

Año 2012



Tesis Doctoral

Materiales biodegradables en base a proteínas de soja y montmorillonitas

Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Exactas

Tesista: Lic. Ignacio Echeverría

**Directores: Dra. Adriana Mauri
Dra. Patricia Eisenberg**

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP, La Plata, Argentina).



Quiero terminar este trabajo agradeciendo a...

La Dra. Adriana Mauri, por haber confiado en mí, haberme dirigido y ayudado durante el desarrollo y la escritura de este trabajo.

La Dra. Patricia Eisenberg, por codirigirme y permitirme utilizar las instalaciones y equipos del INTI que necesité para llevar a cabo parte de esta tesis.

La Dra. Noemí Zaritzky por haberme permitido desarrollar este trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos.

La Universidad Nacional de Mar del Plata por brindarme la formación, de excelencia y gratuita, que me permitió llevar a cabo este trabajo.

La Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) por posibilitarme la realización de este trabajo y brindarme la oportunidad para acceder al grado de Doctor.

La Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el otorgamiento de las becas que me posibilitaron realizar este trabajo.

Elvira, Carmen, Pilar, Mirari, Bego, Nuria, Nacho, Carmen M., Cristina, Fernando, Anita, Mauricio, por hacer de mi estadía en el ICTAN un muy buen recuerdo, por su paciencia, su enseñanza, y por generarme las ganas de volver.

Compañeros y amigos del POLIUNA y LANOTEC, por haberme recibido allá y hacerme sentir parte de su grupo.

Mis viejos y hermanos, por enseñarme a vivir, por no dejarme bajar los brazos y apoyarme siempre.

Maru, por su amor incondicional, por darme las fuerzas para seguir en el momento justo, por su cariño y comprensión.

Joaco, Agus, Jorgito... por hacer que mis primeros tiempos en el CIDCA sean un tiempo de cambio. Gracias por las charlas compartidas entre pasillos y laboratorios, y por sufrir juntos las indecisiones de Joaco.

Cristian "bull", por su amistad y por su ayuda en la última etapa del trabajo.

Ceci O, Ceci C, Anita y Karito, por ayudarme con traducciones y revisión de la bibliografía.

Vic, por haberme ayudado con el diseño de dibujos y portadas, por su amistad y cariño.

Ale, por su amistad, apoyo y cariño en esta última etapa del trabajo.

Todos los amigos y compas del laboratorio de proteínas, por compartir el día a día, y hacer que venir al instituto sea algo más interesante que venir sólo a trabajar.

Todos mis amigos que están lejos, por recordarme, apoyarme y animarme a la distancia.

Javier y Daniel, por el apoyo técnico.

Diana, por su predisposición y asesoramiento en la búsqueda bibliográfica.

Los compañeros y amigos del CIDCA, por los momentos compartidos dentro y fuera del instituto.

Todos los que hicieron durante esta etapa de mi vida: reírme, llorar, acelerarme, gritar, bajar un cambio, enseñarme, pensar, vivir...

Resumen

Entre los biomateriales, las proteínas de soja tienen la capacidad de formar películas comestibles y/o biodegradables. Respecto de los polímeros sintéticos, estas películas proteicas presentan excelentes propiedades barrera a gases, lípidos y aromas; pero comúnmente no muestran propiedades mecánicas y barrera al vapor de agua satisfactorias para aplicaciones prácticas.

Con el fin de mejorar la funcionalidad de estas películas, en este trabajo se estudió la obtención de materiales nanocompuestos, amigables con el medio ambiente, a partir de proteínas de soja y montmorillonitas (MMT) con potencial aplicación como envases de alimentos o como adhesivos.

Se estudió la formación de películas en base a aislado proteico de soja (SPI) y MMT natural por distintas tecnologías de procesamiento: casting, spread coating y termocompresión, analizando el efecto de algunas variables de la formulación como la concentración de arcilla, tipo y concentración de plastificante y pH. Los materiales nanocompuestos obtenidos presentaron una funcionalidad superior a las películas proteicas. En general mostraron mejores propiedades mecánicas y menores contenidos de agua, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua. Las mejoras alcanzadas se debieron al alto grado de exfoliación-intercalación que presentaron las arcillas en la matriz proteica dada por la gran afinidad de estas proteínas con la MMT. El efecto refuerzo de la arcilla resultó ser más significativo para las películas preparadas a través de procesos húmedos (*casting* y *spread coating*) que para las películas obtenidas por un proceso seco (termocompresión), debido al mayor grado de dispersión de las capas de arcilla en la matriz proteica.

Con las mismas formulaciones se prepararon materias primas nanocompuestas en base a proteínas de soja y MMT, donde la arcilla se encontraba dispersa con un buen grado de exfoliación, para facilitar el posterior procesamiento de materiales nanocompuestos. Pero las películas formadas a partir de estas materias primas -por *casting* o termocompresión- presentaron propiedades mecánicas inferiores que las obtenidas por mezcla directa de todos los componentes, debida a una menor homogeneidad de los materiales resultantes.

También se evaluó el efecto de reemplazar la MMT natural por otras orgánicamente modificadas, que fueron procesadas por mezclado en fundido y posterior termocompresión. Pero no fue posible alcanzar una dispersión de estas arcillas suficiente como para que estas ejercieran un efecto refuerzo de las películas proteicas, posiblemente debido a la menor afinidad de las proteínas de soja con estas arcillas más hidrofóbicas.

Las películas nanocompuestas en base a SPI/MMT natural fueron activadas con agregado de aceite esencial de clavo, obteniendo películas con importantes propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Por su parte, el aceite esencial de clavo también ejerció cierto efecto plastificante y favoreció la exfoliación de la arcilla en las matrices proteicas, mientras que las arcillas favorecieron la liberación de los principios activos del aceite esencial. Estas películas fueron evaluadas como material de envase para preservar la calidad de filetes de músculo de atún rojo (*Thunnus thynnus*) durante su almacenamiento refrigerado. Con las mismas fue posible disminuir los valores de nitrógeno básico volátil total y el recuento final de microorganismos así como la autooxidación lipídica durante todo el período de almacenamiento estudiado, no observándose indicio de la difusión de los metales presentes en la arcilla al músculo de pescado en el tiempo analizado.

Por último se evaluó la aplicación de las formulaciones en base a proteínas de soja y MMT como adhesivos, lográndose mejoras en el comportamiento reológico, la resistencia al agua y la fuerza adhesiva de los respectivos adhesivos proteicos.

Estos resultados se muestran prometedores para la utilización de las películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y montmorillonita como envases de algunos alimentos, así como para la formación de adhesivos.

Teniendo en cuenta que todos los materiales desarrollados son amigables con el medio ambiente, este trabajo contribuye a buscar alternativas de sustitución de los materiales sintéticos, en algunas aplicaciones.

