

Tesista: Laura Neira Hazime

Título al que aspira: Doctor en Ciencia de Materiales, UNMdP

Tema: “Películas Comestibles de Gelatina de Pescado con Actividad Antioxidante. Obtención y Caracterización *in vitro* e *in vivo*”

Directora: Dr. Roxana Ruseckaite

Codirectora: Dra. Josefa Martucci

Lugar de Trabajo: Facultad de Ingeniería, UNMdP

Fecha de Defensa: 30 de marzo de 2017

Jurados:

Dra. Carmen Campos (UBA-CONICET)

Dr. Peter Purslow (INCPBA)

Dra Alejandra Ponce (CDS, CONICET – UNMdP)

Resumen

La gelatina de pescado (GP) es una proteína de origen animal y soluble en agua que puede extraerse del tejido conectivo, piel y huesos de pescados de agua fría y cálida. Tiene la particularidad de generar películas con buenas propiedades de barrera a gases en ambientes secos, es biocompatible y no tóxica. La utilización de películas comestibles basadas en gelatina de pescado como vehículo aditivos funcionales (agentes antioxidantes y/o antibacterianos) puede constituir una alternativa para prolongar la vida útil, higiene y seguridad alimenticia de alimentos frescos o precocidos.

La **motivación** del presente estudio fue elaborar películas comestibles de gelatina de pescado con actividad antioxidante a partir de la mezcla o injerto covalente de un compuesto fenólico natural y generalmente reconocido como seguro (GRAS), carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), evaluar su actividad antioxidante *in vitro* mediante ensayos clásicos y determinar su eficiencia como envase comestible para prologar la calidad de medallones de merluza empanados pre-fritos durante su conservación a -4 ± 1 °C. La investigación se organizó en 6 capítulos y un apéndice.

El **Capítulo 1** presenta una introducción y el marco teórico del tema, analizando los últimos avances en el campo de las películas de gelatina de pescado con actividad antioxidante destinadas al envasado de alimentos, incluidos los métodos de fabricación y las posibles aplicaciones en los productos alimenticios. Partiendo de este punto, se propusieron objetivos principales y específicos.

En el **Capítulo 2** se planteó la búsqueda de una formulación con propiedades fisicoquímicas adecuadas para ser utilizada como envase comestible. Se observó que las películas con 20 % de glicerol (sobre una base de gelatina seca) como plastificante exhibían el mejor conjunto de propiedades para ser utilizadas como matriz para la incorporación de un agente activo. Los valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) y de contenido de humedad (MC) resultaron estadísticamente similares a los obtenidos para las películas con 10% en peso de glicerol (8.82 ± 0.71 g / Pa.h.cm y 13.22 ± 0.64 %, respectivamente), pero la elongación ($\epsilon\%$) mejoró 6 veces mientras la resistencia a la tracción (TS) disminuyó hasta 6.95 ± 0.71 MPa, estando en el mismo rango de valores informados para otras películas comestibles basadas en proteínas destinadas a aplicaciones de envasado de alimentos.

