

## CONSERVACIÓN DE PRODUCTOS PERECEDEROS A BASE DE BIOPOLÍMEROS

### REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud de patente reivindica prioridad y el  
beneficio de la solicitud de patente provisional  
estadounidense n.º de serie 61/949,995, presentada el 7 de  
marzo de 2014, titulada "BIOPOLYMER-BASED PRESERVATION OF  
PERISHABLE PRODUCTS" [Conservación de productos perecederos a  
10 base de biopolímeros], cuyo contenido se incorpora a la  
presente en su totalidad mediante esta referencia.

### ANTECEDENTES

15 La conservación de productos perecederos, alimentos en  
particular, típicamente implica la prevención del crecimiento  
de bacterias, hongos (tal como levaduras), y otros  
microorganismos, así como también el retraso de la oxidación  
de grasas que provocan rancidez. La conservación de alimentos  
20 también implica la inhibición de los procesos enzimáticos,  
que conducen a la decoloración y/o cambios en la textura de  
los productos perecederos. Además del deterioro visual o  
junto con este, mantener el valor nutricional y el sabor  
también es un aspecto importante de la conservación de

alimentos.

Existen una cantidad de técnicas que se ha usado tradicionalmente para mejorar la conservación de los  
5 productos perecederos. Estas incluyen, por ejemplo, secado, pasteurización, refrigeración, congelación, envasado al vacío, salado o curado, azucarado, ahumado, aditivos químicos, escabeche, soda cáustica, enlatado y embotellado, irradiación, etc.

10

Más recientemente, se ha explotado el recubrimiento alimentario (a veces denominado glaseado) como medio para mejorar la conservación, así como también las propiedades organolépticas. Se han contemplado varias clases de  
15 biopolímeros como materiales de recubrimiento: polisacáridos, proteínas, lípidos, así como también varias combinaciones de estos biopolímeros (revisado, por ejemplo, en: *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings*. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd., Editor/es: David Plackett; ISBN  
20 impreso: 9780470683415; ISBN en línea: 9781119994312; CH. 10 "Food Packaging Applications of Biopolymer-Based Films"; CH. 11 "Biopolymers for Edible Films and Coatings in Food Applications"; cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia). Los polisacáridos y

las proteínas son conocidos por formar películas con buenas propiedades mecánicas, pero con poca permeabilidad, mientras que los lípidos forman películas frágiles pero con mejor permeabilidad. El recubrimiento de frutas y vegetales con un material de encerado también es un ejemplo común. Las razones principales del encerado son evitar la pérdida de agua y, de este modo, retrasar el encogimiento y el deterioro, y mejorar la apariencia. Los materiales de encerado usados para dichos propósitos dependen en cierta medida de las regulaciones en el país de producción y/o exportación; se usan tanto ceras naturales (por ejemplo, caña de azúcar, carnaúba, goma laca y resina) como ceras a base de petróleo. La cera se puede aplicar en un solvente volátil a base de petróleo pero hoy en día se aplica más comúnmente a través de una emulsión a base de agua. A menudo se usan ceras de parafina mezclada como un aceite o pasta en los vegetales. Dichas técnicas son útiles para productos selectivos, pero no para otros.

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

20

La presente invención proporciona, entre otras cosas, composiciones a base de biopolímeros y métodos para la conservación de productos perecederos, que incluyen alimentos. En particular, la invención incluye el

reconocimiento de que algunos biopolímeros ofrecen características estructurales que son particularmente adecuadas para la producción de materiales de recubrimiento para productos perecederos, sin el requisito de agregar  
5 plastificante para lograr la maleabilidad deseada. Por consiguiente, en la presente se describen recubrimientos seguros, simples y versátiles que mejoran la conservación de varios productos perecederos.

10 En algunas modalidades, los materiales de recubrimiento a base de biopolímeros utilizados para conservar los artículos perecederos son útiles para formar una barrera entre un artículo perecedero y uno o más elementos en su entorno. En algunas modalidades, dichos materiales de recubrimiento  
15 proporcionan una barrera selectiva entre el artículo perecedero y al menos un aspecto de su entorno. Por ejemplo, dichos materiales proporcionan una barrera selectiva entre el artículo perecedero y al menos un aspecto de su entorno, tal como la luz (por ejemplo, determinados intervalos de  
20 longitudes de onda de luz), temperatura, humedad o contenido de agua, microbios (por ejemplo, bacterias, hongos, etc.), etcétera.

La invención también comprende la noción de que los

recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente se pueden utilizar como un portador para uno o más agentes. En algunas modalidades, dichos recubrimientos incorporan un agente o agentes para mejorar adicionalmente la conservación de un artículo perecedero. Los ejemplos incluyen, de modo no taxativo, inhibidores de enzimas, agentes antimicrobianos y agentes de captura de etileno.

De manera adicional o alternativa, en algunas modalidades, dichos recubrimientos tienen un agente o agentes que se utilizan para fines diferentes a la mejor conservación de un artículo perecedero. Por ejemplo, dichos recubrimientos pueden incorporar un agente o agentes para proporcionar atributos o características adicionales, que incluyen, de modo no taxativo, gusto o sabor mejorado o agregado, apariencia, contenido nutricional, esencias, etc. En algunas modalidades, los agentes adicionales pueden proporcionar funcionalidad tal como, etiquetas o códigos que tienen determinada información. Cualquier información adecuada o deseable se puede incluir o codificar, que incluye, de modo no taxativo, información de identificación tal como información sobre la fuente u origen de un producto, ingredientes, información nutricional, información de fabricación, fechas de procesamiento (fecha de cosecha, fecha de recubrimiento o

envasado, etc.), fechas de vencimiento, información de precios, autenticación, publicidad, información de atención al cliente o cualquier combinación de estos.

5 En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente pueden mejorar uno o más características de un producto perecedero. Por ejemplo, dichos recubrimientos pueden proporcionar una mejor apariencia (por ejemplo, color, brillo/lustre, etc.), mejor  
10 textura (por ejemplo, carácter crujiente, etc.), etcétera.

En algunas modalidades, los materiales de recubrimiento a base de biopolímeros usados para conservar los productos perecederos se aplican directamente para que se adhieran a la  
15 superficie del artículo perecedero.

En algunas modalidades, los materiales de recubrimiento a base de biopolímeros usados para conservar los productos perecederos proporcionan el envasado de los artículos  
20 perecederos.

En algunas modalidades, los materiales de recubrimiento a base de biopolímeros usados para conservar los productos perecederos forman un recubrimiento comestible de un artículo

perecedero, por ejemplo, alimentos. En algunas modalidades, dichos materiales de recubrimiento no necesitan lavarse antes del consumo. En algunas modalidades, dichos materiales de recubrimiento pueden lavarse, por ejemplo, con agua antes del consumo.

En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente no afectan el gusto, sabor y/o apariencia del alimento perecedero recubierto con estos. En algunas modalidades, dichos recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente no afectan de manera negativa el gusto, sabor y/o apariencia del alimento perecedero recubierto con estos.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 proporciona imágenes secuenciales del proceso de envejecimiento de las frutillas. Las frutillas se almacenaron a 22 °C y 38 % de RH tal como se recibieron (*control*) y después del recubrimiento con solución de fibroína de seda (*DxCx*). *Dx* representa 'x' etapas de recubrimiento por inmersión. *Cx* representa 'x' horas de recocado en agua. Por lo tanto, *D1C0* significa frutillas que se sometieron a recubrimiento por inmersión solo una vez y que no se

expusieron a recocado en agua.

La Figura 2 proporciona imágenes comparativas que muestran los tejidos internos de las frutillas después de siete días de almacenamiento en condiciones estándares. Las frutillas se  
5 almacenaron a 22 °C y 38 % de RH tal como se recibieron (*control*) y después del recubrimiento con solución de fibroína de seda (*DxCx*). *Dx* representa 'x' etapas de recubrimiento por inmersión. *Cx* representa 'x' horas de  
10 recocado en agua. Por lo tanto, D1C0 significa frutillas que se sometieron a recubrimiento por inmersión solo una vez y que no se expusieron a recocado en agua.

La Figura 3 proporciona una gráfica que muestra la pérdida de  
15 peso de las frutillas almacenadas en función del tiempo (durante siete días en condiciones estándares). Las frutillas se almacenaron a 22 °C y 38% de RH tal como se recibieron (*control*) y después del recubrimiento con solución de fibroína de seda (*DxCx*). *Dx* representa 'x' etapas de  
20 recubrimiento por inmersión. *Cx* representa 'x' horas de recocado en agua. Por lo tanto, D1C0 significa frutillas que se sometieron a recubrimiento por inmersión solo una vez y que no se expusieron a recocado en agua. Se utilizó la prueba ANOVA de dos vías con análisis de la media de Tukey para

evaluar los datos. La cristalinidad de la seda afectó la deshidratación de las frutillas consideradas, pero no la cantidad de etapas de recubrimiento. Los controles sin recubrimiento perdieron alrededor de 50 % en peso de sus pesos originales en los 7 días considerados (resaltados dentro de los rectángulos rojos). Las frutillas recubiertas con seda amorfa (DxC0 - dentro de los rectángulos azules) retuvieron más agua en comparación con los controles en los días 3 ( $p < 0,05$ ). Las frutillas recubiertas con seda cristalina redujeron adicionalmente la velocidad de deshidratación de la fruta en comparación con el recubrimiento amorfo ( $p < 0,05$ ) y con el control ( $p < 0,05$ ) pero no se encontró diferencia estadística para tiempo diferente de recocado en agua ( $p > 0,05$ ).

15

La Figura 4 ilustra la interacción entre agua y membranas delgadas de biopolímeros. La Figura 4 muestra en el panel (a) absorción; (b) permeabilidad hidrodinámica; y (c) coeficiente de difusión del agua. Para el estudio de absorción, las membranas cristalinas de fibroína de seda (espesor = 130  $\mu\text{m}$ ) mostraron absorción de agua teñida en la dirección Z y XY, lo que indica la difusión capilar del agua a través de las construcciones delgadas de fibroína de seda. La investigación de la permeabilidad hidrodinámica no mostró un efecto

20

estadísticamente relevante ( $p > 0,05$ ) de la cristalinidad de la fibroína de seda en la impregnación de agua (según la prueba ANOVA de una vía con análisis de la media de Tukey). El estudio del coeficiente de difusión del agua reveló que la

5 cristalinidad de las membranas de seda afectó ligeramente el transporte en masa de agua a través de la seda (según la prueba ANOVA de una vía con análisis de la media de Tukey).

La Figura 5 proporciona imágenes del proceso de maduración de

10 bananas para la evaluación de las bananas que maduran con y sin el recubrimiento de seda. Las frutas se almacenaron a 22 °C y 38 % de RH tal como se recibieron (*control*) y después del recubrimiento con películas de fibroína de seda cristalinas (*recubiertas con seda*). Las bananas se colgaron

15 de sus tallos respectivos a lo largo de todo el experimento. La Figura 5 muestra en el panel (a) fotografía por intervalos de la maduración de las bananas lo que indica que el recubrimiento de seda disminuyó la velocidad de maduración. La Figura 5 muestra en el panel (b) Investigación de la

20 turgencia de la banana recubierta con seda (i) en comparación con el control sin recubrimiento (ii). La prueba se llevó a cabo en el día 9 después del recubrimiento. La banana recubierta con seda presentó mayor firmeza en comparación con el control sin recubrimiento. La Figura 5 muestra en el panel

(c) fotografía de la pulpa interna de bananas sin recubrimiento (i) y recubiertas (ii) en el día 9 después del tratamiento con recubrimiento de seda. La pulpa de la banana sin recubrimiento presentó un color marrón, mientras que las  
5 frutas recubiertas con seda conservaron una pulpa clara, lo que indica una menor velocidad de maduración dentro de la muestra recubierta con seda.

La Figura 6 proporciona una gráfica que muestra la  
10 caracterización química del recubrimiento de fibroína de seda en la cáscara de banana. Se utilizó ATR-FTIR para investigar la estructura de seda en las cáscaras de banana (línea azul) tras el recubrimiento por inmersión (línea roja) y tras recocado en agua durante 12 horas (línea verde).

15

La Figura 7 muestra los recubrimientos de frutas perecederas con fibroína de seda comestible. La Figura 7 en el panel (a) muestra que el impacto del recubrimiento de fibroína de seda comestible se investigó en frutillas recién recolectadas. La  
20 Figura 7 en el panel (a)(i) muestra que la fibroína de seda se extrajo de fibras de capullos de Bombyx mori mediante disolución en solución de LiBr 9,3 M y la Figura 7 en el panel (a)(ii) diálisis en agua desionizada. Luego, la concentración de la proteína en agua se ajustó a 1 % en peso.

La Figura 7 en el panel (a)(iii) muestra que el recubrimiento de las frutillas se logró luego mediante proceso de recubrimiento por inmersión en solución de fibroína de seda (1 % en peso). El proceso de recubrimiento por inmersión se repitió hasta 4 veces. La Figura 7 en el panel (a)(iv) muestra que la cristalinidad del recubrimiento comestible de fibroína de seda se moduló usando recocado en agua después del procesamiento. Cuanto mayor sea la exposición al vapor de agua (hasta 12 horas), mayor será el grado de cristalinidad de la proteína. La Figura 7 en el panel (a)(v) muestra que las frutillas recubiertas con fibroína de seda luego se dejaron a condiciones de ambiente ( $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RH} = 38\%$ ) para investigar el impacto del recubrimiento comestible en la calidad de la fruta. Se utilizó el tinte cristal violeta para teñir el recubrimiento de fibroína de seda. La Figura 7 en el panel (b) muestra imágenes macroscópicas representativas de frutillas teñidas. La Figura 7 en el panel (b)(i) muestra frutillas recién recolectadas, la Figura 7 en el panel (b)(ii) muestra frutillas recubiertas con un recubrimiento comestible de fibroína de seda amorfa (4 procesos de recubrimiento por inmersión, no se aplicó recocado en agua) y la Figura 7 en el panel (b)(iii) muestra frutillas recubiertas con un recubrimiento comestible de fibroína de seda cristalina (4 procesos de recubrimiento por inmersión,

12 horas de recocado en agua). El tinte cristal violeta es apenas visible en la superficie de las frutillas recubiertas (puntos negros) dado que el recubrimiento tenía un espesor de pocos micrones. La Figura 7 en el panel (c) muestra imágenes estereoscópicas de la superficie y del corte transversal (recuadros) de frutillas frescas teñidas con cristal violeta. La Figura 7 en el panel (c)(i) muestra frutillas recolectadas, la Figura 7 en el panel (c)(ii) muestra frutillas recubiertas con un recubrimiento comestible de fibroína de seda amorfa y la Figura 7 en el panel (c)(iii) muestra frutillas recubiertas con un recubrimiento comestible de fibroína de seda cristalina. Escala gráfica: 2 mm.

La Figura 8 muestra la maduración y pérdida de peso de las frutillas recubiertas con recubrimiento de fibroína de seda comestible. La Figura 8 en el panel (a) muestra el transcurso de tiempo de la maduración de las frutillas. Las frutillas recolectadas se almacenaron a 22 °C y 38 % de RH (sin recubrimiento) o se sometieron a recubrimiento por inmersión en solución de fibroína de seda (recubrimiento de seda amorfa). Se utilizó el recocado en agua como un proceso posterior para modular el grado de cristalinidad de la fibroína de seda. En el día 7, el recubrimiento de fibroína de seda cristalina solo demostró una mejora en la calidad de

las frutillas almacenadas. La Figura 8 en el panel (b) muestra la pérdida de peso de frutillas almacenadas durante hasta 14 días a 22 °C y 38 % de RH. Las frutillas se almacenaron tal como se recolectaron (es decir, sin recubrimiento) o después del recubrimiento con solución de fibroína de seda (DxCx). Dx representa 'x' etapas de recubrimiento por inmersión. Cx representa 'x' horas de proceso posterior de recocido en agua (por ejemplo, D1C0 significa que las frutillas se sometieron a recubrimiento por inmersión una vez y no se expusieron a recocido en agua). Se utilizó la prueba ANOVA de dos vías con análisis de la media de Tukey para evaluar los datos de pérdida de peso. La cristalinidad de la seda afectó la deshidratación de las frutillas consideradas, pero no la cantidad de etapas de recubrimiento por inmersión. Los controles sin recubrimiento perdieron alrededor de 70 % en peso de sus pesos originales en los 14 días considerados (resaltados dentro de los rectángulos rojos). Las frutillas recubiertas con seda amorfa (DxC0) retuvieron más agua que los controles sin recubrimiento en el día 3 ( $p < 0,05$ ). El recubrimiento de fibroína de seda cristalina disminuyó adicionalmente la velocidad de deshidratación de la fruta en comparación con el recubrimiento de fibroína de seda amorfa ( $p < 0,05$ ) y con el control sin recubrimiento ( $p < 0,05$ ) pero no se encontró

diferencia estadística para diferente tiempo de recocido en agua ( $p > 0,05$ ).

