dependiente del pH del extracto de YM para analizar su potencial aplicación como indicador en el desarrollo de materiales inteligentes. Los materiales en forma de película se obtuvieron mediante la técnica de *casting*, utilizando dos biomásas: pared celular de levadura residual cervecera (YCW-R), rico en  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas, y gránulos de kéfir de agua (K-5), compuesto por dextrano (polisacárido de glucosa). En ambas matrices se incorporaron los extractos de HL (0,05% - 10% p/p b.s) y YM (5% - 20% p/p b.s) y se caracterizaron las propiedades funcionales de las películas resultantes. Los extractos de HL y YM mostraron una notable actividad antioxidante, correlacionada con su alto contenido de fenoles totales, junto con una efectiva actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Adicionalmente, el extracto de YM demostró una respuesta cromática visible en medios alcalinos, evidenciando su potencial como indicador natural en etiquetas inteligentes para el monitoreo de la frescura en productos pesqueros. La adición de HL en las películas YCW-R y K-5 mostraron un comportamiento dependiente de la concentración. Concentraciones bajas (0,05-1% p/p) mejoraron la estabilidad térmica y las propiedades mecánicas debido al entrecruzamiento entre la matriz y el extracto, confirmado por FTIR. Por el contrario, concentraciones elevadas (5-10% p/p) incrementaron la plastificación y la capacidad de hidratación. Las películas con 10% HL mostraron una relevante actividad antioxidante ( $\%RSA > 90\%$ ) y actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. La incorporación de YM en las películas YCW-R indujo una coloración oscura, atribuida a la reacción de las cianidinas en el medio alcalino de la matriz. La adición de 5% YM incrementó la rigidez en un 60%, mientras que un 20% YM mejoró las propiedades barreras al vapor de

agua. Además, los ensayos de migración en simulante de alimento graso confirmaron una actividad antioxidante dependiente de la concentración de YM y de liberación controlada, validando su potencial para envases activos. La adición de 5% y 10% YM en las películas K-5 incrementó su rigidez, mientras que el agregado de 20% ejerció un efecto plastificante. Asimismo, la adición de 20% YM mejoró las propiedades barreras al vapor de agua y confirió una notable actividad antioxidante, alcanzando porcentajes de captación radicalaria (%RSA) de  $99 \pm 1$  (ABTS) y  $71 \pm 5$  (DPPH). Además, esta concentración tuvo un efecto bactericida completo (100%) frente a *Staphylococcus aureus*. Los estudios de sensibilidad al amoníaco confirmaron una respuesta cromática visible en estas películas, validando su potencial aplicación como etiquetas inteligentes para monitorear la frescura de productos pesqueros. El monitoreo de los filetes de merluza confirmó que la sensibilidad de las etiquetas K-5 20% YM se correlaciona con los cambios del nitrógeno básico volátil (NBV) del pescado. Las etiquetas cambiaron de color al alcanzarse el límite establecido por la legislación alimentaria y exhibieron una transición cromática hacia tonos más oscuros en etapas avanzadas de degradación. Además, los resultados demostraron que la matriz K-5 con YM constituye un sistema de monitoreo más eficaz que las matrices de papel con el mismo extracto, y que la inspección visual directa de los filetes no representa un método objetivo para evaluar la frescura. En conclusión, este trabajo demostró la posibilidad de desarrollar materiales innovadores y sustentables con funcionalidades mejoradas, posicionándolos como una alternativa viable para aplicaciones en la industria de envasado alimentario.

## ABSTRACT

The growing demand for plastic packaging, while crucial for extending the shelf-life of food, generates a linear production and disposal model that compromises the environmental sustainability of the global food system. To address this problem, this work was oriented towards the development of sustainable materials, alternative to fossil-based polymers, with enhanced (active and intelligent) functionalities through the valorisation of residual biomass, agro-industrial by-products, and natural extracts, intended for applications in the food industry. The natural extracts used were refined liquid smoke (HL), a natural food preservative exempt from smoky flavour and aroma, and an aqueous extract of residual yerba mate (YM), obtained from post-consumption waste of the infusion. The total phenolic content, the antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) and antimicrobial activity (MIC) were determined for both extracts. Furthermore, the pH-dependent chromatic response of the YM extract was evaluated to analyse its potential application as an indicator in the development of intelligent materials. The film-based materials were obtained using the casting technique, employing two types of biomasses: residual brewer's yeast cell wall (YCW-R), rich in  $\beta$ -glucans and mannoproteins, and water kefir grains (K-5), composed of dextran (a glucose polysaccharide). Both HL (0.05% - 10% w/w d.b.) and YM (5% - 20% w/w d.b.) extracts were incorporated into these matrices, and the functional properties of the resulting films were characterised. The HL and YM extracts showed notable antioxidant activity, correlated with their high total phenol content, along with effective antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis*. Additionally, the YM extract demonstrated a visible chromatic response in alkaline media, evidencing its potential as a natural indicator in intelligent labels for monitoring the freshness of fish products. The addition of HL to the YCW-R and K-5 films showed concentration-dependent behaviour. Low concentrations (0.05-1% w/w) improved thermal stability and mechanical properties due to a cross-linking effect between the matrix and the extract, as confirmed by FTIR. Conversely, high concentrations (5-10% w/w) increased plasticisation and hydration capacity. Films with 10% HL showed significant antioxidant activity ( $\%RSA > 90\%$ ) and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The incorporation of YM into the YCW-R films induced a dark coloration, attributed to the reaction of cyanidins in the alkaline matrix medium. The addition of 5% YM increased stiffness by 60%, while 20% YM improved water vapour barrier properties. Furthermore, migration assays in a fatty food simulant confirmed a concentration-dependent and controlled-release antioxidant activity for YM, validating its potential for active packaging. The addition of 5%

and 10% YM to the K-5 films increased their stiffness, whereas the addition of 20% exerted a plasticising effect. Likewise, the addition of 20% YM improved water vapour barrier properties and conferred notable antioxidant activity, achieving radical scavenging activity (%RSA) percentages of  $99 \pm 1$  (ABTS) and  $71 \pm 5$  (DPPH). Furthermore, this concentration had a complete (100%) bactericidal effect against *Staphylococcus aureus*. Ammonia sensitivity studies confirmed a visible chromatic response in these films, validating their potential application as intelligent labels for monitoring the freshness of fish products. The monitoring of hake fillets confirmed that the sensitivity of the K-5 20% YM labels correlates with changes in the fish's volatile basic nitrogen (NBV). The labels changed colour upon reaching the limit established by food legislation and exhibited a chromatic transition towards darker shades in advanced stages of degradation. Furthermore, the results demonstrated that the K-5 matrix with YM constitutes a more effective monitoring system than paper-based matrices with the same extract, and that the direct visual inspection of the fillets does not represent an objective method for assessing freshness. In conclusion, this work demonstrated the possibility of developing innovative and sustainable materials with enhanced functionalities, positioning them as a viable alternative for applications in the food packaging industry.

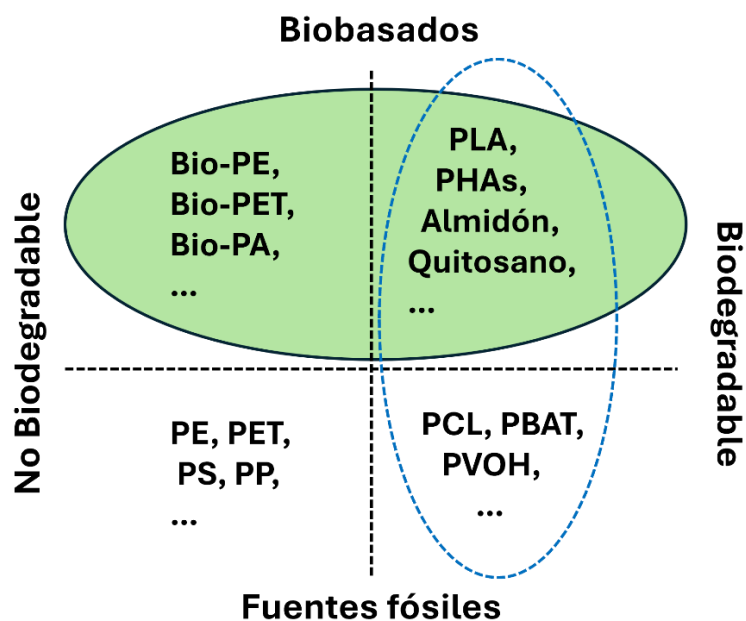
# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Materiales biobasados

Los materiales plásticos de fuentes fósiles son ampliamente utilizados en el envasado de alimentos debido a su bajo costo, ligereza, versatilidad, facilidad de procesamiento y durabilidad. La producción global de plásticos ha crecido exponencialmente desde 1950, alcanzando los 464 millones de toneladas en 2020, con proyecciones que superarían los 884 millones de toneladas para 2050 (Dockl *et al.*, 2024). Sin embargo, el alto volumen de producción, el corto tiempo de uso, la naturaleza no biodegradable y la gestión inadecuada de los plásticos han generado preocupación a nivel mundial.

La industria de envases alimentarios representa uno de los mayores consumidores de plásticos de fuentes fósiles, con un significativo impacto ambiental derivado de: (1) elevadas emisiones de gases de efecto invernadero durante su producción, (2) alto consumo de agua y energía en sus procesos de fabricación, y (3) una marcada falta de circularidad en su ciclo de vida, debido a que el 95% de los envases se diseñan para un solo uso y se desechan en períodos menores a seis meses (Kan & Miller, 2024). Esta realidad contrasta con los principios de economía circular y plantea una paradoja: mientras los envases plásticos prolongan la vida útil de los alimentos, su modelo de producción y descarte actual compromete la sostenibilidad ambiental del sistema alimentario global. Esta problemática exige buscar alternativas a estos polímeros de fuentes fósiles como materiales de base para la producción de plásticos.

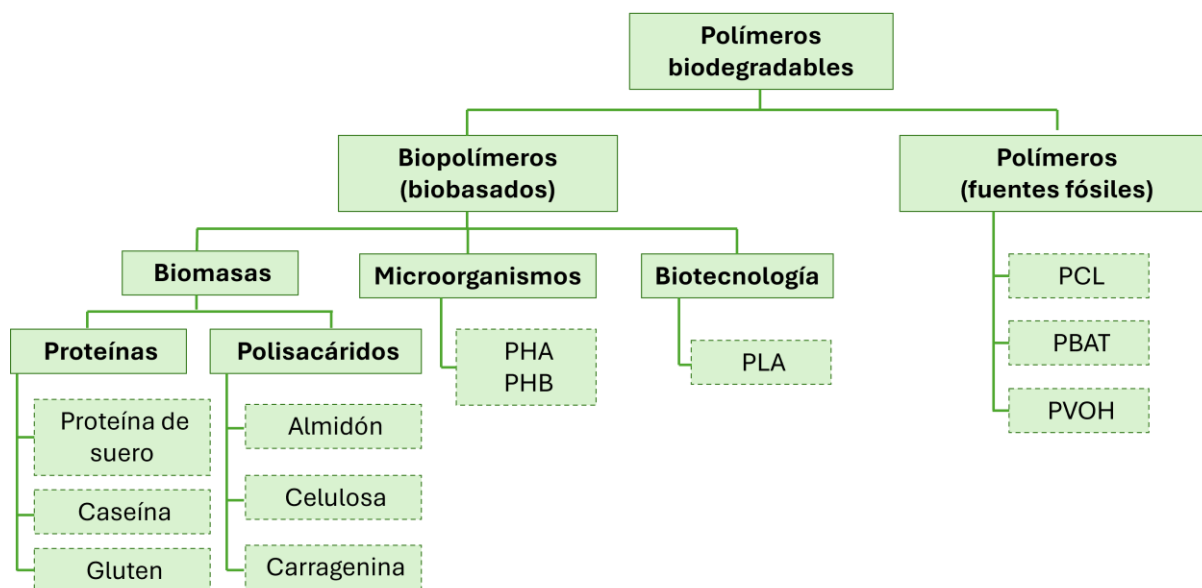
Químicamente, los polímeros son macromoléculas constituidas por monómeros repetitivos, cuya procedencia y comportamiento ambiental determinan su clasificación según la norma EN 16575 en: (1) biobasados, (2) de fuentes fósiles, (3) biodegradables y (4) no biodegradables (*Figura 1.1.1*). Es crucial destacar que los términos "biobasado" y "biodegradable" no son equivalentes, ya que describen propiedades distintas de los materiales (Eissenberger *et al.*, 2023).



*Figura 1.1.1.* Clasificación de los polímeros.

Un material se considera *biobasado* cuando su composición deriva total o parcialmente de biomasa de origen vegetal, animal o microbiana, rica en biopolímeros. Esta característica hace referencia exclusivamente al origen de la materia prima, sin implicar necesariamente que el material sea biodegradable (Oliver-Cuenca et al, 2024).

Por otro lado, la *biodegradabilidad* se refiere al proceso bioquímico mediante el cual los microorganismos descomponen el material en condiciones ambientales específicas, transformándolo en agua, dióxido de carbono y biomasa (Shah *et al.*, 2008). El proceso de biodegradación se ve afectado por diversos factores, como la morfología del polímero, la estructura, el tratamiento químico y la masa molecular (Samir *et al.*, 2022). Como ilustra la *Figura 1.1.2*, el espectro de *polímeros biodegradables* abarca desde aquellos presentes naturalmente en biomasa vegetal, animal y microbiana (proteínas y polisacáridos) hasta poliésteres sintetizados a partir de recursos biobasados (PLA), petroquímicos (PCL, PBAT, PVOH) o producidos por fermentaciones microbianas (PHA, PHB) demostrando la diversidad de estrategias disponibles (Zhong *et al.*, 2020).



**Figura 1.1.2.** Clasificación de polímeros biodegradables de fuentes renovables (biobasados) y de fuentes fósiles.

La biosfera ofrece una amplia gama de recursos naturales para la obtención de biopolímeros, los cuales pueden clasificarse en cuatro categorías principales según su origen. Entre las fuentes más destacadas se encuentran los recursos vegetales, que incluyen cultivos como arroz (Alonso-González *et al.*, 2025), maíz (Stasi *et al.*, 2020), trigo (Peron-Schlosser *et al.*, 2021), yuca (Lilavanichakul & Yoksan, 2023), papa (Calliope *et al.*, 2023), soja (Uribarrena *et al.*, 2025) y cebada (Tejinder, 2003). Estos cultivos proporcionan materias primas fundamentales para la producción química de biopolímeros, ya que contienen componentes monoméricos clave como aceites, azúcares y aminoácidos, que pueden ser transformados mediante procesos biotecnológicos y químicos en materiales poliméricos sostenibles.

Por otro lado, los recursos animales también representan una fuente importante de biopolímeros, siendo el ganado vacuno una de las principales fuentes de colágeno, gelatina y otras proteínas estructurales (Duta & Sit, 2023; Kumar *et al.*, 2023; Carter *et al.*, 2021). Además, los ecosistemas marinos aportan biopolímeros de alto valor a través de organismos como corales, esponjas, peces, langostas y camarones, de los que se obtienen quitosano (Kumari & Rath, 2014) y otros polisacáridos con aplicaciones en biomedicina, envases activos y agricultura (Ibrahim *et al.*, 2023).

Sin embargo, una de las fuentes más prometedoras y versátiles de biopolímeros es el mundo microbiano, representado por bacterias, levaduras, y hongos filamentosos. Algunos de estos microorganismos son capaces de asociarse entre ellos y formar comunidades simbióticas que realizan procesos fermentativos eficientes y escalables que producen polisacáridos como

subproducto (Cottet *et al.*, 2020). Como ejemplo tenemos las comunidades simbióticas de bacterias y levaduras del kéfir de agua, de leche y la kombucha que producen como subproducto los polisacáridos dextrano, kefirano y celulosa, respectivamente (Coma *et al.*, 2019; Ramírez Tapias *et al.*, 2024; Ramírez Tapias *et al.*, 2020). Por otra parte, algunos microorganismos tales como la levadura constituyen una biomasa rica en proteínas y polisacáridos estructurales como  $\beta$ -glucanos (Sharma *et al.*, 2024).

A diferencia de los cultivos vegetales tradicionales, los sistemas microbianos presentan ventajas significativas: (1) son una fuente de biomasa de rápido crecimiento y bajo costo (Cottet *et al.*, 2020); (2) no requieren grandes extensiones de tierra cultivable, evitando así la deforestación y el uso excesivo de herbicidas y plaguicidas (Bos *et al.*, 2012); y (3) pueden ser cultivados en biorreactores bajo condiciones controladas, optimizando la producción y reduciendo la huella ambiental (Ramírez Tapias *et al.*, 2024).

Estas características convierten a los microorganismos en una alternativa sostenible para la producción de biopolímeros destinados a aplicaciones en cosmética, industria alimentaria y biomedicina (Sharma *et al.*, 2024). En el campo biomédico, los biopolímeros derivados de levaduras y otros hongos han demostrado potencial en sistemas de liberación controlada de fármacos y materiales de curación de heridas, gracias a su biocompatibilidad y propiedades reguladoras del sistema inmunológico (Jayachandran *et al.*, 2018; Choque *et al.*, 2015). Asimismo, en la industria cosmética (Serra *et al.*, 2024), se emplean como agentes hidratantes y vehículos para la encapsulación de principios activos (Fu *et al.*, 2022). En el sector alimentario, los biopolímeros microbianos se utilizan en soluciones innovadoras como el desarrollo de *películas* y *recubrimientos biobasados* con propiedades activas e inteligentes (Yam *et al.*, 2005). Los materiales activos son aquellos que interactúan con el alimento extendiendo su vida útil, mientras que los materiales inteligentes son aquellos que informan al consumidor el estado del alimento en tiempo real. Ambos tipos de materiales se describirán en profundidad en la *sección 1.3*.

Una de las metodologías más utilizadas a escala laboratorio para la preparación de películas basadas en biopolímeros naturales es el *casting*. Esta técnica parte de una solución o dispersión de polímeros de cadenas largas, a la cual se le elimina el solvente mediante un método apropiado, generalmente evaporación. Este proceso permite que las cadenas poliméricas se aproximen entre sí de manera controlada. Cuando las cadenas poliméricas se encuentran próximas, pueden interactuar entre sí y entrecruzarse y entrelazarse, aumentando la viscosidad del sistema y llegando al estado de "*film*" o película. En sistemas acuosos, las cadenas poliméricas entrelazadas constituyen la matriz de la película, que puede estar totalmente

deshidratada, o contener agua de hidratación que actúa en forma de plastificante flexibilizando el movimiento entre las cadenas (Felton, 2013). La utilización de películas biobasadas en aplicaciones alimentarias se basa en ciertas características tales como disponibilidad, propiedades funcionales, mecánicas (tensión y flexibilidad), ópticas (brillo y opacidad), sus propiedades barreras frente al flujo de gases y vapor de agua, resistencia estructural al agua, a microorganismos y su aceptabilidad sensorial. Estas características son influenciadas por parámetros como el tipo de material implementado como matriz estructural (conformación, masa molecular, distribución de cargas), las condiciones bajo las cuales se preforman las películas (tipo de solvente, pH, concentración de componentes, temperatura) y el tipo y concentración de los aditivos (plastificantes, agentes entrecruzantes, antimicrobianos, antioxidantes) (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

Los plastificantes son esenciales para mejorar la integridad y las propiedades mecánicas de las películas biopoliméricas (Perera *et al.*, 2023). Típicamente, los plastificantes son moléculas pequeñas, siendo el glicerol —un compuesto triol simple— el más utilizado en películas a base de biopolímeros debido a su buena miscibilidad y bajo costo (Ramírez Tapias *et al.*, 2024). Los plastificantes desestabilizan los enlaces de hidrógeno interpoliméricos, reduciendo las fuerzas intermoleculares y, por lo tanto, aumentando la movilidad y el espacio entre las cadenas de polímeros (Özeren *et al.*, 2021). En consecuencia, los plastificantes pueden modificar las propiedades mecánicas. Es así que pueden reducir la resistencia a la tracción y la dureza, mientras aumentan la elongación en la rotura, así como la flexibilidad y la resistencia a la fractura de la matriz polimérica (Ramírez Tapias *et al.*, 2020). Adicionalmente, los plastificantes suelen aumentar la hidratación de la película y disminuir las propiedades de barrera al vapor de agua (Delgado *et al.*, 2018b).

Los biopolímeros para el envasado de alimentos se encuentran principalmente en fase de investigación. Aunque presentan desafíos, como su inherente hidrofiliidad, demuestran un gran potencial para su escalado industrial como alternativa sostenible a los plásticos convencionales (Muneer *et al.*, 2021). Para lograr esto, es fundamental que su procesamiento utilice métodos ya establecidos en la industria de polímeros sintéticos, tales como la extrusión, el moldeo por inyección, el termoformado y, más recientemente, la impresión 3D. Su producción a gran escala podría reducir significativamente la contaminación ambiental y acelerar la transición hacia una economía circular.

En consecuencia, en este trabajo se desarrollarán películas biobasadas mediante la técnica de *casting* para realizar una caracterización exhaustiva de sus propiedades físico-químicas y funcionales. Este estudio permitirá determinar las características fundamentales del material,

identificar sus ventajas y limitaciones, y sentar las bases para su futuro procesamiento mediante tecnologías escalables industrialmente, como las previamente mencionadas.

## 1.2 Uso de residuos industriales para el desarrollo de materiales

Los residuos y subproductos agroalimentarios, históricamente considerados como materiales de escaso valor, han adquirido en la actualidad un notable interés científico-tecnológico como materias primas estratégicas para la fabricación de envases biobasados con propiedades mejoradas (Zhang & Sablani, 2021; Guillard *et al.*, 2018). Los biopolímeros obtenidos de estas fuentes presentan aplicaciones potenciales en diversos sistemas de envasado, incluyendo la producción de bioplásticos, recipientes termoformados, embalajes de un solo uso y recubrimientos comestibles para protección alimentaria (Abotbina *et al.*, 2022). La utilización de estos materiales de origen biológico ofrece ventajas sustanciales desde la perspectiva de la sostenibilidad: su naturaleza renovable, la ausencia de toxicidad, su capacidad de reciclaje y su competitividad económica los posicionan como alternativas viables a los materiales convencionales derivados del petróleo.

Por otro lado, el procesamiento de biomasa agrícola destinada a la industria alimentaria genera considerables volúmenes de subproductos, residuos y desechos orgánicos (Baetge & Kaltschmitt, 2018). Se estima que más del 50% de las frutas y hortalizas frescas se pierden durante las etapas de postcosecha, procesamiento, almacenamiento y consumo (Rezaei & Liu, 2017). Sin embargo, estos residuos, principalmente constituidos por bagazo (compuesto por pulpa, cáscaras, semillas y tallos), representan una fuente valiosa de polisacáridos, proteínas, pigmentos y compuestos fenólicos con múltiples aplicaciones potenciales (Szymańska-Chargot *et al.*, 2017).

Las biomásas microbianas residuales constituyen desechos generados por la industria de alimentos y bebidas, caracterizados por su riqueza en microorganismos (bacterias, levaduras y otros hongos) que confieren un alto valor biotecnológico. Este potencial reside en su contenido de biopolímeros estructurales (como  $\beta$ -glucanos, quitina y celulosa microbiana), proteínas y compuestos bioactivos (Cottet *et al.*, 2020). En este trabajo, se utilizaron levaduras residuales de la industria cervecera (*sección 1.2.1*), un residuo que se genera masivamente tras el proceso de fermentación y que, debido a su elevada carga orgánica, no puede destinarse a vertederos, siendo actualmente utilizado principalmente para alimentación animal. No obstante, esta biomasa, de bajo costo, abundante y con un alto contenido de  $\beta$ -glucanos y proteínas, reúne las características idóneas para su aprovechamiento en el desarrollo de materiales biobasados activos (*sección 1.3*).

Por otra parte, los microorganismos forman consorcios simbióticos integrados por bacterias y levaduras. En esta cooperación mutualista, establecen una cadena trófica donde los desechos de una especie son el alimento de otra (Cottet *et al.*, 2020). La interacción deriva en un proceso de fermentación cuyo subproducto es, generalmente, un exopolisacárido. Estos son polisacáridos extracelulares sintetizados y secretados por bacterias, como las presentes en el kéfir de agua y leche, mediante la acción de proteínas de membrana específicas (Ramírez Tapias *et al.*, 2024). En la producción de las bebidas de kéfir, estos polisacáridos constituyen los comúnmente denominados gránulos, de los cuales solo una fracción menor se reutiliza como inóculo para nuevos cultivos (Cottet *et al.*, 2020). En este trabajo se utilizaron gránulos de kéfir de agua (*sección 1.2.2*), una biomasa de fácil y rápida obtención, compuesta principalmente por dextrano. Este polisacárido está constituido por cadenas lineales de glucosa con uniones  $\alpha$ -D-1,6 y con una baja proporción de ramificaciones  $\alpha$ -1,3 (Coma *et al.*, 2019). Estudios previos realizados en LOMCEM (Coma *et al.*, 2019; Lago *et al.*, 2023), han demostrado la factibilidad de utilizar esta biomasa para la preparación de películas transparentes y destacadas propiedades mecánicas, que sustentan su potencial como matriz para el desarrollo de materiales activos e inteligentes (*sección 1.3*).

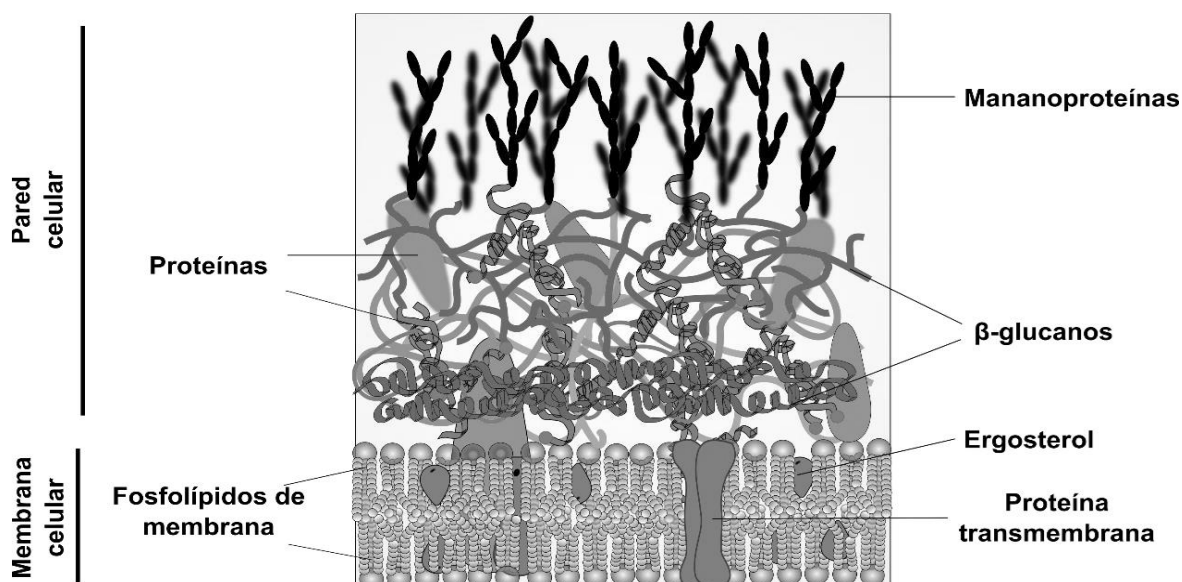
### **1.2.1 Biomasa de levadura residual cervecera**

Entre las biomasas microbianas derivadas de residuos industriales, destacan las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, un ingrediente alimentario seguro, económico y de alta disponibilidad. Históricamente, este hongo unicelular ha sido fundamental para procesos industriales clave como la producción de etanol y dióxido de carbono en panificación, vitivinicultura y destilerías. Sin embargo, investigaciones recientes revelan aplicaciones innovadoras para su biomasa residual. La levadura residual contiene aproximadamente 50% de su peso seco en proteínas y polisacáridos estructurales, componentes con extraordinario potencial para su aplicación en matrices filmogénicas (Delgado *et al.*, 2016).

El Dr. Delgado, integrante del grupo de investigación LOMCEM, ha estudiado y demostrado la factibilidad de la aplicación de la biomasa de levadura entera para la producción de películas (Delgado *et al.*, 2016; Delgado *et al.*, 2018a; Delgado *et al.*, 2018b). Sus investigaciones sentaron precedente al desarrollar una metodología que combina la ruptura celular de levaduras mediante homogeneización a alta presión (125 MPa) y tratamiento térmico a 90 °C (Delgado *et al.*, 2016). En su trabajo se estudiaron las distintas fracciones de la célula para la producción de películas. Se observaron mejoras en las propiedades térmicas, mecánicas y de barrera al vapor de agua de las películas obtenidas al utilizar la fracción insoluble (pared

celular) y alcalinización de la dispersión (Delgado *et al.*, 2021; Delgado, 2021, pp. 183-201). Estas mejoras se atribuyen principalmente a su composición rica en  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas.

La pared celular de las levaduras (*Figura 1.2.1*) está compuesta por 55-65%  $\beta$ -glucanos y 35-40% mananoproteínas (Fan *et al.*, 2025). Estructuralmente, los  $\beta$ -glucanos presentes en estas biomásas presentan una cadena principal de  $\beta$ -(1,3)-D-glucosa con ramificaciones de  $\beta$ -(1,6)-D-glucosa, lo que les confiere propiedades bioactivas únicas. Numerosas investigaciones han demostrado que los  $\beta$ -glucanos fortalecen el sistema inmunitario, poseen actividad antioxidante, antibacteriana, antitumorales y antivirales, además de acelerar la cicatrización de heridas (Peltzer *et al.*, 2018b; Jayachandran *et al.*, 2018).



*Figura 1.2.1.* Vista transversal de la membrana y pared celular de levadura *S. cerevisiae*.  
Fuente: Delgado, 2021, p. 35.

La elevada concentración de biopolímeros en esta biomasa permite producir películas cuyas propiedades dependen de su origen, la concentración de plastificante y la incorporación de agentes activos. En este sentido, trabajos realizados en LOMCEM, han demostrado que las matrices de pared celular de levadura son portadores óptimos de agentes antimicrobianos y antioxidantes naturales (Rezzani *et al.*, 2022). La incorporación de metabolitos fúngicos en estos materiales, exhibieron una notable actividad antioxidante, alcanzando aproximadamente un 90% de inhibición de radicales libres tras 15 minutos de incubación. Asimismo, en medios simulantes de alimentos grasos, la liberación de los compuestos activos mostró una

dependencia directa con la concentración inicial del aditivo, observándose un incremento progresivo a lo largo del tiempo.

Por su parte, la Dra. Peltzer, estudió la utilización de biomasa residual proveniente de la fabricación de extracto de levadura. Este producto es obtenido tras la hidrólisis mecánica o enzimática de las células de levadura, luego el material intracelular es aislado y utilizado para suplementos alimentarios, realzadores de sabor o para medios de cultivo. La pared celular (rica en polisacáridos y proteínas) es descartada como residuo o para alimentación animal (Peltzer *et al.*, 2018). A partir de esta biomasa se preparó una dispersión al 5% p/p en base seca, se le realizó un tratamiento térmico a 90 °C durante 20 min, se alcalinizó a pH 11 y se agregaron distintas concentraciones de glicerol como plastificante. Las películas obtenidas por el método de *casting* fueron homogéneas y de color amarillo-marrón. La caracterización reveló que, aunque el glicerol incrementó la solubilidad de las películas, este permaneció efectivamente unido dentro de la red polimérica. Además, se identificó que una concentración de glicerol al 15% en peso era la óptima para las propiedades mecánicas, aunque la permeabilidad al vapor de agua exhibió un aumento lineal con el contenido de glicerol, reflejando el papel del plastificante en la modulación de las propiedades hidrofílicas.

En la industria cervecera, la levadura residual representa el segundo subproducto más abundante, superado solo por los residuos de grano o también llamado bagazo. La separación de la levadura del medio fermentado ocurre mediante floculación, un proceso natural que tiene lugar en las etapas finales de la fermentación. Durante este fenómeno, miles de células de levadura se agregan formando "flóculos", los cuales pueden ascender a la superficie (en el caso de levaduras de fermentación alta) o sedimentar en el fondo del tanque (levaduras de fermentación baja) (Jaeger *et al.*, 2020).

Una porción minoritaria de esta levadura se reutiliza para iniciar nuevos ciclos de fermentación mediante reinoculación, mientras que el excedente constituye un residuo. Aunque los productores la reciclan entre 3 y 5 veces, y en algunos casos hasta 8-10 ciclos, su vida útil está limitada por la degeneración celular y la acumulación de metabolitos que alteran el perfil sensorial de la cerveza (Loviso y Libkind, 2018).

El vertido directo de este residuo a efluentes está prohibido sin tratamiento previo, debido a su alta carga orgánica y un valor de demanda química de oxígeno (DQO) de 0,53 kg/hL, que generaría un impacto ambiental severo (Jaeger *et al.*, 2020). Se estima que el volumen de levadura residual equivale al 1,5-2,5% de la producción total (Ferreira *et al.*, 2010). En Argentina, donde la producción anual supera los 20 mil millones de hectolitros de cerveza, esto se traduce en aproximadamente 400 millones de hectolitros anuales de residuo (MAGyP,

2010). Pese a su potencial, en muchos casos este subproducto solo se destina a alimentación animal, desaprovechando oportunidades de valorización tecnológica.

En este trabajo se empleó levadura residual procedente de una cervecería artesanal local, la cual fue sometida a un proceso de ruptura celular mediante homogeneización mecánica a alta presión, con el fin de obtener biomasa de pared celular de levadura. Este material innovador se utilizó de forma integral (sin purificación previa de sus biopolímeros constituyentes) para la fabricación de películas activas destinadas a aplicaciones en el envasado de alimentos.

### 1.2.2 Biomasa de kéfir de agua

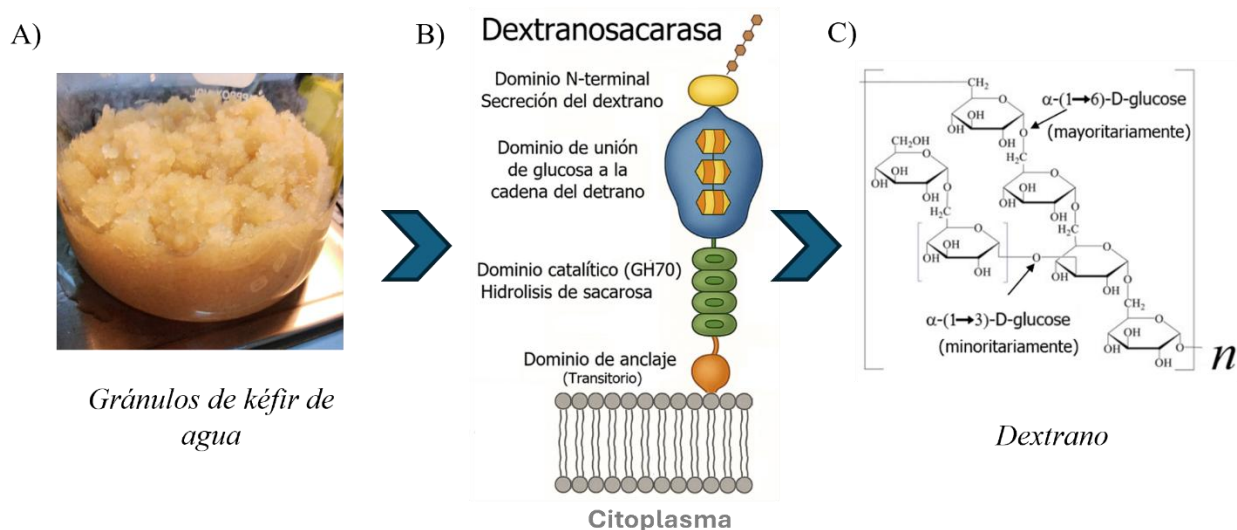
El kéfir de agua es una bebida fermentada, ligeramente ácida y de bajo contenido alcohólico (<3% vol.), elaborada mediante la fermentación de una solución acuosa azucarada con higos y limón, producida por cultivos iniciadores denominados *nódulos*, *tibicos* o *gránulos de kéfir de agua*. El Código Alimentario Argentino (CAA) define esta bebida como: “Kéfir de agua (Water kefir o Sugary kefir) a la bebida obtenida a partir de la fermentación de gránulos de kéfir de agua en agua azucarada de la cual se han retirado los nódulos (cultivo iniciador)” (Argentina, 2024). El origen del kéfir de agua es incierto, algunos reportes de 1892 indican que los gránulos se denominaban "*gingerbeer plants*" y que fueron importados por soldados británicos durante la Guerra de Crimea en 1855. Otros reportes de 1899 mencionan un sistema similar llamado “Tibi”, de origen mexicano y asociado a plantas de *Opuntia*, una especie de cactus de cuyas hojas fueron extraídos (Gulitz *et al.*, 2011).

Hasta la fecha, se conoce que la diversidad de especies microbianas del kéfir de agua consiste en un consorcio estable compuesto principalmente por bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras (Cottet *et al.*, 2020). Estas cepas no patógenas, junto con los metabolitos que producen y que permanecen en la bebida fermentada “kéfir”, ejercen múltiples efectos beneficiosos para la salud. Entre ellos destacan: propiedades probióticas, regulación de la composición de la microbiota intestinal, actividad antimicrobiana y mejoras en la salud inmunometabólica. Además, presentan efectos específicos como actividad anticancerígena, antihipertensiva y antioxidante, entre otros (Papadopoulou *et al.*, 2024).

En la elaboración de la bebida probiótica “kéfir” se genera como subproducto de fermentación los gránulos. Estos albergan al consorcio microbiano adheridos a su superficie, por lo que una pequeña porción de estos puede reutilizarse como iniciador (o inóculo) para nuevos cultivos. Esta biomasa se produce en grandes cantidades, llegando a duplicarse tras un período de 48 horas (Lago *et al.*, 2023).

Los gránulos de kéfir de agua (*Figura 1.2.2*) están constituidos por exopolisacáridos, compuestos predominantemente por dextrano (~99%). Este polímero está conformado por cadenas lineales de glucosa con enlaces  $\alpha$ -D-1,6 y presenta una baja proporción de ramificaciones  $\alpha$ -1,3 (Coma *et al.*, 2019). La síntesis de este polisacárido es producida por la enzima dextranosacarasa, una proteína inicialmente unida a la membrana celular de bacterias lácticas, principalmente *Leconostoc mesenteroides*, y luego liberada al medio (Lanvers *et al.*, 2025; Naessens *et al.*, 2005). Estas proteínas, están constituidas por varios dominios que hidrolizan la sacarosa del medio y polimerizan la glucosa para formar una cadena de dextrano, la cual es finalmente excretada (Naessens *et al.*, 2005). La longitud de esta cadena determina directamente la masa molecular del polímero, la cual depende de la actividad de la enzima al unir las unidades de glucosa. Esta actividad puede verse afectada por diversos factores (pH del medio, temperatura, etc.), lo que confiere una alta polidispersidad en la masa molecular del dextrano producido (Lanvers *et al.*, 2025).

Estudios realizados en LOMCEM han determinado que el dextrano obtenido posee una masa molecular promedio de  $3,3 \times 10^6$  Da. Este alto peso molecular le confiere propiedades notables, como una elevada viscosidad y una marcada capacidad gelificante. Asimismo, la abundancia de grupos hidroxilos en su estructura lo convierte en un compuesto altamente hidrofílico (Delgado *et al.*, 2025).



**Figura 1.2.2.** A) Gránulos de kéfir de agua; B) Proteína productora de dextrano (dextranosacarasa); C) Estructura química del dextrano.

Desde el año 2024, el kéfir de agua se encuentra incorporado en el Código Alimentario Argentino (Artículo 1084 del capítulo XIII “Bebidas fermentadas”), con esta medida se espera que se incremente la distribución y producción a mayor escala (Argentina, 2024). Actualmente,

si bien es posible encontrar bebidas de kéfir comercializadas en supermercados, centros comerciales y tiendas naturistas, la forma predominante de adquisición y transmisión del conocimiento sobre su preparación sigue métodos tradicionales (CONICET, 2023).

A menudo, el kéfir de agua es confundido con el kéfir de leche, tanto por consumidores como en cierta literatura científica, a pesar de que sus características son marcadamente diferentes (Moretti *et al.*, 2022). Si bien ambos son consorcios simbióticos de bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras, se distinguen fundamentalmente en tres aspectos. Primero, por su medio de cultivo: el de leche emplea la lactosa como sustrato, mientras que el de agua se fermenta en una solución acuosa azucarada. Segundo, por la morfología de sus gránulos: los del kéfir de leche poseen una estructura similar a una coliflor, de 1 a 4 cm, y color blanco a amarillo claro (Azizi *et al.*, 2021); en contraste, los gránulos de kéfir de agua son gelatinosos, translúcidos, de color amarillento a marrón, con formas irregulares y un tamaño que va desde milímetros hasta pocos centímetros (Moretti *et al.*, 2022). La tercera y crucial diferencia reside en la composición de los exopolisacáridos que forman los gránulos: el kéfir de leche está compuesto principalmente por kefirán, un heteropolisacárido ramificado de glucosa y galactosa en proporciones similares, mientras que, como se ha mencionado, el kéfir de agua se compone casi en su totalidad por dextrano, un polímero lineal de glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,6 y algunas ramificaciones  $\alpha$ -1,3.

Existen numerosos reportes sobre el uso de dextrano comercial de bajo peso molecular (70 kDa – 150 kDa) para diversas aplicaciones (Campos *et al.*, 2016; Díaz-Montes, 2021). En cambio, en este trabajo se utilizó el grano de kéfir de agua, el cual, luego de sucesivos lavados con agua destilada, produce dextrano de alta pureza (99%) y de alto peso molecular ( $3,3 \times 10^6$  Da) (Delgado *et al.*, 2025). Por esta razón, el uso integral de los gránulos de kéfir de agua se presenta como una alternativa más eficiente y sustentable para el aprovechamiento de estas biomazas microbianas. En esta línea, estudios realizados en LOMCEM han demostrado la factibilidad de desarrollar películas biodegradables mediante la técnica de *casting*, utilizando directamente la biomasa integral de gránulos de kéfir de agua. Dichas investigaciones evaluaron el efecto de la concentración de biomasa y del plastificante en las propiedades fisicoquímicas, térmicas, mecánicas y barrera al vapor de agua del material resultante (Coma *et al.*, 2019). Las películas obtenidas destacaron por su excelente transparencia y notables propiedades mecánicas, alcanzando valores excepcionales de elongación ( $275 \pm 15\%$ ) con la incorporación de 30% de glicerol como plastificante. Este comportamiento se atribuye principalmente a la acción molecular del glicerol con las moléculas de dextrano, reduciendo las fuerzas cohesivas entre las cadenas poliméricas, incrementando su movilidad y mejorando

significativamente la flexibilidad del material. Cabe destacar que estos valores de deformación superaron ampliamente los reportados para otros materiales biodegradables en condiciones similares, incluyendo películas de kefirán plastificado con mayor concentración de glicerol (35%, ~170% de elongación) e incluso materiales convencionales como el polietileno de alta densidad ( $150 \pm 8\%$ ) (Cottet *et al.*, 2020), lo que posiciona a estas películas basadas en kéfir de agua como una alternativa prometedora en el desarrollo de materiales sostenibles.

La biomasa de gránulos de kéfir de agua, revalorizada bajo los principios de economía circular, fue seleccionada para este estudio debido a su capacidad comprobada de formar películas biobasadas con propiedades funcionales destacables, tales como su transparencia y capacidad de elongación (Coma *et al.*, 2019; Lago *et al.*, 2023).

En la presente investigación se exploró específicamente el potencial de esta biomasa para dos aplicaciones innovadoras: por un lado, la producción de películas activas mediante la incorporación de compuestos bioactivos, aprovechando la transparencia de las películas para desarrollar películas inteligentes para aplicaciones en el monitoreo de calidad alimentaria, particularmente como indicadores de frescura en tiempo real.

### 1.3 Materiales activos e inteligentes

Numerosas investigaciones han demostrado que las películas biobasadas pueden proporcionar propiedades de barrera contra el oxígeno (Oyom *et al.*, 2022; Senturk Parreidt *et al.*, 2018; Kjellgren *et al.*, 2006), grasas (Coltelli *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2000), y/o vapor de agua (Vijayan *et al.*, 2023; de Oliveira Filho *et al.*, 2020; Bosquez-Molina *et al.*, 2003). Si bien estos materiales protegen y conservan la frescura de los alimentos envasados hasta cierto punto, aún no existen soluciones óptimas disponibles en el mercado. Además, en muchos casos, sería deseable una mayor extensión de la vida útil de los productos.