El **Capítulo 3** abarca el procesamiento y caracterización de películas de gelatina modificadas con cantidades variables de carvacrol (CRV, 0-0.6 % en peso sobre base de gelatina seca) y plastificadas con un 20 % de glicerol (GP-CRV). La inclusión de cantidades crecientes de CRV en la solución formadora de película alteró el comportamiento de las soluciones, aumentó la viscosidad aparente y acortó los tiempos de gelación. A partir de estas características, se fijaron las condiciones de secado para elaborar las películas. La polaridad superficial, MC y WVP se mejoraron en aproximadamente 20 %, 14 % y 60 %, respectivamente, respecto de la película sin CRV al añadir 0.6 % CRV. La retracción en MC indujo una disminución en $\epsilon\%$ con el concomitante aumento de TS. Esto se relacionó con la formación de interacciones entre CRV y gelatina durante la etapa de secado. La actividad antioxidante *in vitro* para GP-0.6CRV determinada como la capacidad para desactivar radical al libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (RAS%) y capacidad reductora frente al ión férrico (FRAP) resultaron 56.2 ± 1.2 % y 350.7 ± 40.2 ppm AAE/g, respectivamente. Las películas control (GP-0CRV) y GP-0.6CRV se almacenaron a 25 ± 2 °C y HR al 65 % para evaluar la estabilidad de las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes en el tiempo. Ambas películas disminuyeron sus valores de MC y WVP durante la primera semana debido a la migración de glicerol y carvacrol, como se evidenció por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), respectivamente. Desde la segunda semana hasta el final del estudio, MC y $\epsilon\%$ aumentaron con la reducción simultánea de TS. Los valores de WVP apenas variaron hasta el final del estudio, siendo los valores de la película GP-0.6CRV los más bajos durante todo el período. La actividad antioxidante de la película GP-0.6CRV experimentó una reducción significativa durante 15 días de almacenamiento. El valor de RS declinó al cabo de 15 días desde $56.2 \pm 1.2\%$ hasta $1.3 \pm 0.1\%$, en consistencia con la migración de CRV durante el almacenamiento.

En función de los resultados obtenidos en el Capítulo 3, se buscó una estrategia que permitiera mejorar la estabilidad de la actividad antioxidante de las películas de gelatina. Esto se consiguió mediante el injerto de CRV sobre la cadena principal de gelatina de pescado a través de un procedimiento de injerto radicalario de un solo paso, usando un sistema de iniciador de radicales de ácido ascórbico / peróxido de hidrógeno soluble en agua y ambientalmente benigno (**Capítulo 4**). Las condiciones de reacción se optimizaron variando la concentración de CRV. La síntesis se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente con el fin de conservar la gelatina de pescado y la integridad antioxidante. El contenido total de fenoles (TPC) de la gelatina injertada, determinada por

Folin-Ciocalteu, se incrementó 2.96 ± 0.13 mg AG/g de gelatina injertada respecto al control GP. Los resultados de la espectroscopia UVvisible, FTIR y resonancia magnética nuclear de H (HNMR) verificaron la inserción de CRV en GP. La gelatina de pescado injertada mostró una RSA% dependiente de la concentración, alcanzando un plateau aproximadamente de 80 % (equivalente a 43.5 mg CRV/gGP-g-CRV), la cual se mantuvo invariable durante 21 días. Se elaboraron películas mezclando partes iguales (en masa) de gelatina de pescado y gelatina de pescado injertada con CRV (GP/GP-g-CRV) y 20 % en peso de glicerol, y se almacenaron a 25 ± 2 °C y 65 % RH durante 21 días. Las propiedades fisicoquímicas de las películas injertadas evolucionaron con el tiempo de forma similar a las de GP-0.6CRV, sin embargo las GP/GP-g-CRV mantuvieron el RSA% inicial invariable hasta el final del estudio, demostrando la eficacia del injerto.

Se probó la eficiencia de las películas comestibles GP/GP-g-CRV y GP-0.6CRV sobre la conservación de medallones de merluza empanados pre-fritos comerciales. (**Capítulo 5**). Las muestras de medallones de merluza se envolvieron en sendas películas de activas gelatina de pescado y los envases se termosellaron y almacenaron a -4 ± 1 °C durante 49 días. Se usaron películas GP-0CRV y medallones sin envolver como controles. Se extrajeron muestras a tiempos pre determinados y se analizaron las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas (pH, nitrógeno básico volátil total (NBVT), índice de peróxido (IP), índice de oxidación total (IT) e índice de anisidina (IA) del producto envasado. Durante todo el período de almacenamiento, el valor de NBVT y los conteos de bacterias psicrótrofas totales arrojaron valores significativamente menores en el medallón de pescado envuelto con la película GP-0.6CRV en comparación con el alimento sin envolver y el envasado en la película GP y GP/GP-g-CRV. Los valores de IP, IA e IT se redujeron en 30%, 16% y 18%, respectivamente, en comparación con los controles. La película GP/GP-g-CRV no resultó una barrera eficiente para reducir el deterioro microbiano ni la oxidación, probablemente asociado a que el activo se encuentra injertado en la matriz impidiendo su migración hacia el alimento. Se envasaron muestras de los medallones en películas GP-0CRV y GP-0.6CRV, se frieron y se evaluó su aceptación por un panel sensorial de evaluadores no entrenados. De acuerdo con el análisis estadístico de las especificaciones sensoriales, las muestras envueltas en las películas comestibles GP-0.6CRV evidenciaron un nivel favorable de aceptación a excepción de algunos atributos de olor y sabor impartidos en el alimento. Los resultados indican que la película de GP-0.6CRV desarrollada es eficiente en la prolongación de la vida de almacenamiento del medallón de merluza empanado pre-cocido.