Índice**Agradecimientos****Resumen****Índice**

1. Introducción General	1
1.1 Materiales plásticos	1
1.2. Importancia económica de los plásticos	2
1.3. Problemática ambiental asociada a los plásticos sintéticos	3
1.4. Materiales plásticos biodegradables	4
1.5. Materiales en base a proteínas	6
1.5.1. Las proteínas como polímeros	6
1.5.2. Tecnologías de obtención de películas proteicas	8
1.5.3. Propiedades de las películas proteicas	9
1.5.4. Alternativas para mejorar la funcionalidad de los materiales	10
proteicos	
1.6. Materiales compuestos de matriz proteica	12
1.7. Materiales nanocompuestos	14
1.8. Utilización de nanoarcillas como refuerzo	15
1.8.1. Estructura de los filosilicatos, entre ellos la Montmorillonita	15
1.8.2. Montmorillonitas orgánicamente modificadas	17
1.8.3. Obtención de los materiales nanocompuestos reforzados con	19
arcillas	
1.8.3.1 Intercalación en solución	20
1.8.3.2. Intercalación in-situ	21
1.8.3.3. Intercalación en fundido	22
1.8.4. Propiedades de los materiales nanocompuestos	23
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	27

2. Películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y montmorillonita natural obtenidas por casting	29
2.1. Introducción	29
2.2. Materiales y métodos	31
2.2.1. Materiales	31
2.2.2. Obtención de las películas proteicas y nanocompuestas por <i>casting</i>	32
2.2.3. Caracterización de las dispersiones filmogénicas mediante ensayos reológicos	34
2.2.4. Caracterización de las películas proteicas	34
2.2.4.1. Contenido de humedad	34
2.2.4.2. Espesor	35
2.2.4.3. Color	35
2.2.4.4. Opacidad	36
2.2.4.5. Solubilidad de las películas en agua	36
2.2.4.6. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	37
2.2.4.7. Isotermas de sorción	38
2.2.4.8. Coeficientes de solubilidad y difusividad efectiva del agua en la película	39
2.2.4.9. Determinación de temperatura de transición vítrea (Tg)	40
2.2.4.10. Propiedades mecánicas	40
2.2.4.11. Solubilidad diferencial de proteínas	41
2.2.4.12. Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida	42
2.2.4.13. Difracción de rayos X (XRD)	43
2.2.4.14. Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM)	43
2.2.4.15. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	44
2.2.4.16. Ángulo de contacto	44
2.2.4.17. Análisis Termogravimétrico (TGA)	44
2.2.4.18. Análisis estadístico	45
2.3. Resultados y discusión	45
2.3.1. Caracterización del aislado proteico de soja	45
2.3.2. Efecto de la concentración de MMT en la funcionalidad de las películas nanocompuestas	47
2.3.2.1. Caracterización reológica de las dispersiones filmogénicas	47
2.3.2.2. Caracterización de las películas	50

2.3.2.2.1. Apariencia	50
2.3.2.2.2. Susceptibilidad al agua	51
2.3.2.2.3. Propiedades mecánicas	57
2.3.2.2.4. Propiedades térmicas	60
2.3.2.2.5. Morfología	63
2.3.3. Efecto del plastificante en las propiedades de las películas nanocompuestas	69
2.3.3.1. Morfología de las películas	70
2.3.3.2. Susceptibilidad al agua	74
2.3.3.3. Propiedades mecánicas	81
2.3.3.4. Apariencia	84
2.3.4. Efecto del pH de la dispersión filmogénica sobre las propiedades de películas nanocompuestos	87
2.3.4.1. Formación de las películas	87
2.3.4.2. Caracterización de las películas	88
2.3.4.2.1. Morfología	88
2.3.4.2.2. Susceptibilidad al agua	89
2.3.4.2.3. Propiedades mecánicas	92
2.3.4.2.4. Apariencia	94
2.4. Conclusiones	96
3. Obtención de películas nanocompuestas a escala planta piloto	98
3.1. Introducción	98
3.2. Materiales y métodos	99
3.2.1. Materiales	99
3.2.2. Obtención de las películas nanocompuestas por spread coating (SC)	99
3.2.3. Obtención de las películas nanocompuestas por termocompresión	100
3.2.4. Caracterización de las películas proteicas	101
3.2.3. Análisis estadístico	102
3.3. Resultados y discusión	102
3.3.1. Materiales nanocompuestos en base a proteínas de soja-montmorillonita obtenidos por spread coating	102
3.3.1.1. Apariencia	102

3.3.1.2. Susceptibilidad al vapor de agua	103
3.3.1.3. Propiedades mecánicas	106
3.3.1.4. Morfología	109
3.3.2. Materiales nanocompuestos obtenidas a partir de proteína de soja y montmorillonita natural obtenidos por termocompresión	111
3.3.2.1. Apariencia	111
3.3.2.2. Susceptibilidad al agua	113
3.3.2.3. Temperatura de Transición Vítrea	115
3.3.2.4. Propiedades mecánicas	116
3.3.2.5. Morfología	117
3.5. Conclusiones	119
4. Polvos nanocompuestos en base a proteínas de soja y montmorillonita como materias primas para la formación de materiales	120
4.1. Introducción	120
4.2. Materiales y métodos	121
4.2.1. Materiales	121
4.2.2. Obtención de polvos nanocompuestos de soja y MMT	121
4.2.3. Caracterización de los polvos nanocompuestos	121
4.2.3.1. Hidrofobicidad superficial	122
4.2.4. Obtención de películas nanocompuestas por <i>casting</i> a partir de polvos nanocompuestos	123
4.2.5. Obtención de películas nanocompuestas por <i>termocompresión</i> a partir de polvos nanocompuestos	123
4.2.6. Caracterización de las películas obtenidas a partir de polvos nanocompuestos	123
4.2.7. Análisis estadístico	124
4.3. Resultados y discusión	124
4.3.1. Caracterización de los polvos nanocompuestos	124
4.3.2. Películas nanocompuestas en base a SPI-MMT obtenidas a partir de los polvos nanocompuestos por <i>casting</i>	128
4.3.2.1. Apariencia	128
4.3.2.2. Susceptibilidad al agua	129

4.3.2.3. Propiedades mecánicas	132
4.4.3. Caracterización de películas a partir de polvos nanocompuestos obtenidas por termocompresión	134
4.4. Conclusiones	139
5. Películas nanocompuestas de matriz proteica de soja reforzadas con montmorillonitas orgánicamente modificadas	140
5.1. Introducción	140
5.2. Materiales y métodos	
5.2.1. Materiales	141
5.2.1.1. Montmorillonitas modificadas	141
5.2.2. Obtención de las películas	143
5.2.3. Caracterización de las películas proteicas	143
5.2.4. Análisis estadístico	143
5.3. Resultados y Discusión	
5.3.1. Morfología de las arcillas modificadas	144
5.3.2. Materiales nanocompuestos en base a proteínas de soja y montmorillonita orgánicamente modificadas obtenidos por termocompresión	145
5.3.1. Apariencia	145
5.3.2. Susceptibilidad al agua	147
5.3.3. Propiedades mecánicas	151
5.3.4. Morfología	153
5.4. Conclusiones	156
6. Películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y montmorillonita activadas con aceite esencial de clavo con potencial aplicación en envase de alimentos	157
6.1. Introducción	157
6.2. Materiales y métodos	160

6.2.1. Materiales	160
6.2.2. Obtención de las películas proteicas y nanocompuestas aditivadas con aceite esencial de clavo	160
6.2.3. Caracterización de las películas proteicas y nanocompuestas aditivadas con aceite esencial de clavo	161
6.2.3.1. Propiedades antioxidantes	161
6.2.3.2. Propiedades antimicrobianas	162
6.2.3.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	163
6.2.3.4. Determinación de metales	164
6.2.4. Aplicación de las películas proteicas y nanocompuestas en la preservación de pescado	164
6.2.4.1. Determinación de pH	165
6.2.4.2. Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT)	165
6.2.4.3. Índice de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	165
6.2.4.4. Índice de Peróxidos (IP)	166
6.2.4.5. Ensayos microbiológicos	167
6.2.4.6. FTIR-Espectroscopía de Reflectancia Total Atenuada (ATR)	167
6.2.4.7. Determinación de metales	167
6.3. Resultados y Discusión	168
6.3.1 Efecto del agregado de aceite esencial de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i> l.) sobre la funcionalidad de las películas nanocompuestas SPI-MMT	168
6.3.1.1. Apariencia	168
6.3.1.2. Susceptibilidad al vapor de agua	169
6.3.1.3. Propiedades mecánicas	172
6.3.1.4. Morfología	174
6.3.1.5. Propiedades antioxidantes	177
6.3.1.6. Propiedades antimicrobianas	180
6.3.1.7. Liberación de minerales	183
6.3.2. Aplicación de películas nanocompuestas activadas con aceite esencial de clavo en la conservación de filetes de atún rojo (<i>Thunnus thynnus</i>)	184
6.3.2.1. Caracterizaciones bioquímicas y microbiológicas para la evaluación de la eficacia de las películas desarrolladas en la preservación de pescado	184
6.3.2.2. Migración de minerales al pescado	197
6.4. Conclusiones	199

