

MEMBRANAS DE QUITOSANO OBTENIDAS A PARTIR DE BIOMASA: EFECTO CONTRA FUSARIUM VERTICILLIOIDES

Gabriela Lluberás^{1*}, Jimena M. Herrera^{2,3}, Gabriela Montes de Oca-Vásquez⁴, Diego Batista Menezes⁴, Pablo Raimonda⁵, Jose R. Vega-Baudrit^{4,6}, Julio A. Zygadlo², Mary Lopretti¹

1) Laboratorio de Técnicas Nucleares Aplicadas a Bioquímica y Biotecnología, Centro de Investigaciones Nucleares-Facultad de Ciencias, Matajío 2055, Montevideo CP 11400, Uruguay. Correo electrónico: Gabriela lluberás@hotmail.com

2) Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016GCA Córdoba, Argentina.

3) Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ICTA, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 1611. X5016GCA, Córdoba, Argentina

4) Laboratorio Nacional de Nanotecnología, Centro Nacional de Alta Tecnología, Costa Rica 1174-1200, San José CP 10109, Costa Rica.

5) Instituto de Ensayos de Materiales, Facultad de Ingeniería, U de la R, Julio Herrera and Reissig 565 CP 11,300, Uruguay

6) Laboratorio de Polímeros, POLIUNA-Escuela de Química Universidad Nacional, Heredia, San José CP 86-3000, Costa Rica.

Recibido: Junio de 2021; Aceptado: Septiembre de 2021

RESUMEN

La industrialización de la biomasa de granos y cereales ha demostrado ser valiosa para los residuos industriales que no se utilizan en todo su potencial. En este trabajo se utilizó aceite de soja como emulsionante y quitosano como biopolímero para formar membranas con actividad antifúngica. Las membranas de quitosano se fabricaron por emulsificación (w/o). En las membranas, incorporamos biopesticidas como fenoles funcionalizados (FF) y 1-octen-3-ol por adsorción e inclusión. Así, se evaluaron las propiedades ópticas, mecánicas, térmicas, químicas y biológicas. Se evaluó la actividad antifúngica de las membranas que contenían FF frente a *Fusarium verticillioides*. Las micrografías electrónicas de barrido determinaron membranas con diferentes morfologías según el método de incorporación, inclusión y adsorción. El ensayo de tracción de las membranas de control y de las membranas con FF mostró un porcentaje de elongación del 5%, y la ruptura de la probeta a 1,95 kg·cm⁻². Las membranas desarrolladas fueron eficaces en el control de la plaga de los granos almacenados, mostrando un 80% de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides*.

Palabras clave: Biomasa; aceite de soja; membranas de quitosano, *F. verticillioides*

ABSTRACT

The industrialization of biomass from grains and cereals has proved valuable for industrial waste not used to its full potential. In this work, soybean oil as an emulsifier and chitosan as a biopolymer were used to form membranes with antifungal activity. Chitosan membranes were manufactured by emulsification (w/o). In the membranes, we incorporated biopesticides as functionalized phenols (FF) and 1-octen-3-ol by adsorption and inclusion. Thus, optical, mechanical, thermal, chemical and biological properties were evaluated. The antifungal activity of membranes containing FF was assessed against *Fusarium verticillioides*. The scanning electron micrographs determined membranes with different morphologies according to the incorporation method, inclusion and adsorption. The tensile test of control membranes and membranes with FF showed a percentage of elongation of 5%, and the rupture of the test tube at 1.95 kg·cm⁻². The membranes developed were effective in controlling pest of stored grains, showing 80% of inhibition growth on *Fusarium verticillioides*.

Keywords: Biomass; soybean oil; chitosan membranes, *F. verticillioides*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los granos y los cereales han sido una de las principales fuentes de alimentación en la dieta humana [1]. Sin embargo, hoy en día existe una gran preocupación por los residuos agrícolas que se producen en esta industria, especialmente por los problemas

ambientales relacionados. De ahí que exista un gran interés en el desarrollo de subproductos que puedan generarse durante su cadena de procesamiento [1], que podrían tener impactos positivos en el medio ambiente y la economía.

El aumento constante de los residuos de aceite de cocina de la industria alimentaria es una preocupación creciente que debe ser abordada. Los estudios informan del uso del aceite de soja como un residuo barato y disponible que puede utilizarse para muchas aplicaciones, como la producción de biosurfactantes [2], biocombustibles [3] y resinas epoxi [4]. Además, el aceite de soja, similar a la grasa láctea, la lecitina, la cera, el ácido esteárico, el monoglicérido, el diglicérido y la parafina, es uno de los principales agentes encapsulantes que contienen lípidos y que se ha reportado como un excelente formador de película capaz de cubrir partículas individuales, proporcionando una formación uniforme [5].

Los fenoles funcionalizados (FF) y los compuestos orgánicos volátiles (COV) son compuestos resultantes de interacciones biológicas, algunos de los cuales se identifican como polialcoholes. Debido a sus propiedades germicidas y biopesticidas, estos compuestos han despertado el interés del sector agrícola. FF, por ejemplo, tiene una amplia actividad fungicida y bactericida contra *Trichoderma harzianum* y *Escherichia coli spp* [6]. Por otro lado, el 1-octen-3-ol, un compuesto liberado por *Fusarium verticillioides*, tiene actividad repelente contra los insectos granívoros, evitando así la competencia interespecífica por el alimento [7]. Además, estudios recientes han demostrado la capacidad de este compuesto para combatir las plagas de los granos almacenados [8]. También existe un gran interés en las membranas de muchos compuestos como método de protección de moléculas biológicas [9].