El **Capítulo 6** destaca los principales hallazgos del presente trabajo.

En el **Apéndice A** se describen los materiales, métodos y técnicas utilizados en el presente trabajo.

Abstract

The rising interest in putting by-products from the fish industry to good use is one of the reasons why the industrial production of fish gelatin has been growing in recent years. Fish gelatin (GP), a water-soluble protein from cold and hot water fish has been extensively studied for its film forming capacity and applicability as an outer covering to protect food against drying, light, and oxygen. Moreover, it is one of the materials proposed as a carrier

of bio-active components. Due to their good film-forming abilities and excellent barrier against oxygen and aromas, fish gelatin films may be suitable alternatives, at least in part, to synthetic plastics for making films to preserve foodstuffs. Furthermore, enriching these films with functional additives allows antioxidant and /or antibacterial aspects to be enhanced without affecting the integrity of the food product. The high hygroscopic nature of gelatin represents the main drawback in the industrial application of the resultant films because they tend to swell or dissolve in contact with the surface of foodstuffs with high water activity. To avoid this, the application of fish gelatin films as edible coatings or packages may constitute an alternative to prolong the shelf life of fresh or pre-cooked foodstuffs.

Accordingly, the **motivation** of the present study was to develop edible fish gelatin films with antioxidant activity by introducing a natural and generally recognized as safe (GRAS) phenolic antioxidant, carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol), by blending or grafting onto the fish gelatin backbone, evaluate their antioxidant activity by classical *in vitro* assays and determine their efficiency as edible packaging material for extending the storage life of commercially available pre-fried breaded fish medallion. The investigation was organized in 6 chapters and an appendix.

Chapter 1 provides an introduction and the main background and framework of the topic, reviewing the latest advances on the field of antioxidant fish gelatin films intended for food packaging, including manufacturing methods and potential applications on foodstuffs. Starting from this point, main and specific objectives were proposed.

Chapter 2 deals with the selection of a film formulation with adequate physicochemical properties for acting as edible packaging. Films containing 20 wt% of glycerol (on dry gelatin basis) as a plasticizer exhibited the best set of properties for enriching these films with the active compound. Water vapor permeability (WVP) and the moisture content (MC) values were statistically similar to those obtained for films with 10 wt% glycerol (8.82 ± 0.71 g/Pa·h·cm and 13.22 ± 0.64 %, respectively) but the elongation (ϵ %) was improved 6 times while the tensile strength (TS) decreased up to 6.95 ± 0.71 MPa, being in the same range found for other protein-based films intended for edible food packaging applications.