7. Propiedades adhesivas de formulaciones en base a proteínas de soja y montmorillonita	201
7.1. Introducción	201
7.3. Materiales y métodos	203
7.3.1. Materiales	203
7.3.2. Obtención de los adhesivos nanocompuestos	203
7.3.3. Caracterización de los adhesivos proteicos y nanocompuestos	203
7.3.3.1. Ensayos reológicos	204
7.3.3.2. Mediciones de Pelado en T	204
7.3.3.3. Determinación del fallo de la unión adhesiva	206
7.3.3.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	206
7.3.4. Análisis estadístico	207
7.4. Resultados y discusión	207
7.4.1. Caracterización reológica de los adhesivos	207
7.4.2. Hidrofobicidad superficial de los adhesivos	209
7.4.3. Fuerza adhesiva de las uniones adhesivo-sustrato y tipo de fallo de sustrato	211
7.4.4. Morfología de los adhesivos	214
7.4.5. Estabilidad térmica	216
7.5. Conclusiones	218
8. Conclusiones Generales	219
9. Referencias Bibliográficas	222



1

Introducción General



1.1. Materiales plásticos

El término “plástico” proviene del latín “*plasticus*” y del griego “*plastikos*” que significan “susceptible de ser moldeado”, y se emplea, en su sentido más general, para describir a los materiales poliméricos orgánicos, naturales o sintéticos, que carecen de un punto fijo de ebullición y que pueden deformarse por calor o presión hasta conseguir una forma deseada. Sin embargo, cotidianamente, esta palabra se emplea para referirse sólo a los materiales sintéticos obtenidos mediante polimerización de compuestos orgánicos derivados del petróleo.

Los plásticos fueron desarrollados originalmente como sustitutos de los materiales naturales, tales como el marfil, caucho y carey, que se utilizaban como bienes de consumo. Durante la década de 1860, John Wesley Hyatt desarrolló un material disolviendo nitrato de celulosa en una solución de alcanfor y etanol, con el objetivo de sustituir el marfil en la fabricación de bolas de billar. Así nació el “celuloide”, que fue vital en el posterior desarrollo de la industria cinematográfica de finales de siglo XIX. En 1897, Adolph Spitteler obtuvo “galatita”, el primer plástico de origen proteico, mezclando leche agria con formaldehído. Este material se utilizó para la fabricación de joyas, hebillas, peines y botones, entre otros. Posteriormente, en 1905, los hermanos Camille y Henry Dreyfus desarrollaron un proceso comercial para la fabricación de acetato de celulosa (AC), que desde entonces se ha utilizado como base para películas de fotografía, barnices y como componente de algunos adhesivos. En 1909, Leo Hendrik Baekeland patentó “baquelita”, una resina sintética obtenida por reacciones de condensación entre fenol y formaldehído. Este producto, empleado en carcasas de teléfonos y radios, fue el primero de una serie de resinas sintéticas que revolucionaron la tecnología moderna iniciando la “era del plástico”. Durante las décadas de 1930 y 1940 se consigue el desarrollo industrial de varios polímeros importantes de nuestra vida cotidiana: las poliamidas (PA), el poli(cloruro de vinilo) (PCV), el poliestireno (PS), las poliolefinas (polietilenos de alta y baja densidad (PEAD y PEBD, respectivamente) y polipropileno (PP)), el poli(metacrilato de metilo), el poli(tetrafluoretileno) (PTFE), el poliuretano (PU), y el polietilentereftalato (PET), entre otros (García, 2009).

Estos materiales se caracterizan por ser, en términos generales, fáciles de trabajar y moldear; flexibles; fuertes pero ligeros (de baja densidad); aislantes eléctricos, térmicos y

acústicos; resistentes a la corrosión, al agua y a la degradación por productos químicos, luz solar y bacterias. Debido a su amplia gama de propiedades y sus bajos costos de producción, la utilización de los plásticos se hizo extremadamente popular y llegó a sustituir a otros materiales tanto en el ámbito doméstico, como industrial y comercial (Goddard, 1990; Avella y col., 2001).

1.2. Importancia económica de los plásticos

El sector del plástico y sus manufacturas resulta ser uno de los más competitivos en el mundo actual. En los últimos 60 años, la producción y el uso de plásticos en el mundo se han incrementado enormemente (aproximadamente unas 20 veces), llegando a consumirse 100 millones de toneladas en el año 2010. (Silvestre y col. 2011).

Durante el año 2010, Argentina produjo 1.630.000 toneladas de plásticos, lo que representa alrededor del 2% del Producto Bruto Interno. Para destacar la importancia de la industria plástica argentina a nivel internacional basta mencionar que en 1997 nuestro país estaba ubicado en el undécimo puesto en cuanto a consumo anual per cápita de plásticos (30,6 kg), posicionándose primero en Latinoamérica. En el año 2010, el consumo per cápita alcanzó los 42,8 kg de plásticos. A pesar que se observa un pronunciado incremento en el consumo per cápita de plásticos, nuestro país está todavía lejos de otros países como Alemania y Estados Unidos que tienen un consumo superior a los 100 kg por habitante (Cámara Argentina de la Industria Plástica, 2010; www.argentinatradenet.gov.ar).

En la **Figura 1.1** se muestran los campos de aplicación de los productos plásticos en Argentina. En ella se observa que, al igual que lo que sucede a nivel mundial, el 45,5 % de la producción nacional se emplea en la industria del *packaging*, de los cuales el 80 % es usado para envases y embalajes de alimentos (Cámara Argentina de la Industria Plástica, 2010; Silvestre y col., 2011).

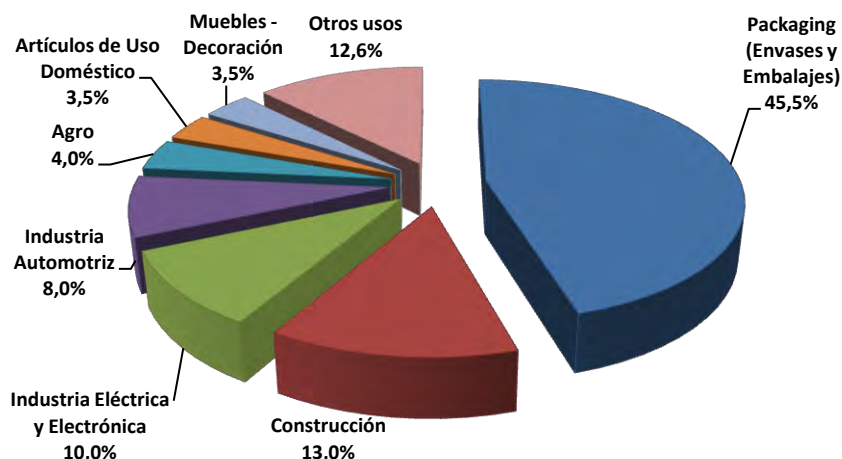


Figura 1.1: Campos de aplicación de los productos plásticos en Argentina (Cámara Argentina de la Industria Plástica, 2010).

1.3. Problemática ambiental asociada a los plásticos sintéticos

El empleo masivo de plásticos sintéticos derivados del petróleo trae aparejado básicamente dos problemas: por un lado el precio del petróleo se incrementará en el futuro por su excesivo consumo actual, siendo éste un recurso no renovable, y por lo tanto esto condiciona el futuro de estos materiales; por otra parte, la utilización del petróleo como materia prima para la producción de plásticos genera problemas ambientales, entre ellos, la emisión de gases invernadero (CO_2 , CH_4 y N_2O) (Zhang y Mittal, 2010).