La Figura 9 muestra la permeabilidad y coeficiente de  
5 difusión del agua y oxígeno en películas de fibroína de seda  
en función de la cristalinidad de la proteína y sus efectos  
en la calidad del recubrimiento comestible. La Figura 9 en el  
panel (a) muestra la permeabilidad hidrodinámica en películas  
de fibroína de seda. El grado de cristalinidad de la proteína  
10 no afecta la filtración de agua a través de la película  
( $p < 0,05$ ). La Figura 9 en el panel (b) muestra el coeficiente  
de difusión del agua en películas de fibroína de seda. El  
grado de cristalinidad de la proteína afecta el coeficiente  
de difusión del agua en el estado transitorio ( $0 < t < 25$   
15 minutos) pero no en el estado estacionario ( $t > 25$  minutos). La  
Figura 9 en el panel (c) muestra la difusión del oxígeno en  
películas de fibroína de seda. El polimorfismo de la fibroína  
de seda afecta en gran medida la difusión del oxígeno ya que  
se midió una disminución de 50 veces en el coeficiente de  
20 difusión eficaz del oxígeno entre una película de fibroína de  
seda altamente cristalina y una amorfa. La Figura 9 en el  
panel (d) muestra que la velocidad de respiración de las  
frutillas recubiertas con seda se midió en función de la  
cristalinidad del recubrimiento, donde los grados de

cristalinidad mayores correspondían a una disminución estadísticamente significativa en la producción de  $\text{CO}_2$  ( $p < 0,05$ ). La Figura 9 en el panel (e) muestra los efectos del recubrimiento de seda en la firmeza de las frutillas en función del tiempo de almacenamiento y de la cristalinidad del recubrimiento. La descomposición natural de las frutillas provoca una disminución en la firmeza de la fruta, tal como se midió por una disminución dependiente del tiempo en la fuerza necesaria para penetrar la fruta ( $p < 0,05$ ). Un aumento en la cristalinidad del recubrimiento correspondió a un retraso estadísticamente significativo en el deterioro de la firmeza de la fruta en los días 3 y 7.

La Figura 10 muestra una evaluación de la maduración de las bananas con y sin recubrimiento de seda cristalina. Las frutas se almacenaron a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $38\%$  de RH tal como se recibieron (sin recubrimiento) y después del recubrimiento con películas de fibroína de seda cristalinas (recubrimiento cristalino). Las bananas se colgaron de sus tallos respectivos a lo largo de todo el experimento. La Figura 10 en el panel (a) muestra una fotografía por intervalos de la maduración de las bananas lo que indica que el recubrimiento de seda disminuyó la velocidad de maduración. La Figura 10 en el panel (b) muestra una investigación de la turgencia de la

banana recubierta con seda. La Figura 10 en el panel (b)(i) muestra la turgencia de un control sin recubrimiento. La turgencia se estudió de forma cualitativa al aplicar una carga muerta (200 g) en la superficie de la fruta. La Figura 5 10 en el panel (b)(ii) muestra que la prueba se llevó a cabo en el día 9 después del recubrimiento. La banana recubierta con seda presentó mayor firmeza en comparación con el control sin recubrimiento. La Figura 10 en el panel (c)(i) muestra imágenes de la pulpa interna de una banana no recubierta y la 10 Figura 10 en el panel (c)(ii) muestra imágenes de la pulpa interna de una banana recubierta en el día 9 después del tratamiento con recubrimiento de seda. La pulpa de la banana sin recubrimiento presentó un color marrón, mientras que las frutas recubiertas con seda conservaron una pulpa clara, lo 15 que indica una menor velocidad de maduración para las muestras recubiertas con seda.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DETERMINADAS MODALIDADES

20 La presente descripción proporciona recubrimientos comestibles a base de biopolímeros para recubrir productos perecederos, tal como artículos alimentarios. Entre otras cosas, la presente invención comprende materiales de recubrimiento a base de proteínas (es decir, a base de

polipéptidos) y métodos relacionados que no requieren el uso de plastificantes agregados. Determinadas características fisicoquímicas y materiales deseables de dichas proteínas (es decir, péptidos) se describen más detalladamente a

5 continuación. Los recubrimientos preparados de acuerdo con la presente invención muestran capacidad superior para conservar los productos perecederos tal como frutas frescas, en comparación con recubrimientos comestibles conocidos. Además, dichos recubrimientos permiten versatilidad funcional ya que

10 se pueden incorporar agentes adicionales para controlar adicionalmente el proceso de conservación de los artículos perecederos o para otros propósitos. Adicionalmente, determinadas características (por ejemplo, la fragilidad) de dichos recubrimientos se puede modular sin el uso de

15 aditivos, lo que proporciona capacidad de ajuste, dependiendo de su aplicación.

Los recubrimientos alimentarios a base de biopolímeros se han estudiado de manera extensiva y se han empleado ampliamente

20 en la industria de los alimentos. Tal vez el ejemplo más común es el uso de cera para recubrir frutas y vegetales. Las ceras son compuestos orgánicos que consisten de manera característica en largas cadenas de alquilo. Las ceras naturales son típicamente ésteres de ácidos grasos y

alcoholes de cadena larga. Las ceras sintéticas son hidrocarburos de cadena larga que carecen de grupos funcionales. La hidrofobicidad de la cera la convierte en una barrera atractiva contra la humedad para mantener frescas a las frutas y los vegetales. La cera adecuada para el recubrimiento de alimentos, sin embargo, también es frágil y típicamente se utiliza junto con un agente plastificante (es decir, un plastificante). Por ejemplo, la cera se puede mezclar con un biopolímero (por ejemplo, quitosano, gelatina) que actúa como plastificante.

Otros biopolímeros que se han empleado como materiales de recubrimiento incluyen, de modo no taxativo, varias proteínas, tal como colágeno, gelatina, zeína de maíz, gluten de trigo, caseína y suero de leche. Tanto el colágeno como la gelatina son muy hidrofílicos y, por lo tanto, no proporcionan una barrera eficaz contra la humedad. La zeína de maíz, por otro lado, es una proteína altamente hidrofóbica y debido a su abundancia también se ha explotado en la industria alimentaria para una cantidad de aplicaciones. Sin embargo, como material de recubrimiento, debido a su fragilidad típicamente requiere el uso de un plastificante agregado. Además, las proteínas zeínas no permanecen transparentes ya que se vuelven blancas tras el contacto con

agua (por ejemplo, humedad), que en algunas aplicaciones no es deseable. El gluten de trigo también requiere un plastificante para utilizarlo como material de recubrimiento. La caseína y el suero de leche también se pueden utilizar  
5 para la producción de materiales de películas comestibles, pero generalmente estas se usan como películas compuestas. Además, típicamente se requiere la adición de agentes plastificantes.

10 A diferencia de estos recubrimientos a base de biopolímeros explotados comercialmente en la actualidad, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente proporcionan características materiales superiores con atributos funcionales deseables. Por ejemplo, dichos  
15 recubrimientos (i) se pueden utilizar para formar una *barrera* entre el artículo perecedero y su entorno; (ii) se pueden utilizar como un *portador* para un agente; (iii) se pueden utilizar como un *potenciador* de al menos una propiedad del artículo perecedero o cualquier combinación de estos. En  
20 cualquiera de estos parámetros funcionales, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente exhiben un rendimiento superior en comparación con los recubrimientos comercialmente disponibles descritos en la técnica previa.

*Productos perecederos recubiertos*

Por consiguiente, en un aspecto, se proporcionan los  
5 productos que comprenden un artículo perecedero y un  
recubrimiento. Dichos productos incluyen al menos un artículo  
perecedero, del cual al menos una parte está en contacto con  
un material de recubrimiento a base de biopolímeros.

10 En el contexto de la presente descripción, productos  
"perecederos" hacen referencia a artículos que son  
susceptibles a al menos un tipo de daño (por ejemplo, calidad  
reducida), que típicamente implica cambios en uno o más  
parámetros, tal como contenido de agua, color, apariencia  
15 general, gusto o sabor, textura (por ejemplo, textura visual  
tal como suavidad y textura estructural tal como el carácter  
crujiente), integridad estructural, olor, crecimiento  
bacteriano o fúngico, etc. Los ejemplos no taxativos de  
artículos perecederos pueden incluir, de modo no taxativo:  
20 artículos alimenticios, tal como productos agrícolas frescos  
(por ejemplo, frutas y vegetales), productos cárnicos (por  
ejemplo, productos de carne procesada y carne cruda), granos,  
nueces, semillas, esporas, productos lácteos (por ejemplo,  
queso), bebidas (por ejemplo, bebidas alcohólicas, vino,

jugos), alimentos procesados (por ejemplo, snacks), comprimidos y cápsulas, tal como cápsulas de gel, plantas y flores, y similares.

5 Tal como se describe más detalladamente en la presente, en algunas modalidades de la invención, los recubrimientos usados para un artículo perecedero comprenden un biopolímero. En algunas modalidades, los recubrimientos descritos en la presente están elaborados con materiales de recubrimiento a  
10 base de proteínas. Los términos "*proteína*" y "*polipéptido*" se usan de manera intercambiable en la presente a menos que se especifique lo contrario.

En algunas modalidades, los materiales de recubrimiento a  
15 base de biopolímeros contienen una o más proteínas. Dichos material pueden contener además componentes de biopolímeros adicionales. Por ejemplo, los materiales de recubrimiento a base de biopolímeros de la presente invención incluyen aquellos con un segundo biopolímero (es decir, copolímero)  
20 mezclado en estos. Los componentes adicionales pueden incluir, de modo no taxativo, polipéptidos, ácidos grasos, ceras, almidones, carbohidratos y polisacáridos, entre otros. En algunas modalidades de la invención, un recubrimiento a base de biopolímeros comprendido por la presente invención

consistente esencialmente en una proteína y agua.

*Características estructurales de polipéptidos preferidos*

- 5 Aunque se han explorado varios recubrimientos alimentarios a base de proteínas a la fecha, la presente invención comprende el reconocimiento de que los péptidos que tienen determinadas características estructurales son especialmente útiles como material de recubrimiento de acuerdo con los métodos
- 10 proporcionados en la presente. En particular, se ha descubierto que los péptidos que son hidrofóbicos en general pero también presentan naturaleza anfifílica son adecuados para el recubrimiento de productos perecederos.
- 15 El término "anfifílico" se refiere a que tiene tanto propiedades hidrofóbicas como hidrofílicas. Por ejemplo, los tensioactivos y los zwitteriones son sustancias anfifílicas comunes. Típicamente, una proteína anfifílica contiene una o más partes hidrofóbicas (por ejemplo, tramos, dominios o
- 20 fracciones), así como también una o más partes hidrofílicas (por ejemplo, tramos, dominios o fracciones), lo que vuelve a la proteína anfifílica. En algunas modalidades, los péptidos anfifílicos pueden formar estructuras micelares (es decir, micelas) en una solución.

Por consiguiente, en algunas modalidades, un polipéptido anfifílico adecuado para la presente invención contiene una o más partes hidrofóbicas y una o más partes hidrofílicas. En algunas modalidades, un polipéptido anfifílico adecuado para la presente invención contiene segmentos intermedios hidrofóbicos e hidrofílicos. En algunas modalidades, un polipéptido anfifílico adecuado para la presente invención contiene segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos organizados en tándem. En modalidades particularmente útiles, los segmentos hidrofóbicos de un polipéptido anfifílico predominan sobre los segmentos hidrofílicos. Por ejemplo, en algunas modalidades, segmentos hidrofóbicos largos de un polipéptido anfifílicos están unidos por segmentos más cortos de motivos enlazadores hidrofílicos.

En algunas modalidades, los polipéptidos anfifílicos adecuados para la presente invención comprenden una parte hidrofóbica que puede formar una estructura secundaria de lámina beta (lámina  $\beta$ ) (por ejemplo, cristalina). En algunas modalidades, los polipéptidos anfifílicos adecuados para la presente invención comprenden múltiples partes hidrofóbicas que pueden formar una estructura secundaria de lámina beta (lámina  $\beta$ ). En algunas modalidades, los polipéptidos

anfifílicos adecuados para la presente invención comprenden una parte hidrofóbica que es amorfa (por ejemplo, una hélice aleatoria). En algunas modalidades, los polipéptidos anfifílicos adecuados para la presente invención comprenden

5 múltiples partes hidrofílicas que forman una hélice aleatoria. En algunas modalidades, los polipéptidos anfifílicos adecuados para la presente invención comprenden múltiples partes hidrofóbicas que pueden formar una estructura secundaria de lámina beta (lámina  $\beta$ ) y múltiples

10 partes hidrofílicas que pueden formar una hélice aleatoria. En algunas modalidades, las múltiples partes hidrofóbicas que pueden formar una estructura secundaria de lámina beta y las múltiples partes hidrofílicas que pueden formar una hélice aleatoria se organizan en tándem.

15

Se ha descubierto además que los péptidos anfifílicos que tienen hidrofobicidad general relativamente alta son adecuados para llevar a cabo la invención descrita en la presente. Definir la hidrofobicidad de las proteínas en una

20 base estructural es complejo ya que puede estar modulada no solo por la estructura primaria (es decir, secuencia de aminoácidos), sino que también implica las estructuras secundaria y terciaria. En el contexto de la presente descripción, sin embargo, los péptidos anfifílicos adecuados

para llevar a cabo la invención descrita típicamente presentan una hidrofobicidad neta de al menos 65 % en el nivel de aminoácido, por ejemplo, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o mayor. Por lo tanto, tal como se usa en la presente, la "hidrofobicidad neta" de un péptido o proteína se determina dividiendo la cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presentes en la secuencia primaria entre la cantidad total de aminoácidos, multiplicado por 100, expresado como porcentaje (%).

Entre los 20 aminoácidos más comunes, se considera que los siguientes son aminoácidos "hidrofóbicos": Alanina (Ala/A), Isoleucina (Ile/I), Leucina (Leu/L), Fenilalanina (Phe/F), Valina (Val/V), Prolina (Pro/P), Glicina (Gly/G). Por otro lado, los aminoácidos polares o cargados son más propensos a estar en contacto con agua (es decir, "hidrofílico") o, en otras palabras, son energéticamente favorables a estar en contacto con agua. Entre los 20 aminoácidos más comunes, los residuos de aminoácidos "cargados" incluyen Arginina (Arg/R), Lisina (Lys/K), Ácido aspártico (Asp/D) y Ácido glutámico (Glu/E). Entre los 20 aminoácidos más comunes, los residuos de aminoácidos "polares" incluyen Glutamina (Gln/Q), Asparagina (Asn/N), Histidina (His/H), Serina (Ser/S),

Treonina (Thr/T), Tirosina (Tyr/Y), Cisteína (Cys/C), Metionina (Met/M) y Triptófano (Trp/W).

Por consiguiente, en algunas modalidades, los polipéptidos  
5 anfifílicos útiles para la presente invención contienen al  
menos 65 % de residuos de aminoácidos que conforman la o las  
partes hidrofóbicas (por ejemplo, estructuras secundarias  
hidrofóbicas) del péptido, por ejemplo, al menos 65 %, al  
menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al  
10 menos 90 %, al menos 95 % o mayor. En algunas modalidades, un  
polipéptido anfifílico adecuado para la presente invención  
contiene al menos 65 % de sus residuos de aminoácidos que  
participan en la formación de estructuras secundarias de  
lámina beta, por ejemplo, al menos 65 %, al menos 70 %, al  
15 menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al  
menos 95 % o mayor.

Además, los inventores de la presente solicitud han  
reconocido que la parte o partes hidrofílicas de un  
20 polipéptido anfifílico descrito en la presente puede  
funcionar sorprendentemente como un "plastificante  
incorporado" cuando se usa como material de recubrimiento.  
Como tales, los recubrimientos elaborados con dichos  
polipéptidos anfifílicos no requieren un agente plastificante

agregado.