Chapter 3 covers the processing and characterization of gelatin films modified with varying amounts of carvacrol (CRV, 0-0.6 wt% on dry gelatin basis) and plasticized by 20 wt% of glycerol (GP-CRV). The inclusion of increasing amounts of CRV in the film-forming solution altered the aggregation behavior, increased the apparent viscosity and shortened the gelation times. From these features, the drying conditions to elaborate the films were fixed. Surface polarity, MC and WVP were improved in about 20 %, 14 % and 60 %, respectively, by adding the highest CRV level (0.6 wt%). The retraction in MC induced a decrease in ϵ % while TS increased. This was linked to the interactions between CRV and gelatin through developed during the drying step. The *in vitro* antioxidant activity determined as the radical scavenging activity (RAS) against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical and the ferric reducing antioxidant power (FRAP) resulted 56.2 ± 1.2 % and 350.7 ± 40.2 ppm AAE/g, respectively, for GP-0.6CRV. Control (GP-0CRV) and GP-0.6CRV films were stored at 25 ± 2 °C and 65 %RH to evaluate the stability of the physicochemical and antioxidant properties with time. Films decreased their MC and WVP values during the first week of storage due to the migration of glycerol and carvacrol, as evidenced by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and high performance liquid chromatography (HPLC),

respectively. From the second week up to the end of the study, MC and ϵ increased with the simultaneous reduction in TS. WVP values barely varied until the end of the experiment, being those of the GP-0.6CRV film the lowest during all the period. The antioxidant activity of the GP-0.6CRV film experienced a significant reduction over 15 days of storage. As an example, RSA values ranged between 56.2 ± 1.2 and 1.3 ± 0.1 %, considering both the initial and final time. This was consistent with the migration of CRV upon storage.

Chapter 4 describes a strategy to improve the stability of the antioxidant activity of gelatin films. This was accomplished by grafting CRV onto fish gelatin backbone through a one-step radical grafting procedure using a water soluble and environmentally benign ascorbic acid/hydrogen peroxide radical initiator system. Reaction condition were optimized by varying CRV concentration. The synthesis was carried out under nitrogen atmosphere and at room temperature in order to preserve fish gelatin and antioxidant integrity. Total phenol content (TPC) of the grafted gelatin, determined by Folin-Ciocalteu was increased 2.96 ± 0.13 mg AG/g grafted gelatin, with respect to control GP. Results of UV-visible spectroscopy, FTIR and proton nuclear magnetic resonance (HNMR) verified the insertion of CRV onto fish gelatin. Grafted fish gelatin displayed a concentration-dependent RSA, attaining a *plateau* at about 80 % (equivalent to 43.5 mg CRV/g GP-g-CRV) which was kept invariable over 21 days. Films obtained by blending fish gelatin and fish gelatin-grafted CRV (GP/GP-g-CRV) at 50:50 (by weight) and 20 wt% glycerol were stored at 25 ± 2 °C and 65% RH for 21 days. Physicochemical properties of grafted films evolved with time similarly than GP—0.6CRV, however grafted films maintained the initial RSA% invariable up to the end of the study, proving the efficiency of the reaction method.

Chapter 5 discusses the efficiency of the antioxidant edible GP/GP-g-CRV and GP-0.6CRV films on the quality retention of commercially available pre-fried breaded hake medallions. Samples of hake medallions were wrapped into fish gelatin films, heatsealed and stored at -4 ± 1 °C for 49 days. Free CRV gelatin films and the unwrapped medallions were used as controls. After predetermined periods of time, food samples were recovered and analyzed in terms of microbiological and physicochemical properties (pH, total volatile basic nitrogen (TVBN), peroxide index (PI), anisidine index (AI) and total oxidation index (TOI)). Over all the storage period, the TVBN value and the total psychrotrophic counts were significantly lesser in fish medallion wrapped in GP-0.6CRV film than both, the unwrapped and fish packed in GP/GP-g-CRV film. The TOI, PI and AI were lowered by 18 %, 30 % and 16 %, respectively, compared with controls. GP/GP-g-CRV film was not efficient to reduce the microbial spoilage or the oxidation, probably due to the retention of CRV into the matrix avoiding the migration toward the foodstuff. Sensory specifications of fried samples wrapped in GP-06CRV edible film showed a favorable level of acceptance unless some flavor and odor attributes were imparted to the product. The results indicate that the developed edible GP-0.6CRV film is efficient in extending the storage life of pre-fired breaded hake medallion with good acceptance of consumers.

Chapter 6 highlights the main findings of the research.

Appendix A describes the materials, methods and techniques used in the present work.