Para abordar esta limitación, los *envases activos* representan un avance significativo al incorporar componentes que interactúan directamente con el alimento. Estos sistemas innovadores pueden operar mediante dos mecanismos: *sistemas absorbentes*, que eliminan compuestos indeseables como humedad, oxígeno o etileno, y *sistemas emisores*, que liberan sustancias activas como CO<sub>2</sub>, etanol o conservantes naturales (Deshmukh *et al.*, 2023). Entre estos últimos, los *agentes antimicrobianos* y *antioxidantes* son los más estudiados por su impacto directo en la seguridad y estabilidad de los alimentos (Benbettaïeb *et al.*, 2018).

En este contexto, las *películas biobasadas activas* con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas surgen como una solución prometedora (Gigante *et al.*, 2021). Estos materiales no solo pueden mejorar las propiedades barreras, sino que también permiten la liberación

controlada de compuestos bioactivos, prolongando así la vida útil de los alimentos (Jamroz *et al.*, 2019). Su desarrollo representa uno de los mayores desafíos tecnológicos para la industria, ya que deben combinar eficacia con sostenibilidad y seguridad (Perera *et al.*, 2023).

Los *agentes antioxidantes* juegan un papel crucial en alimentos grasos, donde previenen la oxidación lipídica responsable de la rancidez, alteraciones organolépticas y pérdida de valor nutricional (Domínguez *et al.*, 2019). Su eficacia depende de factores como su estructura molecular, la matriz del envase y la cinética de migración hacia el alimento, donde actúan mediante mecanismos redox específicos (Deshmukh & Gaikwad, 2024). Los polifenoles, son compuestos con múltiples beneficios para la salud humana, destacándose su efecto preventivo contra enfermedades cardiovasculares, así como sus propiedades antiinflamatorias, anticoagulantes, anticancerígenas y particularmente su potente actividad antioxidante, que los convierte en compuestos de gran interés para la industria alimentaria y farmacéutica (Nemes *et al.*, 2020). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en productos de origen vegetal (verduras, hierbas, semillas), y también pueden ser recuperados de residuos agroindustriales como cáscaras, salvado y cascarillas, que normalmente son descartados durante el procesamiento de alimentos.

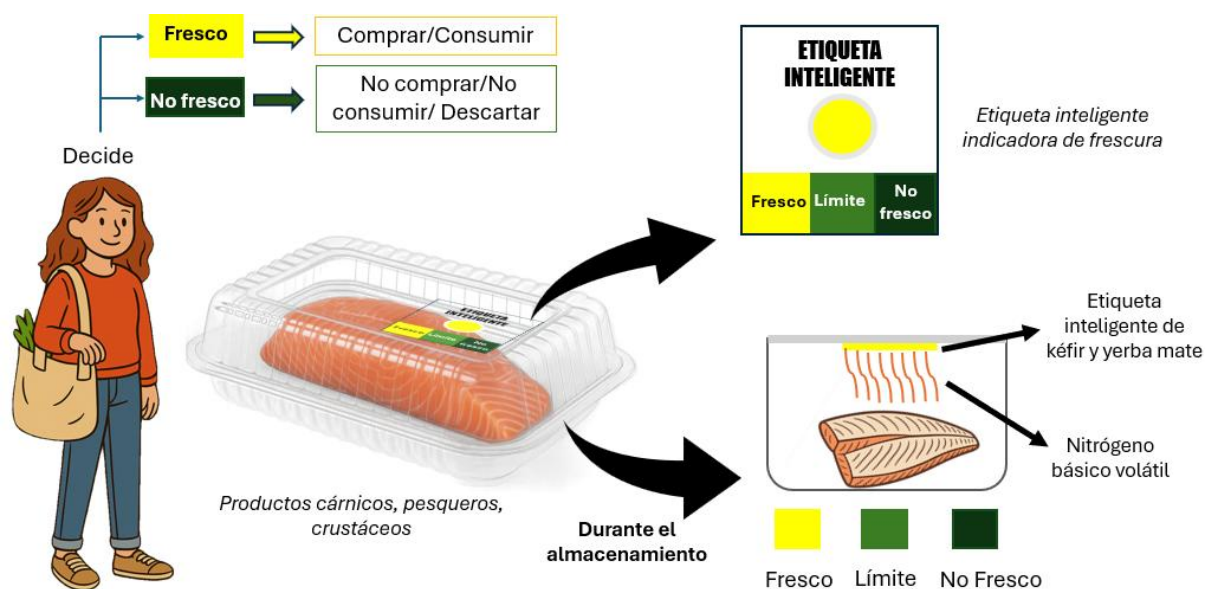
Los sistemas de envasado antimicrobiano representan un avance tecnológico clave en la preservación de alimentos, donde la liberación controlada y sostenida de agentes bioactivos ejerce un efecto inhibitorio sobre microorganismos patógenos y alterantes en la interfase alimento-envase (Cha & Chinnan, 2004). Particularmente, los *agentes antimicrobianos* de origen natural han adquirido especial relevancia como alternativa sostenible a los conservantes sintéticos, exhibiendo diversos modos de acción que incluyen la interferencia con rutas metabólicas esenciales y la desestabilización de membranas celulares (Malhotra *et al.*, 2015). La implementación de estas tecnologías no solo prolonga la vida útil de los alimentos, sino que además preserva sus atributos de calidad y garantiza su seguridad microbiológica a lo largo de la cadena de distribución, posicionándose como una herramienta estratégica para la industria alimentaria.

Otro avance en el ámbito del envasado de alimentos son los *materiales inteligentes*, ya que permiten el monitoreo en tiempo real de las alteraciones asociadas a la calidad del producto o de las condiciones del entorno que lo contiene, proporcionando información objetiva al consumidor (Yam *et al.*, 2005). Estos sistemas están adquiriendo especial relevancia en el sector de productos pesqueros, dado su elevado grado de susceptibilidad al deterioro. Tradicionalmente, el consumidor ha dependido de parámetros organolépticos subjetivos (color, brillo, aroma) para evaluar la frescura y decidir su consumo. No obstante, la implementación

de estos sistemas inteligentes ofrece una herramienta complementaria basada en indicadores objetivos, facilitando así la selección de productos en óptimo estado de frescura y contribuyendo a garantizar la seguridad alimentaria.

Las *etiquetas indicadoras de frescura* consisten en un sustrato que incorpora un pigmento, cuya coloración se modifica en respuesta a las variaciones de pH del medio (Balbinot-Alfaro *et al.*, 2019). En el caso de los productos pesqueros, este mecanismo adquiere especial relevancia debido a que la proliferación microbiana y enzimática durante el deterioro genera compuestos nitrogenados volátiles, como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), trimetilamina (TMA) y dimetilamina (DMA), productos de la degradación del óxido de trimetilamina (OTMA) presente en los tejidos (Zhai *et al.*, 2017).

En la *Figura 1.3* se muestra el mecanismo de acción de las etiquetas inteligentes para el monitoreo de frescura en pescados u otros productos cárnicos. Los compuestos nitrogenados volátiles generados durante el proceso de degradación se acumulan progresivamente en el espacio de cabeza del envase. Dado su carácter alcalino (Ezati *et al.*, 2019), estos compuestos interactúan con las etiquetas indicadoras presentes en el interior del envase, produciendo un cambio de color visible (Dodange *et al.*, 2024). Este fenómeno proporciona al consumidor una señal directa y objetiva del estado de frescura del producto.



**Figura 1.3.** Esquema de funcionamiento de las etiquetas inteligentes indicadoras de frescura a base de kéfir y extracto de yerba mate residual.

La cuantificación de nitrógeno básico volátil (NBV) es el método reconocido por el Código Alimentario Argentino (CAA) para evaluar la calidad de los productos pesqueros. En

particular, la legislación argentina establece un límite máximo de 30 mg de N/100 g de muestra para especies de peces teleósteos marinos, incluyendo peces planos (ej.: lenguados) y merluzas (*Merluccius hubbsi*, *M. merluccius* y *M. australis*) (Burkhard *et al.*, 2023).

En este contexto, las etiquetas inteligentes emergen como una alternativa prometedora, ya que permiten monitorear la frescura del pescado en tiempo real mediante cambios de color, proporcionando información cualitativa o semicuantitativa. Estas tecnologías presentan ventajas significativas frente a los métodos analíticos tradicionales, destacándose por su rapidez, carácter no destructivo, y bajo costo (Zhang *et al.*, 2022). En los últimos años, ha aumentado el interés en el desarrollo de materiales inteligentes basados en biopolímeros y colorantes naturales, destacados por su seguridad, biocompatibilidad y baja toxicidad (Zhang *et al.*, 2019). Entre los colorantes naturales más empleados como indicadores de frescura se encuentran las antocianinas, la curcumina, la alizarina y las betaninas, extraídos de fuentes vegetales como repollo colorado, arándanos, azafrán y cúrcuma (Priyadarshi *et al.*, 2021). Además, investigaciones recientes destacan el potencial de los subproductos agrícolas como fuente de sustratos y colorantes para el desarrollo de materiales inteligentes, estableciendo así un modelo de economía circular en el sector del envasado alimentario (Nemes *et al.*, 2020).

En base a lo expuesto, este trabajo propone el desarrollo de materiales activos e inteligentes utilizando como matrices la biomasa residual de levadura cervecera y los gránulos de kéfir de agua, incorporando para ello agentes bioactivos que se detallarán en la sección siguiente.

#### **1.4 Extracto de humo líquido refinado**

El humo líquido es un aditivo natural ampliamente utilizado en la industria alimentaria para impartir aroma y sabor ahumado a carnes, pescados y quesos. Su uso presenta ventajas significativas frente a las técnicas de ahumado tradicionales: facilidad de aplicación, rapidez, uniformidad de las características finales del alimento, limpieza en el proceso y menor impacto ambiental. Además, permiten un control más preciso de compuestos tóxicos, especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos, derivados del proceso de combustión (Soldera *et al.*, 2008).

Los extractos de humo líquido se obtienen mediante la condensación y posterior purificación del humo generado durante la pirólisis controlada de virutas o aserrín de madera en condiciones de oxígeno limitado (Lingbeck *et al.*, 2014). La composición química de estos extractos está determinada fundamentalmente por el tipo de madera utilizado y su contenido de humedad, siendo este último parámetro particularmente relevante ya que influye directamente tanto en la temperatura alcanzada durante el proceso de pirólisis como en la duración de la generación del

humo. La composición de los extractos de humo líquido es extremadamente compleja, integrando compuestos pertenecientes a diversas clases químicas: aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, ésteres, derivados de furano y pirano, derivados fenólicos, hidrocarburos y compuestos nitrogenados (Montazeri *et al.*, 2013b). Desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, los compuestos fenólicos representan una fracción particularmente relevante. Este grupo está constituido principalmente por fenol, 2-metoxifenol (guayacol), 2,6-dimetoxifenol (siringol) y sus derivados, así como por dihidroxibencenos originados durante la pirólisis de la lignina. Los compuestos fenólicos han sido identificados como los principales responsables del aroma característico del humo, además de contribuir significativamente a la actividad antimicrobiana y antioxidante en los alimentos ahumados (Xin *et al.*, 2021; Soldera *et al.*, 2008).

Aunque el humo líquido posee propiedades antibacterianas y antioxidante que lo convierten en un potencial conservante, su intenso aroma ahumado limita su aplicación en diversos sistemas alimentarios (Montazeri *et al.*, 2013a). Esta limitación ha motivado el desarrollo de formulaciones refinadas del extracto con perfiles de sabor y color modificados, conservando su capacidad como agente conservante natural (Toledo, 2007). Se ha reportado que los extractos de humo líquido refinado poseen un contenido reducido de compuestos fenólicos (principales responsables de las notas ahumadas), valores de acidez comprendidos entre pH 2,0 y 4,3 con una acidez titulable que oscila del 1,5% al 5,9%, junto con concentraciones significativas de compuestos carbonílicos (110-200 mg/mL) (Montazeri *et al.*, 2013a). A pesar del reducido contenido de fenoles, estudios han demostrado que el alto contenido de compuestos carbonilos y ácidos orgánicos les confieren significativa actividad antibacteriana a estos extractos refinados (Lingbeck *et al.*, 2014, Toledo, 2007).

Estudios recientes demuestran que el extracto de humo líquido refinado presenta un gran potencial para el desarrollo de películas activas. Se ha incorporado exitosamente en matrices biopoliméricas como hidroxipropilmetilcelulosa, caseína, carragenina y películas basadas en proteína de suero lácteo (Soazo *et al.*, 2016). Sin embargo, estos trabajos no caracterizaron completamente las propiedades de las películas resultantes. Otras investigaciones revelaron que la adición de humo líquido al 3% p/p (peso seco) en películas de gelatina (Wang *et al.*, 2016), y en concentraciones del 5%, 10% y 15% v/v en películas de proteína de suero, mejoró significativamente las propiedades barrera, térmicas y mecánicas del material (Soazo *et al.*, 2016). Este efecto se atribuye a la capacidad de entrecruzamiento de los compuestos carbonílicos del extracto con las proteínas de la matriz (Wang *et al.*, 2016). El entrecruzamiento implica la formación de diferentes tipos de enlaces entre las cadenas poliméricas para generar

una red tridimensional más fuerte (Garavand *et al.*, 2017). Pueden clasificarse según el tipo de enlace que se produce, lo que da lugar a un entrecruzamiento físico creado por enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido (interacciones de Van der Waals). Por su parte, los enlaces covalentes, también llamados enlaces químicos, involucran energías mayores en orden de magnitud comparadas con las de los enlaces físicos, estos enlaces covalentes involucran interacciones electrónicas que resultan en compartir electrones entre átomos estableciendo orbitales moleculares regidos por el Principio de Exclusión de Pauli de la mecánica cuántica.

Sin embargo, persisten interrogantes sobre el comportamiento de matrices biopoliméricas ante concentraciones elevadas de humo líquido (superiores al 1% p/p), así como sobre ciertos efectos observados a bajas concentraciones. La investigación en esta área resulta crucial para comprender plenamente las interacciones extracto-biopolímero y optimizar el desarrollo de envases activos basados en esta tecnología. Por lo tanto, este estudio propone la incorporación de humo líquido refinado (suministrado por Kerry Group) en un amplio rango de concentraciones, con el fin de evaluar su impacto sobre las propiedades de matrices biopoliméricas basadas en kéfir y en pared celular de levadura residual. Además, se estudiará la actividad antioxidante y antimicrobiana conferida a estos materiales tras la adición del extracto, con vistas a su potencial aplicación en el desarrollo de envases activos.

### 1.5 Extracto de yerba mate residual

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*), especie arbórea nativa de la región subtropical de América del Sur, constituye un recurso de gran relevancia socioeconómica y cultural en Argentina, Uruguay, Paraguay y Brasil, donde su consumo tradicional como infusión ("mate") genera anualmente millones de toneladas de residuos vegetales. Según datos del Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM, 2024), el consumo per cápita en Argentina fue de 5,92 kg en 2020, lo que representó aproximadamente 270 millones de kilogramos de desechos potencialmente valorizables. Estos residuos poseen compuestos fenólicos (ácidos cafeico y clorogénico), flavonoides (catequina, quercetina), metilxantinas (cafeína, teobromina), saponinas, taninos, minerales (P, Fe, Ca) y vitaminas (C, B1, B2) (Arrieta *et al.*, 2018), responsables de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimutagénicas (Bastos *et al.*, 2007; Bracesco *et al.*, 2011).

Los extractos acuosos y alcohólicos de yerba mate presentan una alta concentración de polifenoles superando incluso a fuentes reconocidas como el té verde y los vinos tintos. Uno de los polifenoles mayoritarios es el ácido clorogénico (~ 42%), el cual posee actividad

antioxidante debido a su capacidad inhibidora de radicales libres y secuestrador de metales (Bracesco *et al.*, 2011). Además, estudios han confirmado su efectividad antimicrobiana frente a patógenos alimentarios críticos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Burriss *et al.*, 2011), lo que sugiere un doble mecanismo de acción para su aplicación en materiales activos.

Los residuos de yerba mate poseen además compuestos colorantes denominadas *cianidinas*, una especie de antocianinas, compuestos colorantes sensibles a los cambios de pH (Ceballos *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023). Estudios recientes con películas de almidón nativo e hidrolizado confirman el potencial del extracto para desarrollar materiales inteligentes (Ceballos *et al.*, 2020). Los resultados de esta investigación demostraron que las películas desarrolladas con extracto de yerba mate presentaron un comportamiento cromático diferencial según el pH del medio, manteniendo su coloración estable en condiciones ácidas mientras exhibían un cambio de color visible en medios alcalinos. Esta respuesta selectiva resulta particularmente relevante para su aplicación en el monitoreo de la frescura de productos cárnicos y pesqueros, ya que, durante los procesos de deterioro microbiano y enzimático, como se mencionó anteriormente, se genera una acumulación progresiva de compuestos nitrogenados volátiles ( $\text{NH}_3$ , TMA y DMA), que elevan el pH del medio a valores alcalinos (Ezati *et al.*, 2019). El mecanismo de acción (*Figura 1.3*) se fundamenta en la interacción específica entre estos compuestos básicos y las cianidinas, presentes en el extracto de yerba mate, que actúan como indicadores naturales de pH. Esta propiedad innovadora permitiría el desarrollo de sistemas de envasado inteligente capaces de proporcionar información visual y sostenible sobre el estado de conservación de productos perecederos, representando un avance significativo en la tecnología de alimentos.

Estudios sobre matrices biopoliméricas han revelado un comportamiento dual del extracto de yerba mate: mientras en películas de almidón el agregado de 20% yerba mate actúa como agente plastificante mejorando la flexibilidad (Jaramillo *et al.*, 2015), en sistemas basados en alginato (de Farias *et al.*, 2021) o ácido poliláctico (PLA) funciona como agente entrecruzante, incrementando significativamente la resistencia mecánica y estabilidad térmica debido a la presencia de nanopartículas de lignocelulosa en el extracto (Arrieta *et al.*, 2018).

Sin embargo, no se han reportado estudios que exploren la incorporación de extractos de yerba mate residual en matrices biopoliméricas basadas en biomásas integrales de subproductos y residuos industriales, como los gránulos de kéfir de agua y la levadura residual cervecera. Por lo tanto, la presente investigación propone caracterizar este extracto residual acuoso y evaluar su impacto como agente activo en las biomásas seleccionadas. Adicionalmente, en el caso

particular de la matriz de kéfir, se explorará su aplicabilidad en el diseño de etiquetas inteligentes para monitorear el estado de frescura de productos pesqueros.

## **2 HIPÓTESIS**

La incorporación de extractos bioactivos de yerba mate residual y humo líquido refinado en matrices biopoliméricas, obtenidas a partir de levadura residual cervecera y gránulos de kéfir de agua, permiten el desarrollo de materiales activos e inteligentes destinados a aplicaciones alimentarias.

Los extractos de humo líquido refinado y yerba mate residual poseen características antioxidantes y antimicrobianas que se mantienen al ser incorporados en las matrices biopoliméricas mencionadas.

La presencia de cianidinas en la yerba mate, compuesto colorante pH-dependiente, permite utilizar este extracto como indicador para el desarrollo de etiquetas inteligentes que monitorean en tiempo real la calidad de productos alimenticios.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Desarrollar materiales innovadores activos e inteligentes para su aplicación en la industria alimentaria, obtenidos a partir de la valorización de biomasas residuales (levadura cervecera) y subproductos de fermentación (gránulos de kéfir de agua), con la incorporación de extractos naturales de yerba mate y humo líquido refinado como agentes bioactivos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Obtener un extracto acuoso de yerba mate (YM) a partir de residuos posconsumo.
- b) Evaluar las propiedades funcionales de los extractos de YM y humo líquido refinado (HL), mediante la determinación de su actividad antioxidante, antimicrobiana y la caracterización de la respuesta cromática dependiente del pH del extracto de YM.
- c) Formular películas mediante la técnica de *casting*, utilizando matrices de pared celular de levadura residual cervecera (YCW-R) y gránulos de kéfir de agua (K-5), incorporando los extractos de HL y YM en distintas concentraciones.
- d) Caracterizar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas, hidratación, barrera al vapor de agua y funcionales de las películas activas/inteligentes obtenidas.
- e) Validar la eficacia de las etiquetas inteligentes de kéfir y extracto de YM para monitorear la frescura de filetes de merluza, correlacionando su respuesta cromática con parámetros de deterioro químico durante el almacenamiento refrigerado.



## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Obtención de biomásas y extractos

#### 4.1.1 Biomasa de pared celular de levadura residual cervecera

Se recibió levadura descartada del proceso de elaboración de cerveza artesanal (Cerveza Néstor, La Plata, Argentina), la cual se lavó tres veces con agua destilada y sucesivas centrifugaciones a 3000 rpm y 4 °C por 20 min (Centrifuga Avanti, Rotor JA-14) para eliminar impurezas. Luego, la levadura lavada se suspendió en agua destilada para obtener una dispersión 5% p/v (peso en base seca/volumen). La dispersión fue sometida a un proceso de homogeneización para romper las células, liberar el material citoplasmático y separar la pared celular (YCW-R). La ruptura de la dispersión de levadura se llevó a cabo con un homogeneizador a válvula (Panda 2 K NS1001L, GEA Niro-Soavi, Italia) a 1250 bar, procesando la dispersión durante 9 minutos. Posteriormente, la dispersión ya homogeneizada se centrifugó a 12000 rpm y 4 °C, durante 15 minutos (Centrifuga Avanti, Rotor JA-14). El precipitado obtenido (YCW-R), se lavó con agua destilada y sucesivas centrifugaciones en las condiciones antes descriptas. Este procedimiento se realizó tres veces con el objetivo de separar eficientemente el material citoplasmático (soluble), de la pared celular (insoluble). Al finalizar los lavados, se determinó el contenido de sólidos en estufa a 105 °C.

#### 4.1.2 Biomasa de kéfir de agua

La biomasa de kéfir de agua se obtuvo en el laboratorio LOMCEM a partir de gránulos *LOMCEM KWKI* como iniciadores de cultivo. Se colocaron 100 g de los gránulos de kéfir en un medio de cultivo acuoso de 2 L con 100 g de azúcar mascabo, 50 g de higos negros, y un limón cortado en cuatro rodajas (*Figura 4.1.2*). El medio de cultivo se cambió cada 48 h para mantener la viabilidad de los microorganismos e incrementar la biomasa. Para la preparación de películas, los gránulos de kéfir se filtraron, se lavaron cinco veces con agua destilada, y se escurrieron para remover el excedente de agua. El contenido de sólidos se determinó deshidratando los gránulos a 105 °C hasta peso constante y su resultado se utilizó para la preparación de las dispersiones filmogénicas a partir de los gránulos escurridos.



**Figura 4.1.2.** Medio de cultivo de kéfir de agua.

#### **4.1.3 Extracto de yerba mate residual**

El extracto residual de yerba mate se obtuvo de los residuos posconsumo de la infusión en agua caliente (mate), recolectados en LOMCEM, provenientes de diversas marcas y sin agregado de azúcar. Se secó en estufa a 40°C durante 24 h. El extracto se obtuvo por destilación a reflujo de la siguiente manera: 10 g de residuos de yerba mate y 100 mL de agua destilada se colocaron en un balón de vidrio y se calentó hasta ebullición bajo reflujo durante 60 min., siguiendo la metodología descrita por Arrieta *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente se filtró para separar los sedimentos. El extracto se concentró utilizando un evaporador rotatorio (Laborota 4000, Heidolph, Alemania) a 80 °C, 30 rpm de velocidad, y 60 mm Hg de vacío durante 2 h. El extracto concentrado se centrifugó a 5000 rpm por 20 min y se filtró para remover impurezas. El extracto de yerba mate residual (YM) se conservó congelado a -18 °C.

#### 4.1.4 Extracto de humo líquido refinado

El extracto de humo líquido refinado utilizado en este trabajo fue provisto por la compañía Kerry Group. El refinamiento realizado por la empresa consiste en disminuir el contenido de fenoles totales para eliminar el olor y aroma ahumado. El objetivo de Kerry Group es aplicar estos extractos de humo líquido refinados como conservantes naturales en una amplia gama de productos alimenticios evitando sabor y aromas indeseados.

#### 4.2 Preparación de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de humo líquido refinado (YCW-R con HL)

Para la preparación de las películas activas se realizó una dispersión 5% p/p (b.s) de pared celular de levadura residual cervecera (YCW-R) en agua destilada. Se ajustó el pH de la dispersión a 11 con una solución de NaOH 0,1 M y se realizó un tratamiento térmico en un baño a 90 °C durante 20 min para inactivar enzimas y el despliegue de los  $\beta$ -glucanos. Con el objetivo de romper aglomerados producidos durante el calentamiento, la dispersión se trató con un equipo Ultraturax T-25 (IKA Works, Inc., Staufen, Alemania) a 12000 rpm durante un minuto. Luego se sometió a agitación suave bajo vacío para evitar la formación de burbujas en las películas. Se agregó la cantidad necesaria de extracto de humo líquido refinado (HL) para preparar formulaciones de: 0%, 0,05%, 0,3%, 0,5%, 1%, 5% y 10% (b.s). Se adicionó glicerol al 25% p/p (b.s) como plastificante. Se vertieron 15 g de cada formulación en placas de Petri de plástico de 90 mm de diámetro para que los espesores sean similares. Las películas se obtuvieron por el método de *casting* en estufa a 38 °C por 18-20 h, se pesaron y acondicionaron a 43% h.r para su posterior caracterización. Estas películas se identificaron como YCW-R y su correspondiente concentración de HL.

#### 4.3 Preparación de películas activas a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de humo líquido refinado (K-5 con HL)

Se preparó una dispersión al 5% p/p (b.s) de gránulos escurridos de kéfir en agua destilada y se trató con un equipo Ultraturax T-25 (IKA Works, Inc., Staufen, Alemania) a 12000 rpm durante 3 min. La dispersión se homogeneizó con un equipo de ultrasonido VCX-750 (Sonics and Materials, Inc., Newtown, CT, USA) con una amplitud de 80%, 15 min y pulsos de 30 s. El objetivo de este procesamiento es romper los gránulos y obtener la dispersión filmogénica. Luego, se realizó un tratamiento térmico a 90 °C por 20 min. para inactivar microorganismos y enzimas. La dispersión se procesó nuevamente mediante Ultraturax y ultrasonido bajo las condiciones descritas anteriormente. Se extrajo el aire de las dispersiones mediante una bomba

de vacío para evitar la formación de burbujas en las películas. Se utilizó glicerol como plastificante al 25% p/p (b.s) y se adicionó el extracto de humo líquido refinado (HL) para preparar formulaciones de: 0%, 0,05%, 0,3%, 0,5%, 1%, 5% y 10% p/p (b.s). Se colocaron 19 g de cada formulación en placas de Petri de plástico de 90 mm de diámetro para obtener películas de igual espesor. Las películas se obtuvieron por el método de *casting* en estufa a 38 °C durante 18-20 h. Se registró el peso de estas y se colocaron a 43% h.r para su caracterización. Las películas activas de kéfir de agua y humo líquido se identificaron como K-5 y su correspondiente concentración de HL.

#### **4.4 Preparación de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de yerba mate residual**

Se prepararon dispersiones 5% p/p (b.s) de YCW-R disueltas en extracto de yerba mate residual (YM) y agua destilada para preparar formulaciones con 0%, 5%, 10% y 20% p/p (b.s). Las dispersiones se procesaron siguiendo la metodología descrita en la *sección 4.2*. Se adicionó glicerol como plastificante al 25% p/p (b.s) y se agitó durante 10 min. Posteriormente se vertieron 15 g en placas de Petri de 90 mm de diámetro y se colocó en estufa a 38 °C durante 18 h para obtener las películas. Las películas obtenidas se pesaron y acondicionaron a 43% h.r. Estas películas activas se denominaron YCW-R con su respectivo porcentaje de YM.

#### **4.5 Preparación de películas activas e inteligentes a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de yerba mate residual**

Se prepararon dispersiones 5% p/p (b.s) de gránulos escurridos de kéfir de agua, utilizando el extracto de yerba mate residual (YM) y agua destilada, para realizar formulaciones con 0%, 5%, 10% y 20% p/p (b.s) de YM. Luego se procesaron siguiendo la metodología descrita en la *sección 4.3*. Las películas se denominaron K-5 con su respectivo porcentaje de YM.

#### **4.6 Técnicas de caracterización**

##### **4.6.1 Contenido de sólidos totales**

La determinación de sólidos totales de los extractos y biomasas de pared celular de levadura y gránulos de kéfir de agua se realizaron en estufa a 105 °C hasta peso constante. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron los resultados en porcentaje peso en peso (% p/p).

#### 4.6.2 Medición de pH

Los valores de pH de los extractos y dispersiones filmogénicas se midieron con un pHímetro Altronix TPA-V (SAEN SRL, Buenos Aires, Argentina).

#### 4.6.3 Contenido de proteínas totales y $\beta$ -glucanos

Se determinó el porcentaje de proteína en las biomasas de pared celular de levadura y gránulos de kéfir, a partir del contenido de nitrógeno total obtenido por el método Kjeldahl (FOSS, Dinamarca) y posterior conversión mediante factor ( $F_{N \rightarrow P} = 6,25$ ) para alimentos multicomponente.

Para esto, las muestras se secaron, molieron y pesaron en balanza analítica ( $\pm 10^{-4}$  g). Posteriormente, se colocaron en los tubos de digestión con dos pastillas catalizadoras Kjeltabs® ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) y 17,0 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (98% p/v,  $\rho = 1,84$  g/mL). Paralelamente se realizaron dos blancos con pastillas catalizadoras y ácido sulfúrico, pero sin muestra. Se realizó la digestión a 420 °C durante una hora. Al finalizar, se dejaron enfriar los tubos y se realizó la destilación en el módulo Kjeltec® 8100, programado para que se utilicen 80 mL de agua destilada, 70 mL de NaOH 40% p/v, una intensidad del flujo de vapor de 100%, un tiempo de destilación de 5 min. y el vaciado automático del tubo de digestión al finalizar la destilación. Como recipiente colector se utilizó un Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de solución ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 4,0% p/v con indicador combinado rojo de metilo – verde de bromocresol. Al finalizar la destilación, el indicador combinado en el Erlenmeyer colector cambió de color (rojo-naranja a azul-verde) indicando que el  $\text{NH}_3$  fue recolectado en la solución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Se realizó el mismo procedimiento para los tubos con el blanco.

Se valorizaron los destilados de todos los Erlenmeyer en forma secuencial con una solución estandarizada 0,1 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hasta viraje del indicador combinado de azul-verde a rojo-naranja. Se registró el volumen gastado (mL) de solución valorante para los ensayos correspondientes a las muestras y blancos.

Los porcentajes de nitrógeno total (% p/p) para las muestras ( $N_T$ ) se calcularon por medio de la siguiente ecuación:

$$\%N_T = \frac{(V_M - V_B) \cdot 0,1N \cdot 0,014007}{M} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $V_M$  y  $V_B$  son los volúmenes gastados de solución estandarizada de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , en mL, en la valoración de la muestra y del blanco, respectivamente; 0,1 N es la normalidad de la solución

estandarizada del ácido; 0,014007 es la masa de un miliequivalente de nitrógeno, en gramos;  $M$  es la masa de muestra en gramos.

El porcentaje de proteína bruta ( $P_B$ , % p/p) de las muestras se calculó como:

$$\%P_B = N_T \cdot F_{N \rightarrow P} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $F_{N \rightarrow P}$  es el factor de conversión de nitrógeno total a proteína bruta. Para las biomásas se utilizó el factor  $F_{N \rightarrow P} = 6,25$ , correspondiente a alimentos que están formulados con ingredientes de distintas fuentes que aportan proteínas.

La determinación de los  $\beta$ -glucanos presentes en la biomasa de levadura se realizó por el método enzimático y espectrométrico que se fundamenta en cuantificar el contenido de (1-3:1-4)- $\beta$ -D-glucanos utilizando un Kit ©Megazyme.

#### **4.6.4 Inspección visual, densidad y espesor de las películas**

Las películas se inspeccionaron visualmente para evaluar su apariencia general (color, fracturas, imperfecciones) y se tomaron fotos con una cámara Huawei Y19 Pro. Los espesores fueron medidos en diez locaciones de la muestra con un calibre digital (3109–25-E, Insize Co., China) con una precisión de  $\pm 10^{-6}$  m. Para la determinación de densidad de las películas secas, muestras de 58 cm<sup>2</sup> de área circular se secaron en desecadores con sílica gel durante 7 días. Las películas se pesaron utilizando una balanza analítica ( $\pm 10^{-4}$  g). La densidad de las películas secas  $\rho_{d.f.}$  (g m<sup>-3</sup>) se calculó a través de la *Ecuación 3*:

$$\rho_{d.f.} = m / (A \cdot L) \quad \text{Ecuación 3}$$

donde  $m$  es la masa seca (g),  $A$  el área (m<sup>2</sup>), y  $L$  es el espesor (m).

#### **4.6.5 Determinación de color mediante coordenadas CIELab**

La determinación de color de las películas se realizó mediante coordenadas CIELab utilizando un colorímetro Konica Minolta CR400 (Osaka, Japón) tomando cuatro medidas sobre cada muestra. La diferencia de color  $\Delta E$  se calculó mediante la *Ecuación 4*:

$$\Delta E = \sqrt{(L_1 - L_0)^2 + (a_1 - a_0)^2 + (b_1 - b_0)^2} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde el parámetro  $L$  indica la luminosidad,  $a$  el rango de colores del rojo al verde y  $b$  del amarillo al azul.  $L_0$ ,  $a_0$  y  $b_0$  representan los parámetros de color de la muestra control (películas sin aditivo), mientras que  $L_1$ ,  $a_1$  y  $b_1$  corresponden a las películas aditivadas. Un valor de  $\Delta E \geq 6$  implica un cambio de color perceptible al ojo humano (Mokrzycki & Tatol, 2011).

Las representaciones de los colores se obtuvieron insertando las coordenadas en la aplicación “Analyse the Color” (Lab Tools).

#### 4.6.6 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de las muestras se estudiaron por análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido con temperatura modulada (MDSC).

##### 4.6.6.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

La técnica de análisis termogravimétrico en modo dinámico consiste en registrar a través de una microbalanza, la pérdida del peso con la temperatura de una muestra sometida a una velocidad lineal de calentamiento preestablecida, controlando las condiciones atmosféricas en las que se realiza el ensayo (Prime *et al.*, 2009). El equipo consiste en un horno que contiene una balanza cuya precisión ronda el microgramo, que registra el peso de la muestra colocada en una canasta. El material de la canasta varía según el rango de temperaturas en el que se realiza el ensayo. Por debajo de 500 °C se puede utilizar aluminio, pero si el ensayo requiere temperaturas más altas, la canasta debe ser de platino o un material cerámico. La temperatura es controlada por una termocupla que se ubica muy cerca de la muestra. A pesar de la simpleza de la técnica, sus aplicaciones son múltiples, la principal es la determinación de la estabilidad térmica de un material, pero también puede utilizarse para diferenciar contenido orgánico de inorgánico, analizar composición de un material polimérico, realizar control de calidad, y para el estudio de procesos oxidativos, entre otras aplicaciones.

Además del peso en función de la temperatura, puede obtenerse la derivada del peso respecto de la temperatura, la cual suministra información interesante como la temperatura a la que se produce la máxima tasa de descomposición o, en algunos casos, permite revelar ciertos eventos de descomposición que no se aprecian tan fácilmente en la señal original.

La estabilidad térmica de las muestras fue realizada en atmósfera inerte de nitrógeno (60 mL/min) utilizando un equipo TGA Q-500 (TA-Instruments), calentando a 10 °C/min en un rango de temperatura de 40 a 600 °C. Para llevar a cabo este ensayo se pesaron entre 3 y 5 mg de muestra. El análisis termogravimétrico se centró en tres parámetros fundamentales para caracterizar el comportamiento térmico de los materiales. La temperatura de degradación inicial ( $T_0$ ) se determinó como el punto correspondiente a una pérdida de masa del 12%,

obtenido mediante análisis gráfico de las curvas termogravimétricas. Por otro lado, la temperatura máxima de degradación ( $T_{max}$ ) se identificó como el valor asociado al pico principal en las curvas derivadas de pérdida de peso (DTG), que representa la etapa de mayor descomposición térmica del material. Finalmente, se cuantificó el porcentaje de residuo carbonoso remanente a 600 °C, parámetro que refleja la capacidad del material para formar estructuras estables a altas temperaturas. Estos tres indicadores ( $T_0$ ,  $T_{max}$  y  $Resd.600^{\circ}C$ ) permiten evaluar de manera integral la estabilidad térmica y los mecanismos de degradación de las diferentes formulaciones estudiadas.

#### *4.6.6.2 Calorimetría diferencial de barrido con temperatura modulada (MDSC)*

Las transiciones térmicas fueron determinadas utilizando un calorímetro diferencial de barrido con temperatura modulada (MDSC) (TA Instruments Q200, Delaware, USA). El MDSC aplica una señal de temperatura modulada (lineal + sinusoidal) y analiza la respuesta en flujo de calor. Esto permite separar fenómenos termodinámicos reversibles de los cinéticos irreversibles, mejorando la interpretación frente al DSC convencional. Las ventajas del modulado son una mayor resolución en transiciones sobrepuestas, determinación más precisa de  $T_g$ , incluso en presencia de reacciones, cuantificación de la capacidad calorífica ( $C_p$ ) con más exactitud, identificación de procesos reversibles e irreversibles.

Las transiciones térmicas fueron determinadas en el rango de -80 °C a 170 °C, con una etapa previa de equilibrio a -80 °C durante 5 min, y luego la temperatura se incrementó a 10 °C/min. El procedimiento modulado se realizó a  $\pm 1$  °C cada 4 s. Aproximadamente 4 mg de muestra fueron colocados en cápsulas TzeroR de aluminio. Las muestras se acondicionaron a 22 °C y secadas con sílica gel por una semana y selladas con tapas herméticas antes de comenzar el experimento. Las transiciones vítreas fueron determinadas utilizando el programa TA Universal Analysis (v4.5, TA Instruments, USA), en el punto medio. Los experimentos se realizaron por duplicado.

#### **4.6.7 Propiedades mecánicas**

Las propiedades mecánicas se estudiaron mediante ensayo de tracción, el cual consiste en someter una probeta a la deformación hasta su rotura, con una carga determinada (con una celda de carga) y que es aplicada uniaxialmente a lo largo del eje de la probeta (Callister, 1995). La probeta, de tamaño normalizado, se monta con sus extremos en las mordazas de la máquina de ensayos y se programa para alargarla a velocidad constante, y para medir continua y simultáneamente la carga instantánea aplicada y el alargamiento resultante (utilizando un

extensómetro). El ensayo dura hasta la deformación permanente o rotura de la probeta (Callister, 1995).

Con el resultado del ensayo de tracción se obtienen distintos parámetros característicos del material a ensayar. La *tensión nominal* ( $\sigma$ ) que se define mediante la relación:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad \text{Ecuación 5}$$

En donde F es la carga instantánea aplicada perpendicularmente a la sección de la probeta, en unidades de Newtons (N), y  $A_0$  es el área de la sección original antes de aplicar la carga ( $m^2$ ). La unidad de tensión es MPa (SI).

La *deformación nominal* se define como:

$$\varepsilon = \frac{l_i - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0} \quad \text{Ecuación 6}$$

En donde  $l_0$  es la longitud original antes de aplicar la carga, y  $l_i$  es la longitud instantánea. La cantidad  $\Delta l$  es el alargamiento producido por deformación, o cambio en longitud en un instante determinado, con respecto a la longitud inicial. La deformación no tiene unidades, a veces se expresa como porcentaje, esto es, el valor de la deformación multiplicado por 100.

El grado con que un material se deforma es proporcional a la tensión impuesta según la relación:

$$E = \sigma / \varepsilon \quad \text{Ecuación 7}$$

Esta relación se conoce con el nombre de ley de Hooke, la constante de proporcionalidad,  $E$  (MPa) es el *módulo de elasticidad*, o *módulo de Young*.

Cuando se cumple esta relación la deformación se denomina deformación elástica; al representar la tensión en el eje de ordenada en función de la deformación en el eje de abscisas se obtiene una relación lineal. La pendiente de este segmento lineal corresponde al módulo de elasticidad  $E$ . Este módulo puede ser interpretado como la rigidez, o sea, la resistencia de un material a la deformación elástica. Cuanto mayor es el módulo, más rígido es el material, o sea, menor es la deformación elástica que se origina cuando se aplica una determinada tensión

Si se grafica una curva  $\sigma$  vs.  $\varepsilon$ , llamada curva esfuerzo-deformación, se obtiene una función característica de cada material, y a partir de la misma, es posible obtener varias propiedades

mecánicas, como la elongación máxima hasta ruptura, el módulo de elasticidad o de Young y la resistencia a la tensión.

Los ensayos de tracción se realizaron en una máquina universal de ensayos mecánicos Megatest® TC-500 serie II (Micrometric SRL, Buenos Aires, Argentina) a 22 °C, con una celda de carga de 30 kgf. La velocidad de tracción para las películas YCW-R y K-5 fue de 5 y 10 mm/min, respectivamente. Se cortaron probetas rectangulares de 10 x 50 mm y fueron almacenadas hasta su análisis en una atmósfera controlada de humedad relativa de 53% dada por una solución saturada de  $Mg(NO_3)_2$  ( $a_w$  registrada a 24 °C: 0,53). Se midieron los espesores en cuatro puntos en forma aleatoria de cada probeta con un calibre digital.

#### **4.6.8 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros infrarrojos de las películas se registraron en el rango de 4000 a 400  $cm^{-1}$  en un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu IR-Affinity (Shimadzu Co., Japón) equipado con un módulo de ATR con punta de diamante (GladiATR, Pike Technologies, USA). Los espectros de IR se midieron como un promedio de 48 barridos, una resolución de 4  $cm^{-1}$ .

#### **4.6.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La microestructura de las películas se analizó utilizando un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss NTS-SUPRA). Para la observación de las películas K-5 con YM se utilizó una tensión acelerada de 20 kV con una magnificación de 1000×, mientras que para las películas YCW-R con HL se utilizó una tensión acelerada de 8 Kv con magnificaciones de 500× y 10000×. Las secciones transversales se obtuvieron cortando las muestras con una cuchilla de acero inoxidable y colocándolas en el porta muestras. Todas las muestras se recubrieron con una fina capa de oro y se analizaron por duplicado.

#### **4.6.10 Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de los extractos y de las películas activas se evaluó mediante los ensayos de ABTS y DPPH. Estos ensayos, que se basan en la transferencia de electrones, implican una reacción redox en la que el oxidante actúa como un indicador del punto final de la reacción. Se emplean para medir la capacidad de una muestra de neutralizar o atrapar radicales libres, lo que proporciona información valiosa sobre su potencial antioxidante. Esta capacidad es crucial para el desarrollo de materiales activos que puedan ofrecer beneficios funcionales, como la preservación de alimentos frente a la oxidación. Los resultados obtenidos mediante estos métodos permiten evaluar la eficacia de las películas y los extractos en

contextos de aplicación práctica. Sin embargo, es necesario considerar que las variaciones inherentes a las metodologías, como factores estéricos, mecanismos y sensibilidad de reacción, pueden dificultar la comparación directa de los resultados entre un método y otro. Por lo tanto, es fundamental tener en cuenta estas limitaciones al analizar y discutir los resultados obtenidos mediante los ensayos de ABTS y DPPH.

#### 4.6.10.1 Actividad antioxidante de los extractos: método ABTS

La inhibición del catión radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) se monitorizó a través de su decoloración a 734 nm (Re, 1999). La solución radical se generó al reaccionar una solución de ABTS a 7 mM (Sigma RA1888) con 2,45 mM de persulfato de potasio,  $K_2S_2O_8$  (Sigma® 216,224), y se dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas antes de su uso. Esta solución fue denominada solución A. Posteriormente, se diluyó 1 mL de la solución A en agua destilada hasta alcanzar una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$ , lo que dio lugar a la solución B, que se empleó como solución de trabajo.

La capacidad antioxidante de los extractos se expresó como  $IC_{50}$  (mg/L) (Rezzani *et al.*, 2024), valor que representa la concentración necesaria del extracto para inhibir el 50% de los radicales ABTS y DPPH. Por lo tanto, un menor valor de  $IC_{50}$  indica una mayor actividad antioxidante del extracto. Las mediciones se realizaron por triplicado.