Se han propuesto varios métodos para la producción de membranas. En general, estos procesos se pueden dividir en tres: procesos físicos, procesos químicos y procesos fisicoquímicos. Dos técnicas principales de emulsión pueden ser utilizadas por el proceso de microencapsulación, la emulsión de aceite en agua (o/w) y agua en aceite (w/o). En el caso de (w/o), la fase acuosa (fase dispersa) contiene el polímero y el compuesto a encapsular, que se emulsiona en una fase orgánica (fase continua) que contiene el tensioactivo.

Los biopolímeros naturales son potencialmente eficaces para la síntesis de membranas, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. El quitosano (β -1, 4-glucosamina) es uno de los polímeros naturales utilizados en la producción de membranas. Este biopolímero policationico es la forma soluble (desacetilada) de la quitina, un polímero lineal compuesto por residuos de N-acetilglucosamina, presente en el exoesqueleto de los crustáceos (camarones) [10]. Numerosos estudios han demostrado que el quitosano es un material

muy/particularmente versátil, utilizado en química analítica, biomedicina, agricultura, ganadería, cosmética e industria alimentaria [11].

En el presente trabajo se fabricaron membranas de quitosano por emulsión (w/o) utilizando residuos de granos, para encapsular los fenoles funcionalizados (FF) y el 1–octen–3–ol, un compuesto orgánico volátil (COV). Los FF se obtuvieron a partir de material lignocelulósico de residuos de arroz mediante fermentación semisólida con los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Gloeophyllum trabeum*. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron: (i) caracterizar las membranas de quitosano sintetizadas mediante técnicas ópticas, mecánicas, térmicas y químicas, y (ii) investigar el efecto de esta formulación sobre *Fusarium verticillioides*.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales. El quitosano se obtuvo de la *Universidad de Montevideo, Uruguay*; el aceite de soja (pureza 98%) de *COUSA (Montevideo, Uruguay)*; el alcohol polivinílico (calidad técnica, pb: 74°C) se obtuvo de la droguería industrial (*Montevideo, Uruguay*); el glutaraldehído (calidad técnica Mw: 100,11 g·mol⁻¹, pb: 187°C) de la droguería Industrial (*Montevideo, Uruguay*); y el 1–octen–3–ol (pureza 98%, Mw: 128,21 g mol⁻¹, pb: 84°C) se adquirió de *Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemania)*.

La cepa fúngica *Fusarium verticillioides* M3125 fue proporcionada por el *Dr. Robert Proctor (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola, Instituto de Investigación de Utilización Agrícola (AURI), Peoria, Illinois, USA)*.

Producción de "unidades FF" de lignina. La producción de las unidades FF se llevó a cabo en un sistema de fermentación semisólida durante 40 días en una cámara controlada. Se inoculó un volumen de 1,5 L de cáscara de arroz correspondiente a 500 g con los hongos propagados *Phanerochaete chrysosporium* y *Gloeophyllum trabeum* que fueron previamente probados por la capacidad de producción de enzimas. El proceso de fermentación semisólida se realizó en un recipiente abierto sin agitación, dentro de un horno controlado (humedad: 60–70%; temperatura: 30°C; pH 5,0–6,0). La actividad de los hongos inoculados se controló midiendo la actividad enzimática en el material de la fermentación semisólida. Para ello, se tomaron 2 g de cáscara de arroz inoculada y se suspendieron en 10 mL de agua. Después de una hora, se determinó la actividad enzimática en el líquido: lignina peroxidasa en una media de 50 UE/mL y metoxil hidrolasa en una media de 15 UE/mL. Cuarenta días después de la acción enzimática, se decantó un volumen igual al ocupado por el material sólido, 1,5 L, durante dos horas y se centrifugó.

Síntesis de las membranas de quitosano

Inclusión de FF: Para la preparación de las membranas mediante la inclusión de FF, se utilizó una solución de quitosano al 1,0% (p/v) en ácido acético al 5% como fase dispersa y se filtró utilizando papel de filtro (porosidad de 11 μm). Para la fase continua, se tomaron 150 mL de aceite de soja en un matraz de 500 mL y se añadió 0,1% (p/p) de Span 80. Luego, con una jeringa, se añadieron 5 mL de la solución de quitosano al 1,0% gota a gota ($5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) sobre el aceite de soja, con agitación constante a 300 rpm o agitación periférica, y a 30°C. Posteriormente, se añadió glutaraldehído al 20% manteniendo una agitación constante durante 1 hora, y finalmente se añadió el activo correspondiente. Para ello se incorporó una alícuota de 250 μL a la mezcla de fenoles (FF). Las concentraciones de los compuestos activos se seleccionaron a través de datos bibliográficos (Lopretti et al., 2019 [19]). La emulsión se introdujo en el molde y se secó en el horno a 30°C durante 24 horas.