Por consiguiente, en algunas modalidades, los polipéptidos anfifílicos útiles para la presente invención contienen hasta 5 35 % de residuos de aminoácidos que conforman la o las partes hidrofílicas del péptido, por ejemplo, 35 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos y 5 % o menos. En algunas modalidades, un polipéptido anfifílico adecuado para la presente invención contiene hasta 10 35 % de sus residuos de aminoácidos que forman una o más estructuras de hélice aleatoria, por ejemplo, 35 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos y 5 % o menos.

15 Adicionalmente, los inventores de la presente descripción han reconocido que la interacción a nivel molecular entre los dominios hidrofóbicos (por ejemplo, cristalinos) y los dominios hidrofílicos (por ejemplo, amorfos) de un recubrimiento de proteínas determina el equilibrio de 20 maleabilidad del recubrimiento resultante. Es decir, la formación cristalina depende principalmente de las interacciones intramoleculares e intermoleculares de los dominios hidrofóbicos a través de enlaces de hidrógeno así como también de interacciones hidrofóbicas, mientras la

flexibilidad estructural o maleabilidad del recubrimiento requiere el efecto plastificante proporcionado por los dominios amorfos de dichas proteínas.

5 Esto también significa que, los pesos moleculares relativos o intervalos de pesos moleculares de dichos péptidos que conforman un recubrimiento tienen un efecto en la formación cristalina, o "empaquetamiento", así como también su estabilidad y flexibilidad estructural, porque los polipéptidos con

10 fracciones hidrofóbicas relativamente más grandes pueden proporcionar interacciones moleculares mayores (por ejemplo, más enlaces de hidrógeno, etc.) para estabilizar la estructura de la proteína. Por consiguiente, en algunas modalidades de la invención, las proteínas usadas para un

15 material de recubrimiento tienen un peso molecular promedio de al menos 50 kilodaltons (kDa). En algunas modalidades, las proteínas usadas para un material de recubrimiento de acuerdo con la invención tienen pesos moleculares promedio que varían entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 400 kDa. En algunas

20 modalidades, las proteínas usadas para un material de recubrimiento de acuerdo con la invención tienen un peso molecular promedio de alrededor de 50 kDa, alrededor de 60 kDa, alrededor de 70 kDa, alrededor de 80 kDa, alrededor de 90 kDa, alrededor de 100 kDa, alrededor de 110 kDa, alrededor de

120 kDa, alrededor de 130 kDa, alrededor de 140 kDa, alrededor de 150 kDa, alrededor de 160 kDa, alrededor de 170 kDa, alrededor de 180 kDa, alrededor de 190 kDa, alrededor de 200 kDa, alrededor de 210 kDa, alrededor de 220 kDa, alrededor de 230 kDa, alrededor de 240 kDa, alrededor de 250 kDa, alrededor de 260 kDa, alrededor de 270 kDa, alrededor de 280 kDa, alrededor de 290 kDa, alrededor de 300 kDa, alrededor de 310 kDa, alrededor de 320 kDa, alrededor de 330 kDa, alrededor de 340 kDa, alrededor de 350 kDa, alrededor de 360 kDa, alrededor de 370 kDa, alrededor de 380 kDa, alrededor de 390 kDa, alrededor de 400 kDa y mayor. Típicamente, dichos polipéptidos pueden formar recubrimientos flexibles y menos frágiles sin requerir agentes plastificantes agregados.

15

Para dar un ejemplo, la fibroína de seda es una proteína estructural hidrofóbica que tiene propiedades anfifílicas. La cadena pesada de la fibroína de seda está hecha de fracciones amorfas y cristalinas. Se ha observado que las láminas beta de las proteínas de fibroína se apilan para formar cristales, mientras que otros segmentos forman dominios amorfos. Es la interacción entre los segmentos cristalinos rígidos y las regiones semiamorfas elásticas deformadas, que le da a la seda, al menos en parte, sus propiedades extraordinarias.

20

Además, tanto las estructuras secundarias como terciarias de proteínas se pueden controlar adicionalmente debido al polimorfismo de la proteína. Esta modulación de la estructura de seda permite un buen control de las propiedades mecánicas y físicas de la proteína que da como resultado un material flexible y más plástico, en comparación con proteínas puramente cristalinas, tal como la zeína de maíz. Además, el peso molecular de la fibroína de seda regenerada (por ejemplo, de alrededor de 390 a alrededor de 50 KDa, dependiendo de las condiciones de procesamiento, tal como tiempo de ebullición) es mucho mayor que el de la zeína regenerada (alrededor de 15-40 kDa). Sin pretender limitarse a una teoría en particular, se cree que con dicho peso molecular bajo, los enlaces intermoleculares y el entrelazamiento de cadena son limitados y dan como resultado un material más frágil, que de hecho requiere un plastificante para elaborar un recubrimiento de película adaptable y flexible. Por la misma razón, los recubrimientos de película flexibles no se pueden elaborar típicamente usando fibroína de seda hervida durante un período de tiempo prolongado (tal como 100 min). Dicho procesamiento provoca la fragmentación de la proteína, y a medida que el peso molecular de la proteína se vuelve demasiado bajo, el

material resultante se vuelve demasiado frágil.

Sin embargo, en determinadas situaciones se prefieren los recubrimientos que son frágiles. Por ejemplo, puede ser  
5 conveniente que algunos productos perecederos retengan su carácter crujiente. Por lo tanto, la invención incluye el uso de proteínas de peso molecular bajo seleccionadas para la preparación de recubrimientos. En algunas modalidades, las proteínas de peso molecular bajo tienen un peso molecular  
10 promedio que varía entre alrededor de 10 kDa y alrededor de 45 kDa, es decir, alrededor de 10 kDa, alrededor de 15 kDa, alrededor de 20 kDa, alrededor de 25 kDa, alrededor de 30 kDa, alrededor de 35 kDa, alrededor de 40 kDa y alrededor de 45 kDa.

15

Se puede considerar una cantidad de polipéptidos anfifílicos para llevar a cabo la presente invención. En algunas modalidades, se puede utilizar un polipéptido de una sola fuente (por ejemplo, proteínas de origen natural), que  
20 contiene tanto un tramo o módulo hidrofóbico como un tramo o módulo hidrofílico dentro del polipéptido, de modo que el polipéptido individual en sí mismo es naturalmente anfifílico. En algunas modalidades, un tramo o módulo hidrofóbico y un tramo o módulo hidrofílico pueden fusionarse

o acoplarse entre sí para formar una entidad anfifílica. Dichos polipéptidos de "fusión" o "quiméricos" pueden producirse usando técnicas recombinantes, acoplamiento químico o ambos.

5

Adicionalmente, la presente invención comprende el reconocimiento de que los polipéptidos que incluyen una parte o partes de una secuencia de aminoácidos que adoptan la estructura secundaria de lámina beta (lámina  $\beta$ ) son particularmente útiles para la presente invención. Por consiguiente, en algunas modalidades, los polipéptidos anfifílicos se seleccionan sobre la base de que tienen una estructura de lámina beta o son propensos a formar dicha estructura basándose en la secuencia de aminoácidos.

15

En algunas modalidades, los recubrimientos a base de péptidos descritos en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos de polipéptidos que se seleccionan de de la siguiente lista: fibroínas, actinas, colágenos, cateninas, claudinas, coilinas, elastinas, elauninas, extensinas, fibrilinas, laminas, lamininas, keratinas, tublinas, proteínas estructurales virales, proteínas zeínas (proteína de almacenamiento de semillas) y cualquier combinación de estas. En algunas modalidades, se utiliza la fibroína de seda

20

Los polipéptidos anfifílicos adecuados para poner en práctica la presente invención pueden producirse de varias fuentes, que incluyen una proteína regenerada (por ejemplo, purificada) de fuentes naturales, proteínas recombinantes producidas en sistemas heterólogos, péptidos sintéticos o producidos químicamente o una combinación de estos.

En algunas modalidades, los recubrimientos de la presente invención pueden prepararse a partir de un polipéptido que corresponde a cualquiera de la lista proporcionada anteriormente, con o sin una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos, en comparación con la contraparte natural o de tipo salvaje. Por ejemplo, en algunas modalidades, dichas variantes pueden presentar al menos 85 % de identidad de secuencia general en comparación con la secuencia de tipo salvaje, por ejemplo, al menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %,

98 %, 99 % de identidad de secuencia general. En algunas modalidades, por ejemplo, se prepara un recubrimiento usando fibroína de seda de acuerdo con la presente descripción. En cualquiera de las modalidades, los recubrimientos descritos en la presente pueden comprender un polipéptido de fibroína de seda. En algunas modalidades, dichos recubrimientos pueden consistir esencialmente en un polipéptido de fibroína de seda y agua residual.

#### 10 *Fibroína de seda*

Tal como se usa en la presente, el término "fibroína de seda" se refiere a una proteína de fibroína de seda o fragmento de esta, ya sea producida por el gusano de seda, araña u otro insecto o generada de otra forma (Lucas et al., Adv. Protein Chem., 13: 107-242 (1958)). La seda es producida naturalmente por varias especies que incluyen, de modo no taxativo: *Antheraea mylitta*; *Antheraea pernyi*; *Antheraea yamamai*; *Galleria mellonella*; *Bombyx mori*; *Bombyx mandarina*; *Galleria mellonella*; *Nephila clavipes*; *Nephila senegalensis*; *Gasteracantha mammosa*; *Argiope aurantia*; *Araneus diadematus*; *Latrodectus geometricus*; *Araneus bicentenarius*; *Tetragnatha versicolor*; *Araneus ventricosus*; *Dolomedes tenebrosus*; *Euagrus chisoseus*; *Plectreurys tristis*; *Argiope trifasciata*;

y *Nephila madagascariensis*.

En algunas modalidades, la fibroína de seda se obtiene a partir de una solución que contiene una seda del gusano de  
5 seda o seda de araña disuelta. Por ejemplo, en algunas modalidades, las fibroínas de seda del gusano de seda se obtienen del capullo de *Bombyx mori*. En algunas modalidades, las fibroínas de seda de araña se obtienen, por ejemplo, de *Nephila clavipes*. De manera alternativa, en algunas  
10 modalidades, las fibroínas de seda adecuadas para usar en la invención se obtienen a partir de una solución que contiene una seda diseñada genéticamente o seda producida de manera recombinante cosechada de bacterias, levadura, células de mamífero, animales transgénicos o plantas transgénicas.  
15 Véase, por ejemplo, WO 97/08315 y la patente estadounidense n.º 5,245,012, cada uno de los cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Por lo tanto, en algunas modalidades, se utiliza una solución  
20 de seda para producir recubrimiento de la presente invención que contiene proteínas de fibroína, esencialmente sin sericinas. "Sustancialmente sin" tal como se usa en la presente significa que está ausente o presente a una concentración que (i) se encuentra por debajo de la detección

medida por cualquier medio aceptado en la técnica; o, (ii) tiene poco impacto o impacto nulo en la aplicación posterior, de modo que se considera insignificante.

5 En algunas modalidades, las soluciones de seda usadas para fabricar varias composiciones de la presente invención contienen la cadena pesada de fibroína, pero esencialmente sin otras proteínas. En otras modalidades, las soluciones de seda usadas para fabricar varias composiciones de la presente  
10 invención contienen tanto la cadena pesada como la cadena ligera de fibroína, pero esencialmente sin otras proteínas. En determinadas modalidades, las soluciones de seda usadas para fabricar varias composiciones de la presente invención contienen tanto una cadena pesada como una cadena ligera de  
15 fibroína de seda; en algunas de esas modalidades, la cadena pesada y la cadena ligera de fibroína de seda están unidas mediante al menos un enlace disulfuro. En algunas modalidades donde están presentes las cadenas pesada y ligera de fibroína, estas están unidas mediante uno, dos, tres o más  
20 enlaces disulfuro.

Aunque las diferentes especies de organismos que producen seda, y tipos diferentes de seda, tienen diferentes composiciones de aminoácidos, varias proteínas de fibroína

comparten determinadas características estructurales. Una  
tendencia general en la estructura de la fibroína de seda es  
una secuencia de aminoácidos que se caracteriza por alternar  
frecuentemente glicina y alanina, o alanina sola. Dicha  
5 configuración permite que las moléculas de fibroína se  
autoensamblen en una conformación de lámina beta. Estos  
bloques hidrofóbicos "ricos en Ala" y "ricos en Gly" están  
típicamente separados por segmentos de aminoácidos con grupos  
laterales voluminosos (por ejemplo, espaciadores  
10 hidrofílicos).

En algunas modalidades, las secuencias de repetición  
centrales de los bloques hidrofóbicos de fibroína están  
representadas por las siguientes secuencias de aminoácidos  
15 y/o fórmulas: (GAGAGS)<sub>5-15</sub> (SEQ ID NO: 1); (GX)<sub>5-15</sub> (X=V, I, A)  
(SEQ ID NO: 2); GAAS (SEQ ID NO: 3); (S1-2A11-13) (SEQ ID NO:  
4); GX1-4 GGX (SEQ ID NO: 5); GGGX (X=A, S, Y, R, D V, W, R,  
D) (SEQ ID NO: 6); (S1-2A1-4)<sub>1-2</sub> (SEQ ID NO: 7); GLGGLG (SEQ  
ID NO: 8); GXGGXG (X=L, I, V, P) (SEQ ID NO: 9); GPX (X=L, Y,  
20 I); (GP(GGX)<sub>1-4</sub> Y)<sub>n</sub> (X=Y, V, S, A) (SEQ ID NO: 10); GRGGAn  
(SEQ ID NO: 11); GGX<sub>n</sub> (X=A, T, V, S); GAG(A)<sub>6-7</sub>GGA (SEQ ID NO:  
12); y GGX GX GXX (X=Q, Y, L, A, S, R) (SEQ ID NO: 13).

En algunas modalidades, el péptido de fibroína contiene

múltiples bloques hidrofóbicos, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 bloques hidrofóbicos dentro del péptido. En algunas modalidades, el péptido de fibroína contiene entre 4-17 bloques hidrofóbicos.

5

En algunas modalidades de la invención, un péptido de fibroína comprende al menos una secuencia espaciadora hidrofílica ("bloque hidrofílico") que tiene alrededor de 4-50 aminoácidos de longitud. Los ejemplos no taxativos de

10 secuencias espaciadoras hidrofílicas incluyen: TGSSGFGPYVNGGYSG (SEQ ID NO: 14); YEYAWSSE (SEQ ID NO: 15); SDFGTGS (SEQ ID NO: 16); RRAGYDR (SEQ ID NO: 17); EVIVIDDR (SEQ ID NO: 18); TTIIEDLDITIDGADGPI (SEQ ID NO: 19) y TISEELTI (SEQ ID NO: 20).

15

En determinadas modalidades, un péptido de fibroína contiene una secuencia espaciadora hidrofílica que es un derivado de cualquiera de las secuencias espaciadoras representativas indicadas anteriormente. Dichos derivados son al menos 75 %,

20 al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % idénticos a cualquiera de las secuencias espaciadoras hidrofílicas.

Como se indicó, las sedas son proteínas fibrosas y se

caracterizan por unidades modulares unidas entre sí para formar proteínas altamente repetitivas, de alto peso molecular. Se cree que estas unidades modulares o dominios, cada una con secuencias de aminoácidos y químicas específicas, proporcionan funciones específicas. Por ejemplo, los motivos de secuencia tales como poli-alanina (polyA) y poli-alanina-glicina (poly-AG) tienen tendencia a formar láminas beta; los motivos GXX contribuyen a la formación de hélices; los motivos GXG proporcionan rigidez; y GPGXX (SEQ ID NO: 22) contribuye a la formación de espirales beta. Estos son ejemplos de componentes clave en varias estructuras de seda cuyo posicionamiento y disposición se encuentran ligados estrechamente con las propiedades del material final de los materiales a base de seda (revisado en Omenetto y Kaplan (2010) Science 329: 528-531). Véase también: WO 2011/130335 (PCT/US2011/032195), cuyo contenido se incorpora a la presente mediante referencia.

En cualquiera de las modalidades contempladas en la presente, se pueden utilizar polipéptidos de fibroína de seda de diversos pesos moleculares (por ejemplo, fragmentos). En algunas modalidades, por ejemplo, los recubrimientos de fibroína de seda proporcionados comprenden polipéptidos de fibroína de seda que tienen un peso molecular promedio de

entre alrededor de 3,5 kDa y alrededor de 350 kDa. Los ejemplos no taxativo de intervalos adecuados de fragmentos de fibroína de seda incluyen, de modo no taxativo: polipéptidos de fibroína de seda que tienen un peso molecular promedio de entre alrededor de 50 kDa y alrededor de 350 kDa; polipéptidos de fibroína de seda que tienen un peso molecular promedio de entre alrededor de 100 kDa y alrededor de 350 kDa; polipéptidos de fibroína de seda que tienen un peso molecular promedio de entre alrededor de 150 kDa y alrededor de 350 kDa; polipéptidos de fibroína de seda que tienen un peso molecular promedio de entre alrededor de 200 kDa y alrededor de 350 kDa, etc. Los polipéptidos de fibroína de seda que tienen tamaño "reducido", por ejemplo, más pequeños que la contraparte original o de tipo salvaje, pueden denominarse "fibroína de seda de peso molecular bajo".