#### 4.6.10.2 Actividad antioxidante de extractos: método DPPH

El ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) se evaluó siguiendo el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) con modificaciones. La solución del radical DPPH se preparó disolviendo 19,75 mg de DPPH en 50 mL de etanol grado anhidro y se mantuvo en la oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, se mezclaron 0,1  $\mu$ L de extracto con 0,8  $\mu$ L de etanol grado anhidro y 0,1  $\mu$ L de la solución de radicales DPPH. La mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 15 minutos antes de medir su absorbancia a 517 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como  $IC_{50}$  (mg/L).

#### 4.6.10.3 Actividad antioxidante de películas activas por método ABTS y DPPH

Se preparó solución A de ABTS como se explicó en la sección 4.6.10.1. Posteriormente, se diluyó 1 mL de la solución A en etanol 96% hasta alcanzar una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$ , lo que dio lugar a la solución B, que se empleó como solución de trabajo. Luego se colocaron 10 mg de cada película en tubos Eppendorf y se les adicionó 1 ml de la solución B. Se midió la absorbancia de las soluciones a distintos tiempos en un espectrofotómetro UV-visible (UV-

9000S, Shanghai, China) a 734 nm y, por lo tanto, se determinó la actividad antioxidante de las películas activas.

La solución radicalaria de DPPH preparada en la *sección 4.6.10.2* se utilizó para determinar la actividad antioxidante de las películas activas. En un Eppendorf se colocaron 10 mg de película con 0,9 mL de etanol anhidro y 0,1 mL de solución DPPH. Se midió la absorbancia a 517 nm a distintos tiempos para evaluar la actividad antioxidante de las películas activas.

Para ambas metodologías, las mediciones de absorbancia se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición radicalaria (%RSA) relativo a cada tiempo:

$$\%RSA = \frac{Abs.blanco - Abs.muestra}{Abs.blanco} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde, “*Abs. blanco*” corresponde a las soluciones radicalarias de DPPH y ABTS sin estar en contacto con las películas activas y “*Abs. muestra*” corresponde a las soluciones radicalarias DPPH y ABTS en contacto con las películas activas a distintos tiempos.

#### 4.6.11 Contenido de fenoles totales: método Folin-Ciocalteu

El contenido total de fenoles (TPC, por sus siglas en inglés) de los extractos fue estimado a través de una modificación del método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). 250  $\mu$ L de cada extracto se mezclaron con 1250  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu (1/10 dil.) y 1000  $\mu$ L  $Na_2CO_3$  (7,5% p/v) y se mantuvo en oscuridad por 2 h. La absorbancia de las soluciones se midió a 765 nm en un espectrofotómetro UV-visible (UV-9000S, Shanghai, China). Los experimentos de TPC se realizaron por triplicado y se expresaron en mg equivalente de ácido gálico (GAE) por g de materia seca.

#### 4.6.12 Actividad antimicrobiana

##### 4.6.12.1 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos de humo líquido refinado (HL) y yerba mate residual (YM) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) y *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) fue determinada siguiendo el método de microdilución en caldo de cultivo según las directrices del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI M07-A10) (Cottet *et al.*, 2021). Un cultivo *overnight* de cada cepa bacteriana en agua de peptona estéril al 0,1% se ajustó al estándar McFarland 0,5 (aproximadamente  $\sim 10^8$  UFC/mL) y se utilizó como inóculo. Esta suspensión se diluyó 1:10 en caldo Mueller-Hinton para lograr

una suspensión del inóculo de  $\sim 10^7$  UFC/mL. Posteriormente, 200  $\mu$ L de extracto se pipetearon en la primera columna de un microplato estéril de 96 pocillos y 100  $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton se agregó al resto de los pocillos, excepto a la primera columna. Luego, 100  $\mu$ L de extracto se diluyó en forma seriada a la mitad en el resto de los pocillos, excepto por la última columna. Finalmente, 100  $\mu$ L de cada suspensión de microorganismo se inoculó en todos los pocillos. La última columna, que no contenía extracto, fue usada como control de crecimiento de microorganismos. Los microplatos se cultivaron a 37 °C durante 24 h; al cumplirse este tiempo, se realizó una examinación visual. La presencia de precipitado negro en el fondo del pocillo evidenció crecimiento microbiano. Por el contrario, donde hubo inhibición de crecimiento microbiano, no se observó precipitado o turbidez. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó visualmente (sin precipitados) como la concentración más baja de extracto que inhibió el crecimiento microbiano.

#### 4.6.12.2 Actividad antimicrobiana de las películas: método de contacto directo

La metodología desarrollada se basó en la norma ASTM E2149 (ASTM International, 2001). La actividad antimicrobiana de las películas se evaluó frente a la cepa bacteriana Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). El aislado del microorganismo se incubó en placas de agar nutritivo estéril durante 24 h a 37 °C. Luego, se preparó una suspensión del microorganismo en tubos con agua de peptona 0,1% estéril hasta una turbidez equivalente a 0,5 McFarland ( $10^8$  UFC/mL). La suspensión del inóculo se diluyó en PBS estéril (pH 7,4) hasta obtener una concentración final de  $10^5$  UFC/mL. Las muestras fueron cortadas en cuadrados de 1 cm de lado y colocadas en tubos Eppendorf con 1 mL de la solución de inóculo. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación de 100 rpm. Se tomaron alícuotas y se realizaron conteos de UFC totales a las 0 y 24 h de tiempo de contacto. Se realizó un control de la solución de inóculo (sin película), y aquellas que no contenían extracto de humo líquido refinado (HL) o yerba mate residual (YM) se consideraron películas control. El porcentaje de reducción bacteriana (%) se calculó utilizando la *Ecuación 9*:

$$\text{Reducción bacteriana (\%)} = \frac{B - A}{B} \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde *A* es UFC/mL para la película con aditivo luego de 24 h de tiempo de contacto, y *B* es UFC/mL para la película control (sin aditivo) luego de 24 h de contacto.

#### 4.6.13 Ensayo de migración en simulante alimentario

La liberación de los compuestos activos de las películas se evaluó mediante ensayos de migración específica en un simulante alimentario graso (etanol 95%). Para ello, las películas de cada formulación se recortaron en secciones de 6 cm<sup>2</sup> y se sumergieron en 10 mL del simulante, manteniendo una temperatura constante de 40 °C. El ensayo se realizó a distintos intervalos de tiempo con el objetivo de analizar la migración de los compuestos fenólicos, con capacidad antioxidante.

Este procedimiento estableció una relación superficie/volumen de 6 dm<sup>2</sup>/L de simulante, conforme a las especificaciones del método estandarizado UNE-EN 13130-1:2005. La cantidad de compuestos fenólicos migrados desde las películas fue cuantificada utilizando el método Folin-Ciocalteu (*sección 4.6.11*), mientras que la actividad antioxidante de los compuestos transferidos al simulante se midió en términos de %RSA (*Ecuación 8*) mediante los métodos ABTS y DPPH (*sección 4.6.10.3*). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 4.6.14 Isotermas de hidratación de agua

Las isotermas de sorción de agua se determinaron a 22 °C siguiendo procedimientos establecidos (Rezzani *et al.*, 2024). Las películas fueron secadas y colocadas en desecadores para alcanzar el equilibrio en diferentes actividades de agua ( $a_w = \%h.r./100$ ). Se utilizaron soluciones saturadas de NaOH, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaBr, NaCl y BaCl<sub>2</sub> para generar condiciones de  $a_w$  de 0,10; 0,33; 0,43; 0,57; 0,75 y 0,90, respectivamente. Se generaron atmósferas secas utilizando sílica gel. Las muestras fueron pesadas periódicamente con una balanza analítica ( $\pm 10^{-4}$  g) y los experimentos se realizaron por triplicado.

El contenido de agua o hidratación ( $h$ ), expresado como gramos de agua por gramo de materia seca (m.s.), se evaluó en función de  $a_w$ . Las isotermas se ajustaron utilizando el modelo de Guggenheim-Anderson-De Boer (GAB) (Guggenheim, 1966), el cual considera la hidratación como formada por moléculas de agua directamente unidas a la matriz, estableciendo una monocapa de hidratación, y por moléculas de agua indirectamente unidas a la matriz, formando multicapas de hidratación. El modelo de GAB está representado en la *Ecuación 10*:

$$h(a_w) = (Nck a_w) / [(1 + (c - 1)k a_w)(1 - k a_w)] \quad \text{Ecuación 10}$$

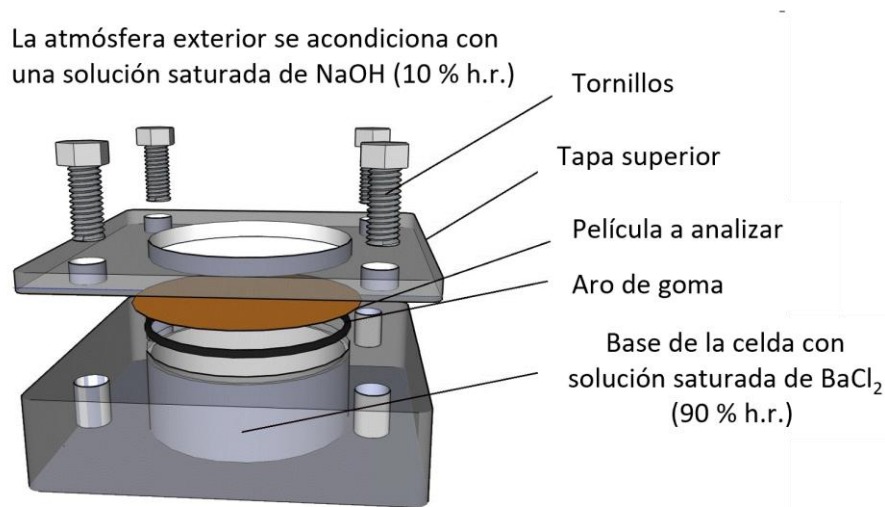
donde  $N$  representa el contenido de agua en la monocapa (g de agua por g de m.s.) asociado a los sitios primarios de unión de agua;  $c$  es un parámetro relacionado con el calor de sorción

para la unión de la monocapa, que da cuenta de la fuerza de unión de las moléculas de agua a los sitios primarios; y  $k$  se relaciona con el calor de sorción de las multicapas, que indica la capacidad del agua para unirse en capas múltiples (Salvay, Colombo & Grigera, 2003).

Para cada muestra se obtuvo una isoterma de sorción de agua y se determinó el contenido de agua  $h$  correspondiente a cada  $a_w$  como el promedio de tres mediciones experimentales con sus respectivas desviaciones estándar. Los valores de los parámetros  $N$ ,  $c$  y  $k$ , junto con sus errores asociados, se obtuvieron ajustando los puntos de los datos experimentales al modelo GAB utilizando OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.).

#### 4.6.15 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua se determinó de manera gravimétrica, siguiendo el método ASTM E-96 con modificaciones (Delgado *et al.*, 2018b). Las muestras fueron acondicionadas a 22 °C y 43% h.r. durante diez días, y posteriormente se sellaron sobre celdas (Figura 4.6.15) que contenían una solución saturada de BaCl<sub>2</sub> (90% h.r.). Las celdas fueron colocadas en gabinetes desecadores a 22 °C con una humedad relativa de 10%, mantenida mediante una solución saturada de NaOH.



**Figura 4.6.15.** Esquema de la celda utilizada para medir la permeabilidad al vapor de agua de las películas. Fuente: Delgado *et al.*, 2018b.

El transporte de agua se monitoreó pesando las celdas con una balanza analítica ( $\pm 10^{-3}$  g). Se graficó la pérdida de peso ( $m$ , en g) en función del tiempo ( $t$ , en min) y, una vez alcanzado el estado estacionario (una línea recta), se registraron datos adicionales durante 36 h. La permeabilidad experimental al vapor de agua ( $P_w^{exp}$ ) se calculó utilizando la Ecuación 11:

$$P_w^{exp} = \frac{1}{A} \left( \frac{\Delta m}{\Delta t} \right) \frac{L}{\Delta p_w} \quad \text{Ecuación 11}$$

donde  $A$  representa el área efectiva expuesta de la película ( $2,2 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ ),  $(\Delta m/\Delta t)$  es la pendiente de la regresión de la pérdida de peso en función del tiempo,  $L$  corresponde al espesor de la película, y  $\Delta p_w = (p_{w2} - p_{w1})$  es la diferencia de presión parcial de vapor de agua a través de la película.  $p_{w1}$  (263,9 Pa) y  $p_{w2}$  (2375,4 Pa) son las presiones parciales de vapor de agua (Pa) fuera y dentro de la celda, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### 4.6.16 Solubilidad efectiva del agua y difusión efectiva del agua

Cuando no hay poros, defectos o perforaciones en la película,  $P_w^{exp}$  puede expresarse según la Ecuación 12 (Delgado *et al.*, 2022):

$$P_w^{exp} = D_w^{eff} S_w^{eff} \quad \text{Ecuación 12}$$

donde  $S_w^{eff}$  ( $\text{g m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$ ) es el coeficiente de solubilidad efectiva del agua en el rango de concentración  $c_{w2}$  a  $c_{w1}$ , correspondiente a las presiones de vapor de agua  $p_{w2}$  y  $p_{w1}$ , respectivamente, y  $D_w^{eff}$  ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) es el valor efectivo del coeficiente de difusión en el rango de concentración de agua,  $c_{w2}$  a  $c_{w1}$ . Las isotermas de sorción de agua permitieron la evaluación de la concentración de agua  $c_w$  ( $c_w = h(a_w) \times \rho_{m.s.}$ ) en la superficie de cada muestra de película en el experimento de permeabilidad. El valor de  $S_w^{eff}$  correspondiente al gradiente de presión o intervalo  $a_w$  [ $a_{w2}=0,9$ ;  $a_{w1}=0,1$ ] se obtuvo mediante la Ecuación 13 (Delgado *et al.*, 2022):

$$S_w^{eff} = \left[ (h(a_{w2}) - h(a_{w1})) / (p_{w2} - p_{w1}) \right] \times \rho_{d.f.} \quad \text{Ecuación 13}$$

donde  $h(a_{w2})$  y  $h(a_{w1})$  son el contenido de agua de la película ( $\text{g H}_2\text{O}$  por  $\text{g}$  de materia seca) en su superficie inferior a  $p_{w2}$  y en la superficie exterior de la taza a  $p_{w1}$ , respectivamente. Según la Ecuación 11,  $D_w^{eff}$  se calcula con la Ecuación 14:

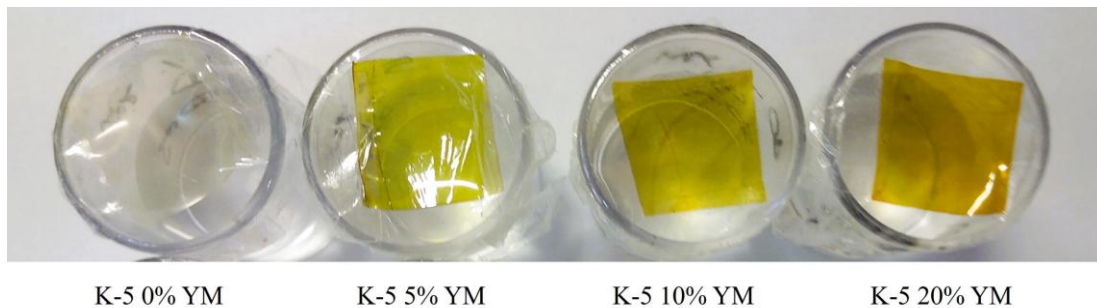
$$D_w^{eff} = P_w^{exp} / S_w^{eff} \quad \text{Ecuación 14}$$

#### 4.6.17 Evaluación de la sensibilidad al amoníaco y al ácido acético

Se realizaron ensayos de sensibilidad al amoníaco y al ácido acético en películas elaboradas a partir de gránulos de kéfir y extracto de yerba mate residual (K-5 con YM). La selección de

estas muestras se basó en su capacidad para evidenciar cambios de color de manera clara debido a su transparencia, lo que las posiciona como candidatas prometedoras para su aplicación como materiales inteligentes indicadores del estado de conservación de alimentos.

En el ensayo de sensibilidad de las películas al amoníaco (*Figura 4.6.17*), se utilizó un vaso de precipitados de 25 mL que contenía 10 mL de una solución de amoníaco al 25% v/v, el cual fue cubierto con una muestra de película de 2 cm de lado (*Zhao et al.*, 2022). Después de 24 h, el color de la película fue medido tres veces para cada muestra utilizando el método CIELab (*sección 4.6.5*). Las coordenadas resultantes se ingresaron en la aplicación “Analyse the Color” (Lab Tools) para representar visualmente el color. De manera análoga, se realizó un ensayo de detección de ácido acético utilizando una solución de ácido acético al 3% v/v.



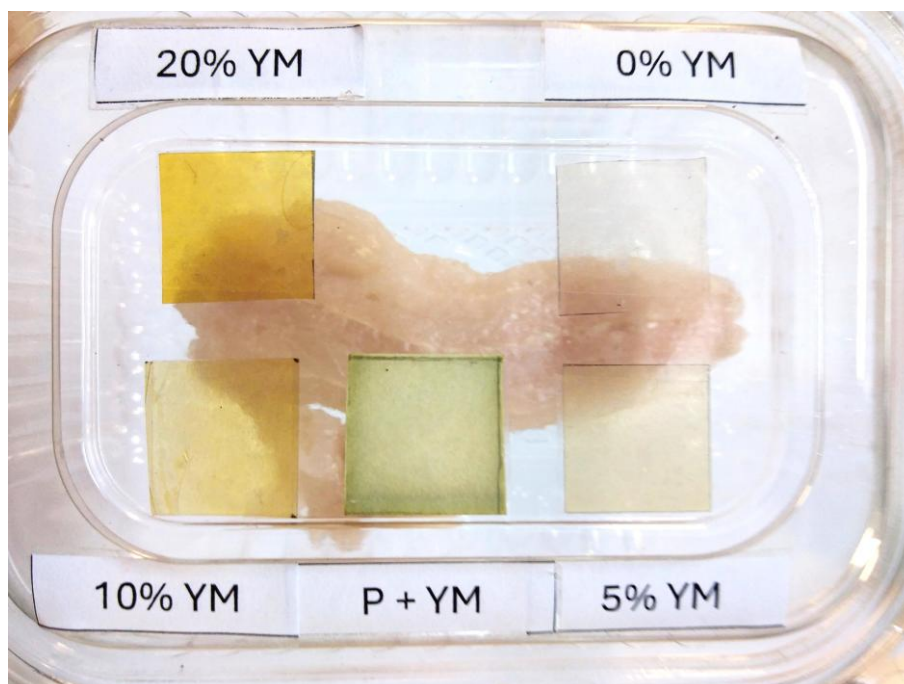
**Figura 4.6.17.** Ensayo de sensibilidad al amoníaco y ácido acético de las películas K-5 con 0%, 5%, 10% y 20% YM.

#### 4.6.18 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias con desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando OriginPro 8 (OriginLab) y el software R (v 3.4.4, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Los datos fueron sometidos a un ANOVA, con las medias comparadas utilizando la prueba post-hoc de HSD de Tukey, considerando un valor de  $p < 0,05$  como significativo. Los errores en los parámetros GAB de las isothermas de sorción de agua se estimaron a partir del análisis del ajuste.

#### 4.7 Aplicación de etiquetas inteligentes basadas en K-5 con YM para monitoreo de calidad en filetes de *Merluccius hubbsi*

Para el estudio de la aplicación de las películas inteligentes K-5 con YM, se utilizó filete de merluza (*Merluccius hubbsi*) fresco proveniente de una pescadería local (Pescadería Mar Argentino, Quilmes). El pescado fue preservado a temperatura de refrigeración hasta el inicio del experimento, el cual comenzó aproximadamente una hora después de la adquisición. El filete de merluza se cortó en trozos de 50 g cada uno y fueron colocados en recipientes con tapa de polietilentereftalato (PET), con dimensiones de 160 mm de ancho, 120 mm de profundidad y 60 mm de alto (Figura 4.7). Se evaluaron cuatro formulaciones de etiquetas K-5 con YM: 0%, 5%, 10% y 20% de extracto añadido con respecto a la masa seca. Adicionalmente, se preparó una etiqueta de papel como matriz modelo, destinada a comparar el comportamiento del color del extracto en un sustrato distinto al preparado a partir del kéfir de agua. El procedimiento de impregnación consistió en sumergir la etiqueta en el extracto de YM durante una hora, seguido de un secado en estufa a 50 °C por un período de 24 h. La concentración final de YM en la etiqueta, determinada por triplicado mediante peso seco en estufa, fue de  $4,8 \pm 0,4$  % p/p (b.s). Dado este resultado, el valor se redondeó al entero más cercano para simplificar la nomenclatura, designándose esta muestra una concentración 5% YM y denominada P+YM.



**Figura 4.7.** Recipiente PET con muestra de filete de merluza y etiquetas inteligentes K-5 con 0%, 5%, 10% y 20% YM. P+YM representa una etiqueta a base de papel con 5% YM.

Las etiquetas fueron adheridas al dorso de la tapa de los recipientes utilizando cinta bifásica, de manera que una de sus caras quedara expuesta a los gases generados durante el proceso de deterioro del filete de merluza. Estos gases incluyen amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), trimetilamina (TMA) y dimetilamina (DMA), productos de la degradación del óxido de trimetilamina (OTMA) presente en los tejidos y que son indicativos de la descomposición microbiana del pescado (Zhai *et al.*, 2017). Los recipientes fueron almacenados en una cámara de refrigeración de gran volumen a una temperatura constante de  $4 \pm 2$  °C durante períodos de 2, 4 y 7 días. Al cumplirse cada uno de estos tiempos, se realizaron mediciones del color de las etiquetas, el pH del filete y el contenido de nitrógeno básico volátil Total (NBV), con el objetivo de evaluar tanto el progreso del deterioro del pescado como la efectividad de las películas inteligentes para indicar el deterioro a través del color.

El experimento y las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado, y también se realizaron mediciones de color, pH y NBV al tiempo 0, es decir, al momento de la recepción del pescado.

#### 4.7.1 Cambio de color

Se midió el color de las etiquetas inteligentes y los filetes de pescado mediante coordenadas del espacio de color CIELab (*sección 4.6.5*) utilizando un colorímetro Konica Minolta CR400 (Osaka, Japón) realizando tres medidas de cada etiqueta sobre la cara externa de la tapa PET del recipiente. También se tomaron cinco medidas de color sobre los filetes colocando una película de polietileno transparente sobre el tejido. En cada caso, se tomaron como referencia de blanco la tapa PET y la película de polietileno. El cambio de color ( $\Delta E$ ) de las etiquetas inteligentes y el pescado se determinó mediante la *Ecuación 4*, según el cual un valor de  $\Delta E \geq 6$  implica un cambio de color perceptible visualmente (Mokrzycki & Tatol, 2011).

Adicionalmente, se incorporó un esquema de la evolución del color promedio del pescado (*Merluccius hubbsi*), se tomaron los valores promedio de las coordenadas del espacio CIELab para cada tiempo y se convirtieron al espacio de color RGB para poder representar el color en gráficos de computadora.

#### 4.7.2 Determinación de pH

Se homogeneizaron 10 g de filete de merluza con 90 mL de agua destilada con un equipo Stomacher (EasyMIX® Blender, bioMerieux, Argentina) durante 1 minuto. El pH de la mezcla homogeneizada se determinó con un pHímetro Altronix TPA-V (SAEN SRL, Buenos Aires, Argentina). La determinación se realizó por duplicado.

#### 4.7.3 Determinación de nitrógeno básico volátil (NBV)

La determinación de NBV es el método de referencia reconocido por el Código Alimentario Argentino (CAA) para evaluar la calidad de los productos pesqueros. Como se mencionó en la *sección 1.3*, la legislación argentina establece un límite máximo de 30 mg de N/100 g para la especie *Merluccius hubbsi*.

La determinación de NBV en la muestra de filete de merluza se realizó siguiendo el método descrito en la norma EU: 2019/627. En primer lugar, se preparó un extracto de la muestra de pescado, para lo cual se mezclaron 10 g de filete de merluza con 90 mL de ácido perclórico 6% p/v y se homogeneizó en un equipo Stomacher durante 1 minuto. Posteriormente, la mezcla se filtró y se separó el extracto para proceder con la determinación de NBV.

Para la medición de NBV, se utilizó un equipo de destilación, como se muestra en la *Figura 4.7.3*. En el balón de destilación se colocaron 50 mL del extracto de pescado y cuatro gotas de fenolftaleína. El destilado se recogió en un Erlenmeyer que contenía 60 mL de ácido bórico 3% p/v y cinco gotas de un indicador combinado rojo de metilo – verde de bromocresol. En la trampa situada sobre el balón, se colocaron 6,5 mL de hidróxido de sodio 20% p/v.



**Figura 4.7.3.** Equipo de destilación para determinación de nitrógeno básico volátil (NBV).

Para iniciar la determinación, se abrió el paso de agua a través de la columna refrigerante y se encendió la manta calefactora. Una vez que comenzaron a observarse los primeros vapores

en el balón, se descargó hidróxido de sodio desde la trampa. Este agregado provocó el viraje de la fenolftaleína a un color fucsia, confirmando la alcalinidad del medio. Se cerró rápidamente la trampa y se añadieron 2 mL de hidróxido de sodio en la trampa para evitar la fuga de gases. Al observarse la primera gota de destilado en el Erlenmeyer recolector, se registró como tiempo cero y se continuó con la destilación durante 10 minutos. Al finalizar, el destilado, de color turquesa, se tituló con una solución previamente valorada de ácido sulfúrico 0,0582 N hasta que el color viró a amarillo-naranja. Se registró el volumen de ácido sulfúrico consumido y se determinó el nitrógeno básico volátil (NBV) en mg por cada 100 g de muestra mediante la *Ecuación 15*:

$$N_{mg/100\text{ g muestra}} = \frac{V_{(\text{ác.sulf.})} \times N_{(\text{ác.sulf.})} \times 14,007 \times 2}{muestra} \times 100 = \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde  $V_{(\text{ác.sulf.})}$  y  $N_{(\text{ác.sulf.})}$  corresponden al volumen consumido y a la normalidad del ácido sulfúrico utilizado en la titulación del destilado, respectivamente. El valor de *muestra* representa el peso del trozo de filete que se homogeneizó con ácido perclórico. El número 14,007 hace referencia al peso equivalente del nitrógeno en miligramos, y el factor 2 corresponde a la dilución, debido a que se utilizó la mitad del extracto de pescado. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

#### 4.7.4 Análisis comparativo de sensibilidad mediante velocidades relativas de cambio

Para evaluar comparativamente la sensibilidad de los diferentes indicadores de frescura (cambio de color,  $\Delta E$ , de las etiquetas y del pescado obtenido según se explicó en la *sección 4.7.1*) frente al deterioro del pescado (cuantificado mediante nitrógeno básico volátil, NBV), se definió un parámetro que da cuenta sobre la sensibilidad del cambio de color  $\Delta E$  en las etiquetas respecto al cambio en la detección de NBV en el pescado. Este parámetro fue evaluado en tres intervalos temporales característicos: fase inicial (0-2 días), fase crítica (2-4 días) y fase avanzada (4-7 días) de almacenamiento.

A tal efecto se calculó la velocidad de cambio de color ( $v_{\Delta E}$ ) en un intervalo temporal determinado ( $t_{inicial}$  a  $t_{final}$ ) mediante la expresión:

$$v_{\Delta E} = \frac{\Delta_{\Delta E}}{\Delta t} = \frac{\Delta E_{final} - \Delta E_{inicial}}{t_{final} - t_{inicial}} \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde  $\Delta E_{final}$  y  $\Delta E_{inicial}$  representan los valores de cambio de color de las etiquetas y del pescado al final e inicio del intervalo, respectivamente y  $(t_{final} - t_{inicial})$  corresponde a la duración del intervalo analizado.

En forma análoga se calculó la velocidad de cambio del NBV ( $v_{NBV}$ ) en cada intervalo temporal determinado ( $t_{inicial}$  a  $t_{final}$ ) utilizando la siguiente ecuación:

$$v_{NBV} = \frac{\Delta_{NBV}}{\Delta t} = \frac{NBV_{final} - NBV_{inicial}}{t_{final} - t_{inicial}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde  $NBV_{final}$  y  $NBV_{inicial}$  representan los valores de NBV del pescado al final e inicio del intervalo de tiempo analizado ( $t_{final} - t_{inicial}$ ).

Finalmente, el parámetro de sensibilidad ( $v_r$ ) que da cuenta de la velocidad relativa del cambio de color  $\Delta E$  en las etiquetas y el pescado respecto al cambio en la detección de NBV en el pescado, se obtuvo como el cociente entre la velocidad de la variación de color (etiquetas y pescado) ( $v_{\Delta E}$ ) y la velocidad de evolución del NBV ( $v_{NBV}$ ) en el mismo intervalo de tiempo:

$$v_r = \frac{v_{\Delta E}}{v_{NBV}} = \frac{\Delta_{\Delta E}}{\Delta_{NBV}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Los valores del parámetro  $v_r$  permiten cuantificar la sensibilidad de cada etiqueta:  $v_r > 1$  indica mayor rapidez de cambio que el incremento de NBV (alta sensibilidad), mientras que  $v_r < 1$  refleja menor velocidad de cambio (baja sensibilidad). Esta relación determina si las etiquetas detectan el deterioro antes o después que el método de referencia (NBV). Los valores del parámetro de sensibilidad deben ser interpretados en el mismo intervalo de tiempo específico de su cálculo. Durante la fase inicial, por ejemplo, donde no se produjo un cambio en el NBV que implique rechazo, el pequeño cambio en el NBV puede impulsar valores de  $v_r$  mayores a 1, aunque esto no signifique una alta sensibilidad de respuesta y posible rechazo del producto. Por esto, este análisis se propuso por intervalo de tiempo (fase inicial, fase crítica y fase avanzada).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Contenido de proteínas totales y $\beta$ -glucanos

El contenido de proteínas totales de la biomasa de pared celular de levadura resultó ser de 37% p/p (b.s), mientras que el de glucanos totales fue de 20% p/p (b.s), distribuidos en un 3% p/p (b.s) de  $\alpha$ -glucanos y un 17% p/p (b.s) de  $\beta$ -glucanos. Al compararlo con lo descrito en la *sección 1.2.1*, donde se indica que la pared celular de levadura contiene entre 35% y 40% mananoproteínas, se observa que el contenido proteico obtenido se encuentra dentro de dicho rango. No obstante, los valores de  $\beta$ -glucanos determinados en este estudio fueron considerablemente inferiores al rango reportado en bibliografía de 55-65%, descritos en la *sección 1.2.1*. Esta diferencia puede atribuirse principalmente al origen del material empleado: levadura residual cervecera. Aunque se realizaron los procedimientos correspondientes para la obtención de pared celular, es posible que persistan otros componentes que incrementarían el contenido total de biomasa y reducirían proporcionalmente el porcentaje de polisacáridos.

Cabe destacar que, dentro de la fracción de glucanos, los  $\beta$ -glucanos constituyeron el tipo mayoritario. En el trabajo de Jaeger *et al.* (2020) se recopilan composiciones de biomasa de levadura cervecera reportadas por distintos autores. Si bien estos datos no corresponden específicamente a pared celular aislada, permiten apreciar que cada componente puede presentarse en intervalos amplios, siendo esta variabilidad característica del trabajo con biomasa residuales.

Por otra parte, en la biomasa de gránulos de kéfir de agua se determinó un contenido de proteínas totales del 1%. Este resultado se condice con lo descrito en la *sección 1.2.2*, donde se ha mencionado que los gránulos de kéfir de agua están constituidos principalmente por dextrano (~99%), un polímero de glucosa con enlaces  $\alpha$ -D-1,6 y ramificaciones  $\alpha$ -1,3 (Coma *et al.*, 2019).

### 5.2 Estudio de extracto de humo líquido refinado como agente activo

El extracto de humo líquido refinado provisto por la empresa Kerry Group se almacenó en un lugar seco y oscuro hasta su estudio. En las siguientes secciones se describen los estudios realizados en el extracto para evaluar sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas para su aplicación en materiales activos.

### 5.2.1 Contenido de sólidos totales, pH, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante

La *Tabla 5.2.1* presenta los resultados de los estudios de sólidos totales, densidad, pH, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante del extracto de humo líquido refinado (HL).

**Tabla 5.2.1.** Caracterización del extracto de humo líquido refinado.

Análisis	Resultado	Metodología
Sólidos (g/100g)	5,43	Estufa 105°C
pH	4,83	-----
$IC_{50}$ (mg/L)	593*	Método ABTS
$IC_{50}$ (mg/L)	1377*	Método DPPH
Fenoles totales (mg GAE/L)	450*	Folin-Ciocalteu

\*Referidos al contenido de sólidos del extracto de humo líquido refinado.

El extracto de humo líquido refinado de Kerry Group presentó color amarillo homogéneo y ausencia de aroma ahumado debido a la reducción de compuestos fenólicos luego del proceso de refinado. Esta característica hace posible su aplicación como preservante en diversos productos alimenticios o como aditivo natural para el desarrollo de películas activas.

El  $IC_{50}$  del extracto HL medido mediante los métodos ABTS y DPPH, fue de 593 mg/L y 1377 mg/L, respectivamente. En comparación, Soldera *et al.* (2008) evaluaron la actividad antioxidante mediante el método DPPH de doce tipos de humos líquidos comerciales, reportando valores de  $IC_{50}$  entre 1300 mg/L y 4800 mg/L. Esta amplia variación se atribuye principalmente al contenido de compuestos fenólicos presentes en cada extracto. Como se mencionó en la *sección 4.6.10.1*, un menor valor de  $IC_{50}$  indica una mayor actividad antioxidante. Por lo tanto, el extracto HL ( $IC_{50}$ : 1377 mg/L, DPPH) demostró poseer una notable actividad antioxidante. Aunque no se han reportado valores de  $IC_{50}$  por el método ABTS para extractos de humos líquidos en la bibliografía, se pueden establecer comparaciones con otros antioxidantes naturales. Por ejemplo, los aceites esenciales de albahaca ( $IC_{50}$ : 687 mg/L) y tomillo ( $IC_{50}$ : 896 mg/L) (Rezzoug *et al.*, 2019), ampliamente utilizados en películas bioactivas, presentan una menor actividad antioxidante (es decir, un  $IC_{50}$  más alto) en comparación con el HL ( $IC_{50}$ : 593 mg/L, ABTS). Además de presentar una mayor capacidad antioxidante, el extracto HL, al carecer de aroma podría ser una alternativa más favorable para

el desarrollo de películas activas en comparación con los aceites esenciales. Estos presentan la desventaja de poseer un aroma muy intenso, lo que puede alterar las características sensoriales de los alimentos en contacto con la película activa.

El contenido de fenoles totales (TPC) en el extracto de humo líquido (HL), determinado mediante el método de Folin-Ciocalteu, fue de 450 mg GAE/L. Este valor se encuentra dentro del rango inferior de los fenoles totales reportados para humos líquidos comerciales (300-600 mg GAE/L), los cuales son comúnmente utilizados como conservantes en alimentos (Lingbeck *et al.*, 2014). Esta reducción en el contenido de compuestos fenólicos se atribuye al proceso de refinado descrito previamente, que también disminuye el sabor y aroma ahumados del extracto. Sin embargo, esta disminución de compuestos fenólicos presentes en HL no ha afectado su actividad antioxidante, sino por el contrario y como se ha mencionado, ha sido muy destacada.

### 5.2.2 Actividad antimicrobiana

En la *Tabla 5.2.2* se presentan los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de humo líquido (HL) en mg/mL sobre base seca. Tras la evaluación visual de la microplaca después de 24 horas de incubación a 37 °C, no se detectó crecimiento microbiano en los pocillos sin inocular, lo que confirma la ausencia de contaminaciones durante el procedimiento. El extracto de HL mostró efectividad en la inhibición del crecimiento de todas las bacterias evaluadas, tanto las Gram negativas como positivas. Los valores más bajos de MIC se observaron frente a *Bacillus cereus* y *Salmonella enteritidis*. Estos resultados destacan el potencial del HL como agente antimicrobiano para su uso en alimentos y el desarrollo de películas activas.

Resultados similares han sido reportados en la literatura, donde se ha demostrado que el extracto de humo líquido es efectivo frente a bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, atribuyéndose esta actividad a la presencia de ácidos orgánicos y compuestos carbonílicos en el extracto (Lingbeck *et al.*, 2014; Montazeri *et al.*, 2013a).

**Tabla 5.2.2.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de humo líquido refinado.

<b>Bacteria</b>	<b>MIC (mg/mL) *</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,612
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,806
<i>Escherichia coli</i>	0,806
<i>Bacillus cereus</i>	0,403
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,403

\*Referidos al contenido de sólidos del extracto de humo líquido refinado.

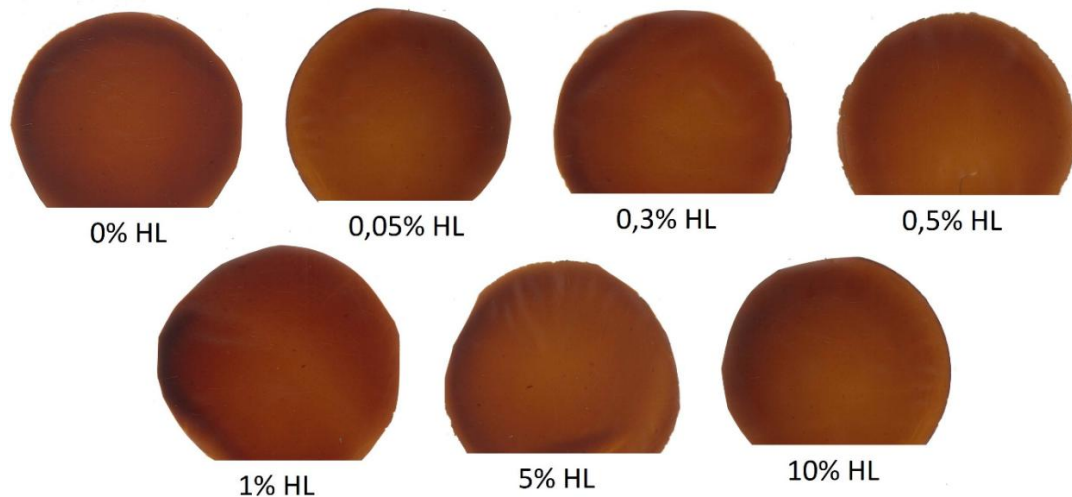
### 5.2.3 Conclusiones parciales

El extracto de humo líquido refinado (HL) demostró una destacada actividad antioxidante y antimicrobiana. Además, debido a la ausencia de aroma ahumado, se presenta como una alternativa superior frente a otros agentes activos empleados en el desarrollo de películas bioactivas. En las siguientes secciones se evaluará la incorporación del extracto de humo líquido refinado (HL) en dispersiones filmogénicas formuladas a partir de pared celular de levadura residual cervecera y en dispersiones basadas en gránulos de kéfir de agua, con el objetivo de desarrollar películas activas.

### 5.3 Caracterización de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de humo líquido refinado

#### 5.3.1 Examinación visual

Las películas desarrolladas a partir de pared celular de levadura residual cervecera (YCW-R) con extracto de humo líquido refinado (HL) se presentan en la *Figura 5.3.1*.

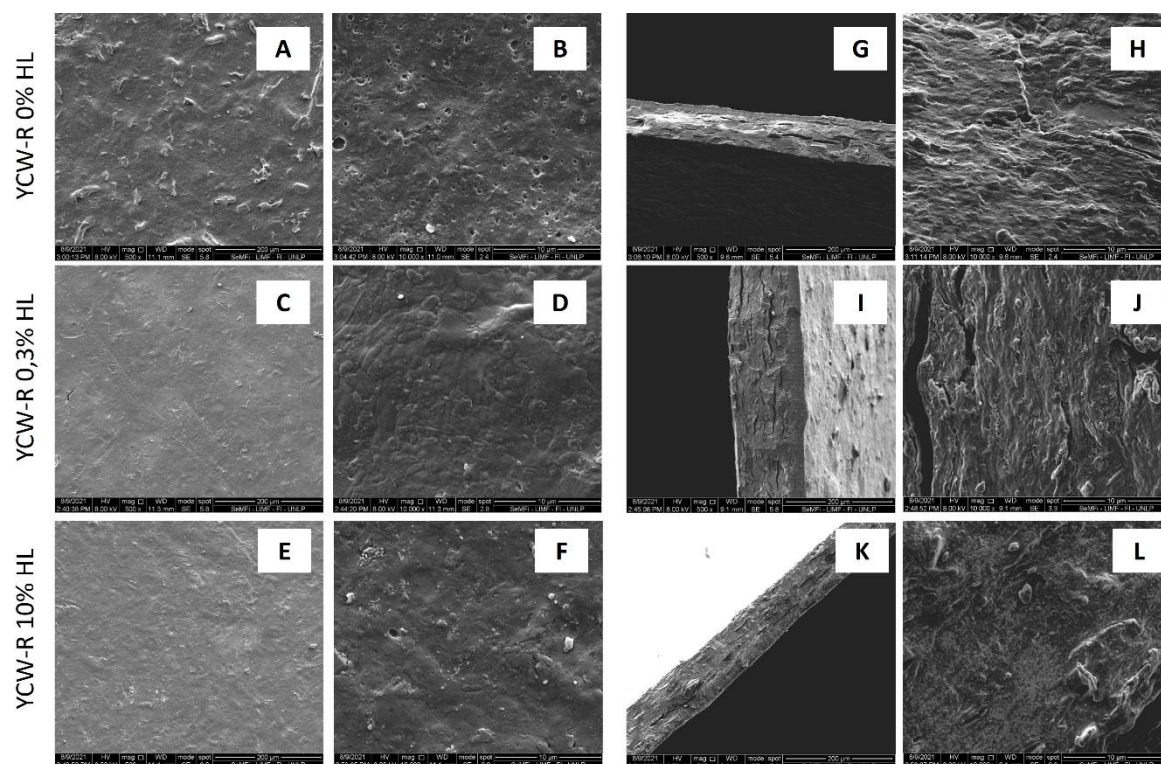


*Figura 5.3.1.* Películas activas YCW-R con HL.

El color marrón intenso observado en las películas se atribuye a reacciones de Maillard ocurridas durante el proceso de *casting*. Además, es importante considerar que la levadura empleada, al ser un residuo de la industria cervecera, podría contener componentes residuales que contribuyan al color marrón. La predominancia de este color oscuro en el material sugiere su potencial como alternativa para el envasado de alimentos sensibles a la luz.

#### 5.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la *Figura 5.3.2* se presentan las micrografías de la superficie de las películas YCW-R con HL (*Figura 5.3.2 A-F*) y de la sección transversal (*Figura 5.3.2 G-L*). Las superficies de las películas mostraron diferencias notables con la incorporación de HL. En particular, las películas YCW-R con 0,3% y 10% de HL exhibieron superficies más lisas y homogéneas en comparación con las muestras control (YCW-R 0% HL).



**Figura 5.3.2.** Microscopía electrónica de barrido (SEM) de películas YCW-R con 0%; 0,3% y 10% HL. A-F: micrografías de superficie; G-L: micrografías de sección transversal.

Por otro lado, la sección transversal de las películas con HL presentó fracturas y canales, lo cual podría atribuirse a una interacción deficiente entre los polisacáridos y las proteínas de la matriz. Este comportamiento ha sido reportado en estudios previos que analizan mezclas de biopolímeros, como almidón y gelatina de pescado (Al-Hassan & Norziah, 2012). De manera similar, investigaciones realizadas en películas de pectina con la adición de gelatina de pescado o proteína de poroto de soja demostraron que las superficies eran lisas cuando solo se utilizaba el polisacárido, pero que con la incorporación de proteínas las películas se volvían rugosas y quebradizas (Liu, Fishman & Hicks, 2007).

Asimismo, otros estudios reportaron que películas elaboradas con gelatina y goma gellan o kappa-carragenina producían zonas discontinuas con fracturas distribuidas de manera aleatoria, generando canales en la matriz de las películas (Pranoto, Lee & Park, 2007). Sin embargo, en este caso, la sección transversal de las películas con HL resultó ser más homogénea que la muestra control, lo que sugiere que la presencia del extracto en la matriz podría mejorar la microestructura del material.

### 5.3.3 Pruebas mecánicas

Como se muestra en la *Tabla 5.3.3*, las propiedades mecánicas de las películas YCW-R fueron afectadas por la adición de HL. Los resultados indicaron efectos diferenciados según la

concentración de extracto de humo líquido refinado añadido. La película YCW-R con 0,3% HL presentó el valor más alto de módulo de elasticidad ( $E$ ) ( $213 \pm 24$  MPa), lo que sugiere un aumento en la rigidez, presumiblemente debido al entrecruzamiento entre los grupos carbonilos de los aldehídos del humo líquido con las proteínas presentes en la matriz, lo que inhibió la movilidad de las cadenas poliméricas (Wang *et al.*, 2022).