Adsorción de 1-octen-3-ol y FF: Para la preparación de las membranas por adsorción de 1-octen-3-ol y FF, se utilizó la misma metodología descrita para la síntesis de las membranas por inclusión: sin embargo, primero se sintetizó la membrana sin la adición del activo correspondiente, y se introdujo la emulsión en el molde y se secó en horno a 30°C durante 24 horas. Una vez secadas las membranas en el horno, se incorporó una alícuota de 250 μL de (1-octen-3-ol, FF) en la superficie sobre la membrana y se cerró el molde para evitar la evaporación del activo; la membrana se almacenó a 30°C durante 24 horas. Las concentraciones de los compuestos activos se seleccionaron a través de datos bibliográficos [6,12]. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Caracterización de las membranas de quitosano

Microscopía electrónica de barrido: Las membranas control y las membranas por inclusión de FF y por adsorción de 1-octen-3-ol y FF se observaron mediante un microscopio electrónico de barrido *SEM JSM-5900 LV (JEOL, Tokio, Japón)*, equipado con EDS, según la metodología descrita por [13], con algunas modificaciones. Los análisis se realizaron bajo un voltaje de aceleración de 20 kV, SEI y tamaño de punto: 50. Las muestras se recubrieron con una capa muy fina de oro en un recubrimiento iónico *EMS 550X Sputter Coater* a 50 mA durante 2:30 min con un vacío de $1 \cdot 10^{-1}$ mbar.

Análisis analítico obtenido de las membranas: La presencia de 1-octen-3-ol en las membranas se determinó mediante análisis SPME/GC siguiendo la metodología descrita por [12]. Brevemente, se colocó una muestra de 13 g de membranas en un vial (10 mL) con septum. A continuación, este vial se colocó en un baño de agua a 60°C durante 30 minutos, después de lo cual, se colocó una microfibra de microextracción en fase sólida (SPME)

(PDMS 100 mm, Supelco, Bellefonte) en el vial durante 10 min con el fin de capturar el biopesticida desorbido. Finalmente, la microfibra se inyectó en un cromatógrafo de gases Perkin–Elmer Clarus 600 acoplado a un detector de masas con trampa de iones (GC–MS) para la identificación y cuantificación de terpenos. Para la separación del compuesto se utilizó una columna capilar ELITE de 5 ms (60 m·0,25 mm de diámetro interior y 0,25 µm de espesor de revestimiento). Las condiciones cromatográficas fueron: inyector a 250°C; programación de la temperatura del horno: 50°C (2 min), 5°C (1 min), 240°C (5 min), tiempo total de ejecución 35 min, y temperatura constante del detector de 240°C. Se utilizó helio como gas portador (caudal de 1,5 mL/min) y los compuestos se identificaron comparando sus índices de retención y espectros de masas con los datos publicados [14], y las bibliotecas disponibles (NIST). El biopesticida se confirmó mediante la coinyección de 1–octen–3–ol puro (Sigma, USA).

Ensayo de tracción: El ensayo de tracción de las membranas de control y de las membranas con FF se realizó en una máquina de ensayo universal, marca Instron, modelo 1011, a una velocidad de 10 mm/min. Las condiciones de ensayo fueron 20°C y 44% de HR. Los ensayos se analizaron por triplicado.

Ensayo de absorción y desorción de agua: El porcentaje de absorción de agua se determinó pesando en una balanza analítica, sumergiendo la probeta durante 24 horas en agua destilada. El peso inicial y final de las membranas se determinó después de 24 horas, mientras que el ensayo de desorción se realizó pesando después de secarlas a 90°C durante 48 horas. El ensayo se realizó a una temperatura de 20°C, 61% HR. Los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis termogravimétrico (TGA): Para los análisis TGA se utilizó una muestra de 5 mg de membranas con FF por inclusión y adsorción y se realizó con un TGA Q500 (TA Instruments, USA), según la metodología descrita por [15]. La rampa de temperatura fue de 10°C/min de 0 a 600°C y, posteriormente, de 20°C/min de 600 a 1.000°C bajo nitrógeno (flujo de 90 mL/min). Se analizaron todas las muestras de glicerol purificado, glicerol crudo y glicerol anhidro (J.T. Baker, Estados Unidos). Los análisis se realizaron por triplicado.

Actividad antifúngica de las membranas que contienen fenoles funcionalizados (FF): Las propiedades antifúngicas de las membranas con FF sobre el crecimiento de *F. verticillioides* (M3125) se evaluaron siguiendo la metodología descrita por Pizzolito et al. [26], con algunas modificaciones. Brevemente, se adhirieron $0,27 \pm 0,1$ g de membrana al medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa (PDA) en placas Petri (90 mm), posición central y lateral. Previamente, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 120°C durante 15

minutos y luego se sembró el hongo. Se realizaron tres repeticiones por tratamientos. El tratamiento de control se mantuvo en las mismas condiciones sin incorporación de las membranas. La actividad antifúngica se evaluó midiendo el crecimiento radial. Se midió diariamente el diámetro perpendicular de la colonia en crecimiento (cm) hasta que la colonia alcanzó el borde de la placa (aproximadamente 7 días). El porcentaje de inhibición micelial se calculó mediante el modelo matemático [16], que se describe a continuación:

$$\%MI = (MB - MA/MB) \cdot 100 \quad (1)$$

donde %MI es el porcentaje de inhibición micelial, MA: crecimiento micelial de MA influenciado por el tratamiento y MB el crecimiento micelial libre (control).

Datos estadísticos. Las medias y los errores estándar se calcularon con el software *InfoStat* [17]. Se realizó la prueba de *Duncan* para determinar las diferencias entre las medias.

RESULTADOS

Caracterización de las membranas

Microscopía electrónica de barrido. Las Figuras 1–4 muestran las membranas de quitosano con diferente morfología tomadas del microscopio electrónico de barrido (SEM). La Figura 1 muestra las imágenes de la membrana de control. Se observa una membrana homogénea con algunos poros y gránulos correspondientes al polímero utilizado, el quitosano.