También hay que considerar que la mayoría de estos materiales sintéticos no son biodegradables, y luego de ser usados, son arrojados al ambiente. La acumulación de estos materiales prácticamente eternos, constituye un serio problema ambiental mundial (Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009). Algunas posibles soluciones a este problema podrían ser: acumularlos en lugares específicos, incinerarlos o reciclarlos (Huang, 1995). Con el crecimiento de las sociedades, es difícil encontrar lugares para acumularlos, aunque esta no constituye una solución real. Por su parte, la incineración de los plásticos produce una gran cantidad de CO_2 , favoreciendo el calentamiento global, y a veces produce gases tóxicos, que también contribuyen a la contaminación ambiental (Song y col., 2011). Y en cuanto al reciclado, requiere mucho trabajo y energía, ya que implica, remover los plásticos, clasificarlos, lavarlos, secarlos, triturarlos y recién después reprocessarlos. Todo este proceso, tiene como consecuencia que el reciclaje no sea rentable en muchos casos (SinhaRay y Bousmina 2005; Marsh y Bugusu, 2007).

Con estos antecedentes, existe una necesidad urgente para el desarrollo de materiales poliméricos que no impliquen el uso de componentes tóxicos o nocivos en su fabricación y que puedan degradarse en productos naturales del medio ambiente. Por estas razones, durante las dos últimas décadas el desarrollo de materiales biodegradables ha sido, y continua siendo, un gran desafío de investigación (Petersen y col., 1999; SinhaRay y Bousmina, 2005; Sorrentino y col., 2007; Cruz-Romero y col., 2008; Siracusa y col., 2008; Zhang y Mittal, 2010).

1.4. Materiales plásticos biodegradables

Se consideran materiales biodegradables a aquellos que pueden ser reducidos y/o degradados a productos naturales por medio de microorganismos (como bacterias, levaduras y hongos) y/o enzimas (Karlsson y Albertsson, 1998). Desde un punto de vista químico se puede representar dos tipos de degradación (Doi y Fukuda, 1994; van der Zee, 2005):

- 1) Aeróbica: Polímero + O₂ -----> CO₂ + H₂O + Biomasa
- 2) Anaeróbica: Polímero -----> CO₂ + H₂O + Biomasa + CH₄

Los materiales biodegradables se pueden dividir en tres categorías principales en función de su origen y de su método de producción (Peterson y col., 1999; Weber, 2000; Yu y col., 2006)

(Figura 1.2):

1°) Polímeros extraídos directamente a partir de la biomasa, principalmente polisacáridos (como almidón, celulosa, gomas, quitosano, etc.) y proteínas (como caseína, gluten, soja, entre otras).

2°) Polímeros producidos por síntesis química clásica utilizando monómeros renovables naturales. El principal ejemplo de esta categoría, producido hoy en día a gran escala, es el ácido poliláctico (PLA), un biopoliéster polimerizado a partir de ácido láctico. Los propios monómeros pueden ser producidos a través de la fermentación de materia prima como carbohidratos.

3°) Polímeros producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente. Este grupo está compuesto principalmente por los polihidroxicanoatos

(PHA), que son poliésteres de reserva producidos por bacterias sometidas a condiciones de estrés, las cuales los sintetizan en varias formas químicas, entre los cuales se encuentra el polihidroxitbutirato (PHB); y por las celulosas bacterianas entre otros.

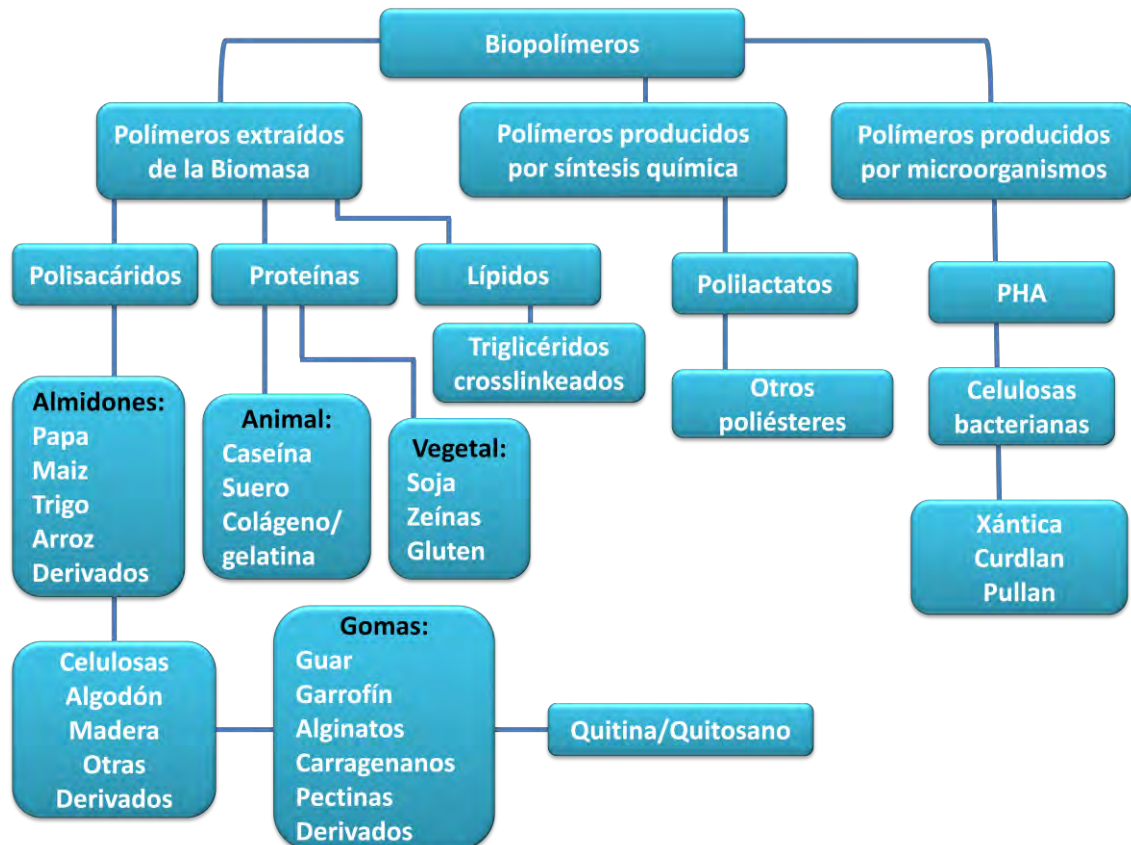


Figura 1.2: Representación esquemática de la clasificación de los biopolímeros según su origen y su método de producción (van Tuil y col., 2000).

Algunos de los polímeros naturales, como el PHB y PLA, poseen un costo elevado comparado con el de los *commodities* derivados del petróleo (9-12 €/kg vs. 0,8-1,2 €/kg, Koisor y col., 2006) por lo que se prevé que serán utilizados sólo en determinadas aplicaciones hasta que su precio disminuya (Arora y Padua, 2010; Chanprateep, 2010; Keshavarz y Roy, 2010; Koller y col., 2010; Nampoothiri y col., 2010)

En contraposición, los biopolímeros derivados de fuentes renovables agrícolas, como proteínas y polisacáridos, son los más abundantes y económicos (1-4,5 €/kg, Koisor y col., 2006). Por lo que se presentan como una alternativa sustentable para suplantar a los plásticos sintéticos, especialmente en aquellas aplicaciones de vida corta, como es el *packaging* de alimentos o plásticos para la agricultura, además de proveer nuevos usos de

mayor valor agregado para los productos agrícolas (Arvanitoyannis, 1999; Fishman y col., 2004; Lu y col., 2005; Kosior y col., 2006).