**Tabla 5.3.3.** Parámetros mecánicos de las películas YCW-R con la adición de HL.

Muestras	$E$ (MPa)	$\epsilon\%$	$TS$ (MPa)
YCW-R 0% HL	$133 \pm 15^a$	$15 \pm 2^a$	$6,9 \pm 0,6^a$
YCW-R 0,05% HL	$168 \pm 21^{a,b}$	$10 \pm 2^b$	$7,5 \pm 0,9^a$
YCW-R 0,3% HL	$213 \pm 24^b$	$11 \pm 1^b$	$8,7 \pm 1,0^b$
YCW-R 0,5% HL	$186 \pm 15^b$	$11 \pm 2^{a,b}$	$8,0 \pm 0,8^{a,b}$
YCW-R 1% HL	$147 \pm 17^a$	$14 \pm 2^{a,b}$	$6,8 \pm 0,8^a$
YCW-R 5% HL	$86 \pm 7^c$	$15 \pm 4^{a,b}$	$4,7 \pm 0,6^c$
YCW-R 10% HL	$70 \pm 7^d$	$19 \pm 3^a$	$4,4 \pm 0,4^c$

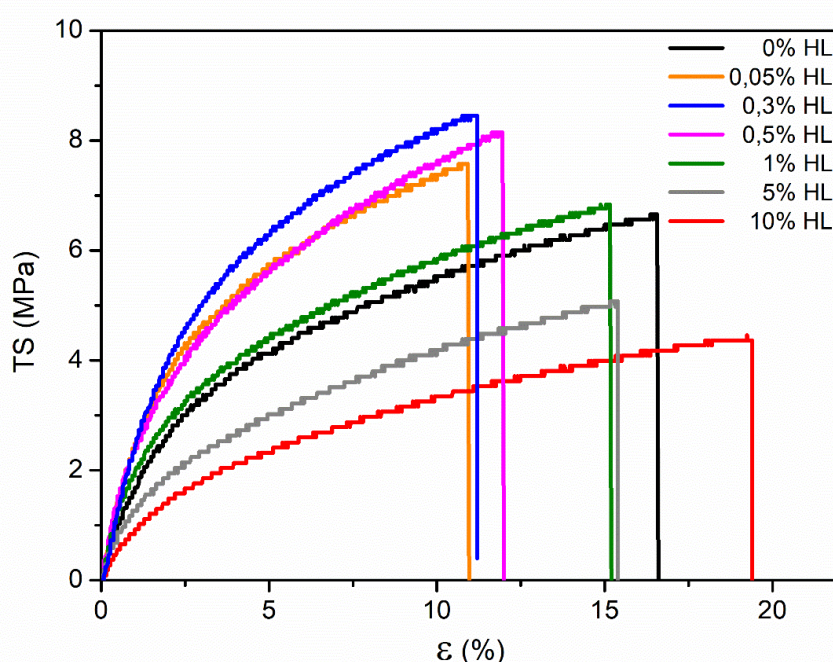
Las diferentes letras asignadas en cada columna se refieren a diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ;  $n = 11$ ).

Es bien conocido que los aldehídos, en particular el glutaraldehído y el formaldehído, son agentes entrecruzantes ampliamente utilizados debido a su rápida reacción con grupos amino y su relativo bajo costo. Sin embargo, tanto el glutaraldehído como el formaldehído han sido asociados con efectos adversos para la salud y el medioambiente (Azeredo & Waldron, 2016). El humo líquido es un aditivo alimentario comercial; sus aldehídos no son tóxicos y están reconocidos como seguros por la FDA, por lo que podría utilizarse como agente entrecruzante en materiales en contacto con alimentos (Montazeri *et al.*, 2013a).

Sin embargo, cuando la concentración añadida del extracto superó el 1% p/p, los valores de  $E$  y resistencia a la tracción ( $TS$ ) de las películas disminuyeron. El exceso de HL podría generar un efecto plastificante a través de interacciones por enlaces de hidrógeno con polisacáridos y proteínas en la matriz de levadura, lo que reduciría las fuerzas cohesivas entre las cadenas poliméricas (Choque *et al.*, 2021). Esta interacción provocada por el exceso de HL incrementaría el volumen libre dentro del material permitiendo movimientos segmentarios (pequeños movimientos en ciertas porciones específicas de la cadena polimérica) capaces de producir reordenamientos localizados, otorgándole la plasticidad a la matriz (Coma *et al.*, 2019).

Resultados similares fueron reportados en películas a base de concentrado de proteína de suero incorporadas con humo líquido, donde la adición del 10% v/v mejoró la resistencia mecánica, pero el agregado del 15% v/v redujo los parámetros de  $E$  y  $TS$  (Soazo *et al.*, 2016).

La variación de  $TS$  y  $\epsilon\%$  con la adición de HL se representó en la *Figura 5.3.3*, donde se pudieron reconocer claramente dos efectos significativos: el efecto de entrecruzamiento en YCW-R 0,05%, 0,3% y 0,5% HL, donde la elongación disminuyó mientras que  $TS$  aumentó con respecto a YCW-R 0% HL; y el efecto plastificante en YCW-R 5% y 10% HL, donde  $\epsilon\%$  aumentó y  $TS$  disminuyó significativamente.



**Figura 5.3.3.** Curvas esfuerzo-deformación de las películas YCW-R con la adición de HL.

### 5.3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

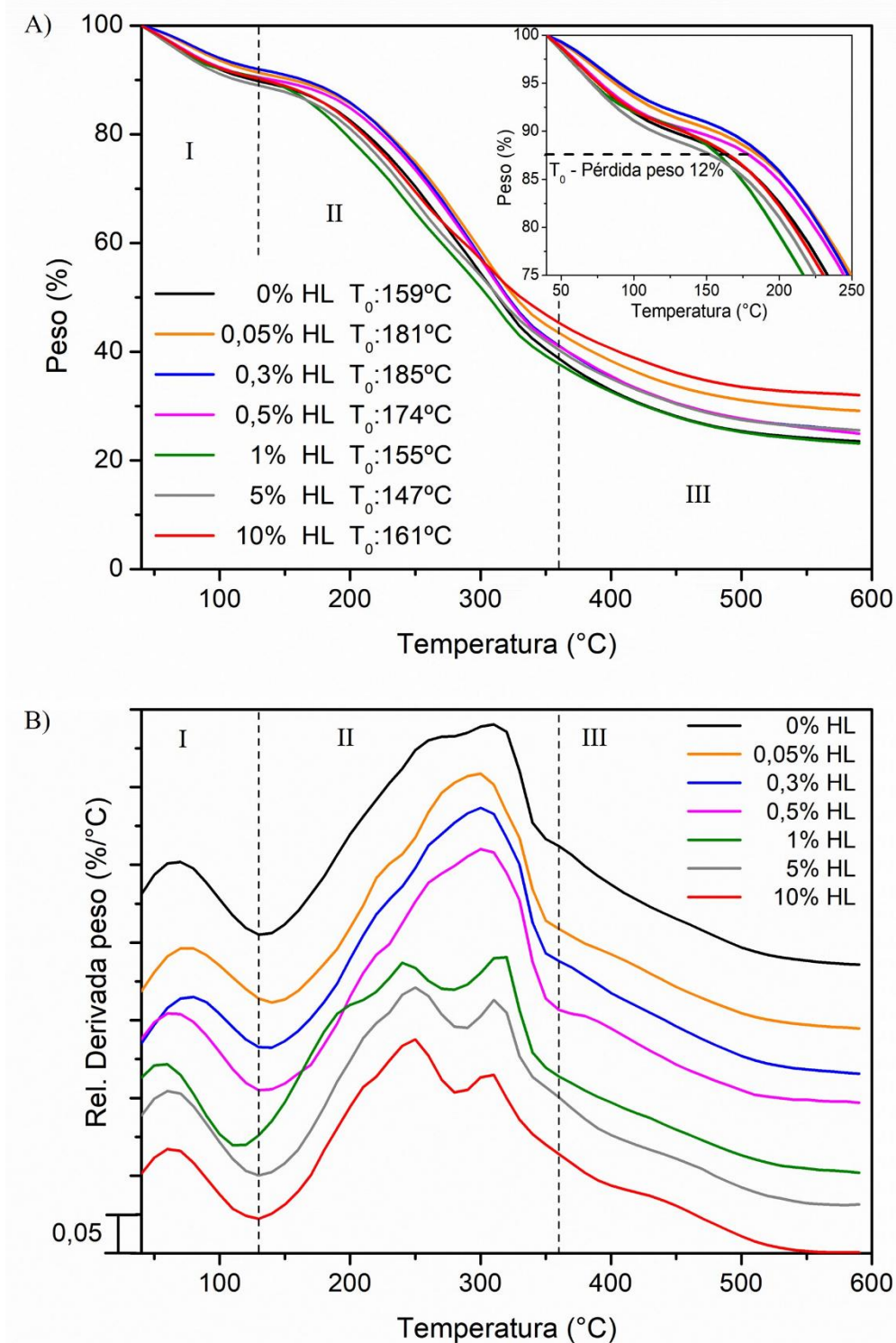
El análisis termogravimétrico de las películas YCW-R con HL, condicionadas a 43% h.r, se muestra en la *Figura 5.3.4*. Como se aprecia en la *Figura 5.3.4-A* y *5.3.4-B*, las películas presentan diferencias significativas tras la adición de HL, evidenciando un perfil de degradación multietapa que se puede dividir en tres zonas bien definidas. La primera etapa (40 – 130 °C) corresponde a la pérdida de humedad y compuestos volátiles del extracto (Lozano-Navarro *et al.*, 2018). La segunda etapa de degradación térmica (130 – 360 °C), corresponde a la degradación del glicerol, mananoproteínas y polisacáridos (Delgado *et al.*, 2018a). En la

tercera etapa (360 – 600 °C), ocurre la degradación final de la matriz, con un residuo remanente de aproximadamente 24% y 32% para las muestras con 0% y 10% HL, respectivamente.

La degradación térmica inicial de las películas YCW-R con HL se muestra en la *Figura 5.3.4-A*. En YCW-R 0,3% HL, se observó un incremento en la temperatura inicial de degradación ( $T_0$ : 185°C) en comparación con YCW-R 0% HL ( $T_0$ : 159 °C). Este efecto puede deberse al entrecruzamiento, como se explicó en la *sección 5.3.3*, entre aldehídos de HL con grupos aminos de proteínas presentes en la matriz (Azeredo & Waldron, 2016). El análisis térmico reveló una mayor estabilidad térmica en las películas con 0,05%, 0,3% y 0,5% de HL, lo que indica un efecto positivo de las bajas concentraciones de HL sobre la resistencia térmica del material. Resultados similares fueron reportados por Wang *et al.* (2016) en películas de gelatina, donde se observó un aumento significativo en la estabilidad térmica al incorporar extracto de humo líquido.

Por otro lado, las muestras YCW-R con 5% de HL mostraron la menor estabilidad térmica ( $T_0$ : 147°C) en comparación con la muestra control. Este comportamiento podría atribuirse a un efecto plastificante, como se describió en las pruebas mecánicas (*sección 5.3.3*) causado por los componentes de bajo peso molecular del extracto de HL, que no se involucraron en el efecto entrecruzante. Estos componentes podrían formar enlaces de hidrógeno con los polisacáridos y proteínas de la matriz YCW-R, debilitando la interacción entre las cadenas de biopolímeros (Choque *et al.*, 2021).

En la *Figura 5.3.4-B* se observaron diferencias significativas en el valor de  $T_{max}$ , las cuales se atribuyen a la incorporación de HL en las películas. Las muestras YCW-R 0% HL mostraron un hombro a 270 °C y  $T_{max}$  a 310 °C; sin embargo, este hombro desapareció al incorporar concentraciones de 0,05%, 0,3% y 0,5% de HL. Por otro lado, las películas con 1%, 5% y 10% de HL exhibieron dos picos principales a 250 °C y 310 °C. Estos cambios podrían explicarse por las distintas interacciones entre HL y la matriz polimérica, que varían según la concentración del extracto, tanto a bajas como a altas concentraciones. En conjunto, los resultados del análisis termogravimétrico sugieren que el extracto de humo líquido tendría un efecto entrecruzante en concentraciones bajas (hasta 0,5% de HL) y un efecto plastificante a concentraciones más altas (por encima del 1% de HL), comportamiento que ha sido observado también en otros estudios con diferentes matrices biobasadas y humo líquido (Wang *et al.*, 2016).



**Figura 5.3.4.** Análisis termogravimétrico (TGA) de las películas YCW-R con diferente contenido de HL. A) Termogramas y temperatura inicial de degradación térmica. B) Derivada de degradación térmica.

### 5.3.5 Calorimetría Diferencial de Barrido a Temperatura Modulada (MDSC)

Las películas activas YCW-R con 0; 0,3 y 10% HL fueron analizadas mediante MDSC para identificar las transiciones térmicas en su compleja matriz polimérica. La selección de las concentraciones de 0,3% y 10% de HL se basó en su capacidad para representar los dos comportamientos opuestos y más significativos dentro de la matriz polimérica. Las películas con 0,3% HL se eligieron porque en los ensayos mecánicos (*sección 5.3.3*) esta concentración mostró los valores máximos de tensión y módulo elástico, lo que indica que el efecto de entrecruzamiento del extracto era predominante. Por el contrario, la formulación con 10% HL exhibió los valores mínimos en esas propiedades mecánicas y un incremento en la elongación, demostrando el claro efecto plastificante del HL.

La determinación de las transiciones térmicas en películas biobasadas conformadas por polisacáridos y/o proteínas no es tan sencilla como en otros polímeros y depende en gran medida de la fuente de estos (Ullah *et al.*, 2019). Debido a estas complejidades, resulta difícil comparar los valores obtenidos con los reportados en la literatura. Sin embargo, en la *Tabla 5.3.5* se presentan las propiedades térmicas de las películas secas de YCW-R obtenidas mediante MDSC, tales como la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y las transiciones endotérmicas ( $T_{end}$ ,  $\Delta H_{end}$ ). El flujo reversible confirmó la presencia de dos  $T_{gs}$  en todas las muestras, aproximadamente a 10 °C y 70 °C. Dado que las películas de YCW-R son materiales multicomponentes, es probable que las  $T_{gs}$  correspondan a una fase rica en componentes más compatibles con el glicerol y otra fase rica en componentes no plastificados. La adición de HL no generó diferencias significativas en estas temperaturas.

Por otro lado, el flujo no reversible mostró la presencia de dos transiciones endotérmicas en todas las muestras, las cuales corresponden a transiciones en el  $\beta$ -glucano (Delgado *et al.*, 2018a): una a 56 °C, cuya energía asociada aumentó con la adición de HL, y otra entre 96 °C y 107 °C. El incremento en la energía en esta última transición podría atribuirse al efecto de entrecruzamiento generado por la incorporación de HL en la matriz de pared celular de levadura.

**Tabla 5.3.5.** Calorimetría Diferencial de Barrido a Temperatura Modulada (MDSC) de películas YCW-R con 0%, 0,3% y 10% de HL.

Muestras	Flujo de calor reversible		Flujo de calor no reversible			
	$T_{g1}$ [°C]	$T_{g2}$ [°C]	$T_{end1}$ [°C]	$\Delta H_{end1}$ [J/g]	$T_{end2}$ [°C]	$\Delta H_{end2}$ [J/g]
0% HL	10,4 ± 1,7 <sup>a</sup>	74 ± 17 <sup>a</sup>	56,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	97,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>
0,3% HL	10,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	68 ± 6 <sup>a</sup>	56,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	96,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
10% HL	9,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	69 ± 16 <sup>a</sup>	55,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,7 ± 1,4 <sup>b</sup>	106,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,5 <sup>a</sup>

Las diferentes letras asignadas en cada columna se refieren a diferencias significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

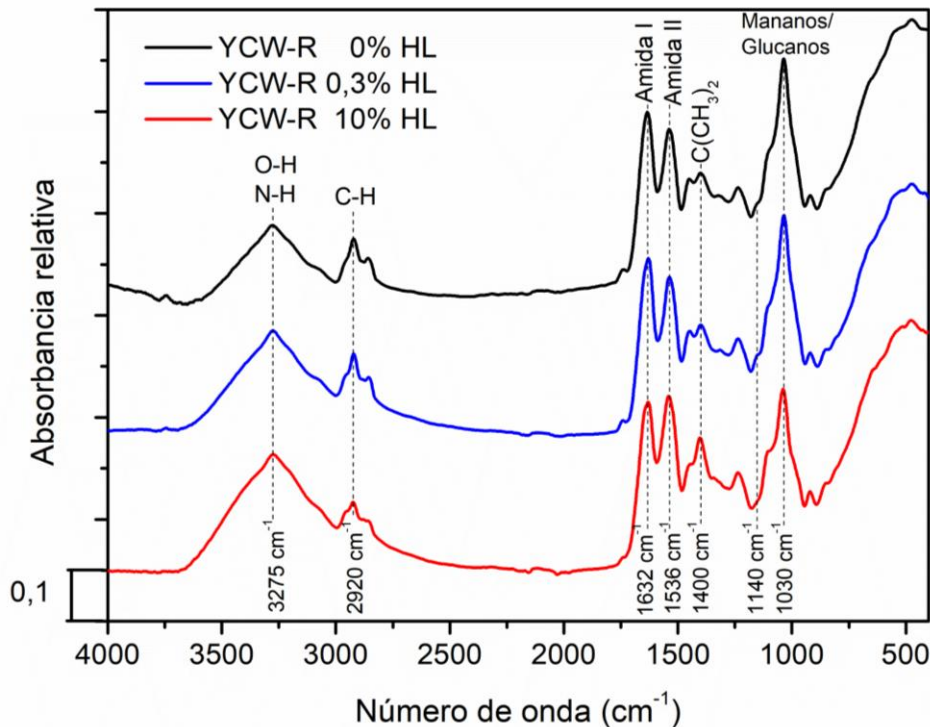
### 5.3.6 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La *Figura 5.3.6* muestra los espectros FTIR comparativos de las películas YCW-R con incorporaciones de 0%, 0,3% y 10% de HL y normalizados al número de onda 1030  $\text{cm}^{-1}$  para mayor claridad. Esta selección de formulaciones permite evaluar de manera contrastante los efectos estructurales producidos por bajas (0,3%) y altas (10%) concentraciones del extracto en la matriz polimérica. El análisis de estas tres concentraciones posibilita una clara identificación de las modificaciones moleculares inducidas por el HL en el rango estudiado.

En los espectros FTIR del sistema, se observó una banda de absorción a 3275  $\text{cm}^{-1}$ , asociado con la frecuencia de vibración por estiramiento de los grupos hidroxilo (O-H) y amino (N-H) (Min *et al.*, 2024). Esta señal se atribuye a la presencia de agua residual, polisacáridos, glicerol y proteínas en la muestra. Las bandas en 2920  $\text{cm}^{-1}$  y 2855  $\text{cm}^{-1}$  correspondieron a la vibración de estiramiento del enlace C-H de las unidades de glucosa. Las bandas de absorción de las amidas I y II, relacionados con proteínas, se observaron en 1632  $\text{cm}^{-1}$  y 1536  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. La banda de amida I se debe principalmente al estiramiento del enlace C=O, mientras que la amida II tiene una contribución predominante del doblamiento del grupo N-H en el enlace amida y una contribución menor del doblamiento del enlace C-N. La banda a 1400  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  de las proteínas. La banda de absorción principal a 1030  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de mananos y  $\beta$ -glucanos (Delgado *et al.*, 2018a).

Las bandas de absorción FTIR de las películas YCW-R con 0%, 0,3% y 10% de HL exhibieron características similares de absorción infrarroja. Resultados similares fueron reportados por Rahmasari & Yenis (2022) en películas activas basadas en almidón de jengibre, donde la adición de humo líquido no alteró la estructura química del material (Rahmasari &

Yemiş 2022). Sin embargo, al comparar YCW-R 10% HL con YCW-R 0% HL, se observó un aumento en la intensidad de las bandas en  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Además, el hombro en  $1140\text{ cm}^{-1}$  presente en YCW-R 0% y 0,3% HL desapareció en las muestras de YCW-R 10% HL. Estas diferencias pueden deberse a la posible plastificación producida por el exceso de HL, como se concluyó en el análisis de propiedades térmicas y pruebas mecánicas, en la que se producen nuevos enlaces entre el extracto y la matriz disminuyendo la interacción entre las cadenas poliméricas.

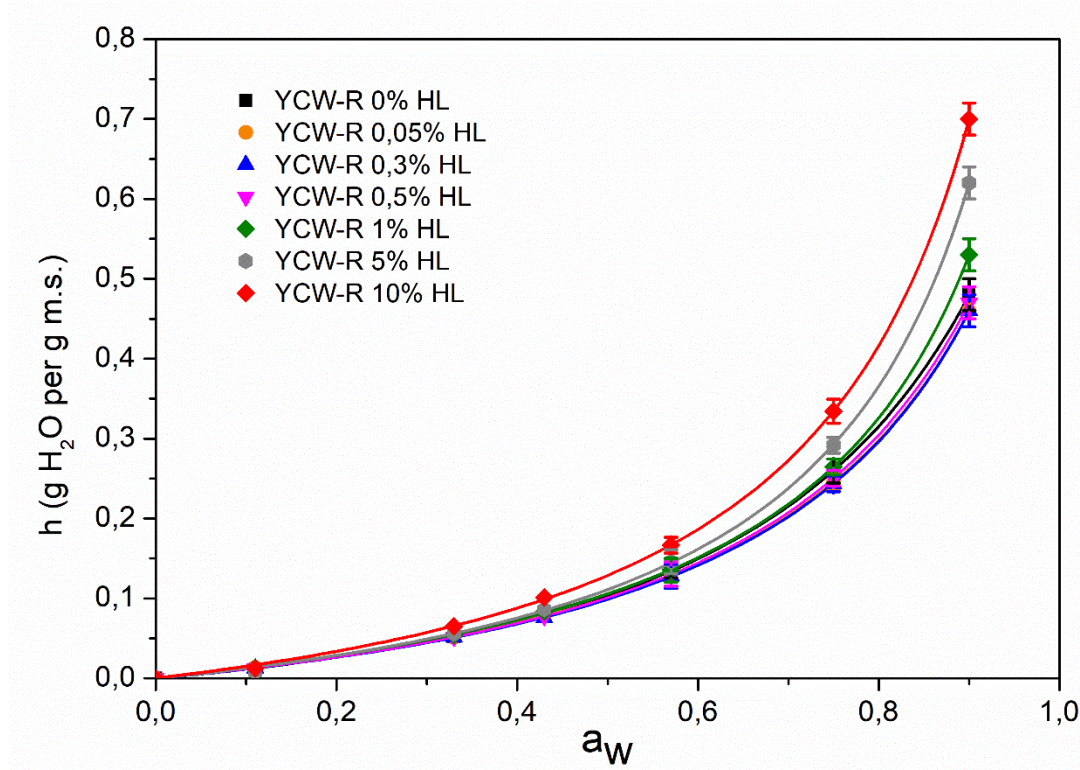


**Figura 5.3.6.** Espectros FTIR de las películas YCW-R con 0%, 0,3% y 10% de HL.

### 5.3.7 Isotermas de sorción de agua

Las isotermas de sorción de agua mostradas en la *Figura 5.3.7* ilustran el efecto del contenido de HL en la hidratación de las películas. Los puntos experimentales se ajustaron al modelo GAB mediante la *Ecuación 10*, y los parámetros obtenidos del ajuste se presentan en la *Tabla 5.3.7*. Todas las isotermas mostraron un leve aumento en el contenido de agua de hidratación para  $a_w < 0,6$ , lo que reveló la presencia de una pequeña cantidad de agua directamente unida a la matriz polimérica formando la monocapa de hidratación. Esto fue confirmado por los pequeños valores del parámetro  $N$  (relacionado con el número de sitios primarios de unión de hidratación) obtenidos de todas las isotermas (*Tabla 5.3.7*). Por otro lado, las isotermas presentaron un marcado aumento en la hidratación para  $a_w > 0,6$ , lo que sugiere que la mayor

parte del agua de hidratación estaba formando multicapas y se encontraba unida indirectamente a la matriz polimérica (Guggenheim, 1966; Delgado *et al.*, 2018b). En general, este comportamiento de las isothermas de sorción es común en la mayoría de las películas hidrofílicas obtenidas a partir de biopolímeros (Delgado, Peltzer & Salvay, 2022; Ramírez Tapias *et al.*, 2020).



**Figura 5.3.7.** Isothermas de sorción de agua de películas YCW-R con adición de HL.

La *Tabla 5.3.7* muestra que el parámetro  $N$  disminuyó cuando se incorporó HL en la matriz de la película, lo que sugiere que la adición del aditivo neutralizó algunos de los sitios primarios de unión al agua. HL podría unirse a algunos de estos sitios y mediar interacciones entre ellos, obstruyendo así su unión directa con las moléculas de agua. Por el contrario, el parámetro  $c$  (relacionado con la fuerza de unión del agua a los sitios primarios de hidratación) aumentó con la adición de HL. La *Tabla 5.3.7* también muestra el producto  $N \times c$ , que está relacionado con el contenido de la monocapa de hidratación y la fuerza de unión del agua a la matriz (Ramírez Tapias *et al.*, 2022).

**Tabla 5.3.9.** Parámetros del modelo GAB obtenidos del ajuste de las isotermas de sorción de agua (Fig. 5.3.7 y contenido de agua medido en las películas en equilibrio a 90% h.r de las películas YCW-R con HL.

Muestras	Isotermas de sorción de agua					
	Parámetros GAB				$h_{90\%rh}$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$N \times c$ [g H <sub>2</sub> O/g]
	$N$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$c$	$k$	$R^2$		
0% HL	0,22 ± 0,02	0,59 ± 0,06	0,81 ± 0,01	0,999	0,49 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,02
0,05% HL	0,15 ± 0,01	0,88 ± 0,05	0,85 ± 0,01	0,999	0,46 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01
0,3% HL	0,15 ± 0,01	0,84 ± 0,04	0,85 ± 0,01	0,999	0,46 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01
0,5% HL	0,16 ± 0,01	0,76 ± 0,03	0,84 ± 0,01	0,999	0,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01
1% HL	0,14 ± 0,01	0,99 ± 0,06	0,89 ± 0,01	0,999	0,53 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,01
5% HL	0,14 ± 0,01	0,88 ± 0,09	0,91 ± 0,01	0,999	0,63 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,03
10% HL	0,16 ± 0,01	0,92 ± 0,09	0,91 ± 0,01	0,999	0,71 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,15 ± 0,02

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ). Los valores reportados del parámetro estadístico  $R^2$  indican un buen ajuste del modelo. Los errores en los parámetros GAB se obtuvieron del análisis del ajuste, y los errores en los valores de  $N \times c$  se calcularon mediante las reglas de propagación de errores.

Se puede observar que  $N \times c$  es prácticamente constante para concentraciones de aditivo de hasta 5% de HL, lo que se refleja en la similitud de las isotermas de estas muestras para  $a_w < 0,6$ . Por otro lado, se observó en la Figura 5.3.7 y la Tabla 5.3.7 que el valor de equilibrio de hidratación al 90% de humedad relativa ( $h_{90\%rh}$ ) no se alteró marcadamente en las películas que contenían HL hasta un 0,5%, mientras que en las películas con mayor contenido de HL,  $h_{90\%rh}$  aumentó a medida que se incrementó el contenido del aditivo. Esto es consistente con los valores obtenidos para el parámetro  $k$  (relacionado con la capacidad de unión del agua a la multicapa) mostrados en la Tabla 5.3.7, que presentaron el mismo comportamiento en función del contenido de HL.

De esta manera, la adición de HL por encima del 0,5% aumentó la capacidad de unión del agua a la multicapa e incrementó el valor de  $h_{90\%rh}$ . Un comportamiento similar del parámetro  $k$  y el valor de equilibrio de hidratación  $h_{90\%rh}$  en función del contenido de glicerol fue observado en películas basadas en almidón de yuca (Mali *et al.*, 2004), películas basadas en biomasa de levadura (Delgado *et al.*, 2018a) y películas basadas en pared celular de levadura (Peltzer *et al.*, 2018). De este modo, desde una perspectiva de hidratación, la incorporación de HL por encima del 0,5% produjo un efecto similar al de un plastificante.

### 5.3.8 Transporte de vapor de agua

En películas biopoliméricas hidrofílicas, la mayoría de las moléculas de agua de hidratación forman multicapas y están unidas indirectamente a la matriz polimérica. Por lo tanto, las moléculas de agua de hidratación en materiales biopoliméricos pueden transportarse mediante un mecanismo de sorción-difusión-desorción a través de un gradiente de presión de vapor de agua (Delgado *et al.*, 2018b; Delgado *et al.*, 2022). La permeabilidad al vapor de agua en películas biopoliméricas depende de las condiciones experimentales del gradiente de presión de vapor de agua y del espesor de la película (Delgado *et al.*, 2022). Por lo tanto, para comparar los valores de  $P_w^{\text{exp}}$  de diferentes películas, estas deben tener el mismo espesor ( $0,12 \pm 0,01$  mm en nuestro caso) y realizarse bajo los mismos gradientes de presión de vapor de agua.

La *Tabla 5.3.8* muestra los valores de  $P_w^{\text{exp}}$  de las películas en función del contenido de HL. Se detectó que  $P_w^{\text{exp}}$  no presentó cambios significativos para contenidos de hasta 1% HL, mientras que la incorporación de HL por encima del 1% incrementó  $P_w^{\text{exp}}$ . La *Tabla 5.3.8* también presenta los valores de  $S_w^{\text{eff}}$  y  $D_w^{\text{eff}}$ , que contribuyen como fenómenos separados a  $P_w^{\text{exp}}$ , como se indica en la *Ecuación 12*. Se observó que  $S_w^{\text{eff}}$  aumentó considerablemente por encima de un contenido de HL del 1%, mientras que  $D_w^{\text{eff}}$  no se vio alterado por la incorporación del aditivo.

**Tabla 5.3.8.** Efecto de la concentración del HL en la permeabilidad experimental al vapor de agua ( $P_w^{\text{exp}}$ ), solubilidad del agua ( $S_w^{\text{eff}}$ ) y difusividad del agua ( $D_w^{\text{eff}}$ ) y la densidad de la película seca ( $\rho_{\text{ms}}$ )

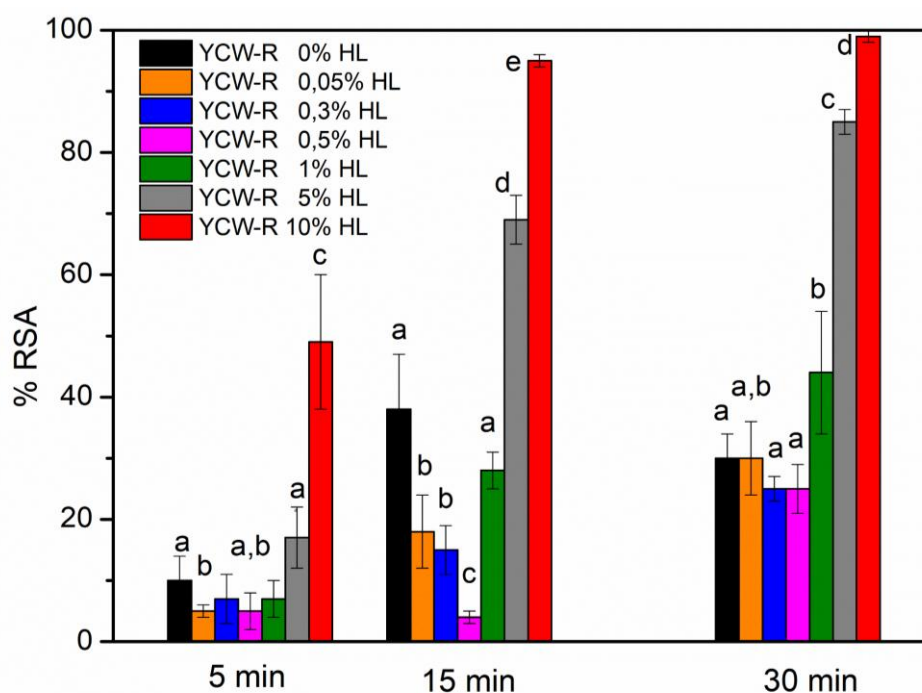
Muestras	$\rho_{\text{m.s.}}$ [ $10^4 \text{g m}^{-3}$ ]	$P_w^{\text{exp}}$ [ $10^{-10} \text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ]	$S_w^{\text{eff}}$ [ $\text{g m}^{-3} \text{Pa}^{-1}$ ]	$D_w^{\text{eff}}$ [ $10^{-13} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ]
YCW-R 0% HL	$123 \pm 3^{\text{a}}$	$3,3 \pm 0,1^{\text{a}}$	$274 \pm 8^{\text{a}}$	$12 \pm 1^{\text{a}}$
YCW-R 0,05% HL	$135 \pm 9^{\text{a}}$	$3,4 \pm 0,1^{\text{a}}$	$283 \pm 8^{\text{a}}$	$12 \pm 1^{\text{a}}$
YCW-R 0,3% HL	$126 \pm 6^{\text{a}}$	$3,4 \pm 0,1^{\text{a}}$	$264 \pm 12^{\text{a}}$	$13 \pm 2^{\text{a}}$
YCW-R 0,5% HL	$128 \pm 3^{\text{a}}$	$3,5 \pm 0,1^{\text{a}}$	$272 \pm 5^{\text{a}}$	$13 \pm 2^{\text{a}}$
YCW-R 1% HL	$122 \pm 9^{\text{a}}$	$3,4 \pm 0,1^{\text{a}}$	$297 \pm 5^{\text{b}}$	$11 \pm 1^{\text{a}}$
YCW-R 5% HL	$123 \pm 5^{\text{a}}$	$3,7 \pm 0,1^{\text{b}}$	$361 \pm 8^{\text{c}}$	$10 \pm 1^{\text{a}}$
YCW-R 10% HL	$120 \pm 6^{\text{a}}$	$4,2 \pm 0,1^{\text{c}}$	$390 \pm 8^{\text{d}}$	$11 \pm 1^{\text{a}}$

Las mismas letras en los datos reportados en una columna indican diferencias no significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

De esta manera, el aumento de  $P_w^{\text{exp}}$  observado en películas con alto contenido de HL se debió al incremento de  $S_w^{\text{eff}}$ . Un comportamiento comparable de  $P_w^{\text{exp}}$ ,  $S_w^{\text{eff}}$  y  $D_w^{\text{eff}}$  en función del contenido de glicerol fue observado en películas basadas en biomasa de levadura (Delgado *et al.*, 2018b) y en películas basadas en pared celular de levadura (Peltzer *et al.*, 2018). Por lo tanto, desde el punto de vista del transporte de agua, la incorporación de HL en altas concentraciones produjo un efecto similar al de un plastificante. Este resultado está alineado con los obtenidos en los estudios espectroscópicos, térmicos, mecánicos y de hidratación.

### 5.3.9 Actividad antioxidante

Los resultados de la capacidad antioxidante (%RSA) de las películas de YCW-R con la adición de HL a lo largo del tiempo en solución de ABTS se muestran en la *Figura 5.3.9*. Se observó que, para todas las formulaciones, la capacidad antioxidante aumentó con el tiempo, demostrando una liberación gradual del aditivo en el solvente de reacción. Además, se evidenció que la formulación que mostró mayor eficacia fue YCW-R 10% HL, alcanzando valores superiores al 90% de RSA después de 15 minutos de ensayo. En el mismo tiempo de estudio, YCW-R 0,5% HL mostró el menor %RSA, lo que podría deberse a la indisponibilidad de HL para reaccionar con el ABTS debido a las reacciones de entrecruzamiento con la matriz mencionadas anteriormente. Las muestras YCW-R 0% HL también mostraron actividad antioxidante en todos los tiempos estudiados. Este comportamiento podría atribuirse a una reacción de los  $\beta$ -glucanos y los aminoácidos presentes en la matriz, en particular la tirosina, con el radical ABTS (Rezzani *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2021; Jaehrig *et al.*, 2008; Gülçin, 2007; van Overveld *et al.*, 2000).



**Figura 5.3.9.** Capacidad antioxidante de las películas YCW-R con la adición de HL en solución de ABTS en etanol.

### 5.3.10 Actividad antimicrobiana

El método de contacto directo se utilizó para estudiar la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* de las películas de YCW-R con HL. Las muestras con 10% de HL mostraron una reducción bacteriana del 76% calculada mediante la *Ecuación 9*, con un recuento de  $3,1 \times 10^5$  UFC/mL, en comparación con las muestras control (0% HL), las cuales presentaron  $1,3 \times 10^6$  UFC/mL. La efectividad antibacteriana del extracto de humo líquido se basa en la presencia de fenoles, carbonilos y ácidos orgánicos (Montazeri *et al.*, 2013a; Soazo *et al.*, 2016). Al compararlo con los resultados obtenidos del ensayo MIC (*sección 5.2.2*) se observa que el HL mantiene su actividad antimicrobiana al incorporarla en la matriz en altas concentraciones.

### 5.3.11 Conclusiones parciales

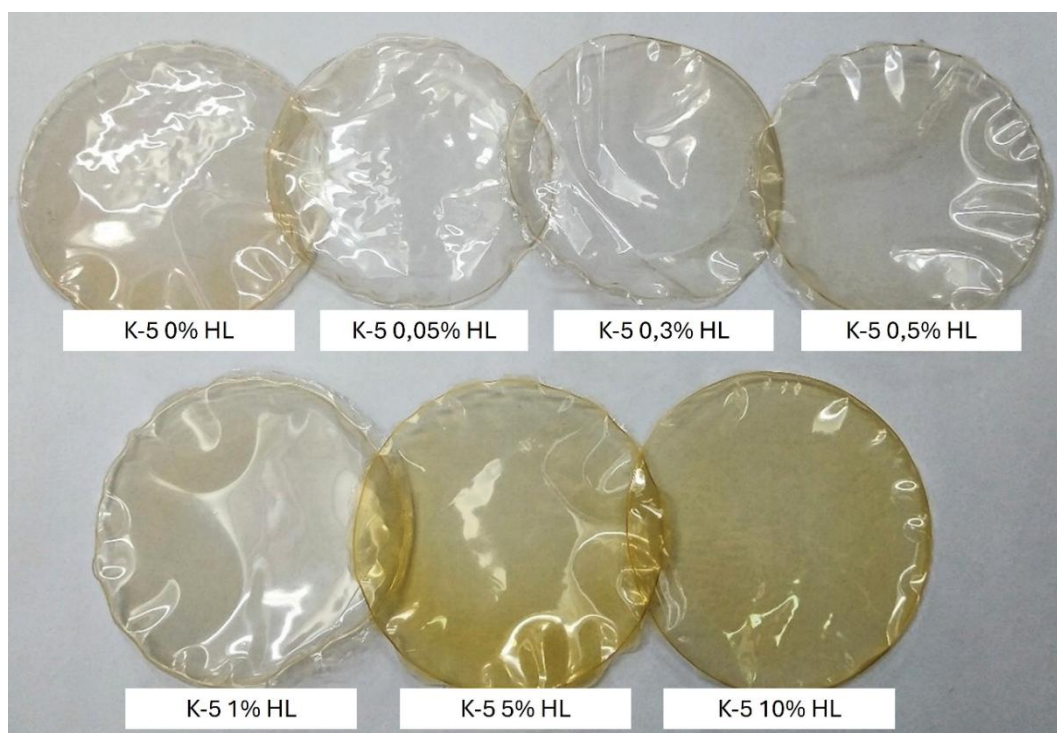
La incorporación de extracto de humo líquido refinado en matrices de pared celular de levadura cervecera residual permitió la obtención de películas homogéneas, flexibles y de color predominantemente marrón. Las propiedades térmicas, mecánicas, antioxidantes y de hidratación de las películas se vieron afectadas por la concentración de humo líquido añadido. En bajas concentraciones de extracto, las películas mejoraron su estabilidad térmica y resistencia mecánica debido a un posible efecto de entrecruzamiento. Sin embargo, altas concentraciones de humo líquido produjeron un efecto plastificante, donde el extracto debilita

las fuerzas de interacción entre las cadenas poliméricas de la matriz. Debido a este efecto, se observó un aumento en la permeabilidad al vapor de agua y la hidratación, una menor resistencia mecánica y una menor estabilidad térmica en las muestras YCW-R 10% HL. No obstante, esta formulación mostró la mayor actividad antioxidante y antimicrobiana. En conclusión, este trabajo demostró el potencial de utilizar levadura residual y humo líquido refinado para el desarrollo de películas activas antioxidantes y antimicrobianas con características mejoradas, constituyendo una alternativa prometedora para el envasado de alimentos.

## 5.4 Desarrollo y estudio de películas activas a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de humo líquido refinado

### 5.4.1 Examinación visual y colorimetría CIELab

Las películas activas de gránulos de kéfir de agua con diferentes concentraciones de extracto de humo líquido refinado (K-5 % HL) se muestran en la *Figura 5.4.1*:



**Figura 5.4.1.** Películas activas de gránulos de kéfir con extracto de humo líquido refinado.

Las películas obtenidas presentaron superficie brillante, flexibilidad, homogeneidad estructural y ausencia de imperfecciones macroscópicas. En cuanto a sus propiedades ópticas, se observó que la incorporación de bajas concentraciones de extracto ( $\leq 1\%$  HL) no produjo cambios significativos en la coloración, manteniendo el tono amarillo pálido y la transparencia característica de la matriz control. Sin embargo, al incrementar la concentración de extracto (5-10% HL), las películas desarrollaron un color amarillo más intenso, aunque conservando su transparencia. Para cuantificar estas variaciones cromáticas de forma objetiva, se realizaron mediciones mediante un colorímetro Konica Minolta CR-400, registrando las coordenadas CIELab en la *Tabla 5.4.1*.

**Tabla 5.4.1.** Coordenadas CIELab de las películas K-5 con HL.

Muestras	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	$\Delta E$
K-5 0% HL	85 ± 1 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	-
K-5 0,05% HL	86 ± 1 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,8 <sup>a</sup>
K-5 0,3% HL	85 ± 1 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,3 <sup>b</sup>
K-5 0,5% HL	85 ± 2 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,3 <sup>c</sup>	6 ± 1 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,8 <sup>a,b</sup>
K-5 1% HL	83 ± 1 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>d</sup>	10 ± 2 <sup>d</sup>	7 ± 2 <sup>c</sup>
K-5 5% HL	81 ± 3 <sup>b</sup>	-0,4 ± 0,1 <sup>e</sup>	16 ± 4 <sup>e</sup>	14 ± 4 <sup>d</sup>
K-5 10% HL	79 ± 2 <sup>c</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>f</sup>	18 ± 2 <sup>e</sup>	16 ± 3 <sup>d</sup>

Las mismas letras en los datos reportados en una columna indican diferencias no significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Los valores del parámetro de luminosidad (*L*) mostraron magnitudes elevadas cercanas al máximo teórico ( $L=100$ ) en todas las formulaciones, aunque se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en las películas con 5% y 10% HL, indicando una ligera reducción en su transparencia respecto al control y a las muestras con bajas concentraciones de HL ( $\leq 1\%$ ). En el parámetro *a* ( $-a$  verde y  $+a$  rojo), los valores próximos a cero confirmaron la ausencia de tonalidades rojas o verdes marcadas, aunque se detectó un desplazamiento significativo hacia valores negativos al aumentar la concentración de HL, sugiriendo una leve tendencia hacia tonos verdosos.

El parámetro *b* ( $-b$  azul y  $+b$  amarillo) presentó las variaciones más notables, mostrando un incremento proporcional a la concentración de HL (de  $b$ :  $2,0 \pm 0,7$  con 0% HL a  $b$ :  $18 \pm 2$  con 10% HL), lo que corrobora cuantitativamente el aumento en la intensidad del color amarillo observado visualmente. Estos cambios se reflejaron en los valores de  $\Delta E$ , donde todas las formulaciones con  $>1\%$  HL superaron el umbral de percepción visual ( $\Delta E \geq 6$ ), siendo este efecto más pronunciado en las muestras con mayor concentración de extracto ( $\Delta E$ :  $16 \pm 3$  con 10% HL).