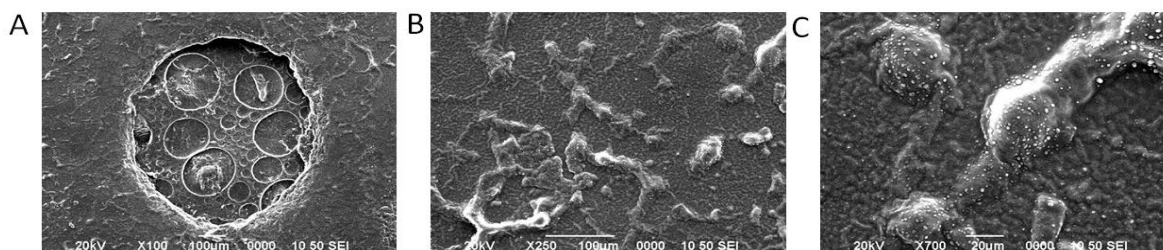


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de las membranas de control. A) 100X, B) 250X, C) 700X.

La Figura 2 muestra las membranas con 1–octen–3–ol añadido por adsorción. Observamos una membrana con partículas granulares de tamaño variable en la superficie de la membrana.

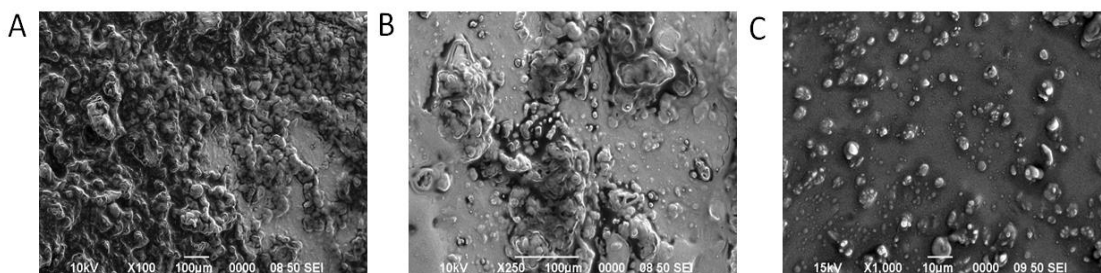


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de membranas por adsorción de 1–octen–3–ol. A) 100X, B) 250X, C) 1.000X.

Las Figuras 3 y 4 muestran las imágenes SEM de las membranas sintetizadas con FF añadido por inclusión y por adsorción, respectivamente. La superficie de la membrana con FF añadido por inclusión tenía una superficie más lisa en comparación con la membrana con FF añadido por absorción. Además, observamos algunas partículas granulares de diferente tamaño en la membrana (Figura 3). Por otro lado, la superficie de la membrana con FF añadido por adsorción era totalmente rugosa (Figura 4).

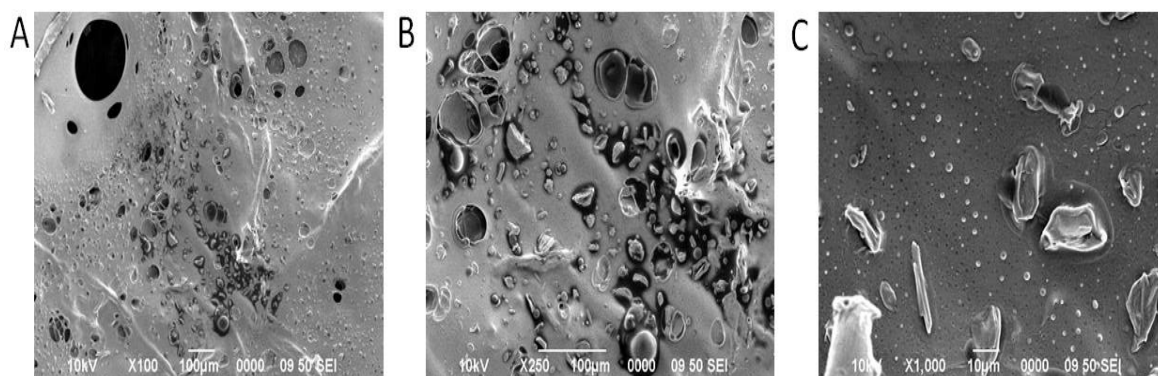


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de membranas por inclusión de FF. A) 100X, B) 250X, C) 1.000X.

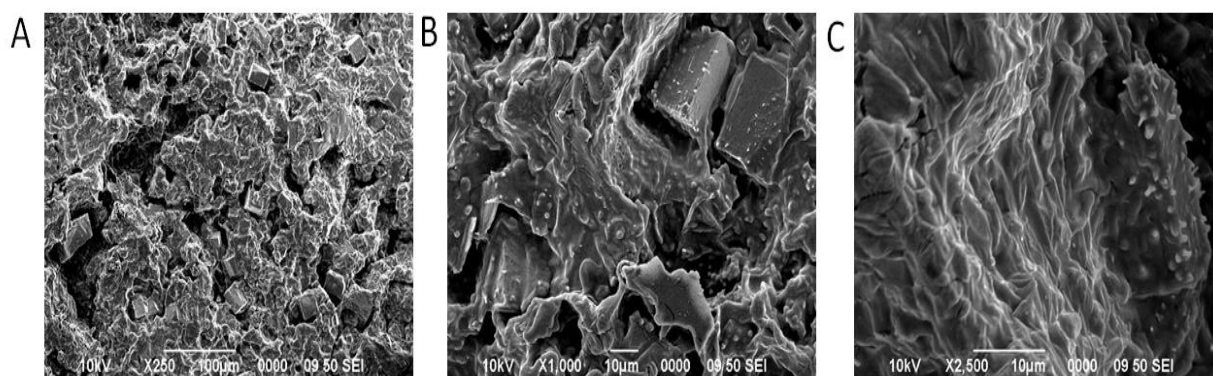


Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de membranas por adsorción de FF. A) 250X, B) 1.000X, C) 2.500X.