#### *Aditivos - plastificantes opcionales*

En cualquiera de las modalidades contempladas por la presente invención, los recubrimientos a base de biopolímeros pueden incluir adicionalmente uno o más aditivos. Aunque no son necesarios, los ejemplos de aditivos adecuados incluyen, de modo no taxativo, uno o más agentes plastificantes (es decir, plastificantes) y otros agentes activos o inactivos,

dependiendo del uso particular.

Tal como se usa en el contexto de la presente descripción, los términos "*agente plastificante*" y "*plastificante*" se usan de manera intercambiable en la presente y significan cualquier sustancia agregada a una preparación de recubrimiento a base de biopolímeros para promover la plasticidad y flexibilidad y para reducir la fragilidad. Típicamente, dicho agente es una sustancia higroscópica que forma enlaces electrostáticos o de hidrógeno con el biopolímero y que aumenta la cantidad de agua de enlaces de congelación y libres retenida en los materiales de biopolímeros. Un ejemplo de dicho agente es glicerol. Debería destacarse, sin embargo, que es posible que al menos algunos plastificantes usados comúnmente para preparaciones convencionales (por ejemplo, determinados aceites) no trabajen con los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente solicitud. En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros incluyen uno o más agentes plastificantes que incluyen, de modo no taxativo: Glicerina; oleato de glicerilo; alcohol de oleilo; PEG-4 PEG-6; PEG-8; PEG-12; PEG-16; PEG-20 PEG-32; PEG-75 (Ref. Handbook of Green Chemistry, Part IV Functional/Application, pp. 2759), ácido esteárico, ácido oleico, lactato de sodio,

Emerest® 2618; Emerest® 2619; Hydrobrite® 200PO; Hydrobrite® 380PO; Hydrobrite® 550PO estearato PEG-20; laurato de propilenglicol; Sementol® 40; Sementol® 70; Sementol® 85 Sementol® 100; Sementol® 350 (Ref. Handbook of Green Chemistry, Part IV  
5 Functional/Application, pp. 2755).

En algunas modalidades, las preparaciones de recubrimiento a base de biopolímeros pueden contener adicionalmente uno o más humectantes. Generalmente, un humectante es un solvente  
10 soluble en agua y cualquiera de un grupo de sustancias higroscópicas con propiedades hidratantes, es decir, usadas para mantener las cosas húmedas. A menudo son una molécula con varios grupos hidrofílicos, más frecuentemente grupos hidroxilo; sin embargo, también pueden encontrarse aminas y  
15 grupos carboxilo, a veces esterificados (su afinidad para formar enlaces de hidrógeno con moléculas de agua, es el rasgo crucial).

Los ejemplos no taxativos de algunos humectantes incluyen:  
20 propilenglicol (E1520), hexilenglicol y butilenglicol; triacetato de glicerilo (E1518); alcohol vinílico; neoagarobiosa; alcoholes de azúcar/polioles de azúcar: glicerol/glicerina, sorbitol (E420), xilitol, maltitol (E965); polioles poliméricos (por ejemplo, polidextrosa

(E1200)); quillay (E999); urea; gel de aloe vera gel; MP Diol; ácidos alfa hidroxí (por ejemplo, ácido láctico); y miel.

## 5 *Aditivos opcionales - Otros componentes*

De acuerdo con la presente invención, los recubrimientos a base de biopolímeros pueden incluir adicionalmente uno o más componentes adicionales de interés. Dichos componentes pueden ser agentes activos o agentes inactivos (o inertes). Los ejemplos no taxativos de aditivos que se pueden incorporar en los materiales de recubrimiento incluyen agentes biológicamente activos tales como: agentes antimicrobianos, tal como agentes antibacterianos y agentes antifúngicos; inhibidores de enzimas; moléculas de unión/captura de etileno, tal como dominios de unión a etileno de receptores de etileno; sustancias absorbentes de etileno, tal como aluminosilicatos (por ejemplo, zeolitas), aerogeles a base de fibroína de seda (véase, solicitud provisional estadounidense 61/902,145 presentada el 8 de noviembre de 2013, titulada "PEPTIDE-BASED NANOFIBRILLAR MATERIALS" [Materiales nanofibrilares a base de péptidos] que se incorpora en la presente) agentes oxidantes, tal como permanganato de potasio; antagonistas del receptor de etileno; porfirinas;

hormonas, agonistas del receptor de hormonas y antagonistas de estos.

Otros aditivo que se pueden incorporar en los materiales de recubrimiento incluyen, de modo no taxativo: agentes 5 nutracéuticos (complementos dietéticos tales como: vitaminas, antioxidantes, ácidos grasos, etc.); saborizantes y otros compuestos agregados para mejorar el sabor, tal como azúcares; perfumes o fragancias, colorantes, tintes, etc.

10

#### *Características funcionales*

Tal como se muestra en la Ejemplificación proporcionada más adelante, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos 15 en la presente solicitud exhiben baja permeabilidad de agua y, por lo tanto, pueden formar una barrera eficaz contra la humedad para evitar la pérdida de humedad de los productos perecederos. Esto es importante para mantener la humedad dentro de los productos perecederos con contenido de agua 20 relativamente alto, tal como las frutas frescas, evitando la deshidratación, así como también para mantener la humedad afuera para mantener los productos secos. El control de la permeabilidad de agua también puede ayudar a controlar la contaminación y crecimiento de microbios.

En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente solicitud tienen un coeficiente de difusión del agua menor que  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s, por ejemplo, menor que  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s, menor que  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s, menor que  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s o menos. En algunas modalidades, dichos recubrimientos tienen un coeficiente de difusión del agua que varía entre alrededor de  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s y alrededor de  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s, por ejemplo, entre alrededor de  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s y alrededor de  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s, entre alrededor de  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s y alrededor de  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s, entre alrededor de  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s y alrededor de  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s, entre alrededor de  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s y alrededor de  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s y entre alrededor de  $10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s y alrededor de  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s.

En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente solicitud exhiben baja permeabilidad de gas. En algunas modalidades, los recubrimientos descritos en la presente tienen un coeficiente de permeabilidad de oxígeno ( $Dk_{O_2}$ ) menor que  $10^{-10}$  [(ml<sub>O<sub>2</sub></sub> • cm) / (cm • s • mmHg)]. En algunas modalidades, dichos recubrimientos tienen un coeficiente de permeabilidad de oxígeno ( $Dk_{O_2}$ ) que varía entre alrededor de  $10^{-10}$  y alrededor de  $10^{-13}$  [(ml<sub>O<sub>2</sub></sub> • cm) / (cm • s • mmHg)], por ejemplo, entre alrededor de  $10^{-10}$  y alrededor de  $10^{-12}$  [(ml<sub>O<sub>2</sub></sub> • cm) / (cm • s •

mmHg)], entre alrededor de  $10^{-10}$  y alrededor de  $10^{-11}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)], entre alrededor de  $10^{-11}$  y alrededor de  $10^{-13}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)], entre alrededor de  $10^{-11}$  y alrededor de  $10^{-12}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)]. En algunas

5 modalidades, un coeficiente de permeabilidad de oxígeno (Dk<sub>O2</sub>) de los recubrimientos descritos es de alrededor de  $10^{-13}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)], alrededor de  $10^{-12}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)] o alrededor de  $10^{-11}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)], alrededor de  $10^{-10}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)].

10

En algunas modalidades de la invención, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente solicitud son útiles por la capacidad mejorada o potenciada de conservar artículos perecederos que son susceptibles a la

15 deshidratación, susceptibles a la decoloración, susceptibles a la oxidación, susceptibles a la fotodegradación, susceptibles a la degradación enzimática, susceptibles a la descomposición provocada por microbios, sensibles al etileno, emiten etileno, susceptibles a la daños mecánicos por golpe o

20 cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros elaborados a partir de un polipéptido anfifílico pero hidrofóbico se usan para conservar productos agrícolas

frescos. En algunas modalidades, los productos perecederos tal como las frutas se recubren uno o más veces con un recubrimiento de biopolímeros.

5 Por lo tanto, la invención proporciona métodos para mejorar la conservación de los artículos perecederos que son susceptibles a la descomposición o fermentación provocada por los hongos (por ejemplo, moho), bacterias o una combinación de estos. Generalmente, la frescura de los productos  
10 perecederos se conserva mejor cuando dichos productos están recubiertos varias veces con los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente, y también cuando se induce la formación cristalina de la proteína en el material de recubrimiento, lo que da como resultado una conservación  
15 prolongada observada por la integridad estructural y apariencia de los tejido externos e internos de los productos después del almacenamiento estándar. Por consecuencia, el aumento de las etapas de recubrimiento y el aumento de la cristalinidad de la proteína dio como resultado una  
20 regulación por disminución del crecimiento microbiano, visible mediante la reducción de descomposición por hongos y moho.

En algunas modalidades, las condiciones de almacenamiento

adecuadas implican almacenar un artículo perecedero a una temperatura que varía entre alrededor de 2 °C y alrededor de 50 °C, pero más típicamente entre alrededor de 2 °C y alrededor de 35 °C, por ejemplo, alrededor de 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, etc.

En cualquiera de dichas modalidades, las condiciones de almacenamiento adecuadas implican almacenar un artículo perecedero con determinados niveles de humedad, por ejemplo, menor que 5 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % y alrededor de 100 %.

20

En cualquiera de dichas modalidades, las condiciones de almacenamiento adecuadas implican almacenar un artículo perecedero durante un período de tiempo que varía entre alrededor de 1 hora y alrededor de 3 años. Más típicamente,

la duración del almacenamiento varía entre alrededor de 1 día y alrededor de 1 año, por ejemplo, alrededor de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 2 días, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más.

- 10 Los recubrimientos preparados y usados de acuerdo con la presente solicitud pueden extender de manera significativa la vida útil de los productos perecederos recubiertos o envasados con estos. "Vida útil" se define generalmente como el período de tiempo que se puede almacenar un producto sin
- 15 que se vuelva no apto para su uso o consumo. Por lo tanto, la vida útil es el tiempo máximo recomendado, durante el cual se pueden almacenar los productos, durante el cual la calidad definida de una proporción especificada de los productos permanece aceptable en condiciones esperadas (o
- 20 especificadas) de distribución, almacenamiento y exposición.

En algunas regiones, se requiere la indicación de una fecha de vencimiento, consumo preferente antes de o fecha límite de consumo en los productos perecederos envasados. Los

recubrimientos descritos en la presente pueden incluir dicha información.

Generalmente, las "*fechas de vencimiento*" se usan como guías  
5 en función de la manipulación y exposición normal y esperada a la temperatura. El uso antes de la fecha de vencimiento no garantiza la seguridad de un producto perecedero, y dicho producto no es necesariamente peligroso o ineficaz después de la fecha de vencimiento.

10

Para artículo alimenticios, típicamente la vida útil es diferente a la fecha de vencimiento ya que la primera se refiere a la calidad del alimento mientras que la última se refiere a la seguridad del alimento. Es probable que un  
15 producto perecedero que haya pasado su vida útil aun sea seguro, pero ya no se garantiza la calidad.

En algunas modalidades, el uso de un recubrimiento descrito en la presente prolonga la vida útil de un producto  
20 perecedero recubierto con este, en comparación con el mismo producto o un producto similar sin el recubrimiento descrito, cuando ambos productos se procesan y almacenan de otra forma en condiciones idénticas o sustancialmente idénticas. Con el uso del recubrimiento descrito, en algunas modalidades, la

vida útil de un producto perecedero se extiende al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 70 %, 5 al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o más, con respecto a la vida útil de un producto equivalente en condiciones de procesamiento y almacenamiento iguales de otra forma, con la excepción del recubrimiento.

10

En algunas modalidades, una vida útil promedio de un artículo perecedero recubierto con un recubrimiento descrito en la presente solicitud se aumenta entre alrededor de 1,1 y alrededor de 10 veces, en comparación con la contraparte 15 correspondiente (por ejemplo, referencia), es decir, un artículo sin el recubrimiento de la invención, por ejemplo, alrededor de 1,2, alrededor de 1,3, alrededor de 1,4, alrededor de 1,5, alrededor de 1,6, alrededor de 1,7, alrededor de 1,8, alrededor de 1,9, alrededor de 2,0, 20 alrededor de 2,1, alrededor de 2,2, alrededor de 2,3, alrededor de 2,4, alrededor de 2,5, alrededor de 2,6, alrededor de 2,7, alrededor de 2,8, alrededor de 2,9, alrededor de 3,0, alrededor de 3,1, alrededor de 3,2, alrededor de 3,3, alrededor de 3,4, alrededor de 3,5,

alrededor de 3,6, alrededor de 3,7, alrededor de 3,8,  
alrededor de 3,9, alrededor de 4,0, alrededor de 4,5,  
alrededor de 5,0, alrededor de 5,5, alrededor de 6,0,  
alrededor de 6,5, alrededor de 7,0, alrededor de 7,5,  
5 alrededor de 8,0, alrededor de 8,5, alrededor de 9,0,  
alrededor de 9,5 y alrededor de 10 veces.

En algunas modalidades, una vida útil promedio de un producto  
perecedero recubierto con un recubrimiento descrito en la  
10 presente, en comparación con un producto de referencia sin  
dicho recubrimiento, se extiende al menos 1 día, al menos 2  
días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al  
menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9  
días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días,  
15 al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al  
menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días, al menos  
19 días, al menos 20 días, al menos 21 días, al menos 22  
días, al menos 23 días, al menos 24 días, al menos 25 días,  
al menos 26 días, al menos 27 días, al menos 28 días, al  
20 menos 29 días, al menos 30 días, al menos 5 semanas, al menos  
6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9  
semanas, al menos 10 semanas, al menos 11 semanas, al menos  
12 semanas, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6  
meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses,

al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 1 año, al menos 18 meses, al menos 2 años, al menos 30 meses, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años o más.

5 En algunas modalidades, los recubrimientos descritos en la presente descripción pueden reducir la necesidad de, o incluso eliminar, el requisito de la cadena de frío convencional empleado típicamente para un producto perecedero particular. Por ejemplo, en algunas modalidades, los  
10 productos perecederos que típicamente se envían y/o almacenan a determinados intervalos de temperaturas preferidas o recomendadas pueden retener uno o más parámetros de calidad del producto fuera de dichos intervalos de temperatura, cuando se recubren con un recubrimiento descrito de acuerdo  
15 con la presente invención. En algunas modalidades, los productos recubiertos con dicho recubrimiento pueden tolerar un mayor grado de desviaciones y/o fluctuaciones de la temperatura, humedad, tensión mecánica, exposición a la luz o cualquier combinación de estos, según se determina mediante  
20 cualquiera de los parámetros descritos en la presente u otros métodos adecuados conocidos en la técnica.

*Mediciones de conservación*

Existen una cantidad de parámetros para medir la eficacia relativa de la conservación de alimentos. Se puede emplear cualquier medio adecuado para medir o evaluar el grado de frescura o conservación, o evaluar la calidad, de productos perecederos antes y después o durante el transcurso del almacenamiento. Estos incluyen, de modo no taxativo, cambios de peso, que pueden reflejar la pérdida de agua, cambios de forma o integridad estructural general, cambios de textura tal como firmeza, cambios de colores que incluyen la tonalidad general o manchas locales, cambios de especies químicas (por ejemplo, contenido de azúcar, almidón, etc.), cambios de acidez, cambios de olor, sabor, etc. También se pueden medir las velocidades de intercambio de gas relativas (por ejemplo, permeabilidad de oxígeno). Además, se puede medir la emisión de compuestos específicos tal como etileno. Los ejemplos no taxativos de mediciones seleccionadas se proporcionan en la Ejemplificación más adelante.

#### *Frutas climatéricas y frutas no climatéricas*

20

Las frutas que maduran mediante la producción de etileno y respiración celular aumentada se denominan climatéricas. Los ejemplos de frutas climatéricas incluyen, de modo no taxativo, manzanas, bananas y tomates. Por el contrario, las

frutillas y las uvas son frutas no climatéricas. Se dice que el evento climatérico se asocia a cambios en el color de la fruta y con la producción de azúcar en el espacio extracelular.