#### 5.4.2 Propiedades mecánicas

En la *Tabla 5.4.2* se muestran los resultados de las pruebas mecánicas de las películas K-5 con HL. Las propiedades mecánicas de las películas variaron con la concentración del extracto, como se mencionó con las películas YCW-R con HL (*sección 5.3.3*). Las películas K-5 1% HL se obtuvieron los valores máximos de módulo de elasticidad (*E*) ( $126 \pm 30$  MPa) y resistencia a la tracción (*TS*) ( $11,0 \pm 1,4$  MPa), lo que indica un aumento en la rigidez de las muestras. Esto podría deberse al efecto de entrecruzamiento entre los aldehídos presentes en el extracto

de humo líquido y grupos hidroxilo del dextrano (Azeredo & Waldron, 2016). Sin embargo, con la adición de 10% HL los valores de  $E$  y  $TS$  disminuyeron respecto a las muestras K-5 1% HL y se incrementó la elongación máxima hasta ruptura ( $\epsilon\%$ ) ( $56 \pm 10\%$ ). Una mayor adición de HL podría tener un efecto plastificante en las películas, como se mencionó en la sección 5.3.6, que logra disminuir la cohesión entre las macromoléculas que constituyen las películas. Esto se debe a un alto contenido de compuestos de bajo peso molecular (ácidos carboxílicos, carbonilos y fenoles) en la matriz, los cuales se colocan entre las cadenas poliméricas, disminuyendo las fuerzas de interacción, y por lo tanto, aumentando la capacidad de desplazamiento intercatenario (Calva-Estrada *et al.*, 2019).

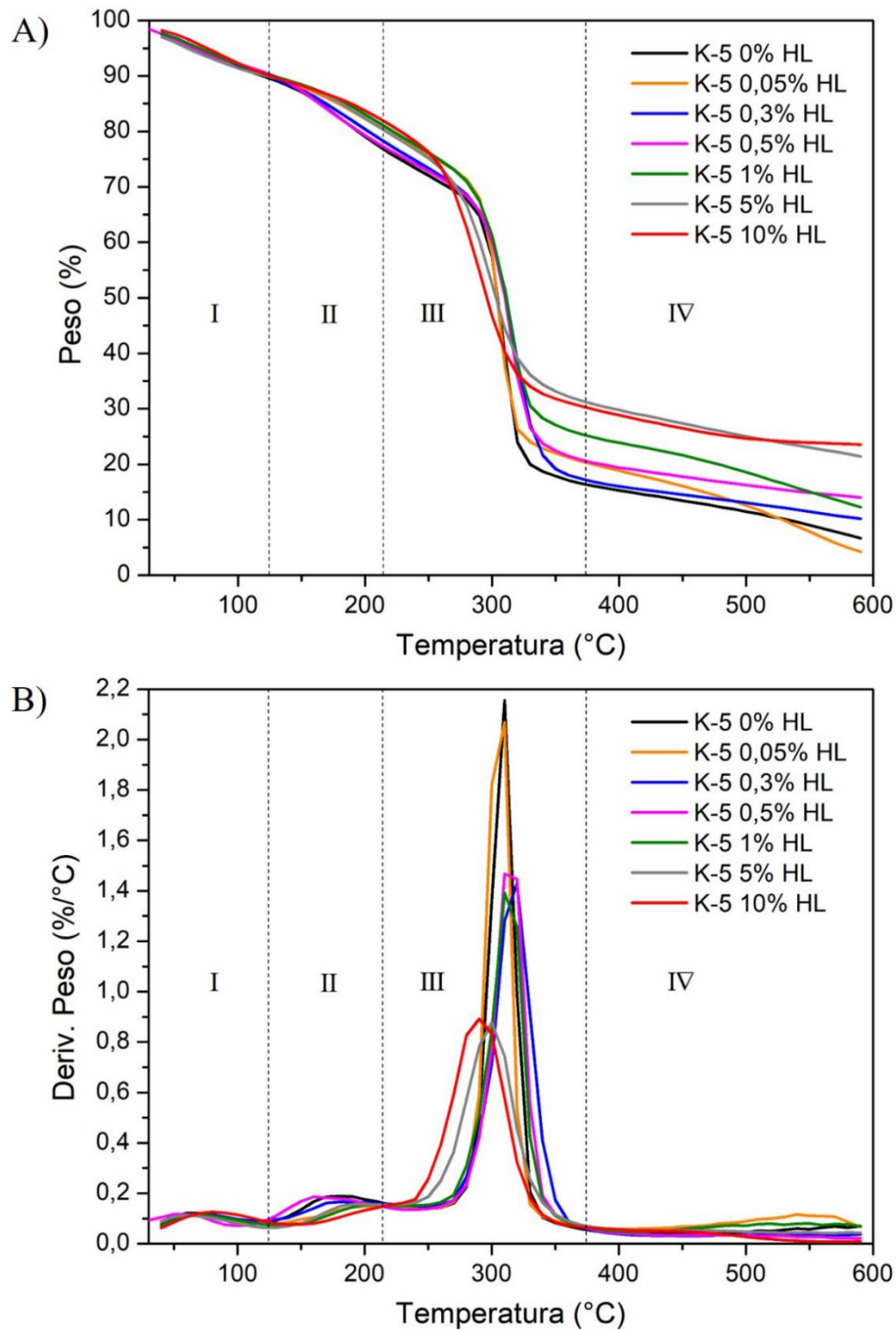
**Tabla 5.4.2.** Propiedades mecánicas de las películas K-5 con la adición de HL.

Muestras	$E$ (MPa)	$\epsilon\%$	$TS$ (MPa)
K-5 0% HL	$62 \pm 6^a$	$31 \pm 9^{a,b}$	$6,5 \pm 0,9^a$
K-5 0,05% HL	$47 \pm 8^b$	$26 \pm 5^a$	$5,0 \pm 0,9^a$
K-5 0,3% HL	$55 \pm 15^{a,b}$	$26 \pm 7^{a,b}$	$5,3 \pm 1,2^a$
K-5 0,5% HL	$97 \pm 14^c$	$37 \pm 7^{a,b}$	$8,6 \pm 0,8^b$
K-5 1% HL	$126 \pm 30^c$	$40 \pm 10^{a,b}$	$11,0 \pm 1,4^c$
K-5 5% HL	$76 \pm 23^{b,c}$	$43 \pm 11^{b,c}$	$8,0 \pm 1,7^{b,c}$
K-5 10% HL	$58 \pm 10^{a,b}$	$56 \pm 10^c$	$6,6 \pm 0,7^{a,b}$

Las diferentes letras asignadas en cada columna hacen referencia a diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ;  $n=10$ ).

### 5.4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de las películas K-5 con HL (*Figura 5.4.3 A-B*) evidenció perfiles de degradación térmica multietapa con diferencias significativas según la concentración de HL incorporada.



**Figura 5.4.3.** Análisis termogravimétrico (TGA) de las películas K-5 con diferente contenido de HL. A) Termogramas y temperatura inicial de degradación térmica. B) Derivada de degradación térmica.

La primera etapa (40-120 °C) correspondió a la pérdida de agua de hidratación y compuestos volátiles, mostrando una disminución de masa del 10%. Entre 120-215 °C se observó la degradación de los componentes más lábiles, incluyendo el extracto de HL y el glicerol, junto

con el inicio de la descomposición de la matriz polimérica. La región de 215-375 °C presentó la mayor pérdida de masa (50-60%), asociada a la degradación térmica del dextrano como componente mayoritario de la matriz. Finalmente, en el rango de 375-600 °C se degradaron los residuos carbonosos y compuestos termoestables derivados del HL, dejando un contenido de residuos remanente que varió entre 8-23% (Tabla 5.4.3) en proporción a la concentración de extracto adicionada en las películas.

En la Tabla 5.4.3 se presentan las temperaturas iniciales de degradación ( $T_0$ ), la temperatura de degradación máxima ( $T_{max}$ ) y el porcentaje de residuos remanente a 600°C ( $Resd.600^\circ C$ ) de cada formulación. Las películas K-5 1% HL mostraron un marcado incremento en la temperatura inicial de degradación ( $T_0$ :  $191 \pm 8$  °C) respecto a la muestra control ( $T_0$ :  $176 \pm 4$  °C). Asimismo, la temperatura de degradación máxima ( $T_{max}$ :  $315 \pm 1$  °C) se incrementó 8 °C respecto a la muestra control ( $T_{max}$ :  $307 \pm 1$  °C). Por el contrario, la adición de 10% HL en las películas K-5, produjo que las películas sean más termolábiles evidenciado por una disminución significativa en la temperatura de degradación máxima ( $T_{max}$ :  $289 \pm 4$  °C) respecto a la muestra K-5 0% HL ( $T_{max}$ :  $307 \pm 1$  °C).

De la misma manera a lo que se observó para las películas YCW-R, los resultados demuestran un comportamiento térmico diferencial dependiente de la concentración de HL en la matriz polimérica. A bajas concentraciones (1% HL), se observa una mejora en la estabilidad térmica del material, posiblemente debido al efecto de entrecruzamiento entre los grupos carbonilo de los aldehídos del HL y los grupos hidroxilo del dextrano. Este mecanismo de entrecruzamiento, descrito previamente en las propiedades mecánicas (sección 5.4.2), genera una estructura polimérica más compacta y resistente a la degradación térmica.

Por el contrario, a altas concentraciones de extracto (10% HL), el material muestra mayor termolabilidad. Este fenómeno se explica por el predominio de moléculas de bajo peso molecular del extracto que, al incrementarse su concentración, establecen numerosos puentes de hidrógeno con las cadenas de dextrano. Estas interacciones compiten con el entrecruzamiento, reduciendo la densidad de enlaces no-covalentes en la matriz y generando una estructura menos estable térmicamente, como se corroboró en los ensayos mecánicos (sección 5.3.2).

**Tabla 5.3.3.** Temperaturas iniciales ( $T_0$ ), temperaturas máximas de degradación ( $T_{m\acute{a}x}$ ) y contenido de residuos a 600 °C ( $Resd.600^{\circ}C$ ) de las películas K-5 con adición de HL.

Muestras	$T_0$ (°C)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	$Resd.600^{\circ}C$ (%)
K-5 0% HL	176 ± 4 <sup>a</sup>	307 ± 1 <sup>a</sup>	8 ± 1 <sup>a</sup>
K-5 0,05% HL	171 ± 8 <sup>a</sup>	309 ± 1 <sup>a</sup>	7 ± 1 <sup>a</sup>
K-5 0,3% HL	177 ± 11 <sup>a,b</sup>	316 ± 1 <sup>b</sup>	10 ± 1 <sup>b</sup>
K-5 0,5% HL	165 ± 2 <sup>b</sup>	316 ± 1 <sup>b</sup>	14 ± 1 <sup>c</sup>
K-5 1% HL	191 ± 8 <sup>c</sup>	315 ± 1 <sup>b</sup>	15 ± 4 <sup>c</sup>
K-5 5% HL	176 ± 8 <sup>a</sup>	301 ± 1 <sup>c</sup>	17 ± 5 <sup>c</sup>
K-5 10% HL	180 ± 12 <sup>a,c</sup>	289 ± 4 <sup>d</sup>	23 ± 1 <sup>d</sup>

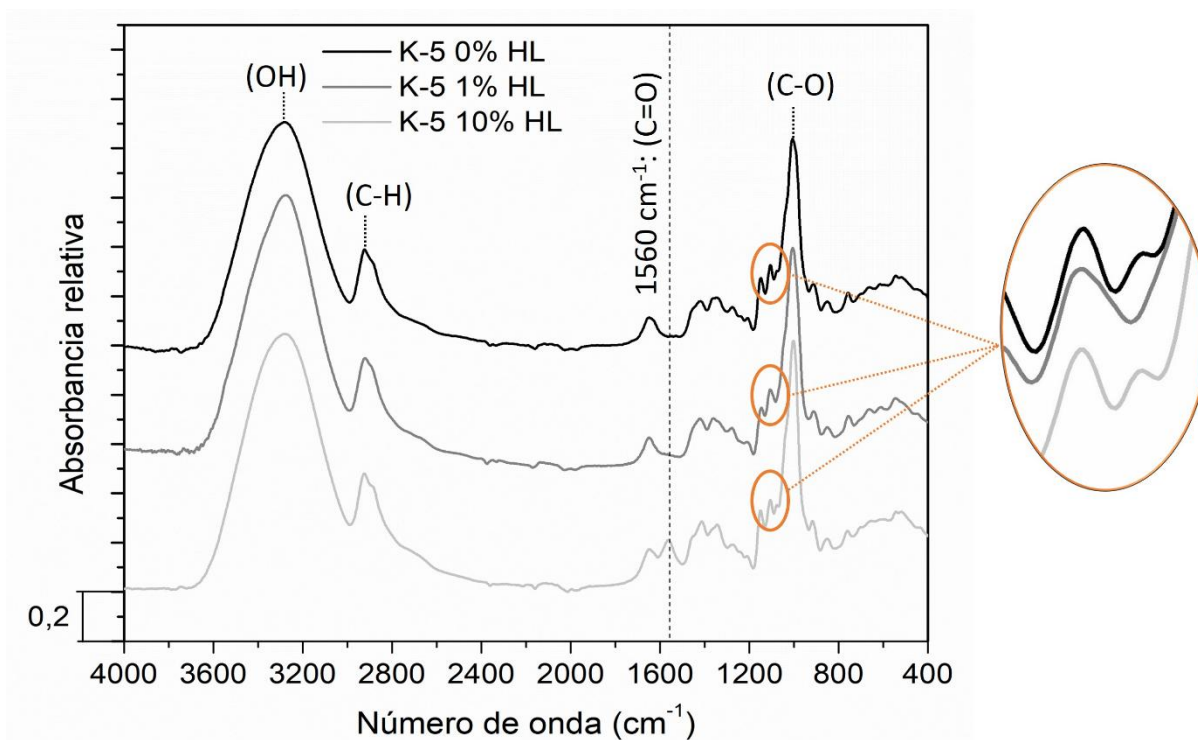
Las diferentes letras asignadas en cada columna hacen referencia a diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ;  $n=3$ ).

#### 5.4.4 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la *Figura 5.4.4* se presentan los espectros FTIR de las películas K-5 con 0%, 1% y 10% HL normalizados en el número de onda 1030  $\text{cm}^{-1}$  para mayor claridad. Estas tres concentraciones se seleccionaron por ser representativas del efecto de entrecruzamiento (1% HL) y plastificante del extracto dentro de la matriz (10% HL). En las propiedades mecánicas, en la formulación con 1% HL se observaron los valores máximos de tensión y módulo elástico. La incorporación de 10% HL produjo una disminución en estos parámetros junto con un incremento en la elongación máxima hasta ruptura, un comportamiento típico de agentes plastificantes. Cabe destacar que estos criterios son específicos para la matriz K-5 y difieren de los utilizados para la matriz de levadura (YCW-R), donde las concentraciones representativas fueron 0.3% y 10% HL. La diferencia en la concentración óptima para el entrecruzamiento (1% en K-5 vs. 0.3% en YCW-R) evidencia la distinta interacción y sensibilidad de cada matriz al extracto de humo líquido.

El análisis FTIR mostró una amplia banda entre 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$ , atribuible a los grupos hidroxilo del sistema agua-dextrano-glicerol y otra banda bien definida, en el rango 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , asociada específicamente a los modos vibracionales de estiramiento C-H de los grupos alquilo ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ) presentes en la estructura polimérica, en concordancia con lo reportado por Coma *et al.* (2019) para películas de kéfir con distintas concentraciones de glicerol. En las películas K-5 10% HL, la banda a 1560  $\text{cm}^{-1}$  se debe principalmente al estiramiento del enlace C=O presente en los aldehídos y cetonas que componen el extracto (Montazeri *et al.*, 2013b). En las películas K-5 1% HL, la ausencia de la banda de absorción a 1076  $\text{cm}^{-1}$  (*Fig. 5.4.4* –

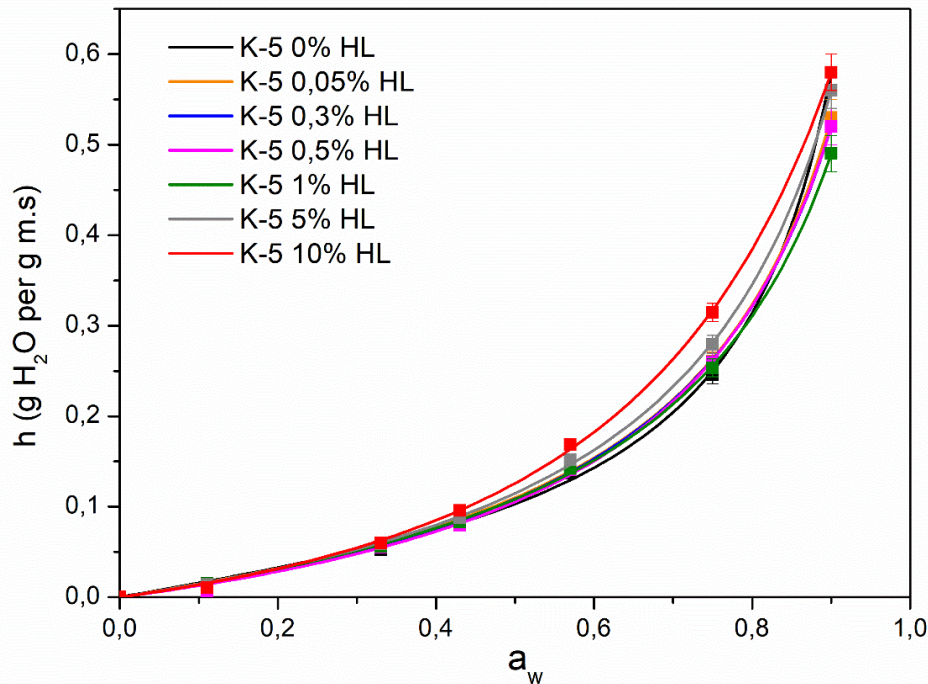
derecha: acercamiento), característica de los modos vibracionales de enlaces C-O-C, C-OH y C-H del dextrano (Coma *et al.*, 2019), indica la participación de estos grupos funcionales en reacciones de entrecruzamiento con aldehídos del humo líquido. Este fenómeno sugiere la formación de estructuras acetal/hemiacetal, donde los grupos carbonilo (C=O) de los aldehídos reaccionan con los hidroxilos (-OH) del dextrano, modificando la red polimérica. Hallazgos concordantes fueron reportados por Wang *et al.* (2016) en películas de gelatina entrecruzadas con humo líquido, donde la disminución de bandas FTIR asociadas a grupos carbonilo (1700–1600  $\text{cm}^{-1}$ ) y C-O ( $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ ) corroboró la formación de enlaces no-covalentes entre los aldehídos del humo líquido y los grupos amino/hidroxilo de la matriz proteica. Este paralelismo refuerza el mecanismo propuesto para el sistema dextrano-humo líquido, donde la reactividad de los aldehídos con polisacáridos conduce a redes poliméricas más estables.



**Figura 5.4.4.** Espectros FTIR de las películas K-5 con 0%, 1% y 10% de HL.

#### 5.4.5 Hidratación y transporte de agua

Las isotermas de sorción de agua de las películas K-5 con extracto HL se muestran en la *Figura 5.4.5*. Los puntos experimentales se ajustaron al modelo GAB mediante la *Ecuación 10* y los parámetros obtenidos del ajuste se presentan en la *Tabla 5.4.5*.



**Figura 5.4.5.** Isotermas de sorción de agua de películas K-5 con adición de HL.

Todas las isotermas presentaron la convexidad típica de los materiales biopoliméricos con un marcado aumento en la hidratación para  $a_w > 0,6$ , indicando una hidratación mayoritariamente en forma de multicapa. Esto indica, como se ha explicado con las películas YCW-R con HL (sección 5.3.9), que a altas humedades la mayor parte del agua de hidratación no está unida directamente a la matriz. La hidratación en equilibrio a la máxima humedad de 90% h.r. ( $h_{90\%rh}$ ) presentó los máximos valores para K-5 0% HL y para las muestras con 5% y 10% HL. Sin embargo, la incorporación de bajas concentraciones de humo líquido (0,05 – 1% HL) disminuyeron los valores de hidratación respecto a la muestra control, mostrando un comportamiento no monótono con el contenido de humo líquido. La muestra K-5 0% HL presentó la menor cantidad de agua en la monocapa ( $N$ :  $0,11 \pm 0,01$  g H<sub>2</sub>O/g) y la multicapa más poblada ( $k$ :  $0,92 \pm 0,01$ ) mientras que en la muestra K-5 10% HL ocurre lo contrario ( $N$ :  $0,32 \pm 0,02$  g H<sub>2</sub>O/g;  $k$ :  $0,78 \pm 0,05$ ), alcanzando ambas muestras valores similares de hidratación al 90% h.r. De esta forma, se observa que el agregado de 10% HL no altera significativamente la cantidad de agua de hidratación, solo cambia la forma en que está estructurada o distribuida en la matriz: poseen mayor cantidad de agua en la monocapa, pero se encuentra débilmente ligada a la matriz ya que presentaron valores de  $c$  (relacionado con la fuerza de unión del agua a los sitios primarios) notablemente más pequeños.

En la *Tabla 5.4.5* se muestran además los valores de permeabilidad al vapor de agua ( $P_w^{exp}$ ) de las películas K-5 con HL. Se observó que el agregado de bajas concentraciones ( $\leq 0,5\%$ ) de HL mejoró las propiedades barreras al vapor de agua debido a un posible efecto de entrecruzamiento del extracto con la matriz, como se describió en las *secciones 5.4.2* y *5.4.3*. Sin embargo, con 10% HL se observó un incremento en la permeabilidad al vapor de agua posiblemente debido al efecto plastificante del extracto dentro de la matriz.

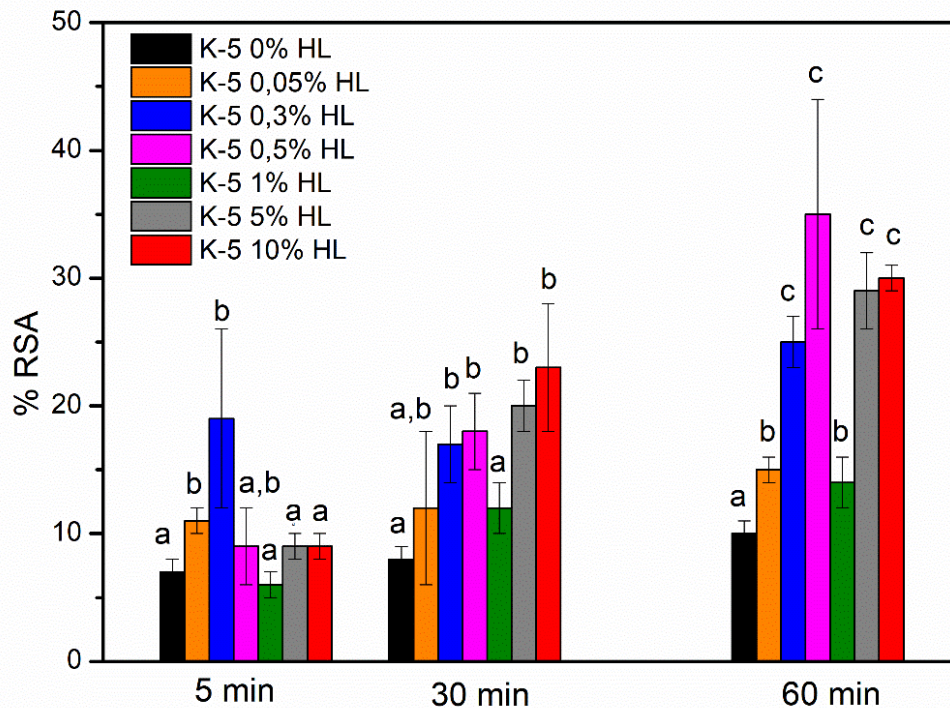
**Tabla 5.4.5.** Parámetros del modelo GAB obtenidos del ajuste de las isotermas de sorción de agua (*Fig. 5.4.5*), contenido de agua medido en las películas en equilibrio a 90% h.r., permeabilidad al vapor de agua y espesor de las películas K-5 con HL.

	Parámetros GAB				$h_{90\%rh}$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$P_w^{exp}$ [10 <sup>-10</sup> g s <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> ]	$L$ [10 <sup>-5</sup> m]
	$N$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$c$	$k$	$R^2$			
<b>0% HL</b>	0,11 ± 0,01	1,3 ± 0,2	0,92 ± 0,01	0,999	0,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a</sup>
<b>0,05% HL</b>	0,11 ± 0,01	1,3 ± 0,2	0,90 ± 0,01	0,999	0,53 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	9 ± 4 <sup>a</sup>
<b>0,3% HL</b>	0,12 ± 0,01	1,2 ± 0,2	0,89 ± 0,01	0,999	0,52 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	9 ± 2 <sup>a</sup>
<b>0,5% HL</b>	0,13 ± 0,01	1,0 ± 0,3	0,88 ± 0,02	0,999	0,52 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	9 ± 1 <sup>a</sup>
<b>1% HL</b>	0,12 ± 0,01	1,2 ± 0,2	0,88 ± 0,01	0,999	0,49 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	13 ± 5 <sup>a</sup>
<b>5% HL</b>	0,13 ± 0,01	1,1 ± 0,2	0,89 ± 0,01	0,999	0,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>d</sup>	10 ± 4 <sup>a</sup>
<b>10% HL</b>	0,32 ± 0,02	0,5 ± 0,2	0,78 ± 0,05	0,999	0,58 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	11 ± 3 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ). Los valores reportados del parámetro estadístico  $R^2$  indican un buen ajuste del modelo.

#### 5.4.6 Actividad antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante (%RSA) de las películas K-5 con la adición de HL a lo largo del tiempo en solución de ABTS en etanol se muestran en la *Figura 5.4.6*.



**Figura 5.4.6.** Capacidad antioxidante de las películas K-5 con la adición de HL en solución de ABTS en etanol.

Se observó un aumento en la actividad antioxidante en el tiempo para todas las formulaciones, demostrando una liberación a tazas controladas del aditivo en el solvente de reacción. A partir del gráfico, lo que se pudo observar es un incremento gradual de la actividad antioxidante en el tiempo de estudio. Además, las películas con bajas concentraciones de HL tuvieron %RSA similares a las de 10% HL. En las películas K-5 se potenció significativamente la actividad antioxidante con la adición de HL en la matriz. Un efecto destacable se observó en las películas K-5 1% HL, que presentaron una marcada disminución en la actividad antioxidante. Este fenómeno podría explicarse por la formación de interacciones moleculares más fuertes entre los componentes del HL y la matriz polimérica (como se detalla en las secciones 5.4.2, 5.4.3 y 5.4.4), lo que reduciría la disponibilidad de los grupos activos para reaccionar con el radical ABTS. Por su parte, las películas sin adición de HL mostraron valores de %RSA cercanos al 10%, atribuibles a la presencia de metabolitos fermentativos del kéfir, particularmente ácidos orgánicos (ácido láctico y acético) y compuestos fenólicos residuales. Estos compuestos, conocidos por su capacidad reductora, pueden interactuar con el radical ABTS según lo reportado por Papadopoulou *et al.* (2025) en estudios de la actividad antioxidante en bebidas de kéfir de agua.

#### 5.4.7 Actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana de las películas K-5 con HL frente a *Staphylococcus aureus*. Los resultados mostraron una reducción microbiana del 92% (Ecuación 9) en las películas con 10% HL, con un recuento de  $1,2 \times 10^6$  UFC/mL, valor marcadamente inferior al registrado en las películas control (0% HL), las cuales alcanzaron  $4,4 \times 10^7$  UFC/mL. Como se ha discutido previamente en la sección 5.2.2, esta actividad antibacteriana puede atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos en el extracto de HL, entre los que destacan ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas, conocidos por su capacidad inhibitoria frente a microorganismos. Esta destacada reducción microbiana demuestra que el extracto de HL conserva su eficacia antimicrobiana al ser incorporado en la matriz de kéfir, lo que sugiere una adecuada compatibilidad y preservación de las propiedades funcionales del extracto dentro del material.

#### 5.4.8 Conclusiones parciales

Las películas desarrolladas a base de gránulos de kéfir de agua, incorporadas con humo líquido refinado, se caracterizaron por ser transparentes, homogéneas y flexibles. La incorporación del extracto ejerció un efecto dual dependiente de la concentración: a bajas concentraciones, se observó una mejora significativa en las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al vapor de agua, atribuible a un efecto de entrecruzamiento molecular dentro de la matriz polimérica. Por el contrario, la incorporación al 10% HL indujo un marcado efecto plastificante, resultando en una disminución de la rigidez y la estabilidad térmica. No obstante, esta misma formulación exhibió la mayor actividad antioxidante y antimicrobiana entre los sistemas evaluados, atribuible a la liberación de compuestos bioactivos. Estos resultados posicionan a estos materiales como candidatos prometedores para el envasado activo de alimentos, con potencial para retrasar el deterioro oxidativo e inhibir el crecimiento microbiano, extendiendo así la vida útil de los productos alimenticios.

## 5.5 Caracterización de extracto de yerba mate residual

El extracto de yerba mate residual (YM) fue caracterizado integralmente para evaluar su potencial como aditivo funcional en el desarrollo de materiales activos e inteligentes. Los estudios se centraron en determinar sus propiedades antioxidantes mediante ensayos ABTS y DPPH, así como su capacidad antimicrobiana frente a microorganismos relevantes en el deterioro de alimentos. Paralelamente, se analizó su comportamiento cromático en función del pH (rango 2-12) para evaluar su aplicabilidad como indicador colorimétrico en materiales inteligentes.

### 5.5.1 Contenido de sólidos totales, pH, actividad antioxidante y contenido de fenoles totales

Los resultados de la caracterización del extracto de yerba mate residual (YM) se presentan en la *Tabla 5.5.1*.

**Tabla 5.5.1.** Características del extracto de yerba mate residual (YM).

Sólidos (%)	pH	* $IC_{50}$ , ABTS (mg/mL)	* $IC_{50}$ , DPPH (mg/mL)	*TPC (mg GAE/g)
1,9	4,4 ± 0,1	0,92 ± 0,04	1,19 ± 0,01	245 ± 13

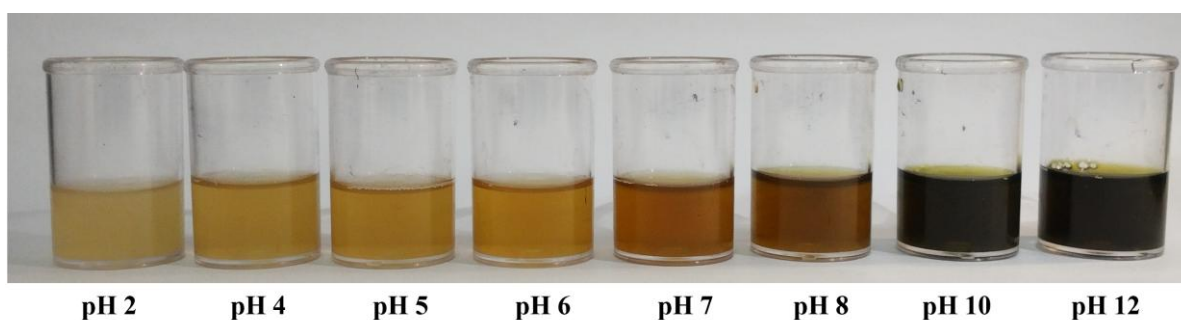
\*Relacionado con el contenido de sólidos del extracto de yerba mate residual.

Antes de la extracción, los residuos de yerba mate en agua destilada mostraron un pH de 6,2 ± 0,1, mientras que el extracto presentó un pH de 4,4 ± 0,1. Esta disminución del pH puede atribuirse a la extracción de ácidos fenólicos, como el ácido clorogénico y el ácido cafeico (Bastos *et al.*, 2007; Jaramillo *et al.*, 2016). El contenido de fenoles totales (TPC) en el extracto fue de 245 ± 13 mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto seco. Este valor superó significativamente los 50-70 mg GAE/g reportados en extractos acuosos de yerba mate por otros investigadores (Arrieta *et al.*, 2018; Correa *et al.*, 2017), aunque fue comparable con el TPC (329,12 mg GAE/g) obtenido en extractos hidroalcohólicos (Budin *et al.*, 2023). De este modo, se alcanzó un alto contenido de fenoles totales evitando el uso de alcohol, un solvente de mayor costo y menor compatibilidad con las dispersiones acuosas formadoras de película, particularmente con las de kéfir.

La actividad antioxidante del extracto, evaluada mediante los ensayos de captación de radicales ABTS ( $IC_{50}$ : 0,92 mg/mL) y DPPH ( $IC_{50}$ : 1,19 mg/mL), confirmó su potencia.

Estudios previos han destacado las propiedades antioxidantes de *Ilex paraguariensis*, con valores de  $IC_{50}$  variables según la metodología de extracción y medición. Por ejemplo, Ziemlewska *et al.* (2021) reportaron  $IC_{50}$  de 0,263 mg/mL (DPPH) y 0,160 mg/mL (ABTS) en extractos de yerba mate. En este estudio, el uso de residuos de la infusión podría explicar la actividad ligeramente menor, aunque aún significativa.

Adicionalmente, se evaluó visualmente el cambio de color del extracto en función del pH (Figura 5.5.1). En medios ácidos predominaron tonalidades amarillas sin variaciones notorias del color en comparación con el control (pH = 4, extracto de YM sin solución buffer). Sin embargo, con valores de pH igual y superiores a 8, el extracto cambió a colores oscuros. Este comportamiento se atribuye a la presencia de cianidinas, un tipo de antocianina presente en las hojas de yerba mate (Ceballos *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023). La coloración de las cianidinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo, así como de su glicosilación con carbohidratos. La posición de estos grupos funcionales influye en la absorción y reflexión de la luz, determinando el color percibido (Badui Dergal, 2013).



**Figura 5.5.1.** Respuesta cromática del extracto de yerba mate residual frente a distintos valores de pH. La muestra control corresponde al recipiente de pH 4.

### 5.5.2 Actividad antimicrobiana

Los resultados de actividad antimicrobiana, realizado mediante microdilución en placa (37 °C, 24 h), del extracto de yerba mate residual (YM), revelaron valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) diferenciados según el tipo de bacteria evaluada (Tabla 5.5.2). *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) mostró mayor sensibilidad (MIC: 1,206 mg/mL) con respecto a *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* (Gram negativas, MIC: 4,825 mg/mL). Esta variación en la efectividad antimicrobiana puede atribuirse a las diferencias estructurales en la pared celular bacteriana: mientras que la monocapa de peptidoglicano característica de las bacterias Gram positivas permite una mayor penetración de los compuestos bioactivos de

YM (especialmente ácido clorogénico y otros polifenoles), la estructura más compleja de la bicapa lipoproteica de las Gram negativas actúa como barrera efectiva.

En este sentido, los valores obtenidos en el presente estudio resultan consistentes con antecedentes reportados para extractos metanólicos de yerba mate. Prado Martin *et al.* (2013) informaron MIC de 1,56 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y de 6,25 mg/mL frente a *Salmonella enteritidis*, mientras que no observaron inhibición sobre *Escherichia coli*. Comparativamente, el extracto de YM evaluado en este trabajo mostró una actividad similar frente a *S. aureus* y una mayor eficacia frente a las bacterias Gram negativas, particularmente en el caso de *E. coli*, donde sí se evidenció inhibición bacteriana. Estas diferencias podrían asociarse a variaciones en el origen de la materia prima, el método de extracción, la composición fenólica resultante y/o las condiciones experimentales empleadas.

Los resultados obtenidos validan el potencial de YM como agente antimicrobiano para aplicaciones en sistemas de envasado activo, particularmente contra patógenos Gram positivos de relevancia en seguridad alimentaria.

**Tabla 5.5.2.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de yerba mate residual.

Bacteria	MIC (mg/mL) *
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,206
<i>Escherichia coli</i>	4,825
<i>Salmonella enteritidis</i>	4,825

\*Referidos al contenido de sólidos del extracto.

### 5.5.3 Conclusiones parciales.

El extracto acuoso de yerba mate residual (YM) desarrollado en este estudio presentó un elevado contenido de fenoles totales ( $245 \pm 13$  mg GAE/g), comparable al obtenido con métodos que emplean alcoholes como solvente, lo que confirma la eficiencia del proceso de extracción acuosa. Su perfil funcional, caracterizado por una notable capacidad antioxidante (evaluada mediante ABTS/DPPH), actividad antimicrobiana selectiva (particularmente efectiva contra bacterias Gram positivas) y una marcada respuesta cromática dependiente del pH, lo posicionan como un aditivo versátil para aplicaciones innovadoras en materiales biobasados activos e inteligentes.



## 5.6 Desarrollo y estudio de películas activas a base de pared celular de levadura residual cervecera y extracto de yerba mate residual

### 5.6.1 Examinación visual y colorimetría CIELab

Las películas YCW-R con 0%, 5%, 10% y 20% YM obtenidas se muestran en la *Figura 5.6.1*.



**Figura 5.6.1.** Películas de pared celular de levadura residual cervecera con diferentes concentraciones de extracto de yerba mate residual.

Las películas desarrolladas exhibieron excelentes propiedades macroscópicas, mostrando homogeneidad estructural, flexibilidad y opacidad. Desde el punto de vista óptico, se observó una marcada variación cromática dependiente de la concentración de YM. Las películas control (0% YM) presentaron un color marrón oscuro, atribuible a los componentes naturales de las levaduras residuales cerveceras y a las reacciones de Maillard ocurridas durante el proceso de *casting*, como se observó en las películas YCW-R con HL (*sección 5.3.1*). Sin embargo, la incorporación de YM indujo una notable modificación hacia tonalidades negras, particularmente evidente tras la alcalinización a pH 11 durante la preparación de las películas. Este cambio cromático se explica por la transformación estructural de las cianidinas presentes en el extracto, como se detalló en la *sección 5.5.1*, donde estos compuestos fenólicos sufren cambios conformacionales en medio alcalino que modifican sus propiedades de absorción de la luz.

La cuantificación del color mediante coordenadas CIELab (*Tabla 5.6.1*) confirmó estas observaciones visuales, revelando disminuciones significativas en todos los parámetros colorimétricos: la luminosidad (*L*) se redujo notablemente, mientras que los valores de los ejes

*a* (verde-rojo) y *b* (azul-amarillo) mostraron desplazamientos hacia regiones negativas del espacio de color. El cambio de color total ( $\Delta E$ ), que superó sistemáticamente el umbral de percepción humana ( $\Delta E > 6$ ) en todas las formulaciones con YM, demostró que estas modificaciones son claramente discernibles visualmente.

**Tabla 5.6.1.** Parámetros de coordenadas CIELab de las películas YCW-R con YM.

Muestras	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	$\Delta E$
YCW-R 0% YM	24,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	7,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	-
YCW-R 5% YM	22,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,1 ± 0,2 <sup>a</sup>
YCW-R 10% YM	21,4 ± 0,6 <sup>c</sup>	0,24 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,52 ± 0,07 <sup>c</sup>	8,5 ± 0,2 <sup>b</sup>
YCW-R 20% YM	21,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,00 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,20 ± 0,04 <sup>d</sup>	8,8 ± 0,1 <sup>c</sup>

Las diferentes letras asignadas en cada columna refieren a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ).

### 5.6.2 Propiedades mecánicas

Los resultados mecánicos (Tabla 5.6.2) muestran un comportamiento dependiente de la concentración de YM. Mientras que la formulación con 5% YM presentó un incremento significativo en el módulo de elasticidad ( $270 \pm 40$  MPa) respecto al control ( $167 \pm 22$  MPa), este efecto reforzante desaparece a mayores concentraciones (10-20% YM), donde los valores de *E* fueron similares al control. Sin embargo, la reducción en la elongación a la ruptura ( $\epsilon\%$ ) se mantiene en todas las formulaciones con YM, sugiriendo dos fenómenos competitivos: por un lado, a bajas concentraciones (5%) las nanopartículas de lignocelulosa del extracto actuarían como refuerzo efectivo mediante interacciones con la matriz polimérica (Arrieta *et al.*, 2018); por otro, a mayores concentraciones (10-20%) podrían formarse agregados que, si bien mantienen la rigidez (al impedir la movilidad de las cadenas poliméricas, explicando la baja  $\epsilon\%$ ), ya no proporcionan el efecto reforzante observado a 5% YM, sino que pueden actuar como puntos preferenciales de ruptura. Este comportamiento coincide con lo reportado por Khan *et al.* (2012) en sistemas de quitosano y nanocompuestos, donde al superar la concentración óptima de partículas (5% p/p), la agregación de estas no incrementa el reforzamiento del material. La resistencia a la tracción (*TS*) muestra una tendencia decreciente con el aumento de YM (de  $8 \pm 1$  MPa a  $5 \pm 1$  MPa), lo que refuerza la hipótesis de que a altas concentraciones se compromete la transferencia efectiva de tensiones en la matriz.

**Tabla 5.5.2.** Parámetros mecánicos de películas YCW-R con adición de YM.

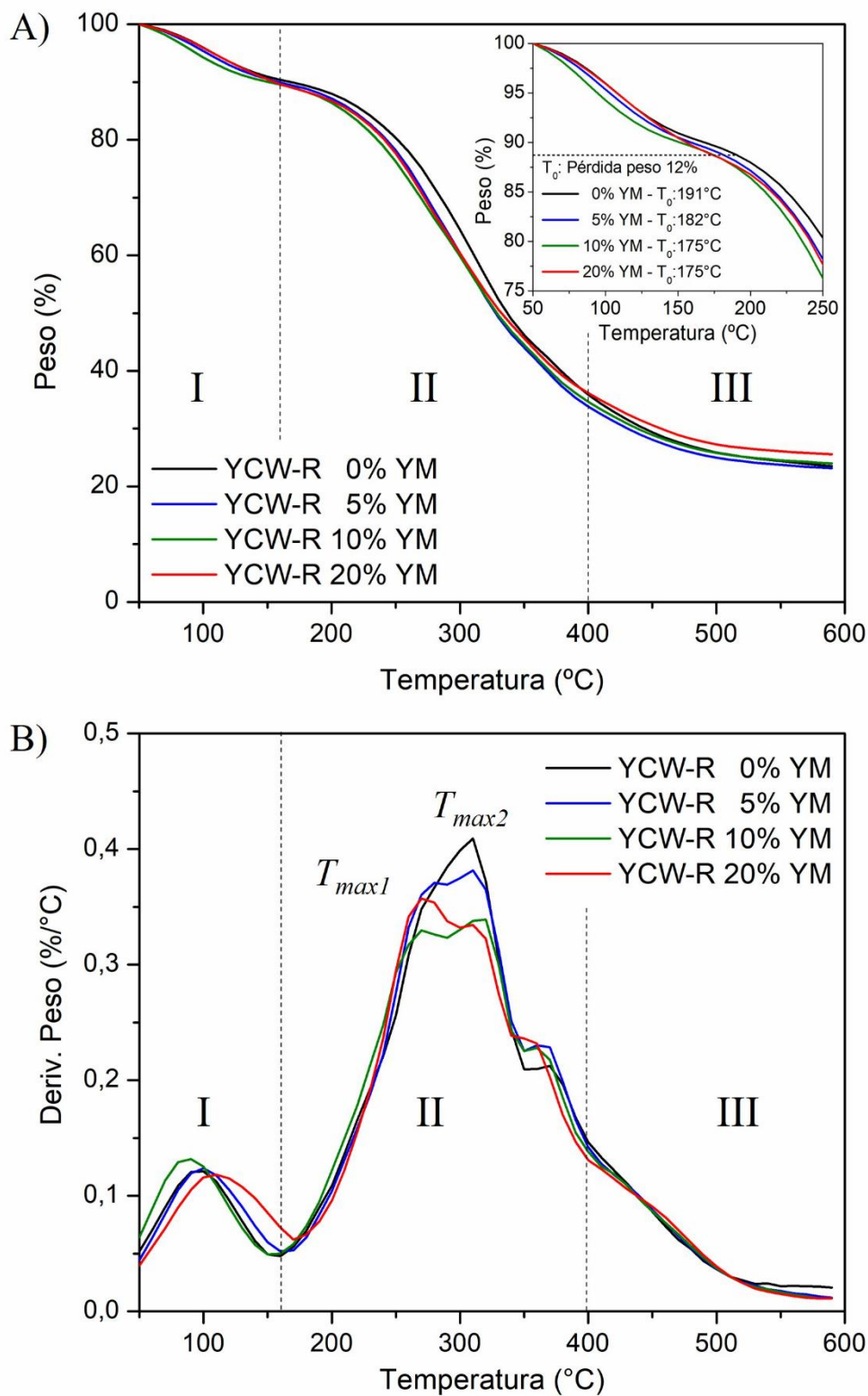
Muestras	<i>E</i> (MPa)	$\epsilon\%$	<i>TS</i> (MPa)
YCW-R 0% YM	167 ± 22 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a</sup>	7 ± 1 <sup>a,b</sup>
YCW-R 5% YM	270 ± 40 <sup>b</sup>	6 ± 1 <sup>b</sup>	8 ± 1 <sup>a</sup>
YCW-R 10% YM	176 ± 15 <sup>a</sup>	5 ± 1 <sup>b</sup>	6 ± 1 <sup>a,b</sup>
YCW-R 20% YM	170 ± 27 <sup>a</sup>	5 ± 1 <sup>b</sup>	5 ± 1 <sup>b</sup>

Las diferentes letras asignadas en cada columna refieren a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ;  $n = 10$ ).