Análisis químico de las membranas: La presencia de 1-octen-3-ol por inclusión en la membrana fue confirmada por el análisis SPME/GC (Figura 5).

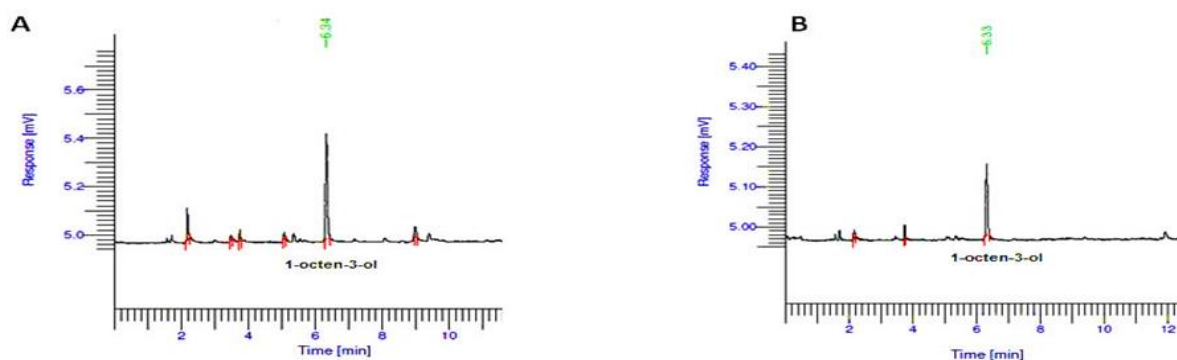


Figura 5. Cromatogramas del 1-octen-3-ol puro (A) y de las membranas activas (B).

Prueba de tracción y de absorción de agua de las membranas con FF. El ensayo de tracción de la membrana de control y de la membrana por absorción con FF mostró un porcentaje de alargamiento del 5%, produciéndose la rotura de la probeta a $1,95 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$. Por otra parte, los ensayos de absorción de agua mostraron un valor del 61%.

Análisis termogravimétrico: El análisis TGA de las membranas de adsorción e inclusión con FF (Figura 6) mostró un primer salto, con una pérdida de masa del 5% cerca de los 130°C , que coincide con la pérdida de masa del material volátil determinada gravimétricamente. El resto de la curva corresponde a una descomposición típica de estos materiales, perdiendo el 70% de la masa antes de los 490°C , dejando unas cenizas cuya temperatura de descomposición supera los 700°C (Figura 6). Los resultados del TGA de los materiales de partida de las membranas pueden encontrarse en otro lugar [9,18].

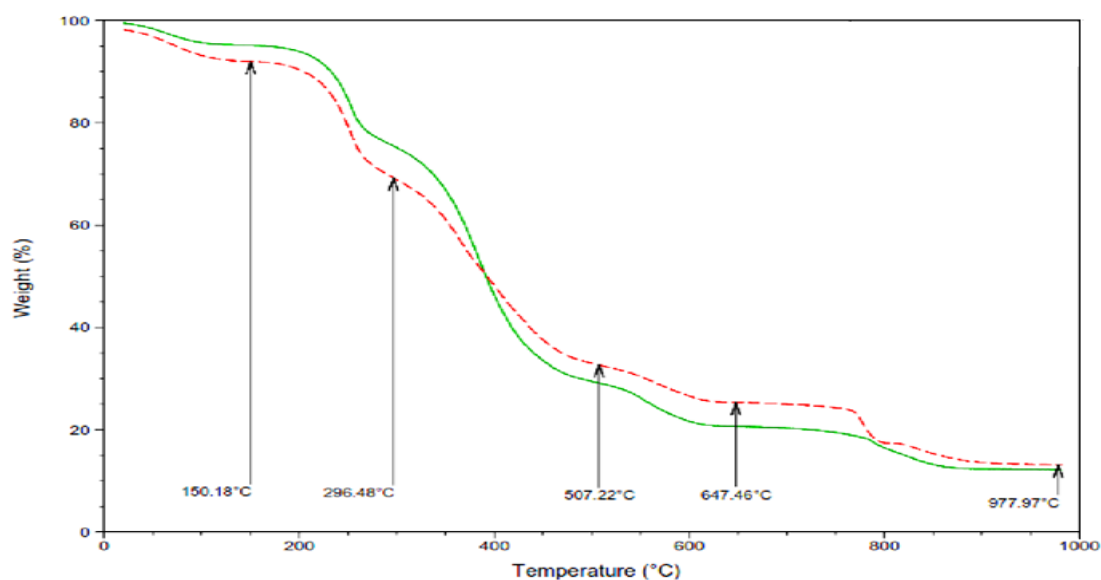


Figura 6. Termogramas de las membranas con FF añadido por inclusión (línea roja discontinua) y por adsorción (línea verde sólida).