5

Tal como se muestra en los ejemplos de trabajo proporcionados en la presente descripción, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente son eficaces para conservar tipos de productos agrícolas tanto climatéricos  
10 como no climatéricos. En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente se pueden utilizar para retrasar la velocidad del proceso de maduración de las frutas. En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la  
15 presente se pueden utilizar para mantener la firmeza de las frutas. En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente se pueden utilizar para enlentecer el crecimiento microbiano. En algunas modalidades, determinadas frutas, tal como frutas no climatéricas (por  
20 ejemplo, frutillas), recubiertas con un recubrimiento a base de biopolímeros descrito en la presente, pueden mostrar una presencia limitada de "manchas negras" que típicamente indican la presencia de moho en la superficie de las frutas.

En algunas modalidades, se puede utilizar el polimorfismo de la proteína para adaptar las propiedades del recubrimiento, lo que afecta la interacción entre la proteína (tal como fibroína de seda) y la evaporación de agua y la  
5 descomposición alimentaria provocada por microbios.

### *Métodos y aplicaciones generales*

En un aspecto adicional, se proporcionan métodos relacionados  
10 para conservar productos perecederos.

En sentido amplio, dicho método implica agregarle un recubrimiento a al menos una parte de un artículo perecedero que se desea almacenar o conservar. Típicamente, al menos una  
15 parte del artículo perecedero está en contacto directo con al menos una parte de un recubrimiento que comprende un biopolímero tal como se describió anteriormente en más detalle.

20 Se dice que un artículo perecedero está conservado, al menos en parte, cuando retiene una o más propiedades o el estado/características originales, según se midió mediante cualquier parámetro adecuado tal como contenido de agua, color, peso, forma, textura, integridad estructural, gusto,

sabor, olor, etc.

Un recubrimiento de biopolímeros descrito en la presente se prepara como una solución acuosa de un biopolímero adecuado, por ejemplo, polipéptidos anfifílicos que tienen características hidrofóbicas generales, tal como se describió anteriormente. Típicamente, los materiales de recubrimiento se preparan como una solución con el biopolímero disuelto en esta, a una concentración final de alrededor de 0,1-20 % en peso, por ejemplo, alrededor de 0,1 %, alrededor de 0,2 %, alrededor de 0,3 %, alrededor de 0,4 %, alrededor de 0,5 %, alrededor de 0,6 %, alrededor de 0,7 %, alrededor de 0,8 %, alrededor de 0,9 %, alrededor de 1 %, alrededor de 1,5 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, alrededor de 19 %, alrededor de 20 % o más.

Si se desea, se le pueden agregar determinados aditivos a dichas soluciones.

Se puede utilizar cualquier técnica adecuada para realizar la etapa de recubrimiento (por ejemplo, etapa de depositar un material de recubrimiento sobre un artículo perecedero). Por ejemplo, el proceso de recubrimiento se puede realizar mediante cualquier medio adecuado que incluye, de modo no taxativo, recubrimiento por inmersión, recubrimiento por aerosol, cepillado, etc. Dicha etapa se puede realizar una vez o repetirse múltiples veces, por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 16 veces, 17 veces, 18 veces, 19 veces, 20 veces, 21 veces, 22 veces, 23 veces, 24 veces, 25 veces 26 veces, 27 veces, 28 veces, 29 veces, 30 veces o más.

Entre cada una de las etapas de recubrimiento o después de estas, el recubrimiento a base de biopolímeros puede secarse y, opcionalmente, recocerse, reticularse o ambos. Los datos presentados en la presente descripción sugieren que aumentar el grado de cristalinidad en el biopolímero puede mejorar los efectos conservantes. Estos efectos pueden implicar al menos dos factores: uno es la prevención de la pérdida de agua y el otro es la prevención del crecimiento microbiano.

En algunas modalidades, el proceso de recocido puede implicar

inducir la formación de láminas beta en el biopolímero usado como material de recubrimiento. Se han descrito las técnicas de recocido (por ejemplo, mayor cristalinidad) o la promoción de otra forma del "empaquetamiento molecular" de biopolímeros.

En algunas modalidades, el recocido (por ejemplo, formación de láminas beta) se induce mediante la adición de un solvente orgánico. Los solventes orgánicos adecuados incluyen, de modo no taxativo: metanol, etanol, acetona, isopropanol o una combinación de estos.

En algunas modalidades, el recocido se realiza mediante el denominado "recocido en agua" o "recocido por vapor de agua" en el que se utiliza vapor de agua como catalizador o agente plastificante intermedio para promover el empaquetamiento de las láminas beta. En algunas modalidades, el proceso del recocido en agua puede realizarse al vacío. Se han descrito métodos adecuados. Véase, por ejemplo, Jin H-J et ál. (2005), Water-stable Silk Films with Reduced Beta-Sheet Content, Advanced Functional Materials, 15: 1241-1247; Xiao H. et ál. (2011), Regulation of Silk Material Structure by Temperature-Controlled Water Vapor Annealing, Biomacromolecules, 12(5): 1686-1696.

En algunas modalidades, la etapa de recocido o reticulación implica exponer el polipéptido anfifílico del material de recubrimiento a una fuente de energía elevada, tal como  
5 mediante irradiación.

Una fuente útil de energía elevada para dicho proceso puede incluir, de modo no taxativo, un haz de electrones, fotones, radiación ionizante, radiación nuclear.

10

De acuerdo con la invención, al menos una parte de un artículo perecedero puede recubrirse o cubrirse con un recubrimiento a base de biopolímeros en una o más capas. Una capa de dichos recubrimientos puede ser de cualquier espesor  
15 adecuado, por ejemplo, entre alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$  y alrededor de 1 mm, por ejemplo, alrededor de 0,5  $\mu\text{m}$ , alrededor de 1  $\mu\text{m}$ , alrededor de 5  $\mu\text{m}$ , alrededor de 10  $\mu\text{m}$ , alrededor de 15  $\mu\text{m}$ , alrededor de 20  $\mu\text{m}$ , alrededor de 30  $\mu\text{m}$ , alrededor de 40  $\mu\text{m}$ , alrededor de 50  $\mu\text{m}$ , alrededor de 60  $\mu\text{m}$ , alrededor de 70  $\mu\text{m}$ ,  
20 alrededor de 80  $\mu\text{m}$ , alrededor de 90  $\mu\text{m}$ , alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , alrededor de 110  $\mu\text{m}$ , alrededor de 120  $\mu\text{m}$ , alrededor de 130  $\mu\text{m}$ , alrededor de 140  $\mu\text{m}$ , alrededor de 150  $\mu\text{m}$ , alrededor de 160  $\mu\text{m}$ , alrededor de 170  $\mu\text{m}$ , alrededor de 180  $\mu\text{m}$ , alrededor de 190  $\mu\text{m}$ , alrededor de 200  $\mu\text{m}$ , alrededor de 210  $\mu\text{m}$ ,

alrededor de 220  $\mu\text{m}$ , alrededor de 230  $\mu\text{m}$ , alrededor de 240  $\mu\text{m}$ , alrededor de 250  $\mu\text{m}$ , alrededor de 300  $\mu\text{m}$ , alrededor de 350  $\mu\text{m}$ , alrededor de 400  $\mu\text{m}$ , alrededor de 450  $\mu\text{m}$ , alrededor de 500  $\mu\text{m}$ , alrededor de 550  $\mu\text{m}$ , alrededor de 600  $\mu\text{m}$ ,  
5 alrededor de 650  $\mu\text{m}$ , alrededor de 700  $\mu\text{m}$ , alrededor de 750  $\mu\text{m}$ , alrededor de 800  $\mu\text{m}$ , alrededor de 850  $\mu\text{m}$ , alrededor de 900  $\mu\text{m}$ , alrededor de 950  $\mu\text{m}$ , alrededor de 1000  $\mu\text{m}$  o más. Dicho recubrimiento puede estar compuesto por una única capa o múltiples capas de recubrimientos.

10

En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros de la presente invención forman una cobertura o revestimiento conforme sobre al menos una parte de la superficie de un producto perecedero. En algunas modalidades,  
15 dichos recubrimientos pueden revestir completamente una o todas las superficies de un producto perecedero.

Los recubrimientos a base de biopolímeros de la presente invención pueden ser sustancialmente transparentes cuando se  
20 forman como recubrimiento sobre un producto perecedero. La transparencia es una característica deseable para mantener el color o apariencia natural del producto perecedero. De manera adicional, en algunas modalidades, dichos recubrimientos pueden tener un efecto de brillo agregado (por ejemplo,

apariencia lustrosa) en el producto que se recubre.

Típicamente, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente son inodoros, insípidos o ambos.

5

En algunas modalidades, los recubrimientos a base de biopolímeros descritos en la presente pueden elaborarse para que sean los suficientemente solubles en agua y, por lo tanto, son fácilmente lavables. Sin embargo, en algunas  
10 modalidades, no es necesario retirar los recubrimientos de los artículos alimentarios perecederos antes del consumo.

Los recubrimientos a base de biopolímeros comprendidos por la presente invención también se pueden utilizar como materiales  
15 de envasado para una variedad de productos. Por ejemplo, los recubrimientos a base de biopolímeros proporcionados en la presente pueden reemplazar al menos en parte cualquier material de envasado convencional que se utilice para envolver, cubrir o embotellar artículos perecederos que  
20 incluyen, de modo no taxativo, productos lácteos, vinos y bebidas alcohólicas, otras bebidas embotelladas y similares.

En algunas modalidades, los materiales de envasado convencionales pueden estar recubiertos al menos en un lado con un recubrimiento a base de biopolímeros descrito en la

presente. En algunas modalidades, un componente de envasado puede reemplazarse con o incorporar un recubrimiento a base de biopolímeros descrito en la presente. Por ejemplo, los materiales de recubrimiento a base de biopolímeros se pueden  
5 utilizar como tapón de vino para reemplazar el corcho.

En cualquiera de las modalidades comprendidas por la presente invención, los recubrimientos pueden comprender además una o más características adicionales, tal como nano y/o  
10 microestructuras fabricadas o incorporadas en estos. Dichas estructuras pueden proporcionarle al menos una característica óptica al recubrimiento. Los ejemplos de características ópticas incluyen, de modo no taxativo: redes de difracción, orificios y hoyos a nanoescala, microprismas y similares. En  
15 algunas modalidades, dichas estructuras se diseñan para que actúen como sensores. Véanse, por ejemplo, WO 2008/127404; WO 2008/118211; WO 2008/127402; WO 2008/127403; WO 2008/127401; WO 2008/140562; WO 2009/061823; WO 2009/155397; WO 2010/126640; WO 2011/046652; WO 2011/026101; WO 2012/054121;  
20 WO 2011/130335; WO 2011/112931; WO 2012/047682; WO 2012/031282; WO 2010/088585; WO 2013/130156; los contenidos de cada una de las publicaciones indicadas anteriormente se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

En algunas modalidades, dichas características ópticas y/o a nanoescala están diseñadas para transportar o codificar determinada información (por ejemplo, etiquetas y códigos).

5 Cualquier información adecuada o deseable puede codificarse o incluirse, que incluye, de modo no taxativo, información de identificación, tal como información sobre la fuente u origen de un producto, ingredientes, información nutricional, información de fabricación, fechas de procesamiento (fecha de cosecha, fecha de recubrimiento o envasado, etc.), consumo  
10 preferente antes de o fecha límite de consumo, fechas de vencimiento, información de precios, autenticación, publicidad, información de atención al cliente o cualquier combinación de estos.

15

En cualquiera de las modalidades comprendidas en la presente, la característica o características adicionales agregadas a los recubrimientos de la presente invención pueden proporcionar efectos estéticos, tal como diseños, patrones,  
20 colores, dibujos, imágenes, logos y cualquier combinación de estos.

La siguiente Ejemplificación proporciona modalidades no taxativas de ejemplos de trabajo realizados de acuerdo con la

presente invención descrita en la presente. Los datos se presentan solamente con fines ilustrativos y de ninguna manera deben considerarse limitativos.

5

## EJEMPLIFICACIÓN

Fibroína de seda como recubrimiento comestible para la conservación de alimentos perecederos

10 Muchos alimentos perecederos poseen una actividad metabólica alta y presentan una alta posibilidad de contaminación microbiana, lo que da como resultado una vida útil corta, descomposición por hongos, cambio de color y mal sabor. Entre todos los alimentos perecederos, por ejemplo, se considera

15 que las frutillas son uno de los más difíciles de conservar frescos en el proceso "de la granja a la mesa" y, por lo tanto, se usan como modelo para analizar la eficacia de las estrategias de conservación de alimentos perecederos descritas en la presente descripción. Las frutillas son ricas

20 en polifenoles y antocianinas, vitaminas y aminoácidos. A la fecha se han utilizado varias opciones para conservar la frescura de las frutillas. Estas incluyen, fungicidas químicos sintéticos, envasado en atmósfera modificada, tratamientos osmóticos, tratamientos hipobáricos y térmicos,

crioconservación y recubrimientos comestibles. Los recubrimientos comestibles, en particular, se han estudiado extensamente en los últimos años ya que sus efectos beneficiosos y fácil manipulación hacen que sean ampliamente aplicables a frutas blandas, tal como las frutillas. En particular, las principales ventajas funcionales atribuidas al uso de recubrimientos comestibles incluyen menor velocidad de respiración, períodos de almacenamiento extendidos, retención de la firmeza y crecimiento microbiano controlado.

Se han contemplado varias clases de biopolímeros para desarrollar recubrimientos comestibles: polisacáridos, proteínas, lípidos, así como también varias combinaciones de estos biopolímeros. Se conoce que los polisacáridos y las proteínas forman películas con buenas propiedades mecánicas, pero con poca permeabilidad, mientras que los lípidos forman películas frágiles pero con permeabilidad mejorada. Por lo tanto, la investigación de recubrimientos comestibles de frutas ahora se enfoca en el uso de matrices poliméricas sólidas con grupos hidrofóbicos para combinar la solidez mecánica con baja permeabilidad a los vapores de agua.

Además, un material de recubrimiento ideal para la conservación de alimentos perecederos debe presentar biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividades antibacterianas y antifúngicas, capacidad de formar membranas

y seguridad (es decir, comestible y no alergénico).

La fibroína de seda es un biomaterial ampliamente investigado por su potencial en aplicaciones textiles, biomédicas, 5 fotónicas y electrónicas. La fibroína de seda es una proteína estructural, como el colágeno, pero con una característica única: se produce a partir de la extrusión de una solución de aminoácidos mediante un organismo complejo vivo (mientras que el colágeno se produce en el espacio extracelular mediante 10 autoensamblaje de monómeros producidos por células). Las propiedades de la fibroína de seda derivan de su estructura, que consiste en bloques hidrofóbicos escalonados mediante espaciadores ácidos hidrofílicos. En su estado natural, la fibroína de seda se organiza en cristales de láminas  $\beta$  15 alternados con regiones amorfas, lo que le proporciona resistencia y elasticidad a la proteína. La multiplicidad de formas en la que se puede procesar la fibroína de seda regenerada a una alta concentración de proteína y peso molecular la hace atractiva para varias aplicaciones de alta 20 tecnología, como se informó recientemente. El grado de cristalinidad de la proteína puede ajustarse con precisión y esto tiene influencia en las propiedades físicas, bioquímicas, mecánicas y biológicas del material. Además, la naturaleza de aminoácido de la fibroína de seda presenta una

diversidad de químicas de las cadenas laterales que permite la incorporación y estabilización de macromoléculas útiles en aplicaciones de administración de fármacos o para proporcionar instrucciones celulares. En particular, la

5 fibroína de seda con grados modulares de cristalinidad se puede obtener al regular el tiempo (intervalo de minutos a hora) y temperatura (4-60 °C) a las que la proteína se expone al vapor de agua o solventes polares comestibles (es decir, etanol). El grado de cristalinidad de la fibroína de seda

10 estabiliza las vacunas y antibióticos, lo que elimina la necesidad de la cadena de frío. De hecho, se considera que la seda es un tecnología de plataforma en la fabricación de biomateriales ya que su solidez y calidad tiene los recursos necesarios para proporcionar una cartera de características

15 distintas (por ejemplo, nanopatrones, funcionalización bioquímica) para la construcción final. El procesamiento de la fibroína regenerada generalmente implica la deshidratación parcial o total de una solución de fibroína (contenido de proteína de 1-15 % en peso) para formar películas, esponjas,

20 geles, esferas (con tamaño de micrones a nano) y espumas con numerosas técnicas (por ejemplo, fundición con solventes, liofilización, lixiviación con sal o sonicación). La lógica detrás de estos procesos de fabricación es la elaboración de un material sólido que combine la resistencia mecánica con

propiedades bioquímicas.