### 5.6.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los análisis termogravimétricos de las películas YCW-R con YM (*Figura 5.6.3 A-B*) revelaron un proceso de degradación térmica en tres etapas diferenciadas, como se ha descrito en las películas YCW-R con HL (*sección 5.3.4*). La primera etapa (50-160 °C) corresponde a la pérdida de humedad y compuestos volátiles, seguida por la degradación del glicerol, el extracto de YM y los biopolímeros principales ( $\beta$ -glucanos y mananoproteínas) en el rango de 160-400 °C (Jaramillo *et al.*, 2016; Delgado *et al.*, 2018a). Finalmente, entre 400-600 °C ocurre la degradación final de la matriz, dejando un residuo carbonoso del 23-25%.

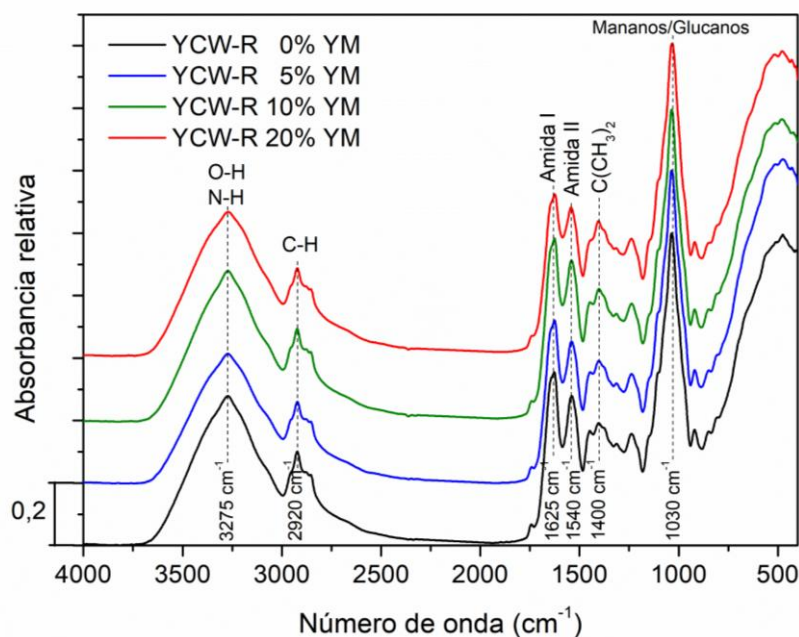
Las películas con YM mostraron mayor pérdida de peso que el control, evidenciado por la disminución en las temperaturas iniciales de degradación ( $T_0$ ) desde 191 °C (0% YM) hasta 175 °C (20% YM), atribuible a la presencia de compuestos termolábiles en el extracto. El análisis de la derivada termogravimétrica (*Figura 5.6.3-B*) identificó dos eventos principales:  $T_{max1}$  (260-280 °C), exclusivo de las formulaciones con YM y proporcional a su concentración, sugiriendo interacciones específicas con la matriz; y  $T_{max2}$  (310 °C), presente en todas las muestras y asociado a la degradación de los  $\beta$ -glucanos y mananoproteínas de la pared celular de levadura, como se ha descrito anteriormente (*sección 5.3.4*). La presencia de estos dos eventos térmicos diferenciados confirma el efecto modificador del extracto de YM sobre el comportamiento térmico de la matriz polimérica YCW-R.



**Figura 5.6.3.** Análisis termogravimétrico (TGA) de las películas YCW-R con diferente contenido de YM. A) Termogramas y temperatura inicial de degradación térmica. B) Derivada de la degradación térmica.

### 5.6.4 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

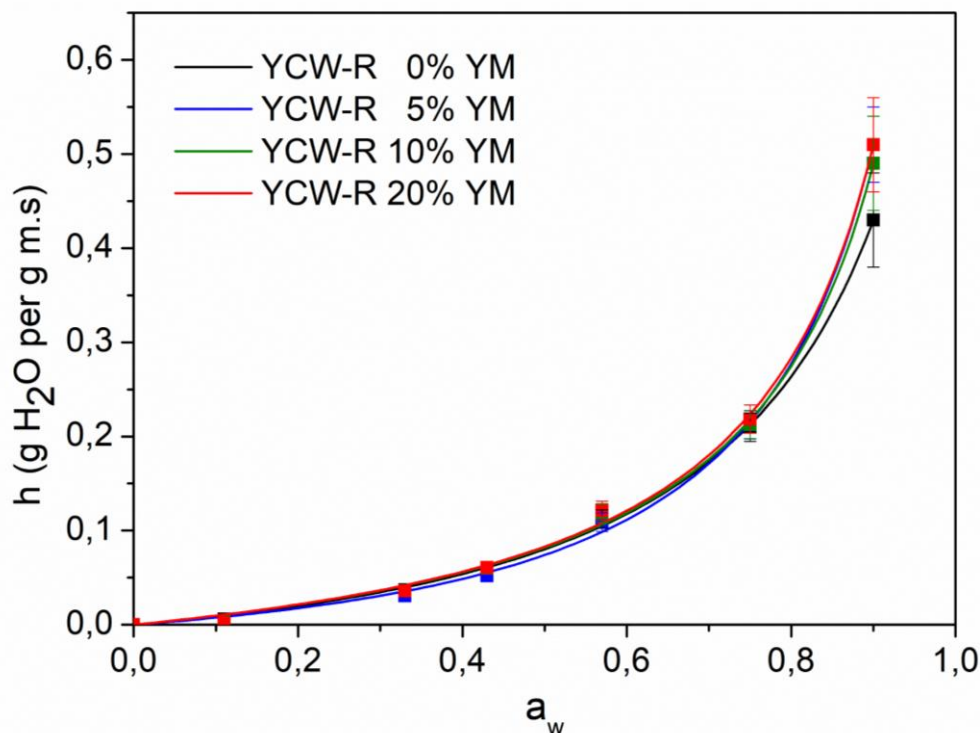
Los espectros FTIR normalizados a  $1030\text{ cm}^{-1}$  de las películas YCW-R con diferentes concentraciones de YM se presentan en la *Figura 5.6.4*, mostrando un perfil espectral consistente con lo reportado previamente para sistemas similares (*sección 5.3.6*). Las bandas características identificadas incluyen: (i) una absorción ancha centrada en  $3275\text{ cm}^{-1}$ , atribuible al estiramiento de grupos hidroxilos (O-H) y amino (N-H) procedentes del agua residual, polisacáridos, glicerol y proteínas de la matriz; (ii) bandas a  $2920\text{ cm}^{-1}$  y  $2855\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los modos de estiramiento (C-H) de las cadenas glucosídicas; y (iii) las bandas de amida I ( $1625\text{ cm}^{-1}$ ) y amida II ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ) características de las proteínas estructurales. Particularmente relevante fue el incremento progresivo en la intensidad de la banda a  $1400\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) con el aumento de concentración de YM, efecto que podría asociarse tanto a la contribución de grupos metilo del extracto como a posibles vibraciones (C-O) de polifenoles (Ceballos *et al.*, 2020). La intensa absorción a  $1030\text{ cm}^{-1}$ , asignada a los modos (CO) de mananoproteínas y  $\beta$ -glucanos (Delgado *et al.*, 2018a), sirvió como referencia para la normalización espectral. Cabe destacar que, a pesar de la incorporación de hasta 20% YM, no se observaron diferencias significativas en los espectros entre las distintas formulaciones, lo que sugiere que las posibles interacciones matriz-extracto (enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo) no generan modificaciones estructurales detectables por esta técnica, probablemente debido al enmascaramiento espectral producido por los componentes mayoritarios de la matriz.



**Figura 5.6.4.** Espectros FTIR de películas YCW-R con 0%, 5%, 10% y 20% YM.

### 5.6.5 Hidratación y transporte de agua

Las isothermas de sorción de las películas YCW-R con YM se muestran en la *Figura 5.6.5*, y los puntos experimentales se ajustaron con el modelo GAB utilizando la *Ecuación 10*.



**Figura 5.6.5.** Isothermas de sorción de agua de las películas YCW-R con adición de YM.

Las isothermas de sorción revelaron que el contenido de humedad asociado a la hidratación aumentó moderadamente en condiciones de baja actividad acuosa ( $a_w < 0,6$ ), mientras que, para valores superiores, el incremento fue más notable. Este patrón es característico de sistemas biopoliméricos, como se ha explicado en las *secciones 5.3.8* y *5.4.5*, donde inicialmente las moléculas de agua se adsorben preferentemente en sitios específicos de la matriz, formando una monocapa. Al elevarse la  $a_w$ , el agua adicional se organiza en multicapas, estableciendo interacciones más débiles con la matriz polimérica. Como consecuencia, esta fracción de agua presenta mayor movilidad, favoreciendo su transporte por procesos difusivos (Delgado *et al.*, 2018; Delgado, Peltzer & Salvay, 2022).

Los parámetros derivados del modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), como el número de sitios de unión primarios ( $N$ ), la constante de afinidad ( $c$ ) y el coeficiente de interacción multicapa ( $k$ ), no mostraron variaciones significativas ante la adición de YM. Tampoco se detectaron diferencias significativas en el contenido de humedad de equilibrio ( $h_{90\%rh}$ ), medido a una humedad relativa del 90% (*Tabla 5.6.5*).

Por otro lado, los ensayos de permeabilidad al vapor de agua ( $P_w^{exp}$ ) demostraron que la adición de 20% YM redujo significativamente este parámetro en comparación con las películas control. Dado que ambos sistemas alcanzaron valores similares de  $h_{90\%rh}$ , la disminución observada en  $P_w^{exp}$  sugiere un efecto restrictivo sobre la difusividad del agua dentro de la matriz polimérica (Delgado, Peltzer & Salvay, 2022). Este fenómeno podría atribuirse a que las nanopartículas de lignocelulosa derivadas del YM generan una estructura matricial más tortuosa, limitando la movilidad del agua a través de la red polimérica. En otras palabras, aunque la capacidad de hidratación no varía, la dispersión de las nanopartículas actuaría como barrera física, dificultando la difusión del vapor de agua.

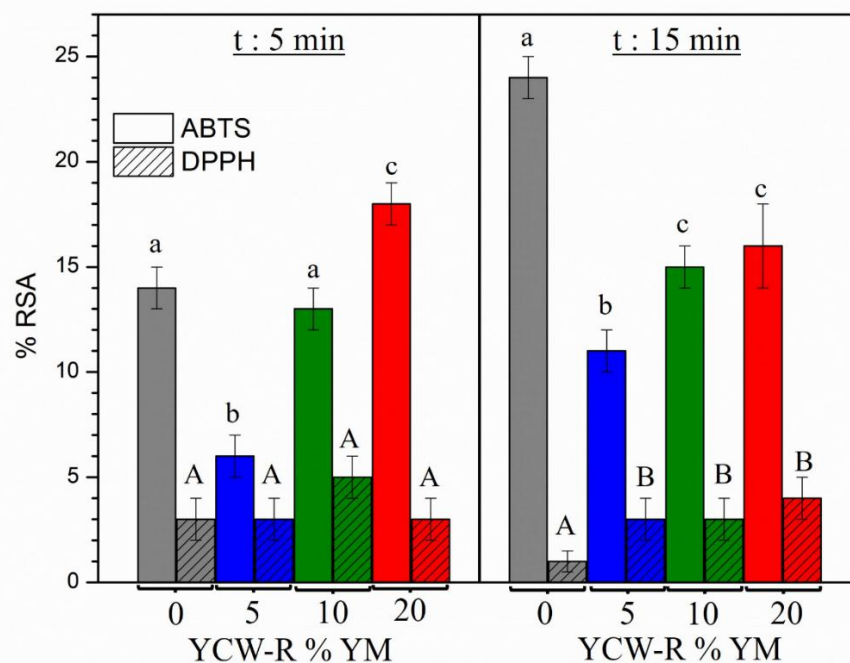
**Tabla 5.6.5.** Parámetros del modelo GAB obtenidos del ajuste de las isothermas de sorción de agua (Fig. 5.6.5), contenido de agua medido en las películas en equilibrio a 90% h.r, permeabilidad al vapor de agua y espesor de las películas YCW-R con YM.

	Parámetros GAB				$h_{90\%rh}$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$P_w^{exp}$ [10 <sup>-10</sup> g s <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> ]	$L$ [10 <sup>-5</sup> m]
	$N$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$c$	$k$	$R^2$			
<b>0% YM</b>	0,13 ± 0,04	0,7 ± 0,3	0,87 ± 0,04	0,999	0,43 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	17,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
<b>5% YM</b>	0,10 ± 0,03	0,8 ± 0,3	0,92 ± 0,03	0,999	0,49 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	16,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
<b>10% YM</b>	0,09 ± 0,02	1,1 ± 0,5	0,94 ± 0,02	0,998	0,49 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	14,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>20% YM</b>	0,10 ± 0,03	0,9 ± 0,4	0,93 ± 0,03	0,998	0,50 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	16,4 ± 0,3 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ). Los valores reportados del parámetro estadístico  $R^2$  indican un buen ajuste del modelo. Los errores en los parámetros del modelo GAB se obtuvieron del análisis de ajuste.

### 5.6.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las películas YCW-R con YM medido en %RSA por el método ABTS y DPPH tras 5 y 15 minutos de incubación se muestra en la Figura 5.6.6.



**Figura 5.6.6.** Actividad antioxidante de películas YCW-R evaluada mediante los métodos ABTS y DPPH: efecto de la concentración de YM (0-20% p/p) y tiempo de reacción (5 y 15 min). Los valores seguidos por la misma letra (minúsculas para ABTS, mayúsculas para DPPH) no presentan diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ).

Los ensayos de actividad antioxidante revelaron un comportamiento dependiente del método analítico empleado y del tiempo de reacción. En las mediciones iniciales (5 minutos) mediante ABTS, se observó un incremento significativo en la capacidad de estabilización de radicales (%RSA) únicamente para la formulación con 20% YM ( $18 \pm 1\%$ ), mientras que las muestras con 5% y 10% YM mostraron valores inferiores o comparables al control. Este patrón sugiere que, a bajas concentraciones, los compuestos fenólicos de YM podrían estar parcialmente inmovilizados en la matriz polimérica, limitando su interacción con los radicales ABTS. Sin embargo, al extender el tiempo de reacción a 15 minutos, se evidenció un notable aumento en la actividad antioxidante de las muestras control ( $24 \pm 1\%$ ) y aquellas con 5% y 10% YM, lo que confirma la contribución intrínseca de los  $\beta$ -glucanos de la matriz (Rezzani *et al.*, 2022). Curiosamente, la formulación con 20% YM no mostró mejoramiento adicional en su %RSA ( $16 \pm 2\%$ ), posiblemente debido a una saturación en la migración de compuestos activos al medio de reacción.

En marcado contraste, los ensayos con DPPH mostraron valores consistentemente bajos (%RSA  $\leq 5\%$  para todas las formulaciones), incluso tras tiempos de incubación prolongados. Esta discrepancia puede explicarse por las limitaciones inherentes del método DPPH, particularmente su sensibilidad a factores estéricos y su preferencia por mecanismos

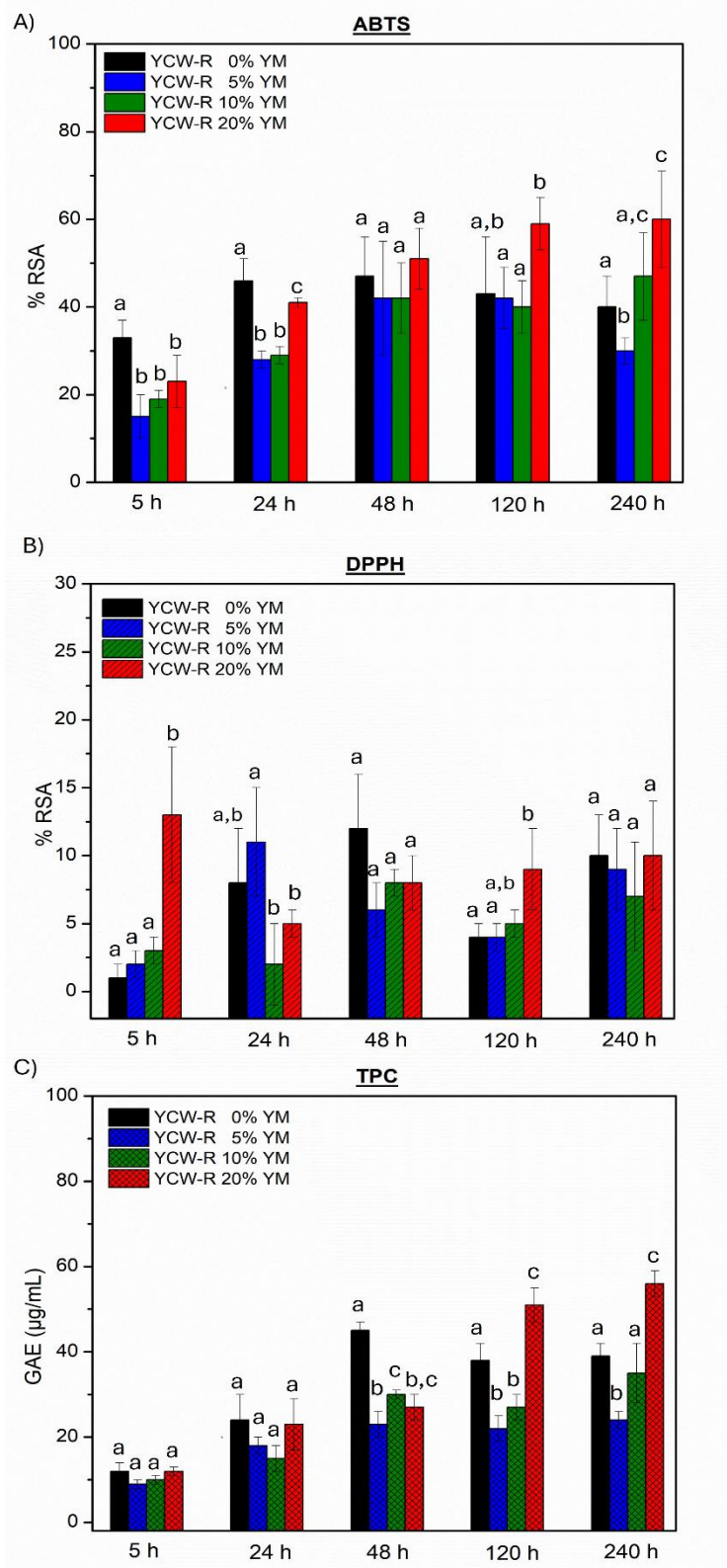
específicos de transferencia de hidrógeno (HAT) sobre transferencia de electrones (SET) (Prior *et al.*, 2005). La estructura voluminosa del radical DPPH y su menor reactividad con compuestos poliméricos o glicosilados explicarían su baja sensibilidad para detectar la actividad antioxidante en este sistema, donde los compuestos bioactivos pueden estar parcialmente inmovilizados o presentar grupos funcionales menos accesibles. Estos resultados destacan la importancia de considerar tanto las características del material como las particularidades de cada método analítico al evaluar propiedades antioxidantes en materiales biopoliméricos con adición de extractos vegetales.

### 5.6.7 Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana de las películas YCW-R con incorporación de 20% YM frente a *Staphylococcus aureus*, realizada mediante el método de contacto directo, demostró que la adición del extracto no indujo una reducción en la carga bacteriana. Sin embargo, se observó que tampoco se produjo un aumento en el recuento microbiano, lo que sugiere un posible efecto bacterioestático de YM. Este fenómeno implica la inhibición de la proliferación bacteriana sin una disminución de la población inicial. Este comportamiento podría atribuirse a una interacción entre los compuestos activos del extracto (especialmente ácido clorogénico y cafeico) y la matriz polimérica de YCW-R. Como se discutió en la *sección* 5.6.6, dicha interacción podría reducir la biodisponibilidad de los compuestos antimicrobianos, resultando en una fracción libre insuficiente para ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

### 5.6.8 Estudio de migración en simulante alimentario graso

Los resultados del ensayo de migración en simulante alimentario graso a 40 °C se muestran en la *Figura 5.6.8*. La actividad antioxidante de los componentes migrados se evaluó mediante dos metodologías complementarias: ABTS y DPPH, expresando los resultados como porcentaje de inhibición radicalaria %RSA. Paralelamente, se cuantificó el contenido de fenoles totales liberados al medio graso (*Figura 5.6.8-C*) mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, reportando los valores en equivalentes de ácido gálico (GAE, µg/mL).



**Figura 5.6.8.** Ensayo de migración a 40 °C de las películas YCW-R con 0%, 5%, 10% y 20% de YM en simulante de alimento graso. **A)** Actividad antioxidante medida por ABTS. **B)** Actividad antioxidante medida por DPPH. **C)** Compuestos fenólicos totales

Los resultados de actividad antioxidante obtenidos en el simulante alimentario mediante el método ABTS (*Figura 5.6.8-A*) mostraron una correlación directa con el contenido de fenoles totales liberados al medio (*Figura 5.6.8-C*). Las películas YCW-R 0% YM presentaron una notable actividad antioxidante atribuida a la capacidad de los  $\beta$ -glucanos presentes en la matriz para reaccionar con especies radicalarias. También se observó que la incorporación de un 20% de YM en las películas YCW-R produjo un incremento significativo de la actividad antioxidante tras 120 y 240 h de ensayo de migración. Además, la tasa de liberación de los componentes activos aumentó progresivamente con el tiempo, alcanzando un estado de equilibrio a las 120 horas. Este comportamiento sugiere que el agregado de YM no solo mejora la capacidad antioxidante de las películas, sino que también permite una liberación controlada del compuesto activo hacia el alimento, lo que podría contribuir a retardar los procesos de rancidez oxidativa. Resultados similares fueron reportados por el grupo LOMCEM, quienes estudiaron películas elaboradas a partir de pared celular de levadura con la adición de metabolitos secundarios fúngicos, observando que la tasa de liberación al medio era dependiente de la concentración inicial del agente activo (Rezzani *et al.*, 2022).

En el análisis por el método DPPH (*Figura 5.6.8-B*), las películas YCW-R 20% YM alcanzaron la máxima actividad antioxidante (%RSA:  $13 \pm 5$ ) a las 5 horas de migración. Luego, esa actividad antioxidante disminuyó a las 24 h pero se incrementó gradualmente en el tiempo hasta las 240 h. Esto indicaría que la liberación de antioxidantes se da a tazas controladas y su actividad perdura en el tiempo. Cabe destacar que las muestras control (YCW-R 0% YM) mantuvieron una actividad antioxidante considerable durante todo el periodo de estudio. Estos hallazgos, consistentes entre ambos métodos (ABTS y DPPH), confirman que la incorporación de YM mejora la funcionalidad antioxidante de las películas. Asimismo, se verificó que la liberación del agente activo ocurre de manera controlada, una característica altamente deseable en materiales activos destinados al envasado de alimentos.

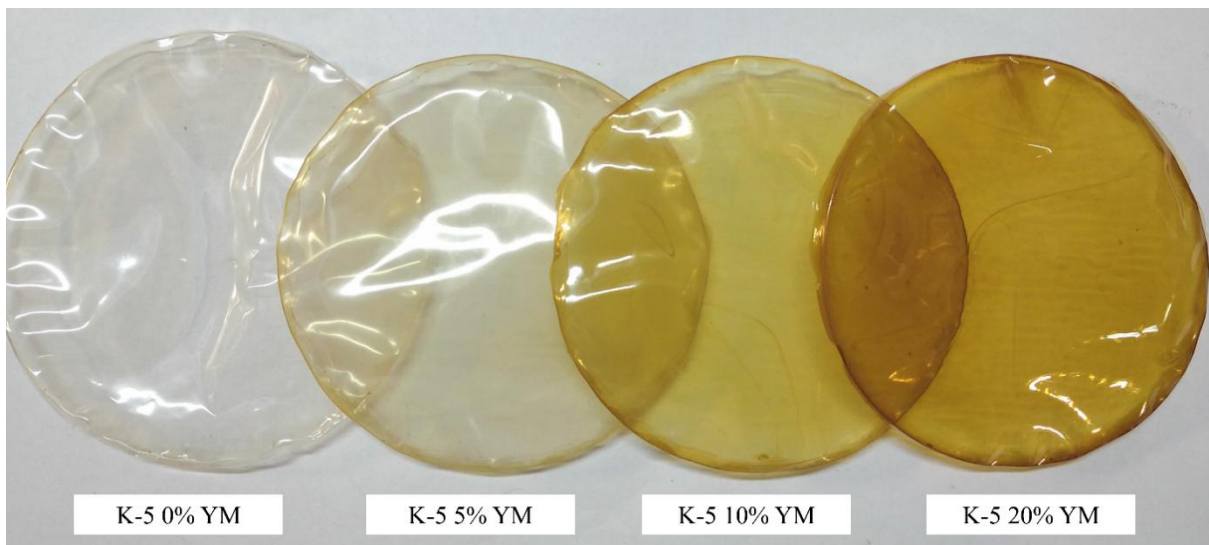
### 5.6.9 Conclusiones parciales

El desarrollo de películas YCW-R con incorporación de YM mostraron resultados destacables. En primer lugar, la YM les aportó un color marrón oscuro – negro que podría ser deseable para la protección de alimentos frente a la luz. En segundo lugar, la incorporación de YM en bajas concentraciones mejoró las propiedades mecánicas debido a la interacción de los componentes de la matriz con el extracto y al posible refuerzo por parte de nanopartículas de lignocelulosa que podrían estar presentes en el extracto. Asimismo, estas nanopartículas serían las responsables de mejorar las propiedades de barreras de las películas con 20% YM. En tercer lugar, los estudios de migración en simulante alimentario graso demostró que los componentes de la YM incorporados en las películas se liberaron al medio y presentaron una actividad antioxidante significativa. Adicionalmente, se evidenció que la matriz de YCW-R posee notable actividad antioxidante atribuida a la capacidad de los  $\beta$ -glucanos presentes en la matriz para reaccionar con especies radicalarias. Las películas YCW-R con 20% YM tuvieron un efecto bacterioestático frente a *Staphylococcus aureus*, lo que implica la inhibición de la proliferación bacteriana sin una disminución de la población inicial. En conjunto, estos resultados demuestran el potencial de la utilización de un residuo industrial, como es la levadura cervecera, para el desarrollo de materiales activos en contacto con alimentos.

## 5.7 Desarrollo y estudio de películas activas e inteligentes a base de gránulos de kéfir de agua y extracto de yerba mate residual

### 5.7.1 Examinación visual y colorimetría en el espacio CIELab

Las películas K-5 con YM se muestran en la *Figura 5.7.1*. Las películas obtenidas fueron flexibles, homogéneas y sin grietas o imperfecciones macroscópicas y la incorporación de extracto de yerba mate resultó en cambios notables en su color. Para cuantificar estas alteraciones de manera precisa, se emplearon las coordenadas del espacio de color CIELab. La coordenada  $L$  varió de  $90 \pm 1$  a  $74 \pm 3$  con la adición de 0% YM a 20% YM, lo que indica una disminución en la luminosidad de las muestras. Los valores obtenidos en la coordenada  $a$  indicaron una muy leve tendencia hacia el color verde en todas las muestras, con valores en el rango de  $-0,21 \pm 0,07$  a  $-2,3 \pm 0,5$ . Mientras que los valores de  $b$  variaron de  $8 \pm 1$  a  $45 \pm 4$ , lo que indica un aumento en el color amarillo con la incorporación de YM. Por lo tanto, el cambio de color  $\Delta E$  fue fácilmente observable al ojo humano ( $\Delta E > 6$ ) para todas las muestras con YM y aumentó en proporción al extracto añadido, con un  $\Delta E$  máximo de  $40 \pm 4$  para K-5 20% YM en comparación con la muestra de control.



**Figura 5.7.1.** Películas de kéfir con extracto de yerba mate.

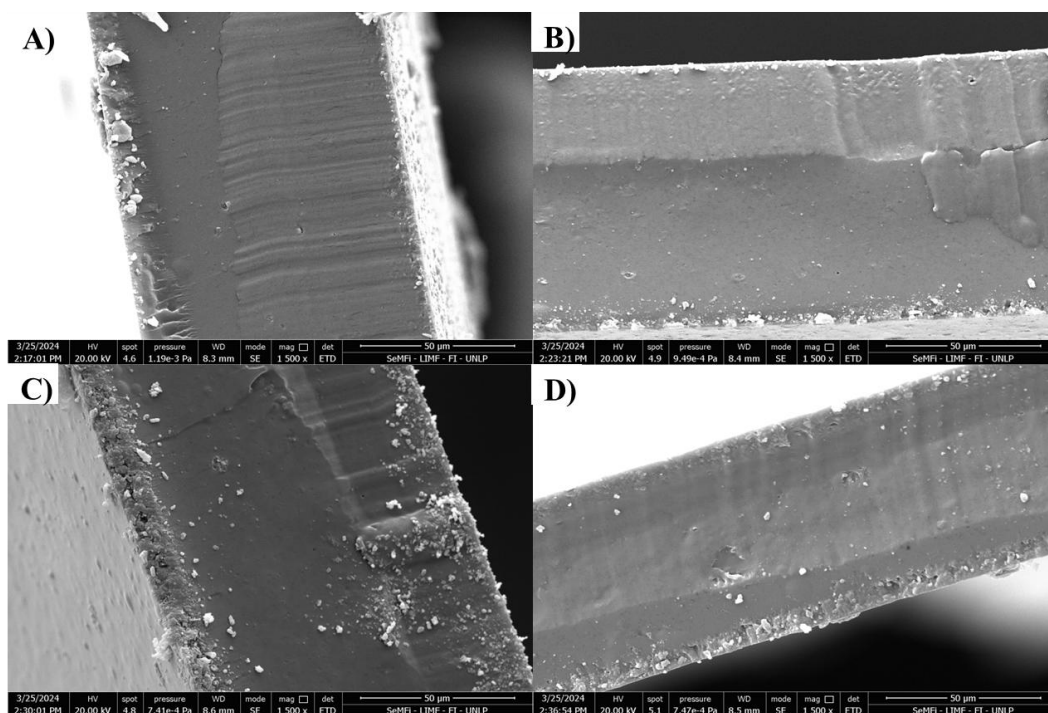
**Tabla 5.7.1.** Coordenadas CIELab de las películas K-5 con YM

Muestras	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	$\Delta E$
K-5 0% YM	$90 \pm 1^a$	$-0,21 \pm 0,07^a$	$8 \pm 1^a$	-
K-5 5% YM	$85 \pm 1^b$	$-1,7 \pm 0,1^b$	$21 \pm 2^b$	$13 \pm 2^a$
K-5 10% YM	$76 \pm 2^c$	$-1,2 \pm 0,3^c$	$36 \pm 3^c$	$31 \pm 3^b$
K-5 20% YM	$74 \pm 3^c$	$-2,3 \pm 0,5^d$	$45 \pm 4^d$	$40 \pm 4^c$

Las diferentes letras asignadas en cada columna refieren a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ;  $n=8$ )

### 5.7.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 5.7.2 muestra las micrografías de la sección transversal de las películas K-5 con 0% YM (A), 5% YM (B), 10% YM (C) y 20% YM (D). Las muestras presentaron una matriz densa con una sección transversal continua y homogénea, sin aglomerados, poros, fallas o separación de fases. No se observaron diferencias significativas entre las micrografías con la incorporación de YM, lo que indica que el extracto se dispersó adecuadamente en la matriz a través de enlaces de hidrógeno (Jaramillo *et al.*, 2015).



**Figura 5.6.2.** Micrografías de la sección transversal de las películas K-5 con 0% YM (A), 5% YM (B), 10% YM (C) y 20% YM (D).

### 5.7.3 Propiedades mecánicas

Los parámetros mecánicos de las películas K-5 con YM se muestran en la *Tabla 5.7.3*. El módulo elástico ( $E$ ) y la resistencia a la tracción ( $TS$ ) exhibieron un aumento marcado con la adición de 5% YM y 10% YM en comparación con la muestra control K-5 0% YM. Esto puede deberse a la acción de compuestos de la YM, entre ellas nanopartículas de lignocelulosa, que se conectan a las cadenas poliméricas mediante enlaces de hidrógeno, reforzando la red de la matriz y reduciendo la movilidad de las cadenas poliméricas. Un efecto similar se observó en las películas YCW-R cuando se incorporó el extracto de YM en bajas concentraciones (*sección 5.6.2*). Como consecuencia de esta interacción, la resistencia y la rigidez de las películas K-5 con 5% YM y 10% YM aumentaron. Sin embargo, los valores de  $E$  y  $TS$  de las películas K-5 disminuyeron cuando se incorporó un 20% de YM. Este efecto podría deberse a un efecto plastificante que enmascaró el refuerzo producido en la matriz a bajas concentraciones de YM. Un exceso de YM en la película podría desestabilizar los enlaces de hidrógeno entre las cadenas poliméricas, reduciendo las fuerzas entre estas y aumentando el espacio y la movilidad de las cadenas poliméricas, de manera similar a un plastificante (Coma *et al.*, 2019; Bourtoom, 2008). No se observaron diferencias significativas en la elongación máxima hasta ruptura (%) en todas las muestras cuando se añadió YM.

**Tabla 5.7.3.** Parámetros mecánicos de películas K-5 con adición de YM.

Muestras	$E$ (MPa)	$\epsilon\%$	$TS$ (MPa)
K-5 0% YM	$50 \pm 6^a$	$40 \pm 10^a$	$5,8 \pm 0,7^a$
K-5 5% YM	$65 \pm 12^{a,b}$	$42 \pm 9^a$	$7,4 \pm 0,4^b$
K-5 10% YM	$66 \pm 8^b$	$35 \pm 10^a$	$6,6 \pm 0,6^{a,b}$
K-5 20% YM	$53 \pm 7^{a,b}$	$37 \pm 7^a$	$5,4 \pm 0,4^a$

Las diferentes letras asignadas en cada columna refieren a diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ;  $n = 10$ ).

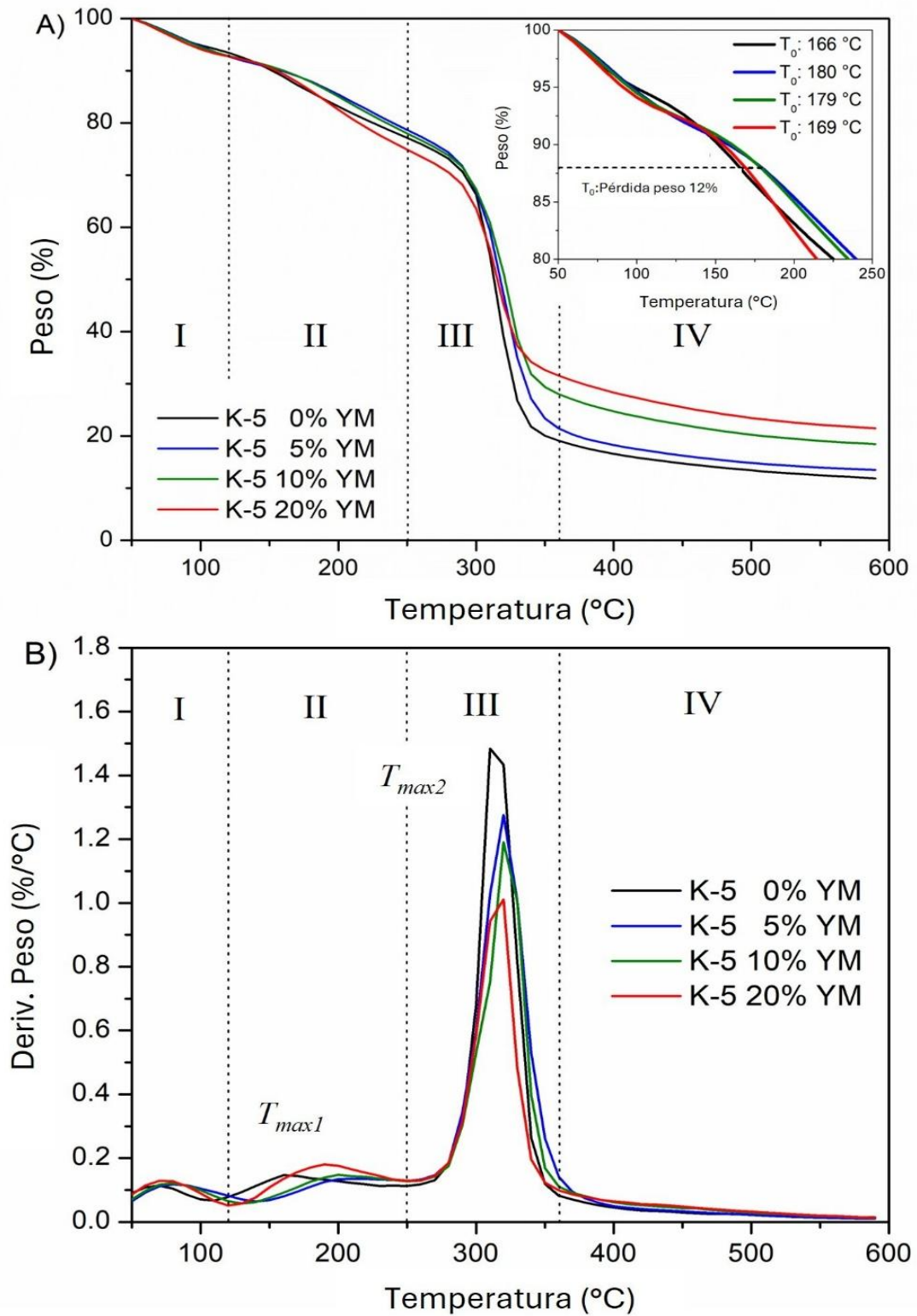
### 5.7.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de las películas, previamente equilibradas a 43% de humedad relativa, se presenta en la *Figura 5.7.4*. Como se muestra en las *Fig. 5.7.4-A* y *5.7.4-B*, los termogramas se pueden dividir en cuatro zonas distintas, como se ha descrito en las películas K-5 con HL (*sección 5.4.3*). La degradación térmica de las películas K-5 exhibió diferencias significativas con la adición de YM, manifestando un perfil de degradación en múltiples etapas, como se ilustra en las *Fig. 5.7.4-A* y *5.7.4-B*. La pérdida de masa hasta 120 °C se atribuye a la evaporación de humedad en la etapa inicial. La segunda pérdida de peso, entre 120 °C y 250 °C, corresponde a la degradación del glicerol y componentes del YM (Jaramillo *et al.*, 2016;

Lago *et al.*, 2023). La tercera pérdida de peso, entre 250 °C y 360 °C, corresponde a la degradación térmica del dextrano, que es el componente principal de las películas (Coma *et al.*, 2019). La cuarta etapa de degradación, entre 360 °C y 600 °C, está relacionada con la degradación final de la matriz y los residuos de carbonización provenientes de anillos aromáticos.

La temperatura inicial de degradación de las muestras ( $T_{\theta}$ ) aumentó de 166 °C a 180 °C con la incorporación de 5% de YM. La estabilidad térmica del material se vio significativamente mejorada por la interacción entre los compuestos de la YM y las cadenas poliméricas, como se mencionó en las propiedades mecánicas (*sección 5.7.3*), lo que estabiliza la matriz frente al aumento de temperatura. Este efecto se observó además en la *Fig. 5.7.4-B*, donde el  $T_{max1}$  fue de 160 °C para K-5 0% YM, mientras que las formulaciones con 5% YM y 10% YM exhibieron un  $T_{max1}$  de 205 °C y 200 °C, respectivamente. El  $T_{max2}$ , correspondiente a la degradación del dextrano, se desplazó de 313 °C a 320 °C con 5% YM y 10% YM. Sin embargo, la adición de 20% YM mostró una disminución en  $T_{\theta}$  (169 °C),  $T_{max1}$  (193 °C) y  $T_{max2}$  (314 °C) en comparación con los valores de las películas con 5% y 10% YM. Como se observó en los ensayos mecánicos, el exceso de YM en la matriz reduce las fuerzas entre las cadenas de polisacáridos, aumentando así la movilidad de las cadenas de dextrano de manera similar a un plastificante. Este efecto plastificante con un 20% de extracto de yerba mate también fue reportado por Jaramillo *et al.* (2016) en películas de almidón.

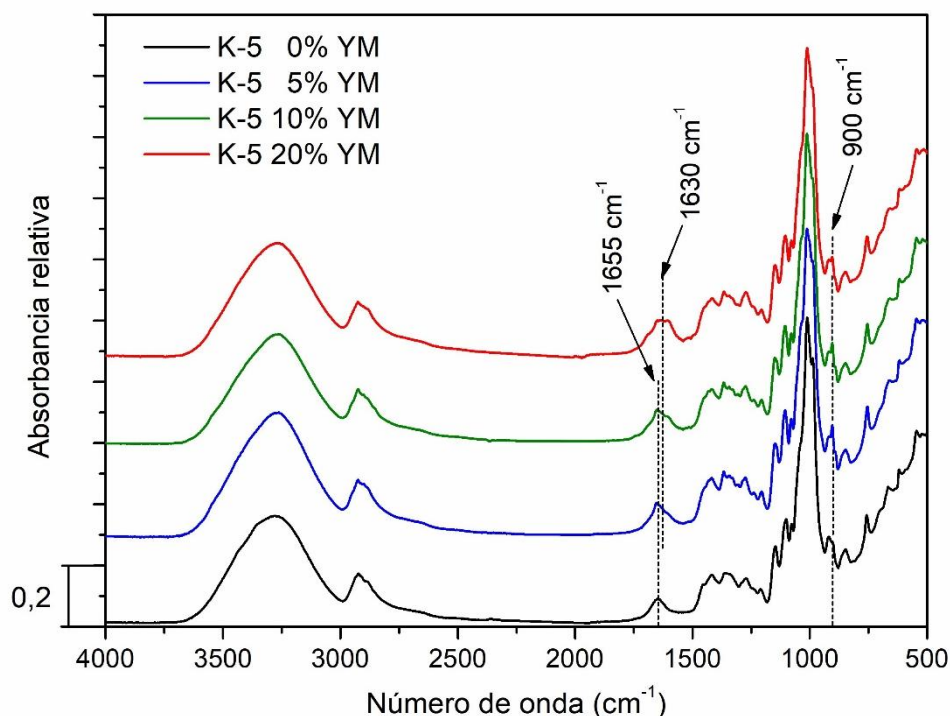
La *Fig. 5.7.4-A* mostró diferencias significativas a 600 °C con la incorporación de YM en las matrices, atribuidas a residuos de carbonización derivados de anillos aromáticos presentes en el extracto (Jaramillo *et al.*, 2016).



**Figura 5.7.4.** Análisis termogravimétrico (TGA) de las películas K-5 con diferente contenido de YM. A) Termogramas y temperatura inicial de degradación térmica. B) Derivada de la degradación térmica.