Actividad fungicida de las membranas: La Figura 7 muestra el efecto antifúngico de las membranas por inclusión de FF sobre el crecimiento de *F. verticillioides* (M3125), tras 10 días de exposición. Así, la membrana activa colocada en posición central en la placa de Petri tiene un efecto inhibitor del micelio más potente en comparación con la membrana colocada en posición lateral, con valores de 90,6 y 70%, respectivamente.

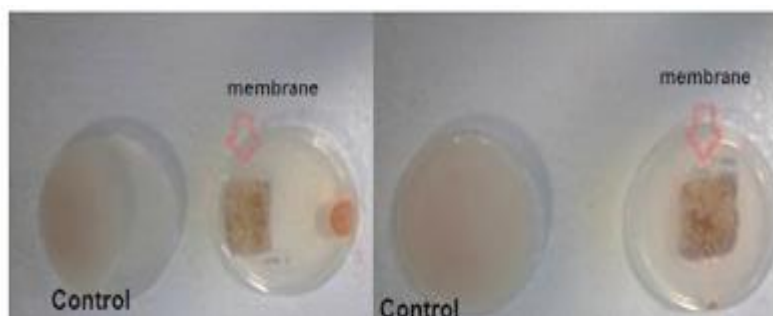


Figura 7. Crecimiento micelial de *F. verticillioides* (M3125) con y sin membrana (control), tras 10 días de exposición.

DISCUSION

Una membrana se define como una tecnología de envasado de sólidos, líquidos o gases [19] que libera su contenido sellado a tasas controladas bajo condiciones específicas, protegiendo el producto retenido de condiciones externas como la luz y el oxígeno [20]. En este estudio se obtuvieron membranas activas mediante la técnica de emulsificación, modificando la forma de inclusión y adsorción de los agentes bioactivos (FF y 1-octen-3-ol). Se utilizó quitosano y alcohol polivinílico como agentes tensioactivos y aceite de soja como emulsionante [9]. El aceite de soja está compuesto por una mezcla natural de fosfolípidos, glicolípidos, azúcares, triglicéridos, ácidos grasos y otros compuestos. Es uno de los aceites vegetales con menor coste del mercado [21]. Por otro lado, el quitosano ha sido utilizado en muchos estudios debido a su capacidad para formar membranas, su bajo coste, su fácil capacidad para formar películas, su respeto al medio ambiente, su biodegradabilidad, su estabilidad térmica y sus buenas propiedades mecánicas [22].

Las micrografías de microscopía electrónica de barrido muestran la morfología de la superficie de las membranas de quitosano. Las imágenes de SEM mostraron que se encontraron diferencias entre las membranas en el aspecto externo, en relación con la forma en que se incorpora el ingrediente activo a las membranas (inclusión o adsorción). Es probable que se observen membranas más suaves cuando el principio activo se incorpora por inclusión que cuando el principio activo se incorpora por adsorción, asegurando así una incorporación homogénea de 1-octen-3-ol o FF durante la síntesis. Por otro lado, cuando el principio activo se incorpora por adsorción, su incorporación está limitada por su interacción con la superficie de la membrana [23-24]. Los ensayos de absorción de agua mostraron un valor del 61% y es una retención reversible (ASTM D570).

Según la prueba de tracción, las membranas tienen una baja elongación. Esto también se ve afectado por la metodología mediante la cual se incorporó el activo. En este caso, el activo se incorporó por adsorción, lo que está limitado por las interacciones fisicoquímicas con la superficie de la membrana. Esperamos que esta característica de la membrana pueda ser incrementada mejorando el método de producción de las membranas, como por ejemplo

umentando su temperatura de síntesis, lo que llevará a un mayor entrecruzamiento de los componentes de la membrana logrando así una mayor resistencia en la composición, como se ha reportado en otros estudios [25].

Los termogramas muestran variaciones en la temperatura de degradación entre las membranas de quitosano con FF añadido por inclusión y por adsorción. Esta diferencia podría ser el resultado de la forma de sintetizarlas [26]. Las membranas con FF añadidas por inclusión muestran una superficie más suave en comparación con las membranas con FF añadidas por adsorción, lo que las hace más estables. Esto podría explicar el hecho de que la curva TGA siempre se mantiene por debajo, en comparación con la membrana con FF añadido por inclusión, hasta aproximadamente 400°C donde las curvas se cruzan. Además, el intervalo de temperatura de 296–507°C puede estar relacionado con la descomposición del quitosano [27]. Este tipo de membrana, con una temperatura de descomposición superior a 296°C, es ideal para la manipulación de fármacos, entre otras aplicaciones, donde las temperaturas de procesamiento y trabajo no pueden ser muy/extremadamente altas debido a la descomposición del principio activo. Del mismo modo, en el campo de la cosmética, productos como las enzimas (proteasas o queratinasas) utilizadas en aplicaciones depilatorias se desnaturalizan por encima de los 50°C. Por otra parte, a temperaturas más elevadas, la variación de masa es brusca, según la curva DTGA, lo que no permitiría garantizar unas buenas propiedades mecánicas para aplicaciones muy exigentes, como las de la industria química o la analítica. El estudio de TMA de este material, previsto como siguiente paso, aunque fuera del alcance de este trabajo, nos permitirá seguir determinando, y ampliando, otro tipo de aplicaciones.