1.5. Materiales en base a proteínas

1.5.1. Las proteínas como polímeros

Las proteínas cubren una amplia gama de compuestos poliméricos cuya función es aportar estructura y actividad biológica a plantas y animales. Están constituidas por aproximadamente 20 aminoácidos, que además de tener los grupos alfa amino y alfa carboxilo involucrados en las uniones peptídicas, presentan una cadena lateral con diferentes grupos funcionales que le dan un carácter distintivo (Mauri y Añón, 2011).

La mayoría de las proteínas están constituidas por 100-500 aminoácidos. Dependiendo del orden que se unan los aminoácidos –estructura primaria– para formar la cadena polipeptídica, la misma asumirá distintas organizaciones espaciales sobre su eje –estructura secundaria–, estabilizadas básicamente por puentes de hidrógeno. El siguiente nivel de estructura –estructura terciaria– refleja la organización tridimensional de la cadena polipeptídica, en base a uniones puentes de hidrógeno, de van der Waals, interacciones electroestáticas e hidrofóbicas y puentes disulfuro, para formar estructuras proteicas globulares, fibrosas o al azar. Finalmente la estructura cuaternaria ocurre como consecuencia de la asociación de diferentes cadenas polipeptídicas, iguales o no entre sí, que interactúan a través de uniones no covalentes originando moléculas únicas (Cheftel y col., 1985; Gennadios, 2002; Mauri y Añón, 2011). Estos niveles de estructura proteica determinan las propiedades funcionales que presentarán estas macromoléculas, en particular aquellas relacionadas con las interacciones proteína-proteína las cuales dan origen a la formación de matrices con características propias, por ejemplo geles, películas, coberturas y fibras (Damodaran y Paraf, 1997; Denavi y col. 2009, Mauri y Añón, 2011; Song y col., 2011).

Las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas pueden ser modificadas por agentes físicos (tratamientos térmicos, mecánicos, presión hidrostática, irradiación, interfases, etc.) y químicos (pH ácidos y alcalinos, iones metálicos, y solventes orgánicos, entre otros) (Damodaran, 2010). Por lo tanto, estos agentes podrían utilizarse durante la

formación de los materiales proteicos para modificar las interacciones que forman la matriz proteica con el fin de modificar las propiedades de los materiales resultantes (Gennadios, 2002).

En las últimas décadas, numerosas proteínas de origen animal, tales como: caseínas, proteínas del suero de leche, albúminas, colágeno, gelatina, queratina y proteínas miofibrilares; así como también proteínas vegetales: soja, gluten de trigo, zeínas, girasol, algodón, amaranto, maní, arroz, arveja, sorgo, pistacho y lupino, han sido estudiadas por su capacidad de formar películas comestibles y/o biodegradables (Krochta, 1997; Cuq y col., 1998; Gennadios, 2002; Bourtoom, 2008; Dangaran y col., 2009; Zhang y Mittal, 2010; Pérez-Gago, 2012). De todas ellas, las que poseen menor costo de producción por ser extraídas de recursos agropecuarios renovables (“agropoteínas”) o de subproductos industriales son las que presentan mayor atractivo en el desarrollo de materiales biodegradables. Las proteínas de soja, entre otras cumplen con estas premisas (**figura 1.3**).

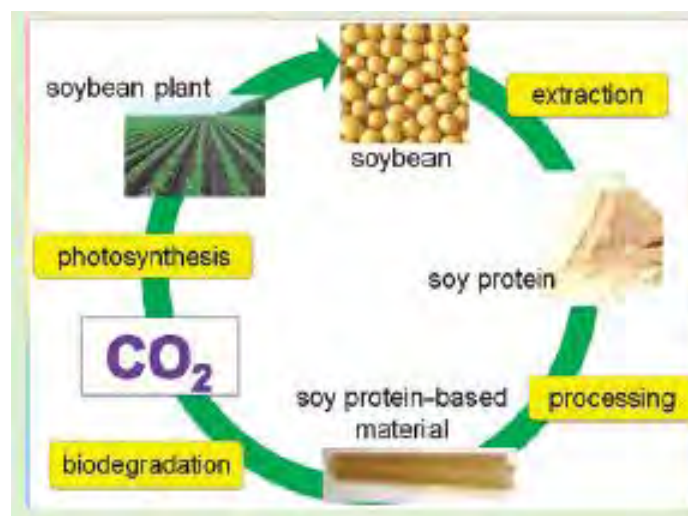


Figura 1.3: Esquema del ciclo de la soja como material biodegradable (extraído de Song y col., 2011).

1.5.2. Tecnologías de obtención de películas proteicas

La formación de una película de matriz proteica implica tres pasos:

1) Ruptura, por procesos químicos o físicos, de los enlaces intermoleculares (no-covalentes y/o covalentes) que estabilizan a las proteínas en su estado nativo lo que permite una mayor movilidad de las cadenas polipeptídicas,

2) Disposición y orientación de las cadenas proteicas móviles a las formas deseadas,

3) Formación de una nueva red tridimensional estabilizada por interacciones inter e intramoleculares del tipo covalentes (como disulfuros y *cross-linkings*) y/o no covalentes (hidrofóbicas, electrostáticas e iónicas, de van der Waals, y puentes de hidrógeno) (Mauri y Añón, 2011).

En la actualidad, las películas en base a proteínas, al igual que las de los otros biopolímeros, pueden formarse por dos procesos tecnológicos: uno “húmedo” basado en la dispersión o solubilización de las proteínas (*casting*), y otro “seco” basado en las propiedades termoplásticas de las proteínas a bajas concentraciones de agua (Cuq y col., 1997; Guilbert y Cuq, 2005).

- **Procesos “húmedos”:** Estos procesos, utilizados principalmente a escala laboratorio, involucran comúnmente la disposición de la solución o dispersión proteica sobre un molde o soporte, y luego la evaporación del solvente (Guilbert y Cuq, 2005; Hettiarachchy y Eswaranandam, 2005). Estos procesos tienen varias limitaciones que incluyen el tamaño y la cantidad de las películas producidas (no es un proceso continuo), los tiempos de producción largos, y la eliminación de grandes cantidades de solventes (dado que la relación materia seca a solvente es baja y los sólidos no superan el 10-12 % de la dispersión inicial) (Kozempel y Tomazula, 2004; Larotonda, 2007; Mauri y Añón, 2011). Aún así, la obtención de materiales por medio de esta tecnología sigue siendo extensamente estudiada, ya que existen antecedentes de escalado de este tipo de procesos en modo semicontinuo (“*spread coating*”) (Kozempel y Tomazula, 2004; Larotonda, 2007), y también es la forma en que generalmente se obtienen los recubrimientos sobre otras superficies (por ejemplo, revestimientos de papel), o sobre semillas o productos alimenticios (Guilbert, 1986; Krochta y col., 1994; Gennadios, 2002).