### 5.7.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

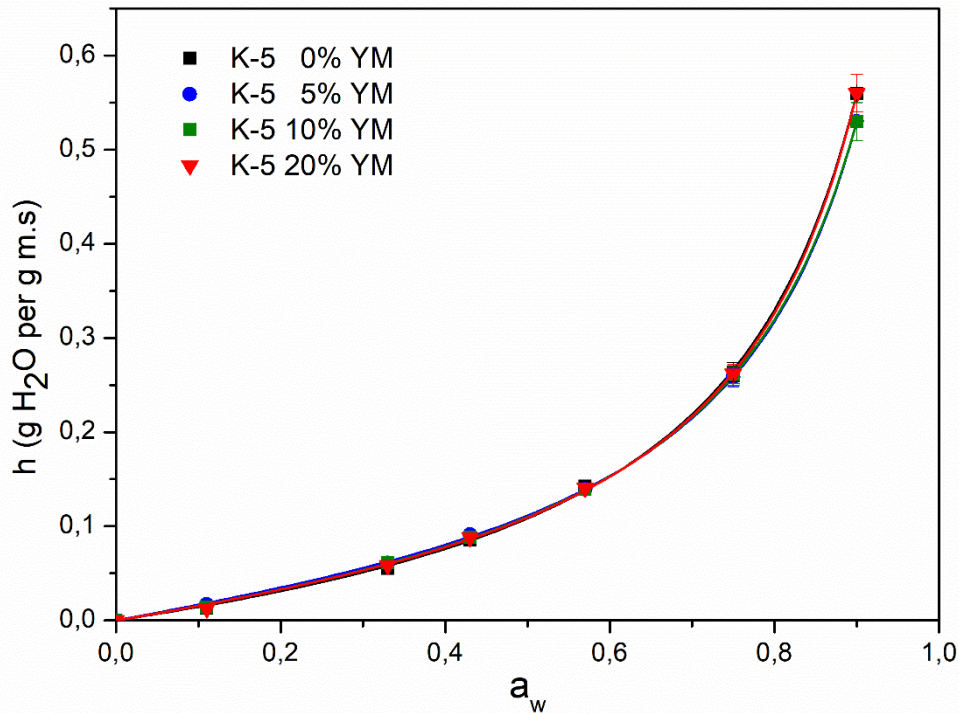
La Figura 5.7.5 muestra los espectros infrarrojos de las películas K-5 con YM normalizados a número de onda  $1010\text{ cm}^{-1}$ . La primera banda ( $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ ) corresponde a los grupos hidroxilo provenientes del agua, el dextrano y el glicerol. La segunda banda de absorción ( $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ) está asociado con el estiramiento de C-H en los grupos funcionales metilo ( $\text{CH}_3$ ) y metileno ( $\text{CH}_2$ ) (Coma *et al.*, 2019), como se describió en las películas K-5 con HL (sección 5.4.4). Se observó un desplazamiento de la banda  $1655\text{ cm}^{-1}$  a  $1630\text{ cm}^{-1}$  en las muestras que contenían YM, siendo más prominente con un 20% de YM. Esta banda de absorción se atribuye a los enlaces de hidrógeno y a las interacciones entre los grupos hidroxilo de las cadenas de polisacáridos, el glicerol y el YM, lo que confirma observaciones previas en los ensayos mecánicos y térmicos (Jaramillo *et al.*, 2016; Ceballos *et al.*, 2020). La zona entre  $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$  contiene bandas principalmente asignadas a los modos de estiramiento de los anillos de carbohidratos y grupos laterales (C-O-C, C-OH, C-H). La banda a  $900\text{ cm}^{-1}$  mostró cambios significativos tras la incorporación de YM, atribuibles a vibraciones C-H aromáticas de los compuestos fenólicos del extracto (Ceballos *et al.*, 2020). Estas modificaciones reflejan interacciones del YM con la matriz polimérica, consistentes con los resultados de actividad antioxidante y estabilidad térmica reportados.



**Figura 5.7.5.** Espectros FTIR de películas K-5 con 0%, 5%, 10% y 20% YM. Los espectros se normalizaron al pico mayor de  $1010\text{ cm}^{-1}$  para claridad.

### 5.7.6 Hidratación y transporte de agua.

Las isotermas de sorción de las películas K-5 con YM se muestran en la *Figura 5.7.6*, y los puntos experimentales se ajustaron con el modelo GAB utilizando la *Ecuación 10*.



**Figura 5.7.6.** Isotermas de sorción de agua de las películas K-5 con adición de YM.

En todas las isotermas, el contenido de agua de hidratación aumentó ligeramente a bajos valores de  $a_w$  y de manera más pronunciada cuando  $a_w$  superó 0,6. Este comportamiento es común en la mayoría de los materiales biopoliméricos. Esto sugiere que una pequeña cantidad de moléculas de agua se une directamente a la matriz polimérica formando una monocapa. Luego, la fracción más grande del agua de hidratación formó parte de la multicapa y se unió indirectamente a la matriz polimérica. Por lo tanto, el agua de hidratación en materiales biopoliméricos es agua móvil y susceptible de ser transportada por mecanismos de difusión (Delgado *et al.*, 2018; Delgado, Peltzer & Salvay, 2022).

La *Tabla 5.7.6* muestra los parámetros del modelo GAB obtenidos del ajuste de las isotermas de sorción de agua. El número de sitios primarios de unión de hidratación ( $N$ ), el parámetro  $c$  relacionado con la fuerza de unión del agua a los sitios primarios y la capacidad del agua para unirse a la multicapa ( $k$ ) no se vieron afectados por la adición de YM. No se observaron diferencias significativas en el parámetro  $h_{90\%th}$ , que se refiere al contenido de agua

medido en las películas en equilibrio a 90% de humedad relativa. De esta manera, es posible decir, con toda claridad, que el YM no tiene efecto en la hidratación máxima de las películas.

**Tabla 5.7.6.** Parámetros del modelo GAB obtenidos del ajuste de las isotermas de sorción de agua (Fig. 5.7.6), contenido de agua medido en las películas en equilibrio a 90% h.r., permeabilidad al vapor de agua y espesor de las películas K-5 con YM.

	Parámetros GAB				$h_{90\%rh}$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$P_w^{exp}$ [10 <sup>-10</sup> g s <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> ]	$L$ [10 <sup>-5</sup> m]
	$N$ [g H <sub>2</sub> O/g]	$c$	$k$	$R^2$			
<b>0% YM</b>	0,10 ± 0,01	1,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	0,999	0,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>5% YM</b>	0,10 ± 0,01	1,9 ± 0,2	3,4 ± 0,1	0,999	0,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	11,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>10% YM</b>	0,10 ± 0,01	1,8 ± 0,2	3,4 ± 0,1	0,999	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	13,4 ± 0,5 <sup>c</sup>
<b>20% YM</b>	0,10 ± 0,01	1,8 ± 0,3	3,5 ± 0,1	0,999	0,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>d</sup>	9,4 ± 0,2 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ). Los valores reportados del parámetro estadístico  $R^2$  indican un buen ajuste del modelo. Los errores en los parámetros del modelo GAB se obtuvieron del análisis de ajuste.

La *Tabla 5.7.6* presenta los valores de permeabilidad al vapor de agua ( $P_w^{exp}$ ) determinados experimentalmente en función del contenido de YM. Es importante aclarar que la permeabilidad al vapor de agua de las películas biopoliméricas depende de las condiciones experimentales del gradiente de presión de agua y del espesor de la película (Delgado, Peltzer & Salvay, 2022). En general, para materiales hidrofílicos, la permeabilidad al vapor de agua aumenta con el incremento del espesor de la película (Delgado *et al.*, 2018). Para permitir una comparación válida de los valores de permeabilidad al vapor de agua entre las películas, estas deben tener el mismo espesor y estar sometidas a idénticas condiciones de presión de vapor de agua en cada lado de la muestra.

En la *Tabla 5.7.6* se observa que las muestras con 5% y 10% de YM mostraron un aumento en los valores de  $P_w^{exp}$  en comparación con el control. Sin embargo, estas muestras también mostraron un aumento en su espesor ( $L$ ), por lo que no es posible confirmar si la diferencia en  $P_w^{exp}$  se debió a la incorporación de YM. No obstante, no hubo diferencias significativas en el espesor entre las películas con 0% y 20% de YM, y los valores de  $P_w^{exp}$  disminuyeron significativamente con la adición de 20% de YM. Ambas muestras alcanzaron el mismo valor de equilibrio de hidratación a 90% de humedad relativa ( $h_{90\%rh}$ ). Dado que la permeabilidad al vapor de agua se define como el producto de la solubilidad de la especie permeante en la matriz y difusividad en la película (Delgado, Peltzer & Salvay, 2022), la reducción en  $P_w^{exp}$  probablemente se deba a una disminución en la difusividad del vapor de agua dentro de la matriz ya que la hidratación es directamente proporcional con la solubilidad.

### 5.7.7 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante, medida como el porcentaje de actividad de captura de radicales (%RSA) de las películas K-5 con YM mediante los ensayos de ABTS y DPPH, se muestra en la *Tabla 5.7.7*. A tiempos cortos de exposición ( $t = 1$  y  $5$  min), la actividad antioxidante de las muestras aumentó notablemente con la incorporación de YM. Este comportamiento puede explicarse por el incremento de compuestos fenólicos en las películas K-5. Resultados similares fueron reportados por Knapp *et al.* (2019) en películas de almidón con extracto de yerba mate. Las muestras K-5 con 20% de YM presentaron un %RSA máximo de  $99 \pm 1$  y  $41 \pm 1$  para los ensayos de ABTS y DPPH, respectivamente. El método ABTS demostró que las películas con YM capturaron cantidades significativas de radicales libres a  $t = 15$  min, indicando una notable actividad antioxidante incluso cuando solo se añadió un 5% de YM a las matrices. Se observó un %RSA menor con el método DPPH, probablemente debido a la diferente afinidad química del YM con el compuesto radical, como se ha reportado en otros estudios (Horton *et al.*, 2019; Floegel *et al.*, 2011; Platzer *et al.*, 2021). Tanto en los ensayos de captación de radicales ABTS como DPPH, la actividad antioxidante de las películas mostró un aumento significativo con la incorporación de YM, confirmándose que el extracto no pierde su capacidad antioxidante al ser incorporado en la matriz de kéfir. Estos hallazgos sugieren que las muestras K-5 con YM podrían ser candidatos prometedores para el desarrollo de materiales antioxidantes activos para aplicaciones alimentarias.

**Tabla 5.7.7.** Porcentaje de actividad captadora de radicales (%RSA) de las películas K-5 con YM mediante ensayos de ABTS y DPPH.

Muestras	ABTS		DPPH	
	t = 1 min	t = 15 min	t = 5 min	t = 15 min
<b>K-5 0% YM</b>	$4 \pm 2^a$	$0 \pm 1^a$	$0 \pm 1^a$	$2 \pm 1^a$
<b>K-5 5% YM</b>	$44 \pm 10^b$	$90 \pm 4^b$	$14 \pm 2^b$	$23 \pm 3^b$
<b>K-5 10% YM</b>	$73 \pm 11^c$	$96 \pm 1^c$	$39 \pm 1^c$	$33 \pm 4^c$
<b>K-5 20% YM</b>	$99 \pm 1^d$	$98 \pm 2^c$	$41 \pm 1^c$	$71 \pm 5^d$

Las mismas letras en los datos reportados en una columna indican que no hay diferencias significativas (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ).

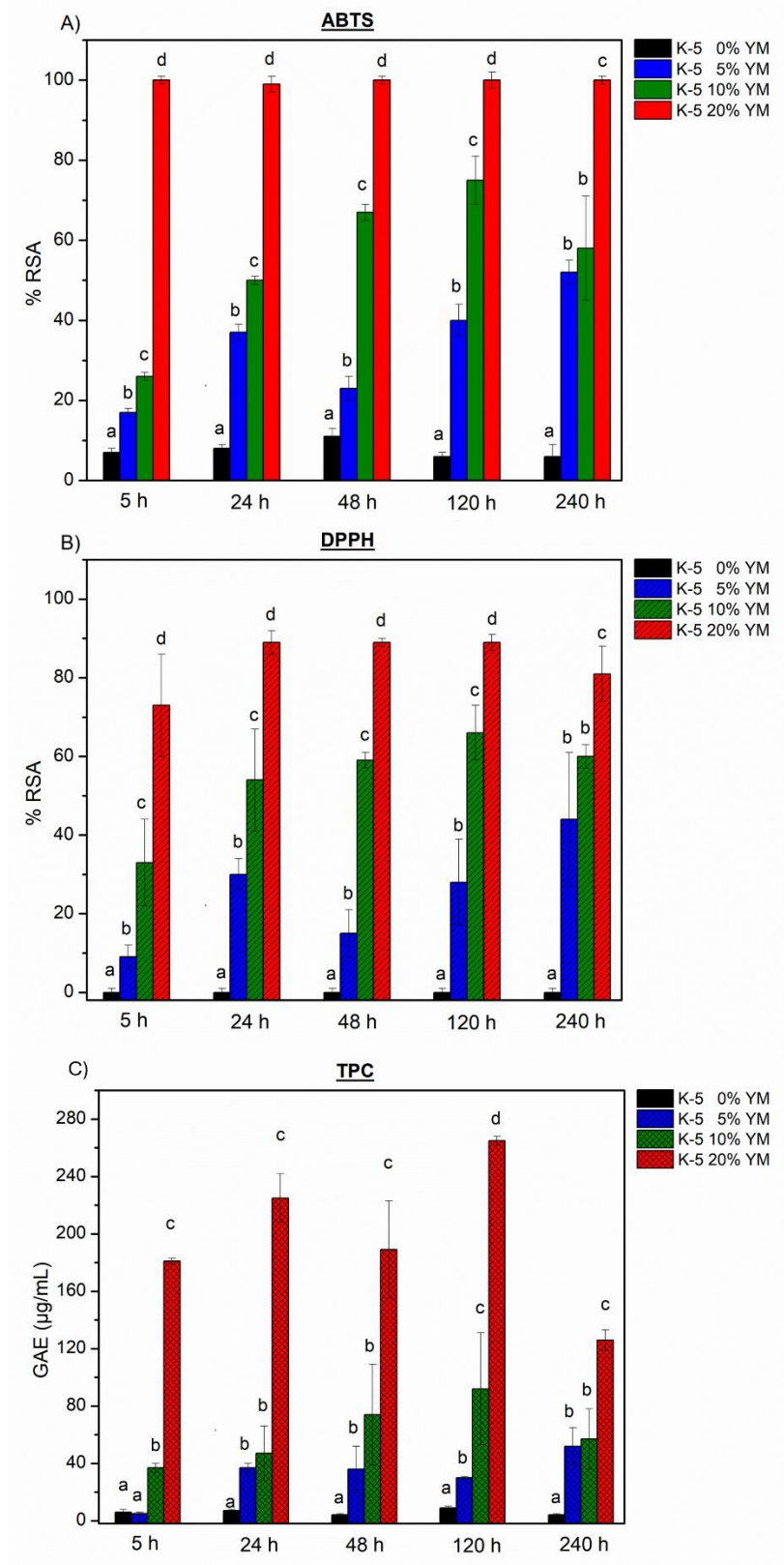
### 5.7.8 Actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana de las películas de K-5 con la incorporación de 20% YM frente a *Staphylococcus aureus*, mediante el método de contacto directo, demostró la ausencia total de crecimiento bacteriano. Este resultado, indica un efecto bactericida

completo (100%) atribuible a la incorporación del extracto en la matriz polimérica. La notable eficacia antimicrobiana observada puede explicarse por la acción de los compuestos bioactivos presentes en el YM, particularmente el ácido clorogénico y otros polifenoles, los cuales actúan sinérgicamente sobre las estructuras celulares bacterianas. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Martin *et al.* (2013), quienes documentaron una significativa actividad inhibitoria de extractos etanólicos y metanólicos de yerba mate frente a *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas, respaldando el potencial de estos compuestos como agentes antimicrobianos eficaces.

### **5.7.9 Estudio de migración en simulante alimentario graso**

Los resultados del ensayo de migración en simulante de alimento graso a 40 °C se muestran en la *Figura 5.7.9*. La actividad antioxidante de los componentes liberados desde las películas K-5 con YM hacia el simulante de alimento se midió como %RSA mediante los ensayos de ABTS (*Fig. 5.7.9-A*) y DPPH (*Fig. 5.7.9-B*). Los compuestos fenólicos totales liberados desde las muestras hacia el simulante de alimento graso (*Fig. 5.7.9-C*) se midieron en equivalentes de ácido gálico (GAE,  $\mu\text{g/mL}$ ) mediante el método de Folin-Ciocalteu.



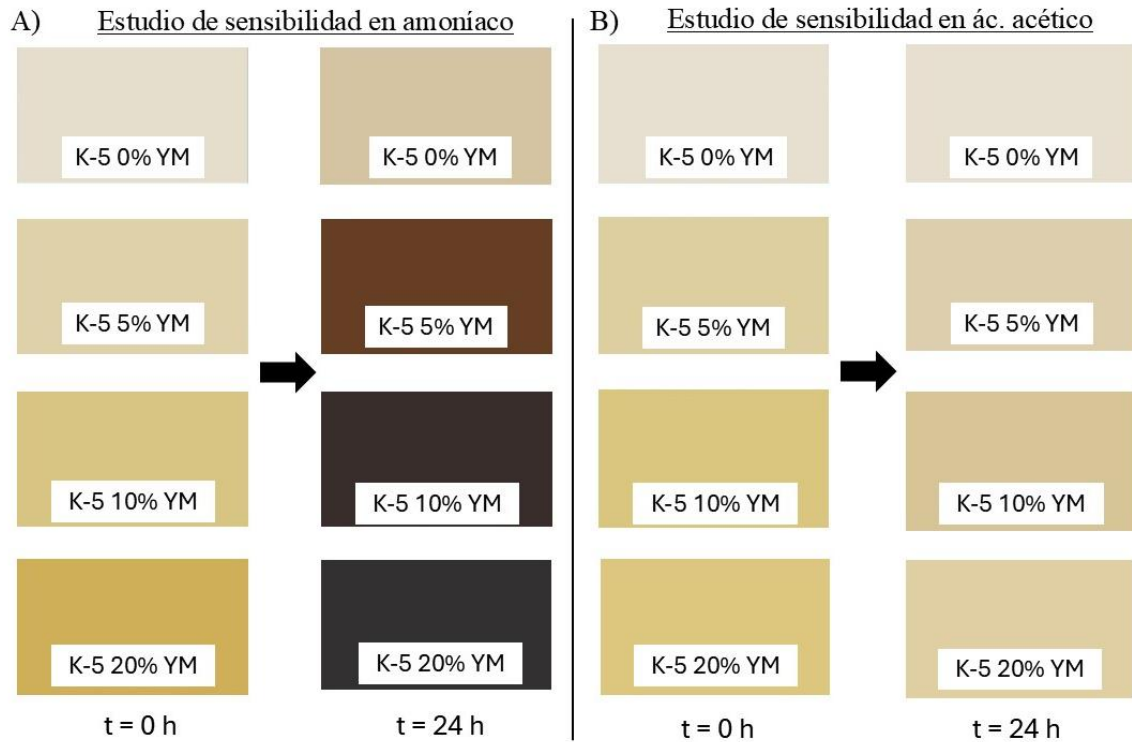
**Figura 5.7.9.** Ensayo de migración a 40 °C de las películas K-5 con 0%, 5%, 10% y 20% de YM en simulante de alimento graso. A) Actividad antioxidante del simulante de alimento medida por ABTS. B) Actividad antioxidante del simulante de alimento medida por DPPH. C) Compuestos fenólicos totales liberados en el simulante de alimento.

En todos los gráficos, la adición de YM a las películas aumentó significativamente la actividad antioxidante de los simulantes, lo que corresponde a un incremento en los compuestos fenólicos totales (TPC). Esto indica una dependencia de la concentración inicial del extracto, de modo que, a mayor concentración inicial, mayor es la migración (Silva de Farias *et al.*, 2021; Ceballos *et al.*, 2020). Las películas K-5 con 20% de YM presentaron el mayor %RSA en los ensayos de ABTS y DPPH, lo que corresponde a una mayor cantidad de TPC liberada en el simulante de alimento. Además, estas muestras alcanzaron el equilibrio a las 5 horas de prueba, ya que no se observaron diferencias apreciables en los valores de %RSA para los otros tiempos, y mantuvieron la actividad antioxidante hasta las 240 horas (*Fig. 5.7.9-A*). Sin embargo, el simulante de alimento graso en contacto con las películas K-5 20% YM mostró una disminución en la actividad antioxidante medida por DPPH y en los TPC después de 240 horas (*Fig. 5.7.9 B-C*). De manera similar, Gullón *et al.* (2018) reportaron que tiempos de extracción prolongados redujeron el contenido de fenoles totales (TPC) y el contenido de flavonoides totales (TFC) debido a una mayor probabilidad de oxidación de los fenoles, lo que disminuye el rendimiento fenólico en los extractos.

Estos resultados indican que el YM proporciona un poder antioxidante significativo a las películas K-5, el cual se retiene en la matriz con el tiempo y tiene una alta tasa de liberación en simulantes de alimentos grasos. Por lo tanto, este material podría ser una alternativa potencial para la preservación de alimentos grasos que son susceptibles a procesos de degradación oxidativa.

#### **5.7.10 Estudio de sensibilidad en amoníaco y ácido acético**

Los cambios de color de las películas K-5 con YM después de ser expuestas durante 24 horas a soluciones de amoníaco y ácido acético se muestran en la *Figura 5.7.10*.



**Figura 5.7.10.** Representación de los cambios de color de las películas K-5 con YM después de la prueba de sensibilidad de amoníaco (A) y la prueba de sensibilidad en ácido acético (B).

En la prueba de detección de amoníaco (*Fig. 5.7.10-A*), los cambios de color de las muestras de amarillo a marrón y negro después de la prueba fueron notables. Después de la exposición a la solución de amoníaco, el valor de la coordenada  $L$  disminuyó aproximadamente un 75%, lo que indica una reducción en la luminosidad. Las películas K-5 con 10% YM y 20% YM mostraron una gran diferencia entre los valores de  $a$  (de  $-2,4 \pm 0,8$  a  $5,0 \pm 0,5$ ) y  $b$  (de  $48 \pm 6$  a  $3,0 \pm 0,6$ ) antes y después de la prueba. Después de la prueba de detección de amoníaco, el cambio de color fue significativo para el ojo humano en todas las muestras ( $\Delta E > 6$ ) y aumentó con la incorporación de YM. Resultados similares fueron reportados por Wang y Liu (2024) en su estudio sobre películas compuestas de metilcelulosa y alginato de zinc incorporadas con antocianinas. Como se describe en la *sección 5.5.1*, la alteración del color se atribuye a la cianidina, un compuesto presente en las hojas de yerba mate que reacciona a las variaciones en los valores de pH.

Los resultados de la prueba de detección de ácido acético y el cambio de color se muestran en la *Fig. 5.7.10-B*. El cambio de color observado en las películas después de 24 horas de exposición a vapores de ácido acético fue menos pronunciado en comparación con el cambio

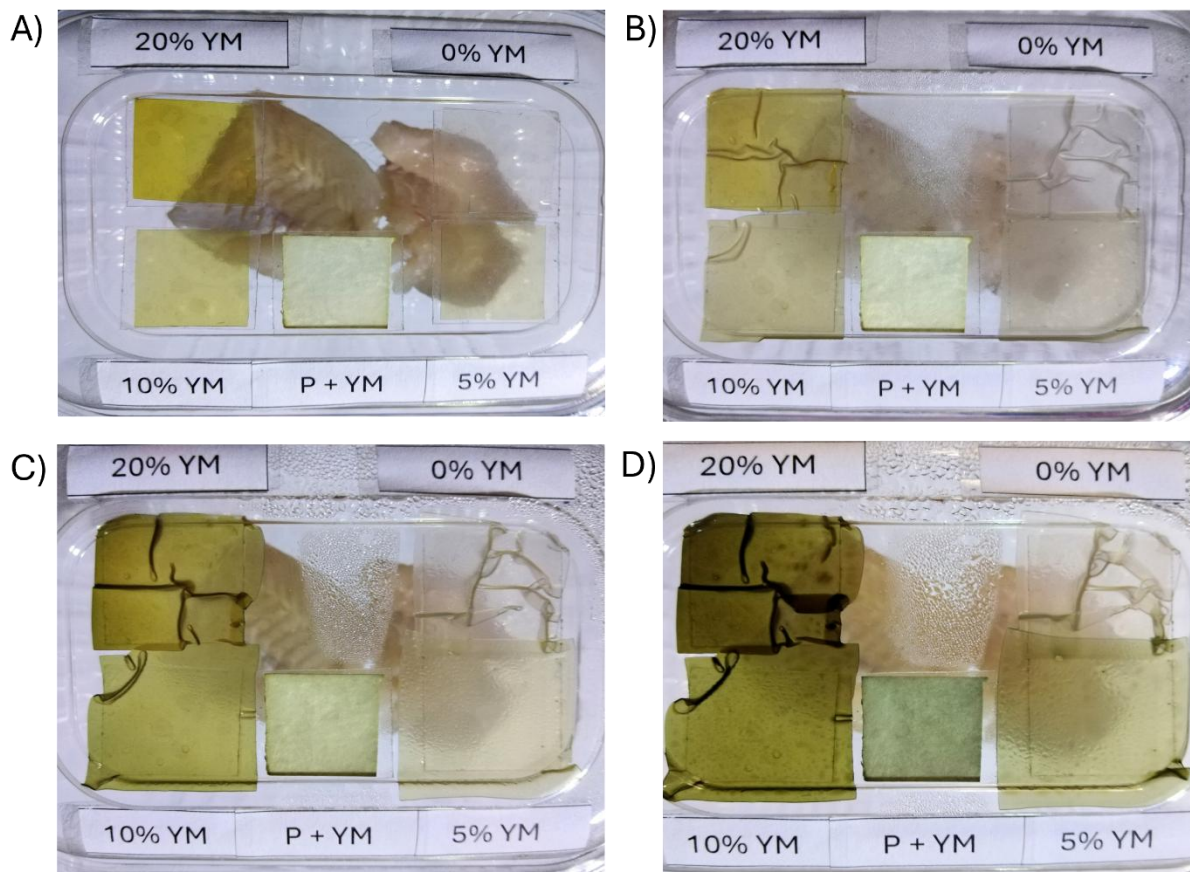
observado en la prueba de amoníaco. Sin embargo, la medición del color mediante las coordenadas CIELab mostró que el cambio de color ( $\Delta E$ ) fue significativo para las muestras K-5 10% YM ( $\Delta E: 13 \pm 1$ ) y K-5 20% YM ( $\Delta E: 16 \pm 1$ ) después de la prueba. A diferencia de la prueba de amoníaco, se observó que el valor de la coordenada  $L$  se mantuvo constante en todas las muestras ( $80 < L < 90$ ), lo que implica que la exposición al ácido acético no induce alteraciones discernibles sin instrumental de precisión en la luminosidad de las películas. Este resultado sugiere que las películas K-5 con YM podrían utilizarse de manera óptima en entornos que promuevan o tengan pH alcalino. La variación de color a diferentes valores de pH podría ser útil en el desarrollo de envases inteligentes para productos alimenticios que informen a los consumidores sobre la frescura del producto.

#### **5.7.11 Conclusiones parciales**

En esta sección se demostró la factibilidad de desarrollar materiales activos e inteligentes utilizando gránulos de kéfir de agua, un subproducto innovador. Los resultados mostraron que la incorporación del extracto de yerba mate ha resultado en una mejora sustancial de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, mecánicas y térmicas de las películas, convirtiéndolos en una alternativa biobasada prometedora para aplicaciones en productos alimenticios. Las películas elaboradas con gránulos de kéfir de agua que incorporan extracto de yerba mate tienen la capacidad de extender la vida útil de los productos alimenticios al retrasar el deterioro oxidativo y poseer efecto bactericida. Además, estos materiales podrían servir como indicadores de frescura, proporcionando a los consumidores información en tiempo real sobre el estado de los productos alimenticios.

### 5.8 Aplicación de etiquetas inteligentes basadas en K-5 con YM para monitoreo de calidad en filetes de *Merluccius hubbsi*

En la *Figura 5.8.1* se muestra el monitoreo de frescura en filetes de merluza (*Merluccius hubbsi*) mediante las etiquetas K-5 con extracto YM (0-20 %) y una etiqueta de papel con 5% extracto (P+YM) en el tiempo inicial de estudio (A), día 2 (B), día 4 (C) y día 7 (D).



**Figura 5.8.1.** Monitoreo de frescura en filetes de merluza mediante etiquetas inteligentes basadas en películas K-5 con diferentes concentraciones de extracto de yerba mate (YM: 0%, 5%, 10% y 20%) y una etiqueta de papel con 5% extracto (P+YM). A) condiciones iniciales (día 0), B) día 2, C) día 4 y D) día 7.

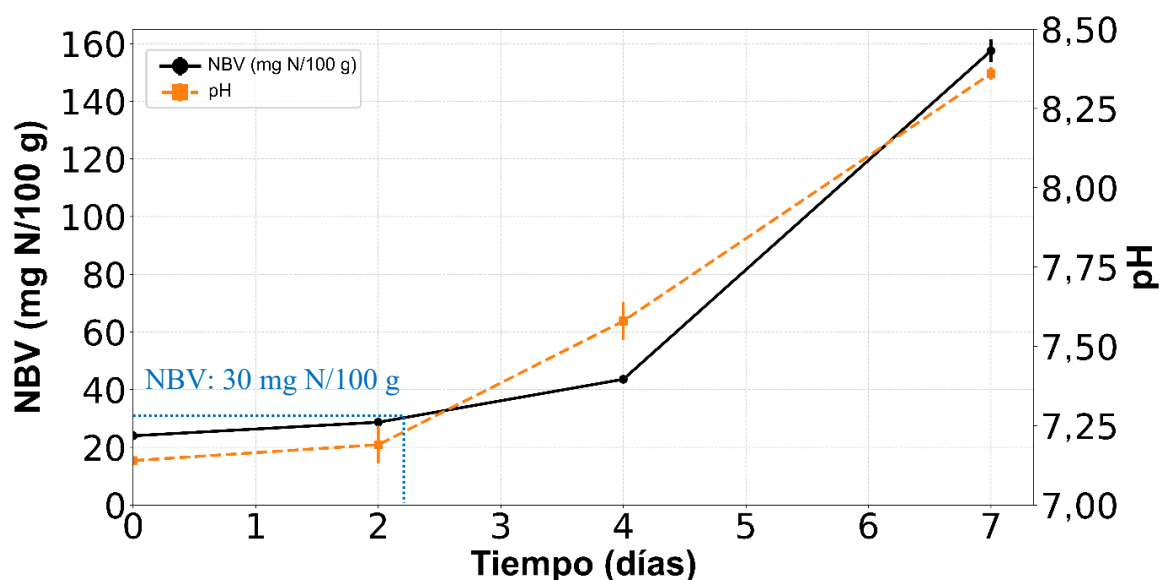
Los ensayos realizados demostraron la efectividad de las etiquetas inteligentes con YM como sistema indicador del deterioro en filetes de merluza. En el día 2, no se evidenciaron cambios de color en las etiquetas inteligentes. Luego de cuatro días de almacenamiento refrigerado, se registró un cambio cromático perceptible al ojo humano en las etiquetas de kéfir y YM, mientras que los parámetros organolépticos del pescado (aspecto visual y aroma) aún no manifestaban alteraciones evidentes mediante evaluación sensorial. Este comportamiento

confirma la sensibilidad mayor del sistema desarrollado frente a los métodos de evaluación convencionales.

La progresión del deterioro del producto (pescado) se hizo evidente al séptimo día de almacenamiento, cuando se detectaron aromas característicos de descomposición (debidos a la presencia de amoníaco y compuestos sulfurados), y esta alteración fue acompañada por un cambio de color visible en las etiquetas. Esta correlación temporal entre la respuesta cromática y los parámetros de calidad convencionales valida el sistema como una herramienta apropiada para el monitoreo de la frescura en forma no destructiva.

Se puede observar en la *Figura 5.8.2* que las etiquetas K-5 experimentaron hinchazón y formación de arrugas como consecuencia de la exposición a la alta humedad generada dentro del envase. Este fenómeno, si bien podría interpretarse como un defecto, debe contextualizarse considerando que el diseño experimental empleó etiquetas de dimensiones ampliadas para facilitar la medición y la observación del cambio cromático. Cabe destacar que, en una aplicación práctica con etiquetas de menor tamaño, la superficie expuesta a la atmósfera húmeda sería significativamente reducida, minimizando estos efectos.

Luego de la inspección visual de las muestras, se analizó el contenido de nitrógeno básico volátil (NBV) y el pH de los filetes de merluza. Los resultados se muestran en la *Figura 5.8.2*.



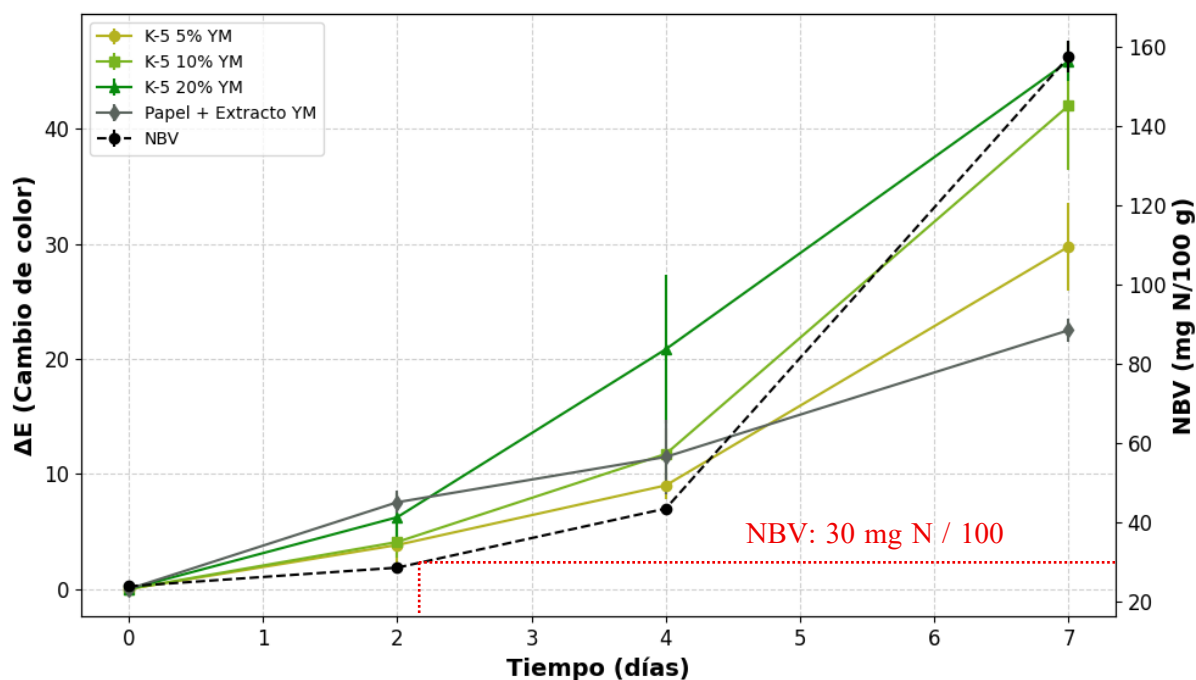
**Figura 5.8.2.** Evolución del pH y nitrógeno básico volátil (NBV) durante el almacenamiento refrigerado de filetes de merluza.

El análisis de la *Figura 5.8.2* permite diferenciar tres etapas en el proceso de deterioro. Durante los primeros dos días de refrigeración, los valores de NBV se mantuvieron dentro del

rango de frescura ( $24,0 \pm 0,7$  a  $28,7 \pm 0,8$  mg/100 g), cumpliendo con la normativa del Código Alimentario Argentino (CAA Cap. VI, Art. 272 bis). La transición crítica ocurrió entre el segundo y cuarto día, cuando los niveles de NBV superaron el límite regulatorio de 30 mg/100 g, alcanzando  $43,6 \pm 0,7$  mg/100 g. Este período fue concordante con la respuesta cromática de las etiquetas inteligentes con extracto de yerba mate. La fase final (días 4-7) mostró un deterioro avanzado, con valores de NBV que llegaron a  $157 \pm 4$  mg/100 g, acompañados por la aparición de compuestos volátiles característicos como amoníaco y aminas libres (Burkhard *et al.*, 2023).

El valor del pH del pescado presentó una correlación con la evolución del NBV en el tiempo, aunque con diferencias en su aplicabilidad como indicador de frescura. Los valores iniciales ( $7,14 \pm 0,05$ ) confirmaron la calidad óptima del producto, mostrando una progresión moderada hasta  $7,59 \pm 0,07$  en el período crítico. Sin embargo, la magnitud de estas variaciones (inferiores a 0,5 unidades) las hace difícilmente detectables sin equipamiento especializado. Solo en la fase terminal se registraron cambios significativos (pH  $8,37 \pm 0,02$ ), momento en que el deterioro resulta evidente mediante una simple evaluación sensorial. Esta limitación metodológica resalta la ventaja comparativa de los sistemas de indicación colorimétrica, particularmente durante la ventana temporal más relevante para la toma de decisiones comerciales (2-4 días de almacenamiento).

La *Figura 5.8.3* presenta la evolución del nitrógeno básico volátil (NBV) y el cambio de color en las etiquetas inteligentes con diferentes concentraciones de extracto YM (5%, 10% y 20%) durante el almacenamiento refrigerado de filetes de merluza.



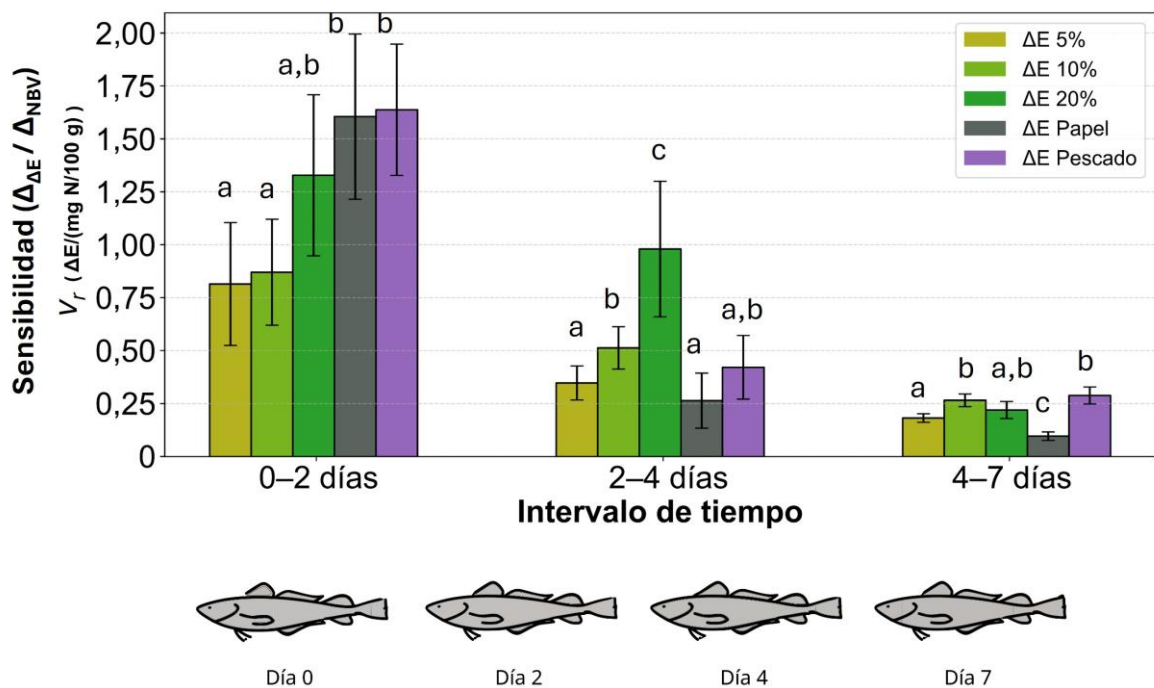
**Figura 5.8.3.** Correlación entre la evolución del cambio de color ( $\Delta E$ ) en etiquetas inteligentes con YM y la concentración de nitrógeno básico volátil (NBV) como indicador de deterioro en filetes de merluza durante el almacenamiento refrigerado.

En el intervalo inicial (0-2 días), se observa un incremento gradual en el cambio de color proporcional a la concentración de extracto, aunque sin superar el umbral de detección perceptible al ojo humano ( $\Delta E \leq 6$ ), dado que los valores de NBV se mantienen bajos. Sin embargo, entre los días 2 y 4, período crítico en el que el NBV supera los límites establecidos por el CAA, las etiquetas con mayor concentración de extracto (10% y 20 YM) exhiben un cambio de color más pronunciado que aquellas con 5% YM, demostrando una mayor sensibilidad para detectar el deterioro del producto. A partir del cuarto día y hasta el séptimo, si bien la tendencia al cambio de color persiste en función de la concentración de YM, su utilidad práctica disminuye, ya que las alteraciones en el pescado son evidentes por otros medios.

Adicionalmente, se comparó el desempeño de estas etiquetas con un sistema alternativo basado en papel impregnado con 5% p/p (b.s) del mismo extracto de yerba mate residual (P+YM). Las etiquetas K-5 con YM mostraron un mayor cambio de color que el sistema opaco de papel, cuyo cambio de color resultó menos perceptible. Estos resultados respaldan la aplicabilidad de las películas de kéfir como indicadores de frescura, particularmente en el rango temporal de mayor relevancia (2-4 días), donde su respuesta cromática se correlaciona eficientemente con los niveles de NBV. Por lo tanto, las etiquetas K-5 con YM representan una

alternativa más efectiva que los sistemas basados en papel para el monitoreo de la calidad del pescado en condiciones de refrigeración.

Aunque las tendencias en las pendientes son observables, las diferencias en las escalas de las variables analizadas impiden realizar comparaciones directas entre ellas. Para superar esta limitación, la *Figura 5.8.4* presenta el parámetro de sensibilidad ( $v_r$ ) que da cuenta de la velocidad relativa del cambio de color  $\Delta E$  en las etiquetas y el pescado respecto al incremento de NBV (*sección 4.7.4*).



**Figura 5.8.4.** Sensibilidad al cambio de color ( $\Delta E$ ) respecto al cambio de nitrógeno básico volátil ( $\Delta_{NBV}$ ) detectado en el pescado para: etiquetas K-5 con 5%, 10%, 20% YM, etiqueta papel con 5% extracto de YM (P+YM) y el cambio de color en el pescado. El inserto inferior muestra la coloración promedio del pescado en espacio RGB como referencia visual de los cambios detectados.

El análisis comparativo de los tres períodos de almacenamiento evidencia un sesgo inherente, previamente observado en la *Figura 5.8.3*, originado por el incremento progresivo en la magnitud de cambio del nitrógeno básico volátil (NBV) conforme avanza el tiempo de almacenamiento. Este efecto es particularmente marcado en el intervalo de 4-7 días, donde las variaciones de NBV alcanzan su máxima expresión. La normalización de las velocidades relativas empleando el  $\Delta_{NBV}$  como denominador explica la aparente disminución en la magnitud de las barras hacia los períodos posteriores, aunque esto no afecta la interpretación válida dentro de cada intervalo temporal individual. El parámetro de sensibilidad ( $v_r$ ) es un método

adecuado para la evaluación de la velocidad relativa de cambio del color de las etiquetas, especialmente, en el período crítico (2 – 4 días), cuando los valores de NBV detectados en el pescado superaron el límite normativo. En este período, los valores de sensibilidad cercanos a la unidad indican una correlación similar entre los cambios del sistema indicador de frescura y los cambios de NBV en el producto; valores significativamente superiores sugieren una mayor sensibilidad del sistema detector a través del cambio de color respecto al cambio de NBV; mientras que los valores notablemente inferiores connotan limitaciones en la capacidad de detección. Esta metodología de normalización permite una comparación rigurosa del desempeño de los distintos sistemas indicadores de frescura (etiquetas K-5/YM y P+YM) en cada fase del almacenamiento, independientemente de las variaciones absolutas en los niveles de NBV, proporcionando así una herramienta analítica valiosa para la evaluación objetiva de sensibilidad en sistemas de detección de deterioro.

El análisis del primer intervalo (0-2 días) muestra que, si bien algunas etiquetas presentan valores de sensibilidad ( $v_r$ ) considerablemente superiores a 1, este período no resulta determinante para validar la eficacia de los indicadores como sistema de monitoreo. Esto se debe a dos factores principales: primero, los cambios en el nitrógeno básico volátil (NBV) son pequeños y no alcanzan el umbral establecido para determinar el fin de la vida útil del producto; segundo, aunque los indicadores muestran alta sensibilidad en términos relativos, las variaciones absolutas de color ( $\Delta E$ ) todavía son demasiado pequeñas para ser perceptibles visualmente. El alto valor de sensibilidad de los sistemas, en este intervalo de tiempo, resulta muy influenciado por el pequeño valor del cambio del NBV en el denominador, pero que no tiene relevancia para analizar su eficacia como indicador por las dos razones antes expuestas.