En este estudio, se informa el uso de una solución de fibroína de seda como material de recubrimiento para la  
5 conservación de frutas perecederas. Se utilizó la solución de fibroína de seda obtenida tal como se describió anteriormente para recubrir frutillas recién recolectadas mediante recubrimiento por inmersión, tal como se muestra en la Figura 1 en el panel (a). Véase D. Rockwood, R. Preda, T. Yucel, X.  
10 Wang, M. Lovett, D. Kaplan, Nature Protocols 2011, 6, 1612, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Se han investigado varias soluciones de fibroína de seda  
15 caracterizadas por cambios en el peso molecular y la concentración de proteína. Además, se ha evaluado la exposición de las frutillas a múltiples etapas de recubrimiento por inmersión así como también se ha investigado el procesamiento posterior de la fruta recubierta  
20 en vapor de agua al vacío (previamente descrito como proceso de recocado en agua) para explorar los efectos del polimorfismo del recubrimiento en la estabilización de la fruta. Los resultados sugirieron que la fibroína de seda prolongó la frescura de las frutas perecederas al enlentecer

la respiración de la fruta, extender la firmeza de la fruta, evitar la deshidratación y evitar el crecimiento microbiano.

El peso molecular de la fibroína de seda se ajustó en el  
5 intervalo de 170-90 kDa mediante regulación del tiempo de  
ebullición (es decir, 30 minutos) durante la extracción de  
fibroína y la concentración de la proteína en la solución de  
inmersión se ajustó a 1 % en peso para obtener una solución  
final con propiedades reológicas (es decir, viscosidad y  
10 tensión superficial) similares a una de las soluciones de  
recubrimiento a base de biopolímeros optimizadas previamente.  
Véase C. Ribeiro, A. A. Vicente, J. A. Teixeira, C. Miranda,  
Postharvest Biology and Technology 2007, 44, 63; A.  
Matsumoto, A. Lindsay, B. Abedian, D. L. Kaplan,  
15 Macromolecular Bioscience 2008, 8, 1006; cada uno de los  
cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante  
esta referencia. El recubrimiento de frutillas con fibroína  
de seda se logró con un proceso de dos fases. En la primera  
fase, se utilizó un proceso de recubrimiento por inmersión de  
20 múltiples etapas (cantidad de etapas de recubrimiento=1, 2 y  
4) para exponer las frutillas a la solución de fibroína de  
seda. En segundo lugar, las frutas recubiertas con fibroína  
de seda se expusieron a vapor de agua al vacío (a saber, un  
proceso posterior de recocado en agua) para explorar los

efectos del polimorfismo de la fibroína de seda en el estabilización de la fruta. Véase X. Hu, K. Shmelev, L. Sun, E.-S. Gil, S.-H. Park, P. Cebe, D. L. Kaplan, Biomacromolecules 2011, 12, 1686, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Los resultados sugirieron que la fibroína de seda prolongó la frescura de las frutas perecederas al enlentecer la respiración de la fruta, extender la firmeza de la fruta, evitar la deshidratación y evitar el crecimiento microbiano.

10

### Materiales y métodos

#### *Regeneración de la fibroína de seda*

15 Se utilizó un capullo de *Bombyx mori* como fuente de fibroína. La extracción de la fibroína de seda se logró mediante un proceso de desgomado estándar, que implicó hervir (t= 30 minutos) 2,5 g de capullos de seda cortados por litro de solución de carbonato de sodio 0,02 M. Luego la fibroína de  
20 seda se solubilizó en bromuro de litio 9,3 M durante 4 horas en un horno a 60 °C. Posteriormente, se retiró la sal caotrópica a través de diálisis (3,5 kDa MWCO) contra agua Milli-Q durante un total de 72 horas, lo que proporciona una solución de fibroína de seda al 8 % (p/v). Luego, la solución

de fibroína de seda resultante se purificó mediante centrifugación a 9000 rpm ( $\sim 12.700\text{ g}$ ) durante dos períodos de 25 minutos, a una constante de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La concentración final de la solución de fibroína de seda luego se ajustó a 5  
5 % en peso mediante adición de agua MilliQ.

#### *Recubrimiento por inmersión de frutillas*

Se recubrieron por inmersión frutillas recién recolectadas  
10 originarias de Nueva Inglaterra (Dzen Brother Farm, South Windsor, CT) 1, 2 y 4 veces (a saber, D1, D2 y D4) en una solución de fibroína de seda de 60 mm de profundidad (1 % en peso) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  asegurándose de que la superficie completa de las frutillas y de su cáliz y epicáliz quedaran expuestos a  
15 la solución. Cada una de las etapas de inmersión duró 10 segundos y luego las frutillas se secaron colgadas del pedúnculo durante 4 horas a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 38 % de RH.

#### *Recubrimiento por inmersión de bananas*

20

Se compraron bananas (Del Monte) de color verde en una tienda local (Whole Foods, Medford MA) y luego se recubrieron por inmersión con fibroína de seda tal como se mencionó anteriormente.

*Cristalización del recubrimiento*

La cristalización del recubrimiento de fibroína de seda se  
5 obtuvo mediante la exposición de las frutillas recubiertas a  
vapor de agua al vacío (a saber, recocado en agua), de  
acuerdo con los protocolos previamente desarrollados. El  
tiempo de exposición se estableció en 0 segundos, 1 hora, 6  
horas y 12 horas (a saber, C0, C1, C6 y C12). Al  
10 procesamiento posterior de recocado en agua más prolongado le  
correspondió una mejor cristalinidad de la fibroína de seda,  
tal como se informó anteriormente.

*Evaluación de la frescura de las frutillas*

15

El efecto de diferentes recubrimientos de fibroína de seda y  
del procesamiento posterior de recocado en agua en la  
frescura de las frutillas se evaluó morfológicamente y  
gravimétricamente. Los cambios de color, forma y formación de  
20 colonias microbianas en las frutillas se evaluaron a través  
de fotografías por intervalos. El análisis gravimétrico de  
las frutillas tal como se recibieron en el laboratorio,  
después del recubrimiento por inmersión y en los días 1, 3, 5  
y 7 se evaluó con una balanza de laboratorio estándar

(Mettler Toledo MS204S). Se calculó el peso de las frutilla como un promedio de tres mediciones.

*Interacción entre el agua y la membrana delgada de seda*

5

Las interacciones de las membranas delgadas de fibroína de seda con el agua se investigaron a través de los lentes de absorción capilar, permeabilidad hidrodinámica y comportamientos de difusión. El análisis del comportamiento de absorción de las películas de seda se observó a lo largo de ambos ejes, Z y XY, de las películas, con y sin la ayuda de la presión gravitacional, así como también horizontalmente. Las membranas delgadas de seda se expusieron parcialmente solución de a Rodamina 6G (Rh6G), que sirvió como indicador colorimétrico para la evolución de frente del solvente a través de las membranas de fibroína de seda. La permeabilidad hidrodinámica de las películas se evaluó mediante experimentos similares a la ley de Darcy. Las membranas de fibroína de seda se colocaron entremedio de dos piezas de acrílico, con una junta tórica de silicio para evitar filtraciones, y luego se sujetaron todos los lados usando tornillos. Las jeringas pegadas al acrílico y selladas con un sellador de silicona contenían 4 mL de agua encima de la película, junto con una balanza, y recolectaban el agua

10

15

20

que pasaba desde abajo. Los lados y la parte superior se sellaron con un parafilm para limitar las pérdidas de evaporación, y se realizaron unos pocos agujeritos en el cilindro debajo para evitar la formación de vacío (aunque fuera poco). El depósito de agua encima de la película aplicó una presión de ~500 Pa conduciendo el agua a través de la membrana. El coeficiente de difusión del agua en la membrana de seda se consideró en el contexto de la teoría existente del transporte en masa de agua en sistemas de polímeros amorfos. Esta suposición también se consideró válida en el caso de membranas de seda cristalina, ya que los cristales de la fibroína de seda poseen estructuras de láminas beta reticuladas de manera intermolecular y altamente hidrofóbicas que limitarán la difusión del agua a través de las regiones amorfas de la proteína. Por lo tanto, el transporte de agua a través de las membranas de fibroína de seda quedará comprendido en el régimen Fickiano o en uno de los regímenes no Fickianos, dependiendo de las escalas de tiempo relativas entre la difusión del agua y la tensión-relajación de la matriz polimérica. Peppas et ál. han desarrollado una expresión de la difusión generalizada para polímeros amorfos:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (1)$$

donde  $M_t$  representa la masa de absorción de agua en el tiempo  $t$ ,  $M^\infty$  representa la masa de absorción de agua a medida que el tiempo se aproxima al infinito y  $k$  y  $n$  son parámetros de ajuste. En particular, el valor del exponente  $n$  puede

5 utilizarse para identificar el régimen de transporte de masa en las condiciones de prueba. Las membranas se prepararon de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente, con un área de  $1 \text{ cm}^2$ . Cada membrana de fibroína de seda seca (espesor de alrededor de  $\cong 90 \pm 20 \text{ }\mu\text{m}$ ) se dejó durante la noche para

10 que se equilibre con el entorno circundante ( $\sim 22^\circ \text{C}$ ,  $\sim 38\%$  de RH), antes de pesarla. Luego, las membranas de fibroína de seda se sumergieron en agua Milli-Q durante 1 hora para permitir que se vuelvan a dilatar y se vuelvan a pesar después de retirar el exceso de agua a través de embotellado

15 cuidadoso. Esto se consideró  $M_{t=0}$ . Se realizaron mediciones posteriores en intervalos de un minuto en la siguiente hora hasta que la película alcanzó nuevamente el equilibrio con el entorno circundante seco, y volvió a su masa original. De hecho,  $M_t$  se calculó como  $M_t - M_{t=0}$ , y  $M^\infty$  se calculó como  $M_{t=1h} -$

20  $M_{t=0}$ .

*Medición de la difusión del oxígeno en películas de fibroína de seda.*

Los coeficientes eficaces de difusión del oxígeno se midieron en películas de fibroína de seda (n=5) de cristalinidad aumentada (C1, C6 y C12) usando un sistema de difusión convencional - medidor de oxígeno con microsensores Microx TX3 (Presens, Alemania) equipado con un Oxygen Microptode (Presens, Alemania) y una cámara de gas sellada con camisa de agua PermeGear, tal como se describió anteriormente. Véase J. E. Valentin, D. O. Freytes, J. M. Grasman, C. Pesyna, J. Freund, T. W. Gilbert, S. F. Badylak, Journal of Biomedical Materials Research Part A 2009, 91A, 1010; C. Androjna, J. E. Gatica, J. M. Belovich, K. A. Derwin, Tissue Engineering Part A 2008, 14, 559, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. El sistema consistía en dos compartimientos que contenían concentraciones conocidas (medidas) de oxígeno, separadas por la película de seda de interés. La abertura entre las dos cámaras tenía un área de 2,75 cm<sup>2</sup>. El espesor de la película de fibroína de seda se midió con un micrómetro (n= 7). Antes del uso, se realizó una calibración de dos puntos de acuerdo con los protocolos del fabricante usando un entorno sin oxígeno (sulfito de sodio) y un entorno saturado con aire (vapor de agua). El promedio de las lecturas de concentración de oxígeno inicial y final se utilizó para el análisis de los datos del coeficiente de difusión. Las concentraciones de

oxígeno se midieron en intervalos de 10 minutos y cada película de fibroína de seda se analizó 3 veces de manera consecutiva.

5 Se calculó el coeficiente eficaz de difusión del oxígeno tal como se informó anteriormente. Véase J. E. Valentin, D. O. Freytes, J. M. Grasman, C. Pesyna, J. Freund, T. W. Gilbert, S. F. Badylak, Journal of Biomedical Materials Research Part A 2009, 91A, 1010; C. Androjna, J. E. Gatica, J. M. Belovich,  
10 K. A. Derwin, Tissue Engineering Part A 2008, 14, 559, cuyos contenidos se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En resumen, con las suposiciones de (i) fluido bien mezclado en el sistema de difusión, (ii) sin consumo de oxígeno, (iii) concentración lineal de oxígeno en  
15 las películas de seda analizadas y (iv) estado estacionario instantáneo, se puede aplicar la ley de Fick para derivar las siguientes ecuaciones:

$$20 \quad \ln \left( \frac{C_D - C_R}{C_D - C_{R0}} \right) \cdot \left( \frac{1}{-\beta} \right) = D' t \quad (2)$$

$$\beta = \frac{A}{z} \left( \frac{1}{V_R} \right) t \quad (3)$$

donde  $D'$  es el factor de difusión del sistema (que depende

del coeficiente eficaz de difusión del oxígeno de la membrana de seda  $D_{e,M}$  y del factor de difusión volumétrico de referencia  $D_B$ ),  $t$  es el tiempo,  $\beta$  es la constante geométrica característica de la membrana eficaz,  $A$  es el área a través de la cual se produce la difusión,  $z$  es el espesor de la membrana de prueba,  $V_R$  es el volumen de la cámara receptora,  $C_D$  es la concentración de oxígeno disuelto en la cámara donante,  $C_R$  es la concentración de oxígeno disuelto en la cámara receptora en el tiempo  $t$ ; y  $C_{R0}$  es la concentración de oxígeno disuelto en la cámara receptora en  $t=0$  (en  $t=0$ ,  $C_R = C_{R0}$ ). El factor de difusión volumétrico de referencia ( $D_B$ ) se determina al reemplazar las muestras de películas de seda con una barrera impermeable al oxígeno (es decir, tapón de caucho). Dado que se asume que en este caso  $D_{e,M} = 0$ , entonces la ecuación (2) se vuelve:

El coeficiente eficaz de difusión del oxígeno de la membrana de seda  $D_{e,M}$  entonces se calcula como:

$$D_{e,M} = \frac{1}{\beta} \left( D' - \frac{D_B}{V_R} \right) \quad (5)$$

*Medición de la velocidad de respiración de las frutillas.*

Se siguió un método previamente publicado para medir la velocidad de respiración de las frutillas. En resumen, las muestras de frutillas (alrededor de 100 g, n=3) se colocaron en frasco de vidrio herméticos de 1L con un tabique en la tapa para sacar muestras de gas a diferentes tiempos de muestreo, durante un período de 36 horas. Los frascos se almacenaron a temperatura ambiente de 22 °C y RH=38 %. El muestreo de gas se realizó cada 30 minutos durante las primeras 5 horas, cada 90 minutos hasta la 12.<sup>a</sup> hora y cada 180 minutos durante las 24 horas restantes con una sonda de aguja. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento de recubrimiento. La velocidad de respiración se calculó usando la siguiente ecuación:

$$Velocidad\ de\ respiración = \frac{\Delta CO_2}{100} \cdot V_{espaciolibre} \cdot \frac{1000}{m} \cdot \frac{60}{t} \quad \left[ \frac{mlCO_2}{kg \cdot h} \right] \quad (6)$$

donde m es la masa de la frutilla,  $V_{espaciolibre}$  es el volumen vacío del frasco hermético [ml],  $\Delta CO_2$  es la diferencia entre la concentración inicial y final de  $CO_2$  y t es el tiempo de muestreo [min].

#### *Medición de la firmeza de las frutillas.*

La firmeza de las frutillas recubiertas con fibroína de seda

y no recubiertas se midió a 22 °C y RH=38 % mediante una prueba de punción usando un sistema uniaxial Instron equipado con una celda de carga 10 N. La firmeza de las frutillas se evaluó en función del tiempo de almacenamiento (como se recibieron, días 1, 3 y 7) y el grado de cristalinidad de la fibroína de seda. La prueba se realizó de acuerdo con un protocolo indicado anteriormente. Véase E. Velickova, E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, V. D. Alves, M. Moldão-Martins, LWT - Food Science and Technology 2013, 52, 80, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. En resumen, se utilizó una varilla de acero inoxidable de 5 mm de diámetro con un extremo plano como sonda para penetrar las frutillas analizadas. La fuerza de penetración máxima (N) se definió como la fuerza máxima necesario para empujar la sonda dentro de las frutillas (n=5) hasta una profundidad de 8 mm a una velocidad de cruceta de 1 mm/s.