El efecto antifúngico de las membranas con FF sobre el crecimiento de *F. verticillioides* tras 10 días de exposición mostró una inhibición del 67 al 90%. Estos resultados son importantes para futuros estudios con aplicaciones agrícolas, ya que los reglamentos internacionales limitan el nivel de toxinas fúngicas en los alimentos, como los granos y los cereales, asociados a problemas de salud humana [28]. Además, encontramos que las membranas se pueden obtener de forma reproducible [9] cuyo procedimiento estará determinado por las propiedades de la sustancia bioactiva y su aplicación final. A partir de análisis previos podemos afirmar la buena retención de los FF funcionalizados en las membranas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), [29]. A partir de estos estudios previos encontramos que los FF fueron liofilizados y caracterizados por HPLC y métodos espectroscópicos. El análisis por HPLC mostró la presencia de un solo producto principal (superior al 98%, con el mismo tiempo de retención que el alcohol 3,4–

dimetoxibencílico (alcohol veratrílico). Numerosos trabajos demostraron el efecto de los compuestos fenólicos contra los hongos de los granos almacenados [30].

Por otro lado, las membranas que contienen 1-octen-3-ol sintetizadas por adsorción del activo mostraron poros con resistencia y retención del agente. Estudios anteriores reportaron múltiples actividades para el 1-octen-3-ol como antifúngico, insecticida, repelente, herbicida y aditivo alimentario [31-32]; *Herrera et al.* [7]. [8], reportaron el efecto de películas de PEBD tratadas con 1-octen-3-ol contra *F. verticillioides* mostrando un 55% de inhibición. Así, la matriz polimérica preparada con agentes bioactivos podría ser una nueva tecnología para desarrollar envases activos con múltiples funciones, entre ellas la conservación de alimentos.

Esto se debe a que mínimos cambios realizados en el método de fabricación tanto de las membranas como de las microesferas pueden dar lugar a grandes cambios, no evidenciados químicamente ya que las materias primas utilizadas para la síntesis de las matrices son las mismas Sin embargo, a nivel físico, por ejemplo, debemos considerar el pH utilizado en la síntesis. Esto es importante porque a un pH ácido la solubilidad del quitosano se incrementa respecto a un pH básico, modificando así su disponibilidad en las membranas y microesferas, siendo este un factor especialmente importante a considerar, ya que influye en las propiedades físicas de las membranas [9].

CONCLUSIONES

En este estudio, obtuvimos membranas activas que cargaban biopesticidas por inclusión y adsorción. La presencia de biopesticidas en las membranas se confirmó mediante análisis instrumentales y biológicos. Se podrían realizar futuros estudios aplicados a la conservación del ensilado de grano para buscar soluciones a la acumulación de residuos y productos de alto valor añadido. También se pretende comparar diferentes métodos de obtención de matrices como las membranas utilizadas en este trabajo y futuras realizaciones de microencapsulación. En futuras investigaciones, deberíamos abordar diferentes concentraciones y otros compuestos bioactivos para encontrar la composición de la membrana más idónea que proporcione mejores resultados en términos de morfología, estabilidad y efecto antifúngico.

Agradecimientos: Los autores agradecen el apoyo financiero del *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)*. JMH y JAZ son investigadores del CONICET. GMV, DBM y JVB son investigadores de LANOTEC-CeNAT. GLL y ML son investigadores del CIN, U de la R.