- **Procesos “secos”:** Las propiedades termoplásticas de los biopolímeros se definen en relación con la teoría de la transición vítrea (Tg). En estos procesos se combinan altas

temperaturas y presiones, esfuerzos de corte y bajos contenidos de humedad (o plastificantes) en intervalos cortos de tiempo. Bajo estas condiciones, las proteínas pasan a través de la transición vítrea formando una masa gomosa a la que se le puede dar forma y estabilizar por enfriamiento y/o eliminando plastificantes volátiles (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008; Mauri y Añón, 2011). Por lo tanto, las proteínas pueden procesarse desde el estado fundido por las técnicas convencionales de los polímeros sintéticos, tales como moldeo por compresión, inyección y extrusión (Cunningham y col., 2000; Orliac y col., 2002 y 2003; Micard y col., 2001; Cuq y col., 1998; Foulk y Bunn 2001; Zhang y col., 2001; Rouilly y col., 2006a y 2006b; Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008; Luecha y col., 2010; Guerrero y col., 2011; Chen y col., 2012). Si bien el moldeo por compresión es útil como un método de procesamiento debido a su simplicidad y la capacidad de producir productos de gran tamaño, los procesos de extrusión e inyección son los métodos preferidos para la producción de materiales con altos rendimientos destinados a usos tales como envases. Estas tecnologías permiten obtener, por ejemplo, materiales compuestos, películas para usos agrícolas, u objetos moldeados tales como contenedores desechables de alimentos (por ejemplo, cubiertas y platos de picnic), bolsas de residuos y de comestibles, macetas y bandejas, aislantes térmicos, entre otros.

Ambas tecnologías de procesamiento (*“húmedo”* o *“seco”*) permiten obtener materiales proteicos con estructura de gel tridimensional reorganizada, con menor contenido de agua, en donde las interacciones entre las proteínas y los demás componentes de la formulación se encuentran favorecidas (Mauri y Añón, 2011). Sin embargo, las condiciones de procesamiento determinarán las propiedades de las matrices proteicas resultantes (Debeaufort y col., 1998).

1.5.3. Propiedades de las películas proteicas

Comparados con los materiales plásticos sintéticos, los materiales proteicos presentan excelentes propiedades barrera a gases (en particular al oxígeno), a los lípidos y a los aromas; pero comúnmente no muestran propiedades mecánicas y barrera al vapor de agua satisfactorias para aplicaciones prácticas, debido a su inherente hidrofiliidad, y a las fuertes interacciones moleculares que presentan; empobreciéndose estas propiedades en

condiciones de mucha humedad. (Krochta 1997; Cuq y col., 1998; Weber, 2000; Gennadios, 2002; Bourtoom, 2008 y 2009; Dangaran y col. 2009; Zhang y Mittal, 2010).

Se ha demostrado, como se mencionó anteriormente, que las propiedades de estas películas están determinadas por su microestructura, la cual varía significativamente dependiendo de la composición proteica inicial y de la metodología utilizada para su obtención (Denavi y col., 2008). La estructura de la proteína (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) determina la capacidad de los polipéptidos de interactuar entre sí y con otros componentes presentes en la formulación. Esto afecta el grado de entrecruzamiento y el carácter hidrofílico–hidrofóbico de las películas y con ello sus propiedades físico-químicas, mecánicas y de barrera (Mauri y col., 2006 y 2008; Salgado y col., 2010).

1.5.4. Alternativas para mejorar la funcionalidad de los materiales proteicos

Con el objetivo de mejorar la funcionalidad de las películas proteicas (principalmente sus propiedades mecánicas y barrera al vapor de agua) y así poder extender su uso, diversos estudios evaluaron:

i) *Modificaciones de las formulaciones iniciales por tratamientos físicos y/o químicos.* A modo de ejemplo podemos mencionar tratamientos térmicos, con alta presión, irradiación, hidrólisis, tratamiento con ácidos o álcalis, adición de iones metálicos, sales, agentes esterificantes, etc. (Rangavajhyala y col., 1997; Krochta, 1997; Rhim y col., 2000; Foulk y Bunn, 2001; Tang y col., 2005; Mauri y Añón 2006 y 2008, Ghorpade y col., 1995; Koehler y col., 2010). En general los cambios producidos en la estructura proteica inducen modificaciones en mayor o menor medida en la funcionalidad de las películas resultantes, siendo más significativos los efectos sobre las propiedades mecánicas y la solubilidad que sobre la permeabilidad al vapor de agua.

ii) Incorporación de aditivos que modifican los mecanismos de formación de las películas, por ejemplo agentes plastificantes y entrecruzantes. La mayoría de los trabajos agregan plastificantes, tales como glicerol y otros polioles, azúcares, sorbitol, etilenglicol y etanolamina y sus respectivos derivados, lípidos y emulsificantes (Park y col., 2002; Wan y col., 2005; Song y col., 2010). El agregado de estos compuestos provoca una disminución de la interacción entre las cadenas peptídicas, como consecuencia de ellos se produce una disminución de la Tg de las películas, un aumento en la elongación acompañado de una

disminución en la resistencia mecánica, y en general una disminución de sus propiedades barrera a la humedad, al oxígeno y a los aromas (Galiotta y col., 1998; Irissin-Mangata y col. 2001; Gennadios, 2002; Orliac y col., 2003; Audic y Chaufer, 2005, Turhan y col., 2007; Cao y col., 2009; Andreuccetti y col., 2009). Otra estrategia es agregar entrecruzantes químicos (por lo general aldehídos de bajo peso molecular como formaldehído, glioxal, y glutaraldehído) que reaccionan con los amino y sulfhidrilos de las proteínas formando interacciones covalentes intra e intermoleculares. Si bien los aldehídos son entrecruzantes efectivos, la posible toxicidad de los mismos los deja limitados para aplicaciones no alimentarias (Galiotta y col., 1998) siendo la vía enzimática (con transglutaminasa, lipoxidasa, lisiloxidasa, polifenoloxidasa y peroxidasa) la de mayor potencialidad. En ambos casos, el aumento en el grado de entrecruzamiento conduce principalmente a matrices más resistentes y menos solubles, pero a veces también logra mejorar las permeabilidades al vapor de agua (Galiotta y col., 1998; Vaz y col. 2003; Audic y Chaufer, 2005; Tang y col., 2005).

iii) Modificación de las condiciones de procesamiento. Cambios en las variables de los procesos puede conducir a la obtención de materiales con distintas propiedades. Por ejemplo, durante el período de secado de las películas, la humedad relativa (RH) afecta la velocidad de secado de la dispersión filmogénica e influencia el tipo y la proporción de interacciones entre cadenas de proteínas (Denavi y col., 2008). Foulk y Bunn (2001) observaron que al aumentar la temperatura usada para obtener películas de soja acetiladas por termocompresión las mismas presentaron mayores resistencias a la tracción y menores permeabilidades al vapor de agua.

iv) Aplicación de tratamientos físicos y químicos posteriores a la formación de las películas. El curado (tratamiento térmico) afecta sensiblemente las propiedades de los films proteicos, en general aumenta la resistencia a la tracción y la coloración, a la vez que disminuye la elongación, el contenido de humedad y la permeabilidad al vapor de agua de las películas resultantes (Gennadios y col., 1996 y Rhim y col., 2000). Por otra parte, la irradiación con rayos UV y gamma también puede afectar a las proteínas provocando cambios conformacionales, oxidación de los aminoácidos, ruptura de enlaces covalentes, formación de radicales libres y reacciones de recombinación y polimerización (Urbain, 1977; Pateau y col., 1994). Ghorpade y col. (1995) y Gennadios y col. (1998) lograron incrementar

la resistencia a la tracción de películas proteicas tratadas con radiación gamma y UV, respectivamente.

v) Incorporación de aditivos que le otorgan una funcionalidad específica. En este caso podemos citar el agregado de antioxidantes, antimicrobianos, vitaminas, microorganismos probióticos, *flavors* y pigmentos (León y col., 2006; Flores y col., 2006; Han y col., 2007; Gómez-Estaca y col., 2008; Giménez y col., 2011) con la finalidad de mejorar la seguridad, el valor nutricional, la calidad y la apariencia del producto que protegen, entrando así en el campo de los materiales activos. Los compuestos adicionados a las matrices proteicas pueden ser de naturaleza sintética, tales como benzoatos, sorbatos, nisina, entre otros con propiedades antimicrobianas, ó butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA) como antioxidantes (Dawson y col., 2003; Franssen y col., 2004; Seacheol y Krochta, 2007; Jongjareonrak y col., 2008; Sivarooban y col., 2008; Ozdemir y Floros, 2008; Gómez-Estaca y col., 2009a; Pintado y col., 2009; Rossi-Márquez y col., 2009; Zhang y col., 2010; Leerahawong y col., 2011) o compuestos naturales, por ejemplo compuestos fenólicos y flavonoides con actividad antioxidante, extractos vegetales como disolventes en la formación de las películas, hidrolizados proteicos con propiedades bioactivas, aceites esenciales que poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, etc. (Oussalah y col., 2004; Güçbilmez y col., 2007; Gómez-Estaca y col., 2009a,b; Atarés y col., 2010; Gemili y col., 2010; Norajit y col., 2010; Siripatrawan y Harte, 2010; Zhang y col., 2010; Salgado y col. 2010 y 2011). Estos compuestos, además de ampliar la funcionalidad de las películas proteicas, pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de los materiales debido a que también podrían actuar como agentes entrecruzantes o plastificantes (Orliac y col., 2002; Ou y col., 2005; Giménez y col., 2009; Salgado y col. 2010 y 2011).