### **Ejemplo 1**

20

### Resultados y discusión

#### *Fotografía por intervalos*

La eficacia del recubrimiento de fibroína de seda en la conservación de la frescura de las frutillas se evaluó en función de las etapas de recubrimiento y de la cristalinidad de la fibroína de seda. El análisis externo del

5 envejecimiento de frutillas representativas en función de las etapas de recubrimiento por inmersión y del polimorfismo de la seda se presenta en la Figura 1. A más etapas de recubrimiento y a mayor cristalinidad de la fibroína de seda (es decir, proceso de recocado en agua más prolongado) le

10 correspondió una conservación prolongada de los tejidos de las frutillas, visible mediante reducción dependiente del tiempo en la tonalidad del color rojo original y mantenimiento de la morfología original. Además, más etapas de recubrimiento y mayor cristalinidad de la fibroína de seda

15 dio como resultado la regulación por reducción del crecimiento microbiano, visible mediante la reducción de descomposición por hongos y moho. Esto también se confirmó mediante la investigación de la descomposición dependiente del tiempo de la pulpa de las frutillas, tal como se muestra

20 en la Figura 2. A un mayor grado de cristalinidad del recubrimiento de fibroína de seda le correspondió una mejor conservación de los tejidos internos para el punto de tiempo considerado.

*Medición de la deshidratación*

La deshidratación de las frutillas es una indicación de la ruptura del tejido receptáculo rojo, lo que provoca el mal  
5 sabor, descomposición microbiana, pérdida de turgencia y evaporación de agua. La Figura 3 muestra la pérdida de peso dependiente del tiempo de las frutillas en función de las etapas de recubrimiento por inmersión y del grado de cristalinidad de la fibroína de seda. Se utilizó la prueba  
10 ANOVA de dos vía con el análisis de la media de Tukey para evaluar los datos. La cristalinidad de la seda, pero no la cantidad de etapas de recubrimiento, afectó la deshidratación de las frutillas consideradas. Los controles sin recubrimiento perdieron alrededor de 50 % en peso de sus  
15 pesos originales en los 7 días considerados (resaltados dentro de los rectángulos rojos). Las frutillas recubiertas con seda amorfa (DxC0 - dentro de los rectángulos azules) retuvieron más agua en comparación con los controles en los días 3 ( $p < 0,05$ ). Las frutillas recubiertas con seda  
20 cristalina enlentecieron adicionalmente la deshidratación de la fruta en comparación con el recubrimiento amorfo ( $p < 0,05$ ) y con el control ( $p < 0,05$ ) pero no se encontró diferencia estadística para diferente tiempo de recocado en agua ( $p > 0,05$ ).

*Interacción entre las membranas delgadas de fibroína de seda y el agua*

5 Para investigar el fenómeno de la deshidratación de la fruta a través de un recubrimiento delgado de fibroína de seda, se ha investigado la interacción entre las membranas delgadas de fibroína de seda y el agua. En particular, se han explorado los fenómenos de absorción, permeabilidad hidrodinámica y

10 coeficiente de difusión del agua. La Figura 4 muestra una evaluación de la interacción entre el agua y las membranas delgadas de fibroína de seda. Para el estudio de absorción, las membranas cristalinas de fibroína de seda (espesor = 130  $\mu\text{m}$ ) mostraron absorción de agua teñida en la dirección Z y

15 XY, lo que indica la difusión capilar del agua a través de las construcciones delgadas de fibroína de seda. La investigación de la permeabilidad hidrodinámica no mostró un efecto estadísticamente relevante ( $p > 0,05$ ) de la cristalinidad de la fibroína de seda en la impregnación de

20 agua (según la prueba ANOVA de una vía con análisis de la media de Tukey). El estudio del coeficiente de difusión del agua reveló que la cristalinidad de las membranas de seda afectó ligeramente el transporte en masa de agua a través de la seda (según la prueba ANOVA de una vía con análisis de la

media de Tukey). La Tabla 1 a continuación indica los coeficientes de difusión calculados para experimentos de transporte de masa.

5

|            | <b>K</b>     | <b>n</b>    | <b>D (cm<sup>2</sup>/s)</b> |
|------------|--------------|-------------|-----------------------------|
| <b>C1</b>  | 0,25 ± 0,048 | 0,42 ± 0,04 | 5,79 x 10 <sup>-6</sup>     |
| <b>C6</b>  | 0,19         | 0,48 ± 0,03 | 3,21 x 10 <sup>-6</sup>     |
| <b>C12</b> | 0,16         | 0,55 ± 0,02 | 1,05 x 10 <sup>-6</sup>     |

10

**Tabla 1:** Coeficientes de difusión para experimentos de transporte de masa

*Permeabilidad de gas a través de membranas de fibroína de seda*

15 El coeficiente de difusión del gas a través de las membranas de fibroína de seda cumple un rol importante en la conservación de la fruta ya que los gases cumplen un rol importante en el metabolismo de las células madre de la fruta (por ejemplo, oxígeno), son subproductos de su metabolismo

20 (por ejemplo, dióxido de carbono) y pueden actuar como factores de crecimiento (por ejemplo, etileno en fruta climatérica). Para evaluar la eficacia del recubrimiento de fibroína de seda como barrera contra el gas, se midió el coeficiente de difusión del oxígeno a través de las membranas

de seda ( $t=80\text{ }\mu\text{m}$ ) de mayor cristalinidad. En particular, se descubrió que el coeficiente de difusión del oxígeno eficaz de la fibroína de seda era modulado por la cristalinidad de la proteína (Tabla 2).

5

La Tabla 2 a continuación resume los cambios en el coeficiente de difusión del oxígeno eficaz calculado de las membranas de fibroína de seda, antes ("pre-recocido") y después ("post-recocido") de que se indujo la cristalización mediante recocido en agua durante períodos de tiempo variados (por ejemplo, 1-24 horas). Por ejemplo, cuando una forma predominantemente amorfa de la fibroína de seda se somete a recocido en agua durante 24 horas para generar una forma cristalina de seda, el coeficiente de difusión del oxígeno eficaz disminuyó en dos órdenes de magnitud. En este ejemplo particular, la cristalinidad de la fibroína de seda recocida era de alrededor de 55 %.

El coeficiente de difusión de gas de la fibroína de seda parece ser significativamente (por ejemplo, varios órdenes de magnitud) menor que el de las ceras comestibles usadas típicamente en la industria alimentaria, lo que indica que los recubrimientos a base de fibroína de seda proporcionan una barrera eficaz contra el transporte de gas, tal como el

oxígeno.

|         | Espesor de la película | Coeficiente de difusión de O <sub>2</sub> eficaz de la membrana [D <sub>e,M</sub> ] (estado estacionario) | Permeabilidad de O <sub>2</sub> [Dk] (estado estacionario)               |
|---------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
|         | μm                     | 10 <sup>-11</sup> • (cm <sup>2</sup> /s)                                                                  | 10 <sup>-11</sup> • mlO <sub>2</sub> • cm / (s • cm <sup>2</sup> • mmHg) |
| Amorfa  | 81±4                   | 83,9±7,2                                                                                                  | 11,04±0,95                                                               |
| WA 1 h  | 78±3                   | 67,9±3,5                                                                                                  | 8,93±0,46                                                                |
| WA 6 h  | 76±4                   | 5,5±1,4                                                                                                   | 0,72±0,18                                                                |
| WA 12 h | 73±2                   | 1,9±0,3                                                                                                   | 0,25±0,04                                                                |
| WA 24 h | 72±5                   | 1,6±0,2                                                                                                   | 0,21±0,03                                                                |

5

**Tabla 2.** Coeficiente de difusión de O<sub>2</sub> eficaz calculado y permeabilidad de O<sub>2</sub> para experimentos de transporte de gas (N=3, RH=30 %)

10

*Fibroína de seda como recubrimiento para frutas climatéricas*

Las frutas que maduran a través de la producción de etileno y respiración celular aumentada se denominan climatéricas. Los ejemplos de frutas climatéricas son manzanas, bananas, tomates, mientras que las frutillas y las uvas son frutas no

15

climatéricas. El evento climatérico está asociado a cambios en el color de la fruta y con la producción de azúcar en el espacio extracelular. Se evaluó la eficacia de un recubrimiento de fruta climatérica a base de seda, la

5 maduración de bananas no recubiertas y recubiertas con fibroína de seda. La Figura 5 muestra una evaluación de la maduración de bananas con y sin un recubrimiento de seda. Las frutas se almacenaron a 22 °C y 38% de RH tal como se recibieron (control) y después del recubrimiento con

10 películas de fibroína de seda amorfa o cristalina (recubiertas con seda). Las bananas se colgaron de sus tallos respectivos a lo largo de todo el experimento. La fotografía por intervalos de la maduración de las bananas indica que el recubrimiento de seda disminuyó la velocidad de maduración.

15 La estructura (es decir, amorfa o cristalina) de la fibroína usada para recubrir la fruta climatérica no afectó la maduración de la fruta (no se muestran los datos). La investigación de la turgencia de una banana recubierta con seda demostró que el recubrimiento aumentó la firmeza de la

20 fruta, en comparación con un control sin recubrimiento en el día 9 después del recubrimiento. Además, el análisis morfológico de la pulpa de bananas recubiertas y no recubiertas en el día 9 después del tratamiento con recubrimiento de seda reveló una fruta más conservada cuando

se aplicó el recubrimiento de seda. La pulpa de la banana sin recubrimiento presentó un color marrón, mientras que las frutas recubiertas con seda conservaron una pulpa clara, lo que indica una menor velocidad de maduración dentro de la muestra recubierta con seda.

## **Ejemplo 2**

### Resultados y discusión

10

*Fibroína de seda como recubrimiento para conservar la frescura de las frutillas.*

El espesor del recubrimiento de fibroína de seda se investigó en función de la cantidad de procesos de recubrimiento por inmersión. El espesor del recubrimiento de fibroína de seda, que se encontraba en el intervalo de 27-35  $\mu\text{m}$ , no se vio influenciado de manera estadísticamente significativa ( $p>0,05$ ) por la cantidad de etapas de recubrimiento por inmersión tal como se muestra a continuación en la Tabla 3. La cristalinidad del recubrimiento de fibroína de seda se calculó con una metodología descrita anteriormente en función de la cuantificación de las estructuras de láminas beta en el pico de absorbancia de Amida III recolectado con un análisis

espectroscópico ATR-FTIR y se estudió en función del tiempo de exposición al proceso posterior de recocido en agua. A diferencia de lo mostrado en la Tabla 3, el proceso posterior de recocido en agua tuvo una gran influencia en las propiedades del recubrimiento de fibroína de seda al aumentar la cantidad de estructuras de láminas beta de 23,2 % (para el recubrimiento sin tratamiento) a 58,4 % (para el recubrimiento expuesto a vapor de agua durante 12 horas).

|    |                                                                                          |                                                                                    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 | Cantidad de procesos de recubrimiento por inmersión en solución de fibroína de seda [Dx] | Espesor [ $\mu\text{m}$ ]                                                          |
|    | D1                                                                                       | $27 \pm 8$                                                                         |
|    | D6                                                                                       | $32 \pm 7$                                                                         |
|    | D12                                                                                      | $35 \pm 8$                                                                         |
| 15 | Tiempo de exposición al proceso posterior de recocido en agua [Cx, x=horas]              | Cristalinidad del recubrimiento comestible de fibroína de seda [% de láminas beta] |
|    | C0 – amorfo                                                                              | $23,2 \pm 1,5$                                                                     |
|    | C1                                                                                       | $36,5 \pm 3,3$                                                                     |
|    | C6                                                                                       | $47,6 \pm 4,1$                                                                     |
| 20 | C12                                                                                      | $58,4 \pm 4,5$                                                                     |

**Tabla 3:** Caracterización del espesor y la cristalinidad del recubrimiento de fibroína de seda comestible

Se utilizó el tinte cristal violeta para teñir el recubrimiento de fibroína de seda. La Figura 7 en el panel (b) muestra imágenes macroscópicas representativas de frutillas teñidas recubiertas con recubrimientos comestibles de fibroína de seda amorfa y cristalina que se presentan en el panel (b) *ii* y panel (b) *iii*, respectivamente. La tinción con cristal violeta es apenas visible en la superficie de las frutillas recubiertas (puntos negros) dado que el recubrimiento tenía un espesor de pocos micrones. Adicionalmente, la Figura 7 en el panel (c) muestra la microscopía estereoscópica de la superficie y del corte transversal de frutillas teñidas con cristal violeta recubiertas con fibroína de seda amorfa y cristalina que no mostraron cambios en la apariencia de la fruta en comparación con el control sin recubrimiento. La eficacia del recubrimiento comestible de fibroína de seda para conservar la frescura de las frutillas se evaluó en función de las etapas de recubrimiento y de la cristalinidad de la fibroína de seda. La Figura 8 muestra la maduración y pérdida de peso de frutillas recubiertas con un recubrimiento de fibroína de seda comestible. La Figura 8 en el panel (a) muestra los análisis externos e internos el envejecimiento de frutillas representativas en función de las etapas de recubrimiento por

inmersión y de la cristalinidad de la seda. A más etapas de recubrimiento y a mayor cristalinidad de la fibroína de seda (es decir, proceso de recocado en agua más prolongado) le correspondió una conservación prolongada de los tejidos de las frutillas, visible mediante reducción dependiente del tiempo en la tonalidad del color rojo original y mantenimiento de la morfología original. Además, más etapas de recubrimiento y mayor cristalinidad de la fibroína de seda dio como resultado la regulación por reducción del crecimiento microbiano, visible mediante la reducción de descomposición por hongos y moho. Esto también se confirmó mediante la investigación de la descomposición dependiente del tiempo de la pulpa de las frutillas. A un mayor grado de cristalinidad del recubrimiento de fibroína de seda le correspondió una mejor conservación de los tejidos internos para el punto de tiempo considerado.

#### *Medición de la deshidratación.*

La deshidratación de las frutillas es una indicación de la ruptura del tejido receptáculo rojo, lo que provoca el mal sabor, descomposición microbiana, pérdida de turgencia y evaporación de agua. La Figura 8 en el panel (b) muestra la pérdida de peso dependiente del tiempo de las frutillas en

función de las etapas de recubrimiento por inmersión y del grado de cristalinidad de la fibroína de seda. Se utilizó la prueba ANOVA de dos vía con el análisis de la media de Tukey para evaluar los datos. La cristalinidad de la seda, pero no la cantidad de etapas de recubrimiento, afectó la deshidratación de las frutillas consideradas. Los controles sin recubrimiento perdieron alrededor de 70 % en peso de sus pesos originales en los 14 días considerados. Las frutillas recubiertas con seda amorfa (DxC0) retuvieron más agua en comparación con los controles en los días 3 ( $p < 0,05$ ). Las frutillas recubiertas con seda cristalina enlentecieron adicionalmente la deshidratación de la fruta en comparación con el recubrimiento amorfo ( $p < 0,05$ ) y con el control ( $p < 0,05$ ) pero no se encontró diferencia estadística para diferente tiempo de recocado en agua ( $p > 0,05$ ).

*Interacción entre las membranas delgadas de fibroína de seda y el agua.*

Para investigar el fenómeno de la deshidratación de la fruta a través de un recubrimiento delgado de fibroína de seda, se ha investigado la interacción entre las membranas delgadas de fibroína de seda y el agua. En particular, la Figura 9 muestra la permeabilidad y coeficiente de difusión del agua y

oxígeno en películas de fibroína de seda en función de la cristalinidad de la proteína y sus efectos en la calidad del recubrimiento comestible. Se exploraron los fenómenos de permeabilidad hidrodinámica (mostrada en el panel (a)) y

5 coeficiente de difusión del agua (mostrado en el panel (b)). La investigación de la permeabilidad hidrodinámica no mostró un efecto estadísticamente relevante ( $p > 0,05$ ) de la cristalinidad de la fibroína de seda en la impregnación de agua (según la prueba ANOVA de una vía con análisis de la

10 media de Tukey). El estudio del coeficiente de difusión del agua reveló que la cristalinidad de las membranas de seda afectó ligeramente el transporte en masa de agua a través de la seda (según la prueba ANOVA de una vía con análisis de la media de Tukey). Los coeficientes de difusión calculados para

15 el experimento de transporte de masa se indican a continuación en la Tabla 4.  $k$  y  $n$  son parámetros de ajuste mientras que  $D$  es el coeficiente de difusión.