BIBLIOGRAFÍA

1. Verni M, Rizzello CG, Coda R. Fermentation Biotechnology Applied to Cereal Industry By-Products: Insights nutricionales y funcionales, *Front Nutr.* **6**, 42 (2019)
2. Lyu S, Chen X, Shah SM, Wu X, Estudio experimental de la influencia del surfactante natural fosfolípido de soja en la humectabilidad del carbón de alto rango, *Fuel*, **239**, 1 (2019)
3. Cardoso CC, Mendes, BMO, Pasa VMD, Producción y caracterización de biocombustible de calidad en frío a partir de aceite de soja utilizando diferentes alcoholes alquílicos y bencílicos. *J. Environ. Chem. Eng.*, **6**, 2241 (2018)
4. Wai TW, Jiang P, Shen Y, Zhang P, Gu Q “Atrapamiento de peroxofosfotungstato en SBA-15 por sililación y su eficiencia catalítica en la epoxidación del aceite de soja”, *Appl. Catal A-Gen.*, **596**, 117537 (2020)
5. Gao W, Wu W, Liu P, Hou H, Li X, Cui B, Preparation and evaluation of hydrophobic biodegradable films made from corn/octenylsuccinated starch incorporated with different concentrations of soybean oil, *Int. J. Biol. Macromol.*, **142**, 376 (2020)
6. Lopretti M, Vega J, Vargas L “Producción biotecnológica de Polímeros de espumas de poliuretano con propiedades germicidas a partir de arroz. Taller de Química Verde y Nanotecnologías en Química de Polímeros”, 2016
7. Usseglio VL, Pizzolitto RP, Rodríguez C, Zunino MP, Zygadlo JA, Areco VA. Compuestos orgánicos volátiles de la interacción entre *Fusarium verticillioides* y granos de maíz como repelentes naturales de *Sitophilus zeamais*”. *J. Stored Prod. Res.*, **73**, 109 (2017)
8. Herrera JM, Gañán NA, Goñi ML, Zygadlo JA, Martini RE “Películas activas de PEBD cargadas con bioplaguicidas mediante CO₂ supercrítico para la protección de granos almacenados”, *Food Packag. Shelf Life*, **18**, 80 (2018)
9. Lluberas G, Montes de Oca-Vásquez G, Batista Menezes D, Vega-Baudrit J, Raimonda P, Lopretti M “Valorización de subproductos de la industrialización de aceites de soja y de la industria pesquera para la obtención de membranas poliméricas, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **20(6)**, 279 (2019)
10. Romagnoli MJ, Vera, González, J “Microesferas de quitosano para textiles dermatoprotectores”, *Revista de plásticos modernos: Ciencia y tecnología de polímeros*, **118**, 749 (2019)
11. 28. FDAs de Estados Unidos, 2008. Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada.
12. Olivera, A, Barreiro F, Lopretti M “Proteínas de actividad biológica microencapsuladas y distribución de cargas”, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **15(4)**, 219 (2014)
13. Herrera JM, Goñi ML, Gañán NA, Zygadlo JA. Una formulación insecticida de cetonas terpénicas contra *Sitophilus zeamais* y su incorporación en películas de polietileno de baja densidad, *Crop Prot.* **98**, 33 (2017)
14. Corrales-Ureña YR, Villalobos-Bermúdez C, Pereira R, Camacho M, Estrada E, Argüello-Miranda O, Vega-Baudrit JR “Micropartículas a base de sílice biogénica obtenidas como subproducto del proceso de extracción de nanocelulosa a partir de cáscaras de piña”, *Sci. Rep.*, **8(1)**, 1 (2018)
15. Adams RP “Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry”. Allured Publishing Corporation, Illinois, 2007
16. Alvarado-Cordero E, Montes de Oca-Vásquez G, Pereira-Reyes R, Vega-Baudrit J, Esquivel-Alfaro M, “Uso de glicerol residual derivado del biodiésel para la producción de polihidroxibutirato por *Bacillus megaterium*”, *J. Renew Mater.*, 2016).
17. Pérez L, Ramírez F, Martínez CX, Algecira MM, “Efecto de las condiciones variables de fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*”. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D. C. 2000
18. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW “InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
19. Mizera K, Ryszkowska J” Elastómeros de poliuretano a partir de polioles basados en aceite de soja con una relación molar diferente”, *Polymer Degradation and Stability*, **132**, 21 (2016). doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.05.004
20. Huang D, Niu LL, Li J, Du J, Wei Y, Hu YC, Lian XJ, Chen WY, Wang KQ “Reinforced chitosan membranes by microspheres for guided bone regeneration”, *J. Mech. Behavior. Biomed. Mater.*, **81**, 195 (2018)
21. Parra Huerta R “A Microencapsulación de alimentos: Una revisión”, *Rev. Fac. Agr. Medellín* **63(2)**, 5669 (2010)
22. Gutiérrez-Gutiérrez MI, Morales-Mendivelso DF, Muvdi-Nova CJ, Chaves-Guerrero A “Síntesis y caracterización de membranas híbridas a partir de quitosano, polivinil alcohol y sílice para su aplicación en deshidratación de gases”, *Iteckne*, **12(1)**, 33 (2015)

23. Cui H, Bai M, Li C, Rukuan Liu, Lin L “Fabricación de nanofibras de quitosano que contienen liposomas de aceite de árbol de té contra Salmonella spp. en pollo”, *LWT*, **96**, 671 (2018)
24. Moreno JC, Giraldo L “Propiedades Termodinámicas del Proceso de Adsorción de Pb²⁺ sobre Carbón Activado a Diferentes pH”, *Información tecnológica*, **19(5)**, 61 (2008)
25. Arias J, Miguel, Paternina, Elihu, Barragán D “Adsorción física sobre sólidos: aspectos termodinámicos”, *Química Nova*, **32(5)**, 1350 (2009)
26. Carlo B, Villagra D, Habert AC, Membranas Compuestas: propiedades superficiales y estabilidad térmica. *Matéria (Río de Janeiro)*, **23(2)**, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1517-707620180002.0400>
27. Hidalgo–Vicelis JL, Alvarez–Perez MA, Miranda–Castro SP, Piña–Barba MC “Membranas de colágeno–chitosán tipo I reticuladas químicamente con clorhidrato de N–(3–dimetilaminopropil)–N’–etilcarbodiimida para la regeneración ósea guiada: Un estudio comparativo”, *Fibers and Polymers*, **21(2)**, 262 (2020)
28. Boggione MJ, Mahl CR, Beppu MM, Farruggia B “Síntesis y caracterización de membranas de quitosano funcionalizadas con aminoácidos y cobre para la adsorción de endoglucanasa”, *Powder Technology*, **315**, 250 (20017)
29. Comisión Europea, 2007. Reglamento (CE) 1126/2007 de la Comisión, de 28 de septiembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que respecta a las toxinas de Fusarium en el maíz y los productos del maíz, *Off. J. Eur. Union L*. 255: 14.IARC. Fumonisin B1 Summaries & Evaluations, **82**, 301 (2002)
30. Lopretti N, Lecot A, Rodríguez, Lluberas G, Orozco F, Bolaños L, Montes De Oca G, Cerecetto H., Vega–Baudrit J, Biorrefinería de cáscara de arroz para la obtención de compuestos bioactivos funcionalizados”, *JRM*, **7(4)** (2019)
31. Dambolena José S., Abel G. López, José M. Meriles, Héctor R. Rubinstein, Julio A. Zygodlo Efecto inhibitorio de 10 compuestos fenólicos naturales sobre Fusarium verticillioides. Un estudio de relación estructura–propiedad–actividad, *Food Control*, **28**, 163 (2012)
32. Zhao S, Yang ZC, Zhou XG, Ling XZ, Mora LS, Diseño, fabricación, caracterización y simulación de composites PIP–SiC/SiC, *CMC–Comput. Mat. Contin.*, **42(2)**,103 (2014)