1.6. Materiales compuestos de matriz proteica

La formación de materiales compuestos también se presenta como una buena alternativa para mejorar las propiedades de los materiales proteicos. El objetivo es combinar a la proteína con otro material a fin de obtener uno nuevo que comparta las ventajas de cada componente y minimice las desventajas que presentan cada uno de ellos por separado. Así por ejemplo, se ha estudiado:

i) la formación de materiales a partir de mezclas de proteínas con otros polímeros

Varios autores han estudiado la formación de películas mediante mezclas de proteínas con otros polímeros, ya sea naturales o sintéticos con el interés e mejorar las propiedades mecánicas y/o barrera así como facilitar el procesamiento de las películas proteicas. La obtención de este tipo de materiales (blends) genera muchas expectativas a nivel de investigación, y hay numerosos estudios en bibliografía que lo demuestran. Así se ha estudiado la formación de materiales a partir de la mezcla de proteínas de distinto origen (Cao y col., 2007; Denavi y col., 2009; Monedero y col., 2010; Chambi y Grosso, 2006; Ghanbarzadeh y. Oromiehi, 2009); de proteínas con otros biopolímeros tales como quitosano (Ferreira y col.; 2009), alginato, pectinas y carragenatos (Coughlan y col., 2004), almidón (Gonzalez-Gutierrez y col., 2010), almidón modificado (Arvanitoyannis y col., 1998), metilcelulosa (Zuo y col., 2009), etc; de proteínas con polímeros biodegradables sintéticos como ácido poliláctico (Rhim y col., 2007) , con policaprolactona (Choi y col., 2006; Hong y col., 2009); polivinilalcohol (Maria y co., 2008; Limpan y col., 2010; Su y col., 2010), etc; e incluso a partir de proteínas y polímeros sintéticos como polietileno y polipropileno (Hong y Krochta, 2006)

ii) el agregado de lípidos a las formulaciones

La combinación de proteínas con lípidos da origen a dos tipos de materiales compuestos: i) laminados en el cual el lípido constituye una capa distinta de la proteica, y en general se forman depositándolos sobre la película proteica a partir del fundido o a partir de una solución que lo contenga; y ii) emulsionados en los cuales las fases lipídicas se encuentran dispersas uniformemente en la matriz proteica.

Entre los lípidos, las ceras han sido las que contribuyeron con mejores propiedades a los materiales proteicos (Debeaufort y col., 2000; Quezada gallo, 2000). Denavi y col. (2008) estudiaron la formación de películas compuestas en base a proteínas de soja y cera de abeja, bicapas y emulsionadas, y observaron que si bien las emulsionadas se formaban en una sola etapa en lugar de dos como las bicapa, estas últimas presentaron mejores propiedades mecánicas y barrera al vapor de agua. También se ha estudiado la formación de películas

proteicas con otros tipos de lípidos tales como ácidos grasos, aceites esenciales, etc y con mezclas de ellos (Atares y col., 2010; Monedero y col., 2009; Zahedi y col., 2010)

iii) el agregado de refuerzos

Las fibras celulósicas naturales, como las de lino, yute, ramio, cáñamo, sisal, y piña, han atraído la atención como refuerzos para materiales compuestos, debido a que son renovables, livianas, biodegradables y biocompatibles y tienen bajo costo y un módulo específico alto (Mohanty, y col, 2000; Wambua y col., 2003; Bledzki y Gassan, 1999).

Se lograron mejorar las propiedades mecánicas al combinar proteínas con fibras celulósicas largas, cortas y microcristalinas, orientadas o no (Liu et al., 2004 y 2005; Salgado et al. 2007; Pateau y col., 1994; Kumar y Zhang, 2009), con lignosulfonatos y lignina (Huang y col., 2003 a y b), e incluso también con fibras de vidrio (Beg y col., 2005).

1.7. Materiales nanocompuestos

Al igual que en el campo de los polímeros sintéticos, en el área de los biopolímeros ha surgido una nueva generación de materiales compuestos, donde el material de refuerzo tiene al menos una de las dimensiones en escala nanométrica. Tales refuerzos se conocen como nanorefuerzos y los materiales compuestos resultantes se denominan nanocompuestos.

El uso de nanorefuerzos en polímeros ha probado ser un camino efectivo para mejorar las propiedades de los polímeros (Giannelis, 1996). Estas mejoras involucran: las propiedades mecánicas (resistencia, módulo y estabilidad dimensional); bajar la permeabilidad a gases, agua e hidrocarburos; la estabilidad térmica y la temperatura de distorsión (heat distortion temperature), el retardamiento a la llama y la emisión de humos, la resistencia química, la apariencia superficial, la conductividad eléctrica y la transparencia. Además es importante señalar que las nanopartículas o las nanofibras confieren esas mejoras en las propiedades con niveles de carga bajos ($\leq 5\%$) mientras que los compuestos tradicionales necesitan mucha más carga (40-50 %) para obtener el mismo comportamiento. Esto resulta en reducciones de pesos para igual comportamiento (importante para varias aplicaciones como

la militar o la espacial), mayor resistencia para dimensiones estructurales similares, y mejoras en el comportamiento barrera para iguales dimensiones.

Si bien son varios los nanorefuerzos que se vienen desarrollando, como por ejemplo nanofibras de celulosa (cellulose nanowhiskers) (Mohanty y col., 2003), nanoagregados de hidroxipropil lignina (Wei y col, 2006; Chen y col., 2006), finas capas de óxido de titanio (Hiroi y col., 2004), nanotubos de carbono (Mitchell y col. 2002, y Potschke y col. 2003), las más estudiadas son los minerales silicatos arcillosos en capas (layered silicate clay mineral), no solo por su fácil disponibilidad, bajo costo y que son amigables con el ambiente, sino también por su procesabilidad relativamente simple y sus mejoras significativas en los polímeros incorporados (Giannelis 1996, Sinha Ray y Okamoto 2003, Sinha Ray y Bousmina, 2005; de Azeredo, 2009).

1.8. Utilización de nanoarcillas como refuerzo

1.8.1. Estructura de los filosilicatos, entre ellos la Montmorillonita

Dentro de los minerales arcillosos en capas, los más comunes pertenecen a la familia de los silicatos con capas 2:1 o filosilicatos (Phyllosilicates) (Grim 1953), entre ellos la *montmorillonita (MMT)*, *hectorita*, y *saponita*.

Su estructura cristalina general consiste en dos capas bidimensionales donde una lámina octaédrica central de aluminio o magnesio está unida por los extremos a dos tetraedros externos de sílice, de modo que los iones oxígeno de la lámina octaédrica también pertenecen a las láminas del tetraedro. El espesor de la capa es de aproximadamente 1 nm y las dimensiones laterales de estas capas varían de 30 nm a varias micras, dependiendo del tipo particular de silicato. Estas capas se organizan formando apilamientos con un espaciado de van der Waals entre estas conocidos como interláminas o galerías (**Figura 1.4**).