El intervalo de 2 a 4 días de almacenamiento constituye el período más relevante para evaluar la aplicabilidad práctica de las etiquetas inteligentes, como se mencionó anteriormente, ya que corresponde al momento en que los niveles de NBV superan el umbral de aceptabilidad establecido. Durante esta fase crítica, en las etiquetas K-5 con 20% YM se observó una sensibilidad con valores cercanos a la unidad, lo que indica que el cambio de color de las etiquetas se correlaciona de manera similar al cambio de NBV del pescado. En consecuencia, estos resultados permiten destacar las etiquetas K-5 con 20% YM como sistema eficaz para el monitoreo de la degradación en productos pesqueros. Valores similares de sensibilidad ( $v_r = 0,97$ ) fueron calculados a partir de los resultados reportados en sistemas a base de almidón y antocianinas provenientes de la piel de uvas para el monitoreo de carne de cerdo (Zhu *et al.*, 2021). Aunque ambos sistemas indicadores son similares en su sensibilidad para el monitoreo de frescura, cabe destacar que tanto las matrices a base de kéfir como el uso de yerba mate

residual han sido poco explorados para esta aplicación. Por lo tanto, este sistema adquiere relevancia debido a sus características innovadoras.

En concordancia con la *Figura 5.8.3*, el período de 4 a 7 días muestra una convergencia en la sensibilidad entre los distintos tipos de etiquetas, situación que no representa una limitación en su capacidad indicadora, ya que en esta fase el deterioro del producto resulta evidente tanto por el exceso del umbral de NBV como por el aroma característico de la degradación del pescado. Es importante destacar que, incluso en esta etapa avanzada, las etiquetas mantienen una sensibilidad equivalente o superior a la evaluación visual del pescado, particularmente cuando éste se encuentra envasado. Resulta significativo que, en este período, todos los sistemas basados en películas de kéfir con extracto de yerba mate superaron consistentemente al indicador de papel con YM, demostrando que la eficacia del sistema no depende exclusivamente del extracto activo, sino de la sinergia entre este componente y la matriz de kéfir. Este hallazgo refuerza la importancia del diseño integral del sistema indicador, donde la elección de la matriz polimérica resulta tan crucial como la selección del compuesto activo para lograr una óptima sensibilidad en la detección del deterioro.

Como complemento al estudio, se evaluó el cambio de color en el tejido del pescado para contrastar su sensibilidad con la de las etiquetas inteligentes. En la *Figura 5.8.4* se representó, en la parte inferior, el pescado coloreado con los valores promedio resultantes de las coordenadas CIELab y convertidas al espacio de color RGB. Al comparar la coloración de los distintos períodos se pudo observar que no hay diferencias visibles de color del pescado en el tiempo. Este resultado, como se mencionó anteriormente, reafirma la deficiencia de evaluar el grado de frescura del producto solo mediante inspección visual y la relevancia de utilizar las etiquetas indicadoras para facilitar el monitoreo del estado del producto.

Los resultados demostraron que los indicadores desarrollados detectan variaciones en los niveles de NBV antes de que estas alteraciones sean perceptibles visualmente en el producto, independientemente de su condición de envasado. Sin embargo, la interpretación de los cambios cromáticos en el tejido se ve limitada por la elevada variabilidad natural en la coloración de los filetes, lo que dificulta la identificación de zonas homogéneas para su análisis y añade un factor de incertidumbre en la evaluación visual. Esta heterogeneidad intrínseca, sumada a la subjetividad del método, confirma lo inadecuado de la observación directa sobre el producto como herramienta confiable para determinar el estado de frescura, reforzando la necesidad de los sistemas de indicación basados en una respuesta colorimétrica objetiva.

### **5.8.1 Conclusiones parciales**

En esta sección se estudió la aplicación de etiquetas inteligentes basadas en gránulos de kéfir con extracto de yerba mate residual para monitorear la calidad de filetes de merluza (*Merluccius hubbsi*). Los resultados mostraron que las etiquetas tuvieron un cambio de color perceptible en el día 4 de almacenamiento refrigerado, coincidiendo con la superación del límite regulatorio de NBV (30 mg/100 g). Este cambio colorimétrico, progresivo hacia tonalidades oscuras, mostró una correlación directa con la acumulación de compuestos nitrogenados volátiles.

Como resultado de este estudio también se observó que las etiquetas mantienen una sensibilidad superior a la observación directa del pescado. Se observó que la etiqueta K-5 con 20% YM tuvo una sensibilidad destacada por sobre los demás sistemas, dado que el cambio de color de las etiquetas se correlaciona de manera similar al cambio de NBV del pescado. Además, todas las formulaciones basadas en películas de kéfir con extracto de yerba mate superaron consistentemente al indicador de papel con extracto, demostrando que la eficacia del sistema no depende exclusivamente del extracto activo, sino de la sinergia entre este componente y la matriz de kéfir. En conclusión, las etiquetas de kéfir y yerba mate son un indicador eficaz, no invasivo y óptima sensibilidad para la evaluación objetiva de la frescura en productos pesqueros.

## 6 CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se desarrollaron y caracterizaron con éxito películas activas e inteligentes para el envasado de alimentos mediante la utilización de residuos y subproductos industriales, dando lugar a una revalorización de los mismos. Los resultados demostraron que la pared celular de levadura residual cervecera y los gránulos de kéfir de agua constituyen matrices biopoliméricas viables para la preparación de películas funcionales, mientras que los extractos de humo líquido refinado (HL) y yerba mate residual (YM) mostraron un destacado potencial como agentes bioactivos.

El extracto de HL se caracterizó por su potente actividad antioxidante y antimicrobiana, y que, en conjunto con la ausencia de aroma ahumado, lo convierten en un compuesto bioactivo adecuado para aplicaciones alimentarias. Por otra parte, el extracto de YM presentó elevado contenido en fenoles, actividad antioxidante y antimicrobiana frente a patógenos relevantes, junto con una respuesta cromática pH-dependiente que lo posiciona como alternativa prometedora para el desarrollo de etiquetas inteligentes.

Los extractos se incorporaron en matrices de pared celular de levadura cervecera residual y gránulos de kéfir de agua obteniéndose las películas YCW-R con HL, YCW-R con YM, K-5 con HL y K-5 con YM. Las características de cada material fueron dependientes de la matriz, del extracto y de su concentración en la película.

Las películas YCW-R presentaron una coloración marrón intenso, el cual se mantuvo con la incorporación de extracto HL, pero tras la incorporación de YM, su color evolucionó hacia tonalidades oscuras cercanas al negro. Estas matrices demostraron poseer actividad antioxidante intrínseca, la cual se potenció significativamente mediante la adición de los extractos de HL y YM en altas concentraciones. Cabe destacar que las formulaciones YCW-R con 10% de HL y 20% de YM exhibieron efectos antimicrobianos diferenciados frente a *Staphylococcus aureus*, manifestando actividad bactericida y bacterioestática, respectivamente. Además, se demostró que las propiedades mecánicas, térmicas, de hidratación y permeabilidad al vapor de agua de las películas YCW-R se vieron afectadas por la concentración de los extractos. En las películas producidas con bajas concentraciones de HL, se observó un efecto de entrecruzamiento con la matriz, obteniéndose películas más rígidas y mejor estabilidad térmica. Mientras que con altas concentraciones de HL mostraron un efecto plastificante. Este efecto produjo un incremento significativo de la permeabilidad al vapor de agua y de la capacidad de hidratación, acompañado de una disminución de la resistencia

mecánica y de la estabilidad térmica. Respecto al extracto de yerba mate (YM), se observó una mejora de las propiedades mecánicas atribuible al efecto de refuerzo estructural proporcionado por nanopartículas de lignocelulosa posiblemente presentes en el extracto. Estas mismas nanopartículas serían responsables del mejoramiento de las propiedades de barrera en las formulaciones con 20% de YM, reduciendo significativamente la permeabilidad al vapor de agua. Los estudios de migración de YCW-R con YM en simulante de alimento graso confirmaron una liberación controlada de compuestos bioactivos, observándose una actividad antioxidante dependiente de la concentración inicial de extracto que se incrementó progresivamente durante el período de estudio.

Las películas de gránulos de kéfir de agua (K-5) se destacaron por su transparencia, característica deseada para envases alimentarios y, especialmente, para el desarrollo de sistemas inteligentes. La incorporación de HL ejerció un efecto dependiente de la concentración: a bajas concentraciones, se observó una mejora significativa en las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al vapor de agua, atribuible a un efecto de entrecruzamiento molecular dentro de la matriz polimérica. Por el contrario, la incorporación al 10% HL indujo un marcado efecto plastificante, resultando en una disminución de la rigidez y la estabilidad térmica. No obstante, esta misma formulación exhibió la mayor actividad antioxidante y antimicrobiana entre los sistemas evaluados, atribuible a la liberación de compuestos bioactivos. Por su parte, la incorporación de YM en la matriz de kéfir mostró un refuerzo en las propiedades mecánicas y mejora en las propiedades barrera de las películas debido a la presencia de nanopartículas de lignocelulosa provenientes del extracto. Además, las películas K-5 20% YM mostraron la mayor actividad antioxidante y efecto bactericida frente a *Staphylococcus aureus*. Se observó que las películas K-5 con YM son altamente sensibles al amoníaco, exhibiendo cambios de color visibles que permitieron su aplicación como etiquetas inteligentes para monitorear en tiempo real la frescura de, por ejemplo, productos pesqueros.

La evaluación de las etiquetas inteligentes desarrolladas a partir de las películas K-5 con YM y aplicadas en filetes de merluza (*Merluccius hubbsi*) arrojaron resultados prometedores. En primer lugar, las etiquetas tuvieron un cambio de color perceptible en el día 4 de almacenamiento refrigerado, coincidiendo con la superación del límite regulatorio de nitrógeno básico volátil establecido en 30 mg/100 g de producto. En segundo lugar, este cambio colorimétrico fue progresivo hacia tonalidades oscuras en estadios de degradación evidente del pescado, mostrando una correlación directa con la acumulación de compuestos nitrogenados volátiles. En tercer lugar, se evidenció la destacada sensibilidad de la etiqueta K-5 20% YM

para el monitoreo de frescura de productos pesqueros. Por último, se evidenció que las etiquetas son un sistema indicador más eficiente y objetivo en comparación con la inspección visual del producto.

Esta investigación demuestra exitosamente la viabilidad de desarrollar materiales activos e inteligentes mediante la valorización de residuos agroindustriales y subproductos de fermentación, materializando el principio de economía circular "de la cuna a la cuna". La incorporación estratégica de extractos de humo líquido refinado y yerba mate residual permitió diseñar sistemas multifuncionales con propiedades personalizables, destacándose como barreras antioxidantes y antimicrobianas eficaces, además de funcionar como indicadores de frescura confiables.

Los desarrollos presentados ofrecen soluciones tecnológicamente avanzadas para la protección activa de alimentos mediante el control oxidativo y microbiano, la monitorización inteligente a través de respuestas cromáticas cuantificables y la sostenibilidad integral mediante la valorización de residuos. Estos avances representan una alternativa tangible a los envases convencionales, estableciendo nuevos paradigmas en el diseño de materiales biobasados que simultáneamente mejoran la seguridad alimentaria, reducen el desperdicio de alimentos, minimizan la dependencia de recursos no renovables y ofrecen transparencia al consumidor final.



## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir de los estudios realizados en este trabajo se plantearon los siguientes planes a futuro:

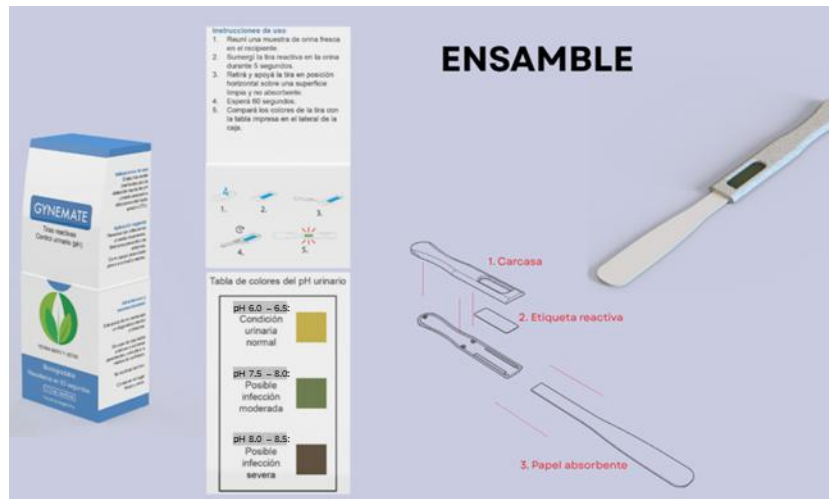
- Continuar con el estudio de actividad antimicrobiana de las películas desarrolladas frente a otras bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*) críticas de la industria alimentaria.
- Desarrollar etiquetas inteligentes a base de películas a base de kéfir utilizando pigmentos naturales con cambio de color en un amplio rango de pH, desde ácidos hasta alcalinos, este es el caso de las antocianinas del repollo colorado.
- Desarrollar un prototipo mejorado de las etiquetas inteligentes a base de kéfir y yerba mate, con un diseño atractivo y analizar su comercialización.
- Explorar aplicaciones potenciales de los materiales desarrollados en áreas de la cosmética, medicina, textil, decoración:
  1. Utilizar las películas a base de levadura residual cervecera como biocuero para el diseño de carteras, manteles, poza vasos y cuencos (*Figura 7.1*).



**Figura 7.1.** Poza vasos de levadura residual cervecera.

Fuente: Biomateriales – FADU UBA

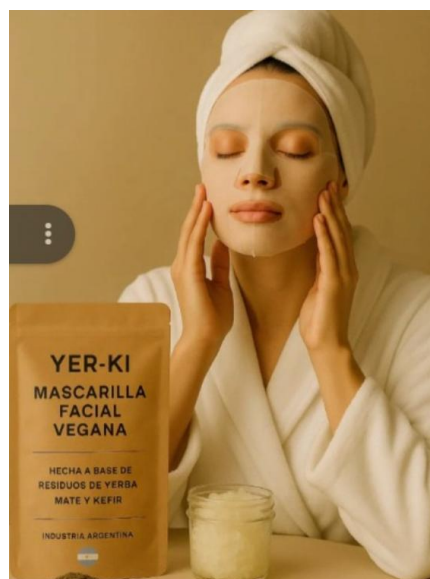
2. Utilizar las películas a base de kéfir y yerba mate para diseñar sensores detectores de infecciones urinarias (*Figura 7.2*). La orina de un paciente saludable tiene un pH de 6 – 7, mientras que en caso de una infección urinaria los valores de pH son superiores a 7, en concordancia con el cambio de color del sensor.



**Figura 7.2.** Sensores de infección urinaria a base de kéfir y yerba mate.

*Fuente:* Biomateriales – FADU UBA

3. Se propone también utilizar las películas a base de kéfir con yerba mate para el desarrollo de mascarillas cosméticas (*Figura 7.3*), con actividad antioxidante y propiedades beneficiosas para la piel.



**Figura 7.3.** Mascarillas cosméticas a base de kéfir y yerba mate.

*Fuente:* Biomateriales – FADU UBA

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Abotbina, W., Sapuan, S. M., Ilyas, R. A., Sultan, M. T. H., Alkbir, M. F. M., Sulaiman, S., & Bayraktar, E. (2022). Recent developments in cassava (*Manihot esculenta*) based biocomposites and their potential industrial applications: A comprehensive review. *Materials*, 15(19), 6992. <https://doi.org/10.3390/ma15196992>
- Al-Hassan AA & Norziah MH (2012). Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocoll.* <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.015>
- Alonso-González, M., Felix, M., Romero, A., Sergi, C., Bavasso, I., & Sarasini, F. (2025). Lab-scale biocomposite manufacturing: Exploring rice bran-based bioplastics reinforced with natural fillers through extrusion and injection molding. *Resources, Conservation and Recycling*, 212, 107990. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2024.107990>
- Argentina. (2024). *Código Alimentario Argentino: Capítulo XIII de bebidas fermentadas, artículo 1084 tris* [Resolución Conjunta Secretaría de Calidad en Salud y Secretaría de Bioeconomía N° 7/2024].
- Arrieta, M. P., Peponi, L., López, D., & Fernández-García, M. (2018). Recovery of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) residue for the development of PLA-based bionanocomposite films. *Industrial crops and products*, 111, 317-328. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.042>
- ASTM E2149-01, Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions (Withdrawn 2010); ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2001; Available online: [www.astm.org](http://www.astm.org).
- Azeredo HM & Waldron KW (2016). Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact—A review. *J. Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008>
- Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., Osman, M. A., Mortadza, S. A. S., & Alitheen, N. B. (2021). Kefir and Its Biological Activities. *Foods*, 10(6), 1210. <https://doi.org/10.3390/foods10061210>
- Baetge, S., & Kaltschmitt, M. (2018). Rice straw and rice husks as energy sources—comparison of direct combustion and biogas production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8(3), 719-737. <https://doi.org/10.1007/s13399-018-0321-y>
- Balbinot-Alfaro, E., Craveiro, D.V., Lima, K. *et al.* Intelligent Packaging with pH Indicator Potential. *Food Eng Rev* 11, 235–244 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09198-9>
- Bastos, D. H. M., De Oliveira, D. M., Matsumoto, R. T., Carvalho, P. D. O., & Ribeiro, M. L. (2007). Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*, 1(1), 37-46.
- Benbettaieb, N., Tanner, C., Cayot, P., Karbowski, T., & Debeaufort, F. (2018). *Impact of functional properties and release kinetics on antioxidant activity of biopolymer active films and coatings*. *Food chemistry*, 242, 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.065>
- Bos, H. L., Meesters, K. P., Conijn, S. G., Corré, W. J., & Patel, M. K. (2012). Accounting for the constrained availability of land: a comparison of bio-based ethanol, polyethylene, and PLA with regard to non-renewable energy use and land use. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(2), 146-158. <https://doi.org/10.1002/bbb.1320>
- Bosquez-Molina, E., Guerrero-Legarreta, I., & Vernon-Carter, E. J. (2003). Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum–candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*, 36(9-10), 885-893. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00097-8)
- Bracesco, N., Sanchez, A. G., Contreras, V., Menini, T., & Gugliucci, A. (2011). Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of ethnopharmacology*, 136(3), 378-384. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>
- Burkhard, I. R., Aon, M. A., Bonavigna, R. A., Kelly, C. L., & Villarreal, P. (2023). Presentación del trabajo “Relación entre el pH y el Nitrógeno Básico Volátil en filete de merluza como indicador de frescura” en las Jornadas Internacionales de Veterinaria. *SNS*, 2(11).

- Burris, K. P., Davidson, P. M., Stewart, Jr, C. N., & Harte, F. M. (2011). Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 76(6), M456-M462. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02255.x>
- Calliope, S. R., Slavutsky, A. M., Segura, N., & Samman, N. C. (2023). Application of an edible coating developed with Andean potato starch and carboxymethyl-cellulose for lipid reduction during frying. *Grasas y Aceites*, 74(4), e529-e529. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0103231>
- Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2019). Protein-based films: Advances in the development of biomaterials applicable to food packaging. *Food Engineering Reviews*, 11, 78-92. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09189-w>
- Campos, F. D. S., Ferrari, L. Z., Cassimiro, D. L., Ribeiro, C. A., De Almeida, A. E., & Gremião, M. P. D. (2016). Effect of 70-kDa and 148-kDa dextran hydrogels on praziquantel solubility. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123(3), 2157-2164. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4826-3>
- Carter, B. G., Cheng, N., Kapoor, R., Meletharayil, G. H., & Drake, M. A. (2021). Invited review: Microfiltration-derived casein and whey proteins from milk. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 2465-2479. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-18811>
- Ceballos, R. L., Ochoa-Yepes, O., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2020). Effect of yerba mate extract on the performance of starch films obtained by extrusion and compression molding as active and smart packaging. *Carbohydrate polymers*, 244, 116495. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116495>
- Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 223-237. <http://dx.doi.org/10.1080/10408690490464276>
- Choque E, Rezzani GD, Salvay AG, Mathieu F, Peltzer MA (2021). Impact of fungal extracts on the physical and antioxidant properties of bioactive films based on enzymatically hydrolyzed yeast cell wall. *J Polym Environ*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-020-02004-2>
- Choque, E., El Rayess, Y., Raynal, J. *et al.* Fungal naphtho- $\gamma$ -pyrones—secondary metabolites of industrial interest. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 1081–1096 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6295-1>
- Código Alimentario Argentino. (2023). *Capítulo VI: Alimentos cárnicos y afines. Artículo 272 bis*. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Coltelli, M. B., Wild, F., Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lindner, M., Schmid, M. & Lazzeri, A. (2015). State of the art in the development and properties of protein-based films and coatings and their applicability to cellulose based products: An extensive review. *Coatings*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3390/coatings6010001>
- Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120, 109234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>
- CONICET. (2023, 18 de mayo). Equipo del CONICET asesora la producción industrial de una bebida ancestral con múltiples beneficios para la salud. <https://www.conicet.gov.ar/equipo-del-conicet-asesora-la-produccion-industrial-de-una-bebida-ancestral-con-multiples-beneficios-para-la-salud/>
- Cottet, C., Ramirez-Tapias, Y. A., Delgado, J. F., de la Osa, O., Salvay, A. G., & Peltzer, M. A. (2020). Biobased Materials from Microbial Biomass and Its Derivatives. *Materials*, 13(6), 1263. <https://doi.org/10.3390/ma13061263>
- Cottet, C., Salvay, A. G., Peltzer, M. A., & Fernández-García, M. (2021). Incorporation of Poly(Itaconic Acid) with Quaternized Thiazole Groups on Gelatin-Based Films for Antimicrobial-Active Food Packaging. *Polymers*, 13(2), 200. <https://doi.org/10.3390/polym13020200>
- de Farias, N. S., Silva, B., de Oliveira Costa, A. C., & Müller, C. M. O. (2021). Alginate based antioxidant films with yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Characterization and kinetics of phenolic compounds release. *Food Packaging and Shelf Life*, 28, 100548. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100548>

- de Oliveira Filho, J. G., Bezerra, C. C. D. O. N., Albiero, B. R., Oldoni, F. C. A., Miranda, M., Egea, M. B., Ferreira, M. D. (2020). New approach in the development of edible films: The use of carnauba wax micro-or nanoemulsions in arrowroot starch-based films. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100589. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100589>
- Delgado J.F., Rodríguez C., Maggi N., Uhrig M.L., Peltzer M.A., Salvay A.G. Simplified alkali immersion route for converting water-kefir dextrans into films and the effect of glycerol plasticisation. (*Octubre 2025, Enviado a publicar*)
- Delgado JF, Peltzer MA, Salvay AG (2022). Water vapour transport in biopolymeric materials: Effects of thickness and water vapour pressure gradient on yeast biomass-based films. *J Polym Environ*. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02412-6>.
- Delgado JF, Peltzer MA, Salvay AG, de la Osa O, Wagner JR (2018a). Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innov Food Sci Emerg Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.017>
- Delgado, J. F. (2021). Desarrollo de películas multicomponentes a base de levadura. Evaluación de sus propiedades físicas y aplicaciones potenciales. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2949>
- Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Wagner, J. R., & Salvay, A. G. (2018b). Hydration and water vapour transport properties in yeast biomass based films: A study of plasticizer content and thickness effects. *European Polymer Journal*, 99, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.11.051>
- Delgado, J. F., Salvay, A. G., de la Osa, O., Wagner, J. R., & Peltzer, M. A. (2021). Impact of the film-forming dispersion pH on the properties of yeast biomass films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(13), 5636-5644. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11216>
- Deshmukh, R.K., Gaikwad, K.K. Natural antimicrobial and antioxidant compounds for active food packaging applications. *Biomass Conv. Bioref.* 14, 4419–4440 (2024). <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02623-w>
- Deshmukh, R.K., Hakim, L. & Gaikwad, K.K. Active Packaging Materials. *Curr Food Sci Tech Rep* 1, 123–132 (2023). <https://doi.org/10.1007/s43555-023-00004-6>
- Díaz-Montes, E. (2021). Dextran: sources, structures, and properties. *Polysaccharides*, 2(3), 554-565. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>
- Dodange, S., Shekarchizadeh, H. & Kadivar, M. A Simple Colorimetric Volatile Nitrogen and Hydrogen Sulfide Indicator Based on Filter Paper and Saffron Petal Anthocyanins to Monitor Fish Spoilage in Intelligent Packaging. *Food Bioprocess Technol* 17, 1785–1796 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03232-9>
- Dokl, M., Copot, A., Krajnc, D., Van Fan, Y., Vujanović, A., Aviso, K. B., & Čuček, L. (2024). Global projections of plastic use, end-of-life fate and potential changes in consumption, reduction, recycling and replacement with bioplastics to 2050. *Sustainable Production and Consumption*, 51, 498-518. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2024.09.025>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants*, 8(10), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- Dutta, D., Sit, N. Comparison of properties of films prepared from casein modified by ultrasound and autoclave treatment. *Food Measure* 17, 5426–5439 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02037-w>
- Eissenberger, K., Ballesteros, A., De Bisschop, R., *et al.*, (2023). Approaches in Sustainable, Biobased Multilayer Packaging Solutions. *Polymers*, 15(5), 1184. <https://doi.org/10.3390/polym15051184>
- European Commission. (2019). Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls. *Off. J. Eur. Union L*, 131, 51-100.
- Ezati, P., Tajik, H., & Moradi, M. (2019). Fabrication and characterization of alizarin colorimetric indicator based on cellulose-chitosan to monitor the freshness of minced beef. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285, 519-528. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.089>

- Fan, Y., Yin, C., Xu, L., Bai, R., Wei, Z., Gao, G., & Pi, Y. (2025). The Biological Functions of Yeast and Yeast Derivatives and Their Application in Swine Production: A Review. *Microorganisms*, 13(7), 1669. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13071669>
- Felton, L. A. (2013). Mechanisms of polymeric film formation. *International journal of pharmaceutics*, 457(2), 423-427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.027>
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Tavarela, J. G. (2010). Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.008>
- Fu, D. W., Fu, J. J., Li, J. J., Tang, Y., Shao, Z. W., Zhou, D. Y., & Song, L. (2022). Efficient encapsulation of curcumin into spent brewer's yeast using a pH-driven method. *Food Chemistry*, 394, 133537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133537>
- Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I., & Mohammadi, R. (2017). Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 687-707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>
- Gigante, V., Panariello, L., Coltelli, M. B., Danti, S., Obisesan, K. A., Hadrich, A., Cinelli, P. (2021). Liquid and solid functional bio-based coatings. *Polymers*, 13(21), 3640. <https://doi.org/10.3390/polym13213640>
- Guggenheim EA (1966) *Applications of statistical mechanics*. Claredon Press, Oxford
- Guillard, V., Gaucel, S., Fornaciari, C., Angellier-Coussy, H., Buche, P., & Gontard, N. (2018). The next generation of sustainable food packaging to preserve our environment in a circular economy context. *Frontiers in nutrition*, 5, 121. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00121>
- Gülçin I (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino acids*, 32, 431-438.
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International journal of food microbiology*, 151(3), 284-288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>
- Ibrahim, M. A., Alhalafi, M. H., Emam, E.-A. M., Ibrahim, H., & Mosaad, R. M. (2023). A Review of Chitosan and Chitosan Nanofiber: Preparation, Characterization, and Its Potential Applications. *Polymers*, 15(13), 2820. <https://doi.org/10.3390/polym15132820>
- Instituto Nacional de la Yerba Mate – (INYM). (2024). [www.inym.org.ar](http://www.inym.org.ar) Consultado 4 de mayo de 2025.
- Jaeger, A., Arendt, E. K., Zannini, E., & Sahin, A. W. (2020). Brewer's Spent Yeast (BSY), an Underutilized Brewing By-Product. *Fermentation*, 6(4), 123. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040123>
- Jaehrig SC, Rohn S, Kroh LW, Wildenauer FX, Lisdat F, Fleischer LG, Kurz T (2008). Antioxidative activity of (1→3),(1→6)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *Food Sci Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.004>
- Jamroz E, Kopel P, Tkaczewska J, Dordevic D, Jancikova S, Kulawik P, Adam V (2019) Nanocomposite furcellaran films. The influence of nanofillers on functional properties of furcellaran films and effect on linseed oil preservation. *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/polym11122046>
- Jaramillo, C., Gonzalez Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2015). Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. *Starch-Stärke*, 67(9-10), 780-789. <https://doi.org/10.1002/star.201500033>
- Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S. S. M., & Xu, B. (2018). A critical review on the impacts of β-glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of nutritional biochemistry*, 61, 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100394>
- Kan, M., & Miller, S. A. (2022). Environmental impacts of plastic packaging of food products. *Resources, Conservation and Recycling*, 180, 106156. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106156>
- Khan, A., Khan, R. A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J. & Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based

- nanocomposite films. *Carbohydrate polymers*, 90(4), 1601-1608. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.037>
- Kjellgren, H., Gällstedt, M., Engström, G., & Järnström, L. (2006). Barrier and surface properties of chitosan-coated greaseproof paper. *Carbohydrate polymers*, 65(4), 453-460. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.005>
  - Kumar, N., Tripathi, S., Pratibha, Mehra, M., Heena, Trajkovska Petkoska, A. (2023). Whey Protein Based Edible Coatings: Recent Trends. In: Poonia, A., Trajkovska Petkoska, A. (eds) *Whey Valorization*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-5459-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-99-5459-9_10)
  - Kumari, S., & Rath, P. K. (2014). Extraction and characterization of chitin and chitosan from (Labeo rohita) fish scales. *Procedia Materials Science*, 6, 482-489. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.062>
  - Lago, A., Delgado, J. F., Rezzani, G. D., Cottet, C., Ramírez Tapias, Y. A., Peltzer, M. A., & Salvay, A. G. (2023). Multi-Component Biodegradable Materials Based on Water Kefir Grains and Yeast Biomasses: Effect of the Mixing Ratio on the Properties of the Films. *Polymers*, 15(12), 2594. <https://doi.org/10.3390/polym15122594>
  - Lanvers, P., Broeker, J., & Schmid, J. (2025). Clinical-type dextran: A review on process and enzyme engineering strategies to control molecular weight distribution. *Carbohydrate Polymers*, 123783. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123783>
  - Lilavanichakul, A., & Yoksan, R. (2023). Development of Bioplastics from Cassava toward the Sustainability of Cassava Value Chain in Thailand. *Sustainability*, 15(20), 14713. <https://doi.org/10.3390/su152014713>
  - Lingbeck, J. M., Cordero, P., O'Bryan, C. A., Johnson, M. G., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014). Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science*, 97(2), 197-206. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.003>
  - Liu CK, Fishman ML, Hicks KB (2007). Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf062612u>
  - Loviso, C. L., & Libkind, D. (2018). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: Esters. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436-446. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
  - Lozano-Navarro JI, Díaz-Zavala NP, Velasco-Santos C, Melo-Banda JA, Páramo-García U, Paraguay-Delgado F, Zapién-Castillo S (2018). Chitosan-starch films with natural extracts: Physical, chemical, morphological and thermal properties. *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma11010120>
  - Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Frontiers in microbiology*, 6, 611. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00611>
  - Mali S, Grossmann MVE, García MA, Martino MN, Zaritzky NE (2004). Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydr. Polym.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.01.004>
  - Martin, J. G. P., Porto, E., de Alencar, S. M., da Glória, E. M., Corrêa, C. B., & Cabral, I. S. R. (2013). Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. *Revista Argentina de microbiología*, 45(2), 93-98. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70006-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70006-3)
  - Min, J. H., Lee, Y. J., Kang, H. J., Moon, N. R., Park, Y. K., Joo, S. T., & Jung, Y. H. (2024). Characterization of yeast protein hydrolysate for potential application as a feed additive. *Food science of animal resources*, 44(3), 723. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2024.e33>
  - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2010). *Análisis de producto: Cerveza*. Alimentos Argentinos. <https://www.alimentosargentinos.gob.ar>
  - Mokrzycki, W. S., & Tatol, M. (2011). Colour difference  $\Delta$ LEA survey. *Mach. Graph. Vis*, 20(4), 383-411.
  - Montazeri, N., Himelbloom, B. H., Oliveira, A. C., Leigh, M. B., & Crapo, C. A. (2013a). Refined liquid smoke: A potential antilisterial additive to cold-smoked sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of food protection*, 76(5), 812-819. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-368>

- Montazeri, N., Oliveira, A. C., Himelbloom, B. H., Leigh, M. B., & Crapo, C. A. (2013b). Chemical characterization of commercial liquid smoke products. *Food science & nutrition*, 1(1), 102-115. <https://doi.org/10.1002%2Ffsn3.9>
- Moretti, A. F., Moure, M. C., Quiñoy, F., Esposito, F., Simonelli, N., Medrano, M., & León-Peláez, Á. (2022). Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, 5, 100123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>
- Muneer, F., Nadeem, H., Arif, A., & Zaheer, W. (2021). Bioplastics from biopolymers: an eco-friendly and sustainable solution of plastic pollution. *Polymer Science, Series C*, 63(1), 47-63. <https://doi.org/10.1134/S1811238221010057>
- Naessens, M., Cerdobbel, A. N., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). Leuconostoc dextranase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 80(8), 845-860. <https://doi.org/10.1002/jctb.1322>
- Nemes, S. A., Szabo, K., & Vodnar, D. C. (2020). Applicability of Agro-Industrial By-Products in Intelligent Food Packaging. *Coatings*, 10(6), 550. <https://doi.org/10.3390/coatings10060550>
- Oliver-Cuenca, V., Salaris, V., Muñoz-Gimena, P. F., Agüero, Á., Peltzer, M. A., *et al.* (2024). Bio-Based and Biodegradable Polymeric Materials for a Circular Economy. *Polymers*, 16(21), 3015. <https://doi.org/10.3390/polym16213015>
- Oyom, W., Zhang, Z., Bi, Y., & Tahergorabi, R. (2022). Application of starch-based coatings incorporated with antimicrobial agents for preservation of fruits and vegetables: A review. *Progress in Organic Coatings*, 166, 106800. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.106800>
- Özeren, H. D., Wei, X. F., Nilsson, F., Olsson, R. T., & Hedenqvist, M. S. (2021). Role of hydrogen bonding in wheat gluten protein systems plasticized with glycerol and water. *Polymer*, 232, 124149. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124149>
- Papadopoulou, D., Chrysikopoulou, V., Rampaouni, A., & Tsoupras, A. (2024). Antioxidant and anti-inflammatory properties of water kefir microbiota and its bioactive metabolites for health promoting bio-functional products and applications. *AIMS microbiology*, 10(4), 756. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2024034>
- Papadopoulou, D., Chrysikopoulou, V., Rampaouni, A., Plakidis, C., Ofrydopoulou, A., Shiels, K., & Tsoupras, A. (2025). Antioxidant, Antithrombotic and Anti-Inflammatory Properties of Amphiphilic Bioactives from Water Kefir Grains and Its Apple Pomace-Based Fermented Beverage. *Antioxidants*, 14(2), 164. <https://doi.org/10.3390/antiox14020164>
- Park, H. J., Kim, S. H., Lim, S. T., Shin, D. H., Choi, S. Y., & Hwang, K. T. (2000). Grease resistance and mechanical properties of isolated soy protein-coated paper. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(3), 269-273. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0044-2>
- Peltzer MA, Salvay AG, Delgado JF, de la Osa O, Wagner JR (2018a). Use of residual yeast cell wall for new biobased materials production: Effect of plasticization on film properties. *Food Bioproc Tech.* <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2156-8>
- Peltzer, M. A., Salvay, A. G., Delgado, J. F., & Wagner, J. R. (2017). Use of edible films and coatings for functional foods developments: A review. *Functional foods sources, health effects and future perspectives; Nelson, DL, Ed*, 1-26.
- Peltzer, M., Delgado, J. F., Salvay, A. G., & Wagner, J. R. (2018b).  $\beta$ -Glucan, a promising polysaccharide for bio-based films developments for food contact materials and medical applications. *Current Organic Chemistry*, 22(12), 1249-1254. <https://doi.org/10.2174/1385272822666171129153633>
- Perera, K. Y., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2023). Biopolymer-Based Sustainable Food Packaging Materials: Challenges, Solutions, and Applications. *Foods*, 12(12), 2422. <https://doi.org/10.3390/foods12122422>
- Peron-Schlosser, B., Carpiné, D., Matos Jorge, R. M., & Rigon Spier, M. (2021). Optimization of wheat flour by product films: A technological and sustainable approach for bio-based packaging material. *Journal of Food Science*, 86(10), 4522-4538. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15908>
- Pranoto Y, Lee CM, Park HJ (2007). Characterizations of fish gelatin films added with gellan and  $\kappa$ -carrageenan. *Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.04.005>

- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Priyadarshi, R., Ezati, P., & Rhim, J. W. (2021). Recent advances in intelligent food packaging applications using natural food colorants. *ACS Food Science & Technology*, 1(2), 124-138. <https://dx.doi.org/10.1021/acscfoodscitech.0c00039>
- Rahmasari Y & Yemiş GP (2022). Characterization of ginger starch-based edible films incorporated with coconut shell liquid smoke by ultrasound treatment and application for ground beef. *Meat Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108799>
- Ramirez Tapias Y.A., Rezzani G.D., Delgado J.F., Peltzer M.A., Salvay A.G. New materials from the integral milk kefir grain biomass and the purified kefir: The role of glycerol content on the film's properties. *Polymers*, 16, 3106 (2024). <https://doi.org/10.3390/polym16223106>
- Ramirez Tapias YA, Di Monte MV, Peltzer MA, Salvay AG (2022). Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131346>
- Ramírez Tapias YA, Peltzer MA, Delgado JF, Salvay AG (2020). Kombucha tea by-product as source of novel materials: Formulation and characterization of films. *Food Bioproc Tech.* <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02471-4>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rezaei, M., & Liu, B. (2017). *Food Loss and Waste in the Food Supply Chain. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*.
- Rezzani, G. D., Choque, E., Salvay, A. G., Mathieu, F., & Peltzer, M. A. (2022). New Antioxidant Active Packaging Films Based on Yeast Cell Wall and Naphtho- $\gamma$ -Pyrone Extract. *Polymers*, 14(10), 2066. <https://doi.org/10.3390/polym14102066>
- Rezzani, G.D., Salvay, A.G. & Peltzer, M.A. Bioactive Materials from Brewery Yeast Cell Wall Residues with the Addition of Refined Liquid Smoke: Development and Study of Functional Properties. *J Polym Environ* 32, 3285–3297 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10924-023-03165-6>
- Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Kilinçarslan, Ö., Mammadov, R., & Bardaweel, S. K. (2019). Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2556-y>
- Rojas-Graü M. A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O. (2009). *Edible coatings to incorporate active ingredients to freshcut fruits: a review*. Trends in Food Science and Technology. 20 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.002>
- Salvay, A. G., Colombo, M. F., & Grigera, J. R. (2003). Hydration effects on the structural properties and haem-haem interaction in haemoglobin. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5(1), 192-197. <https://doi.org/10.1039/B209560B>
- Samir, A., Ashour, F.H., Hakim, A.A.A. *et al.* Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. *npj Mater Degrad* 6, 68 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00277-7>
- Sceni, P., Palazolo, G. G., Vasallo, M. C., Puppo, M. C., Otero, M. A., & Wagner, J. R. (2009). Thermal and surface behavior of yeast protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Science and Technology*, 42(6), 1098–1106
- Senturk Parreidt, T., Müller, K., & Schmid, M. (2018). Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. *Foods*, 7(10), 170. <https://doi.org/10.3390/foods7100170>
- Serra, M., Gudina, E., Botelho, C., Teixeira, J. A., & Barros, A. N. (2024). Polyglutamate: Unleashing the Versatility of a Biopolymer for Cosmetic Industry Applications. *Cosmetics*, 11(3), 76. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11030076>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26(3), 246-265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>

- Sharma, M., Tellili, N., Kacem, I., & Rouissi, T. (2024). Microbial Biopolymers: From Production to Environmental Applications—A Review. *Applied Sciences*, 14(12), 5081. <https://doi.org/10.3390/app14125081>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Soazo M, Pérez LM, Piccirilli GN, Delorenzi NJ, Verdini RA (2016). Antimicrobial and physicochemical characterization of whey protein concentrate edible films incorporated with liquid smoke. *LWT- Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.027>
- Soldera, S., Sebastianutto, N., & Bortolomeazzi, R. (2008). Composition of phenolic compounds and antioxidant activity of commercial aqueous smoke flavorings. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8), 2727-2734.
- Stasi, E., Giuri, A., Ferrari, F., Armenise, V., Colella, S., Listorti, A., Rizzo, A., Ferraris, E., & Esposito Corcione, C. (2020). Biodegradable Carbon-based Ashes/Maize Starch Composite Films for Agricultural Applications. *Polymers*, 12(3), 524. <https://doi.org/10.3390/polym12030524>
- Szymańska-Chargot, M., Chylińska, M., Gdula, K., Koziół, A., & Zdunek, A. (2017). Isolation and characterization of cellulose from different fruit and vegetable pomaces. *Polymers*, 9(10), 495. <https://doi.org/10.3390/polym9100495>
- Tejinder, S. (2003). Preparation and Characterization of Films Using Barley and Oat  $\beta$ -Glucan Extracts. *Cereal chemistry*, 80(6), 728-731. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2003.80.6.728>
- Toledo RT (2007) Wood smoke components and functional properties. Smoked seafood safety. 55. <https://doi.org/10.4027/isscp.2008.12>
- Tovar del Rio, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera* (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología, Escuela de Tecnología Química, Pereira.
- Ullah K, Khan SA, Murtaza G, Sohail M, Manan A, Afzal A (2019). Gelatin-based hydrogels as potential biomaterials for colonic delivery of oxaliplatin. *Int. J. Pharm.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.020>
- UNE-EN 13130. (2005). Materials and articles in contact with foodstuffs- Plastic substances subject to limitation. *Part 1: guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants.*
- Uribarrena, M., Carranza, T., Osquilla, I., Irastorza, A., de la Caba, K., & Guerrero, P. (2025). Assessment of soy protein addition to develop bio-based inks and biocompatible scaffolds by digital light processing 3D printing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145566. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145566>
- van Overveld FW, Haenen GR, Rhemrev J, Vermeiden JP, Bast A (2000). Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem. Biol. Interact.* [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00179-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00179-4)
- Vijayan, S. P., Aparna, S., & Sahoo, S. K. (2023). Effect of beeswax on hydrophobicity, moisture resistance and transparency of UV curable linseed oil based coating for compostable paper packaging. *Industrial Crops and Products*, 197, 116645. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116645>
- Wang W, Li C, Zhang H, Ni Y (2016). Using liquid smoke to improve mechanical and water resistance properties of gelatin films. *J. Food Sci.* <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13282>
- Wang, L., Wang, Q., Fu, N., Song, M., Han, X., Yang, Q. & Zhang, J. (2023). Cyanidin-3-O-glucoside contributes to leaf color change by regulating two bHLH transcription factors in *Phoebe bournei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3829. <https://doi.org/10.3390/ijms24043829>
- Xin X, Bissett A, Wang J, Gan A, Dell K, Baroutian S (2021) Production of liquid smoke using fluidised-bed fast pyrolysis and its application to green lipped mussel meat. *Food Control.* <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107874>

- 
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Intelligent packaging: concepts and applications. *Journal of food science*, 70(1), R1-R10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09052.x>
  - Yu C, Chen H, Du D, Lv W, Li S, Li D, Liu D (2021).  $\beta$ -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* alleviates oxidative stress in LPS-stimulated RAW264. 7 cells via Dectin-1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Cell Stress and Chaperones*. <https://doi.org/10.1007/s12192-021-01205-5>
  - Zhai, X., Shi, J., Zou, X., Wang, S., Jiang, C., Zhang, J., & Holmes, M. (2017). Novel colorimetric films based on starch/polyvinyl alcohol incorporated with roselle anthocyanins for fish freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, 69, 308-317.
  - Zhang, H., & Sablani, S. (2021). Biodegradable packaging reinforced with plant-based food waste and by-products. *Current Opinion in Food Science*, 42, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.05.003>
  - Zhang, H., Hou, A., Xie, K., & Gao, A. (2019). Smart color-changing paper packaging sensors with pH sensitive chromophores based on azo-anthraquinone reactive dyes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 286, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.165>
  - Zhang, Z., Sun, Y., Sang, S., Jia, L., & Ou, C. (2022). Emerging approach for fish freshness evaluation: principle, application and challenges. *Foods*, 11(13), 1897. <https://doi.org/10.3390/foods11131897>
  - Zhao, Y., Du, J., Zhou, H., Zhou, S., Lv, Y., Cheng, Y. & Wang, H. (2022). Biodegradable intelligent film for food preservation and real-time visual detection of food freshness. *Food Hydrocolloids*, 129, 107665. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107665>
  - Zhong, Y., Godwin, P., Jin, Y., & Xiao, H. (2020). Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002>
  - Zhu, B., Lu, W., Qin, Y., Cheng, G., Yuan, M., & Li, L. (2021). An intelligent pH indicator film based on cassava starch/polyvinyl alcohol incorporating anthocyanin extracts for monitoring pork freshness. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(10), e15822. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15822>