20

| Cristalinidad del recubrimiento comestible de fibroína de seda | $k$              | $n$             | $D$ (cm <sup>2</sup> /s) |
|----------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| C1                                                             | $0,25 \pm 0,048$ | $0,42 \pm 0,04$ | $5,79 \times 10^{-6}$    |
| C6                                                             | 0,19             | $0,48 \pm 0,03$ | $3,21 \times 10^{-6}$    |
| C12                                                            | 0,16             | $0,55 \pm 0,02$ | $1,05 \times 10^{-6}$    |

**Tabla 4:** Coeficientes de difusión del agua calculados para experimentos de transporte de masa.

*Coeficiente de difusión de gas a través de membranas de seda.*

El coeficiente de difusión del gas a través de las membranas de fibroína de seda cumple un rol importante en la conservación de la fruta ya que los gases cumplen un rol importante en el metabolismo de las células madre de la fruta (es decir, oxígeno), son subproductos de su metabolismo (es decir, dióxido de carbono) y pueden actuar como factores de crecimiento (es decir, etileno en fruta climatérica). Para evaluar la eficacia del recubrimiento de fibroína de seda como barrera contra el gas. La Figura 9 en el panel (c) y la Tabla 5 a continuación muestran el coeficiente de difusión del oxígeno medido a través de membranas de seda ( $t=70-80\text{ }\mu\text{m}$ ) de mayor cristalinidad. En particular, se descubrió que el coeficiente de difusión del oxígeno eficaz de la fibroína de seda era modulado por la cristalinidad de la proteína, según se calculó una disminución de dos órdenes de magnitud en el coeficiente de difusión del oxígeno eficaz entre la seda amorfa y 58,4 % de seda cristalina (12 horas de recocado en agua).

| Cristalinidad del recubrimiento comestible de fibroína de seda | Espesor de la película<br>$\mu\text{m}$ | Coefficiente de difusión de $\text{O}_2$ eficaz de la membrana $[\text{D}_{\text{e,M}}]$ (estado estacionario)<br>$10^{-11} \cdot (\text{cm}^2/\text{s})$ |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C0- amorfa                                                     | $81 \pm 4$                              | $83,9 \pm 7,2$                                                                                                                                            |
| C1                                                             | $78 \pm 3$                              | $67,9 \pm 3,5$                                                                                                                                            |
| C6                                                             | $76 \pm 4$                              | $5,5 \pm 1,4$                                                                                                                                             |
| C12                                                            | $73 \pm 2$                              | $1,9 \pm 0,3$                                                                                                                                             |

**Tabla 5:** Coeficiente de difusión de  $\text{O}_2$  eficaz de fibroína de seda calculado para experimentos de transporte de gas.

*Velocidad de respiración en frutillas recubiertas con fibroína de seda.*

15

La velocidad de respiración es un parámetro importante para evaluar la actividad metabólica de las células madre presentes en las frutas. Cuanto mayor sea la velocidad de respiración, mayor será la actividad metabólica y será más rápida la descomposición de la fruta. La Figura 9 en el panel (d) muestra la velocidad de respiración de frutillas recubiertas con seda que se midió en función de la cristalinidad del recubrimiento. A mayores grados de cristalinidad le correspondía una disminución

20

estadísticamente significativa en la producción de  $\text{CO}_2$  ( $p < 0,05$ ), lo que indica una disminución en la velocidad de respiración de la fruta. Resultó evidente que el grado de cristalinidad del recubrimiento de fibroína de seda comestible controlaba el intercambio de gases entre la frutilla y el entorno debido a la gran influencia que tiene el polimorfismo de la seda en la permeabilidad a gases como  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ .

10 *Índice de firmeza en frutillas recubiertas con fibroína de seda.*

La Figura 9 en el panel (e) muestra que se utilizó una prueba de punción (o penetración) para evaluar los efectos del recubrimiento de seda en la firmeza de las frutillas en función del tiempo de almacenamiento y de la cristalinidad del recubrimiento. Mientras la descomposición natural de las frutillas provocó una disminución de la firmeza de la fruta, según se midió por una disminución dependiente del tiempo de la fuerza necesaria para penetrar la fruta ( $p < 0,05$ ), un aumento en la cristalinidad del recubrimiento correspondió un retraso a estadísticamente significativo en la deterioro de la firmeza de la fruta en los días 3 y 7.

*Fibroína de seda como recubrimiento de frutas climatéricas.*

Las frutas que maduran mediante la producción de etileno y respiración celular aumentada se denominan climatéricas. Los  
5 ejemplos de frutas climatéricas son manzanas, bananas, tomates, mientras que las frutillas y las uvas son frutas no climatéricas. El evento climatérico está asociado a cambios en el color de la fruta y con la producción de azúcar en el espacio extracelular. La Figura 10 muestra una evaluación de  
10 la eficacia de un recubrimiento de fruta climatérica a base de seda, la maduración de bananas no recubiertas y recubiertas con fibroína de seda. Las frutas se almacenaron a 22 °C y 38 % de RH tal como se recibieron (sin recubrimiento) y después del recubrimiento con películas de fibroína de seda  
15 cristalinas (recubrimiento cristalino). Las bananas se colgaron de sus tallos respectivos a lo largo de todo el experimento. La fotografía por intervalos de la maduración de las bananas indica que el recubrimiento de seda disminuyó la velocidad de maduración. La estructura (es decir, amorfa o  
20 cristalina) de la fibroína usada para recubrir la fruta climatérica no afectó la maduración de la fruta (no se muestran los datos). La investigación de la turgencia de una banana recubierta con seda demostró que el recubrimiento aumentó la firmeza de la fruta, en comparación con un control

sin recubrimiento en el día 9 después del recubrimiento. Además, el análisis morfológico de la pulpa de bananas recubiertas y no recubiertas en el día 9 después del tratamiento con recubrimiento de seda reveló una fruta más conservada cuando se aplicó el recubrimiento de seda. La pulpa de la banana sin recubrimiento presentó un color marrón, mientras que las frutas recubiertas con seda conservaron una pulpa clara, lo que indica una menor velocidad de maduración dentro de la muestra recubierta con seda.

La fibroína de seda es un recubrimiento eficaz para mejorar la frescura de los alimentos perecederos. El polimorfismo de la seda se puede utilizar para adaptar las propiedades del recubrimiento, lo que afecta la interacción entre la fibroína de seda y la evaporación de agua y la descomposición alimentaria provocada por microbios.

### Conclusión

20

La fibroína de seda es un recubrimiento eficaz para mejorar la frescura de los alimentos perecederos. El polimorfismo de la seda se puede utilizar para adaptar las propiedades del recubrimiento, lo que afecta la interacción entre la fibroína

de seda y la evaporación de agua y la descomposición alimentaria provocada por microbios.

#### OTRAS MODALIDADES Y EQUIVALENTES

5

Aunque la presente descripción ha discutido explícitamente determinadas modalidades y ejemplos particulares de la presente descripción, los expertos en la técnica entenderán que no se pretende que la invención se vea limitada a dichas modalidades o ejemplos. Por el contrario, la presente descripción abarca varias alternativas, modificaciones y equivalentes de dichas modalidades y/o ejemplos particulares, como lo entenderán los expertos en la técnica.

10

15

Por consiguiente, por ejemplo, no debería interpretarse que los métodos y diagramas se limitan a un orden o disposición de etapas o elementos particulares descritos a menos que se indique explícitamente de otro modo o que el contexto lo indique claramente (por ejemplo, no operativo de otro modo).

20

Además, las diferentes características de elementos particulares que pueden ejemplificarse en modalidades diferentes se pueden combinar entre sí en algunas modalidades.

Se reivindica:

- 5 1. Un producto que comprende un artículo perecedero y un recubrimiento,

donde al menos una parte del producto perecedero está en contacto con al menos una parte del recubrimiento;

donde el recubrimiento comprende un polipéptido  
10 anfifílico que tiene una hidrofobicidad general de al menos 65 %, de modo que al menos 65 % de los residuos de aminoácidos del polipéptido anfifílico sean residuos de aminoácidos hidrofóbicos.

- 15 2. El producto de la reivindicación 1,

donde el polipéptido anfifílico comprende una fracción amorfa y una fracción cristalina.

3. El producto de la reivindicación 2,

20 donde la fracción amorfa corresponde a una estructura de hélice aleatoria, y

donde la fracción cristalina corresponde a una estructura de láminas beta.

4. El producto de la reivindicación 2 o 3,

donde la fracción cristalina es o comprende un dominio de una proteína o derivado de esta que forma una estructura de láminas beta.

5

5. El producto de la reivindicación 4,

donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en:

fibroínas, actinas, colágenos, cateninas, claudinas,  
10 coilinas, elastinas, elastinas, extensinas, fibrilinas,  
laminas, lamininas, keratinas, tublinas, proteínas  
estructurales virales, proteínas zeínas (proteína de  
almacenamiento de semillas) y cualquier combinación de estas.

15 6. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-5,  
donde el polipéptido anfifílico comprende el motivo de la  
secuencia de aminoácidos GAGAGS (SEQ ID NO: 1).

7. El producto de la reivindicación 6,

20 donde el polipéptido comprende múltiples repeticiones de  
GAGAGS.

8. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7,  
donde al menos 65 % de los aminoácidos en el polipéptido

anfifílico se encuentran en la fracción cristalina.

9. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-8,  
donde el recubrimiento comprende una capa del  
5 polipéptido anfifílico.

10. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-9,  
donde al menos una superficie del artículo perecedero  
está en contacto directo con el recubrimiento.

10

11. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-10,  
donde la superficie entera del producto perecedero está  
en contacto directo con el recubrimiento.

15 12. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11,  
donde el recubrimiento comprende múltiples capas del  
biopolímero anfifílico.

13. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-12,  
20 donde el recubrimiento tiene un espesor que varía entre  
alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$  y alrededor de 1 mm.

14. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-13,  
donde el recubrimiento tiene un coeficiente de difusión

del agua menor que  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s.

15. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-14,  
donde el recubrimiento tiene un coeficiente de difusión  
5 del agua que varía entre alrededor de  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s y alrededor  
de  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s.

16. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-15,  
donde el recubrimiento proporciona un coeficiente de  
10 permeabilidad de oxígeno ( $Dk_{O_2}$ ) menor que  $10^{-10}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm)  
/(cm • s • mmHg)].

17. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-16,  
donde el recubrimiento proporciona un coeficiente de  
15 permeabilidad de oxígeno ( $Dk_{O_2}$ ) que varía entre alrededor de  
 $10^{-10}$  y alrededor de  $10^{-13}$  [(ml<sub>O2</sub> • cm) / (cm • s • mmHg)].

18. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-17,  
donde el recubrimiento es transparente.

20

19. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-18,  
donde el recubrimiento es comestible.

20. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-19,

donde el recubrimiento es soluble en agua.

21. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-20,  
donde el recubrimiento es un material de envasado.

5

22. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-21,  
donde el recubrimiento comprende además un aditivo.

23. El producto de la reivindicación 22,

10 donde el aditivo se selecciona del grupo que consiste  
en:

agentes antibacterianos y agentes antifúngicos;  
inhibidores de enzimas; moléculas de unión/captura de  
etileno, tal como dominios de unión a etileno de receptores  
15 de etileno; sustancias absorbentes de etileno, tal como  
aluminosilicatos (por ejemplo, zeolitas), aerogeles a base de  
fibroína de seda, agentes oxidantes, tal como permanganato de  
potasio; antagonistas del receptor de etileno; porfirinas;  
hormonas, agonistas del receptor de hormonas y antagonistas  
20 de estos; agentes nutracéuticos (complementos dietéticos  
tales como: vitaminas, antioxidantes, ácidos grasos, etc.);  
saborizantes y otros compuestos agregados para mejorar el  
sabor, tal como azúcares; perfumes o fragancias, colorantes,  
tintes y cualquier combinación de estos.

24. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-23,  
donde el artículo perecedero es susceptible a la  
descomposición o fermentación.

5

25. El producto de la reivindicación 24,  
donde la descomposición o fermentación es provocada por  
los hongos (por ejemplo, moho), bacterias o una combinación  
de estos.

10

26. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-25,  
donde el artículo perecedero es susceptible a la  
decoloración.

15

27. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-26,  
donde el artículo perecedero es susceptible a la  
oxidación.

20

28. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-27,  
donde el artículo perecedero es susceptible a la  
fotodegradación.

29. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-28,  
donde el artículo perecedero es sensible al etileno.

30. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-29,  
donde el artículo perecedero emite etileno.

5 31. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-30,  
donde el artículo perecedero es un producto agrícola  
(frutas y vegetales), un producto cárnico, un producto de  
delicatessen, un producto lácteo, una semilla, un grano, un  
producto de alimento procesado, una bebida destilada, una  
10 bebida no destilada, una planta, una flor o cualquier  
combinación de estos.

32. El producto de cualquiera de las reivindicaciones 1-31,  
donde el recubrimiento no contiene un agente  
15 plastificante agregado.

33. El producto con un recubrimiento protector de cualquiera  
de las reivindicaciones 1-32,  
donde el polipéptido anfifílico es fibroína de seda.

20

34. El producto de la reivindicación 33,  
donde la fibroína de seda es fibroína de seda de alto  
peso molecular, fibroína de seda de bajo peso molecular o una  
combinación de estas.

35. Un método para conservar un producto perecedero, donde el método comprende las etapas de:

- i) proporcionar un artículo perecedero;
- 5 ii) agregarle un recubrimiento al artículo perecedero para proporcionar un producto que comprende el artículo perecedero con el recubrimiento, caracterizado porque al menos una parte del artículo perecedero está en contacto directo con al menos una parte del recubrimiento, donde el  
10 recubrimiento comprende una o más capas de biopolímero anfifílico;
- iii) almacenar el producto en una condición de almacenamiento, de modo que el artículo perecedero se conserve, en comparación con un artículo perecedero sin el  
15 recubrimiento en la misma condición de almacenamiento.

36. El método de la reivindicación 35,

donde el biopolímero anfifílico es un polipéptido hidrofóbicos que comprende una estructura secundaria de  
20 láminas beta.

37. El método de la reivindicación 35 o 36,

donde el polipéptido hidrofóbico es o comprende fibroína de seda o un fragmento de esta.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35-37,  
donde la fibroína de seda es una fibroína de seda de  
alto peso molecular, una fibroína de seda de bajo peso  
5 molecular o una combinación de estas.

39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35-38,  
donde la etapa (ii) comprende recubrimiento por  
inmersión, recubrimiento por aerosol, recubrimiento por  
10 polvo, envolver, sellar, cubrir, colocar capas o cualquier  
combinación de estos.

40. El método de la reivindicación 39,  
donde la etapa se repite 2-30 veces.

15

41. El método de la reivindicación 39,  
donde la etapa se repite 2-10 veces.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35-41,  
20 que comprende además una etapa de recocido, reticulación  
o una combinación de estos.

43. El método de la reivindicación 42,  
donde el recocido comprende inducir la formación de

láminas beta en el biopolímero.

44. El método de 43,

donde la formación de láminas beta se induce mediante la  
5 adición de un solvente orgánico.

45. El método de la reivindicación 44,

donde el solvente orgánico es o comprende metanol,  
etanol, acetona, isopropanol o una combinación de estos.

10

46. El método de la reivindicación 42,

donde la etapa de recocido o reticulación comprende  
exponer el polipéptido hidrofóbico a una fuente de energía  
elevada.

15

47. El método de 46,

donde la etapa de exponer el polipéptido a una fuente de  
energía elevada comprende irradiación.

20

48. El método de la reivindicación 46,

donde la fuente de energía elevada comprende un haz de  
electrones, fotones, radiación ionizante, radiación nuclear o  
una combinación de estos.

49. El método de 43,

donde la formación de láminas beta se induce mediante el recocido en agua.

5 50. El método de la reivindicación 49,

donde el recocido en agua se realiza con vapor de agua al vacío.

51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35-50,

10 donde la condición de almacenamiento comprende refrigeración.

52. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35-51,

15 donde la condición de almacenamiento comprende almacenamiento a temperatura ambiente.

53. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35-52,

donde la condición de almacenamiento comprende almacenar durante un período de 1 día a 1 año.

20

54. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35-53,

donde el artículo perecedero está conservado ya que el artículo perecedero retiene una o más propiedades, que se seleccionan del grupo que consiste en:

113  
contenido de agua, color, peso, forma, textura,  
integridad estructural, gusto, sabor, olor.

5

10

15

20

114  
RESUMEN

En la presente se describen recubrimientos a base de biopolímeros y productos que incorporan dichos  
5 recubrimientos. También se proporcionan métodos y uso relacionados.

10

15

20