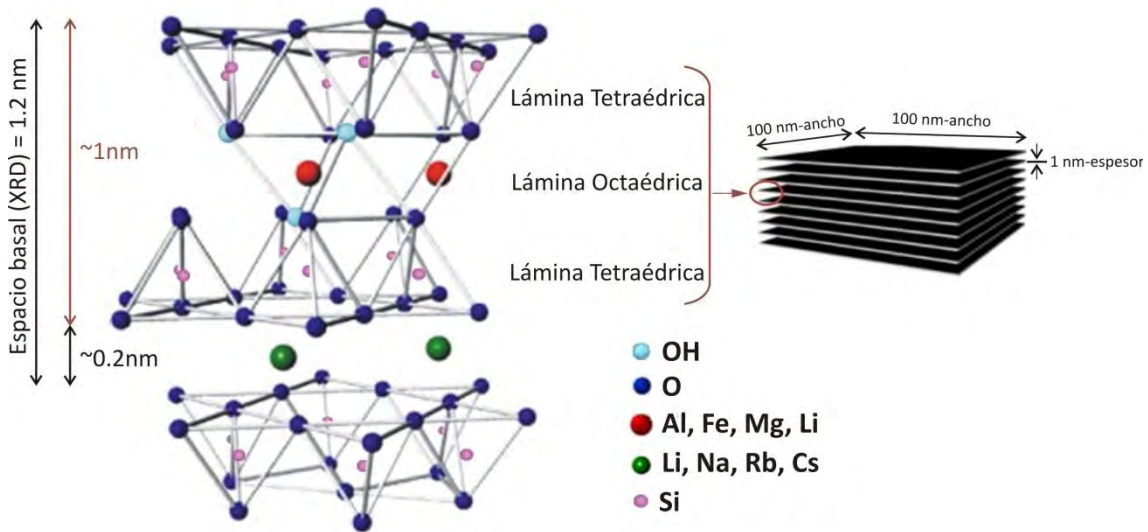


Figura 1.4: Estructura general de los 2:1 filossilicatos.

La sustitución isomórfica dentro de las capas (por ejemplo Al^{+3} reemplazado por Mg^{+2} o Fe^{+2} en la lámina octaédrica, o Si^{+4} reemplazado por Al^{+3} en la lámina tetraédrica) genera cargas negativas que se compensan con cationes alcalinos y alcalino térreos situados en el interior del espacio interlamilar (por ejemplo Na^{+1} , K^{+1} o Ca^{+2}).

Este tipo de silicato en capas se caracteriza por una moderada carga negativa superficial conocida como capacidad de intercambio catiónico (CIC), que se expresa generalmente como meq/100 g. Esta propiedad es dependiente, en gran medida, de la naturaleza de la sustitución isomórfica en las capas tetrahédricas y octahédricas y, por lo tanto, de la naturaleza del suelo donde la arcilla fue formada. Lo cual explica, por ejemplo, por qué las montmorillonitas de diferente origen muestran diferencias en la CIC, con rangos que varían entre 90 - 120 meq/100g aproximadamente. Esta carga no es constante, sino varía de una capa a otra, y debe ser considerado como un valor medio de todo el cristal. Las características de los silicatos más usados se muestran en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1: Fórmula química y parámetros característicos de los 2:1 filosilicatos usados comúnmente (Ray y Okamoto, 2003).

2:1 filosilicatos	Fórmula química	CEC (mequiv/100g)	Longitud de la partícula (nm)
Montmorillonita	$M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$	110	100–150
Hectorita	$M_x(Mg_{6-x}Li_x)Si_8O_{20}(OH)_4$	120	200–300
Saponita	$M_xMg_6(Si_{8-2x}Al_x)Si_8O_{20}(OH)_4$	86,6	50–60

M= catión monovalente; x= grado de sustitución isomórfica (entre 0,5 y 1,3).

En los silicatos en capas naturales, los cationes del espacio interlaminar son generalmente Na^{+1} o K^{+1} hidratados, mostrando propiedades hidrofílicas de superficie. En este estado natural, estos silicatos son más compatibles con polímeros de naturaleza hidrofílica.

Existen dos características particulares de los silicatos laminados que generalmente son interesantes para la formación de los nanocompuestos. La primera es la habilidad de dispersarse en capas individuales. La segunda es la capacidad de modificar químicamente su superficie a través de reacciones de intercambio iónico con cationes orgánicos e inorgánicos. Estas dos características están interrelacionadas entre sí, dado que el grado de dispersión de la capa de silicato en una matriz polimérica en particular depende del catión que existe entre las capas.

1.8.2. Montmorillonitas orgánicamente modificadas

Para generar silicatos en capas miscibles con polímeros hidrofóbicos, se debe convertir la superficie hidrofílica del silicato en una organofílica. Esto puede lograrse a través de reacciones de intercambio iónico con diversos cationes orgánicos (por ejemplo cationes de alquilamonio, cationes surfactantes, etc). Los cationes orgánicos disminuyen la energía superficial de la superficie del silicato, logrando así un espaciado mayor entre las diferentes capas.

Con el objetivo de describir la estructura de la intercapa en las arcillas orgánicas, se debe tener en cuenta que la carga negativa se origina en la capa de silicato, mientras que la cabeza catiónica del grupo de la molécula alquilamonio reside preferencialmente en la superficie de la capa dejando la cola orgánica alejada de la misma. En un rango determinado

de temperatura, son dos los parámetros que definen el equilibrio del espaciado de las capas: la capacidad de intercambio catiónico del silicato que conlleva al empaquetamiento entre las cadenas, y el largo de las colas orgánicas. De acuerdo a la información obtenida con la difracción de rayos X, las cadenas orgánicas podrían permanecer paralelamente sobre la capa de silicato formando mono o bicapas ó, dependiendo de la densidad del empaquetamiento y la longitud de la cadena, podrían permanecer alejadas de la superficie formando un arreglo “parafínico” inclinado mono o bimolecular (Lagaly, 1986), como se muestra en la **Figura 1.5**.

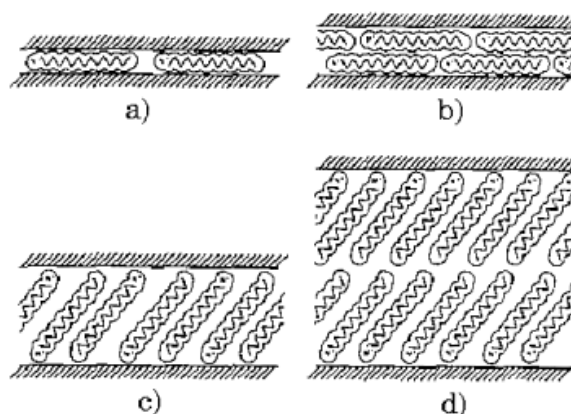


Figura 1.5: Agregación de la cadena alquilo en capas de silicato: (a) monocapa lateral; (b) bicapa lateral; (c) monocapa tipo parafina y (d) bicapa tipo parafina (extraído de Alexandre y Dubois, 2000).

Una descripción más real fue propuesta por Vaia y col. (1994), basada en experimentos con FTIR. Al monitorear los cambios de las vibraciones correspondientes a la elasticidad y plegamiento del CH_2 asimétrico, se encontró que las cadenas intercaladas existen en estados con varios grados de orden. En general, como la densidad de empaquetamiento entre las capas decrece (o la temperatura aumenta), las cadenas intercaladas adoptan una estructura más desordenada, similar a la de un líquido, generada por un incremento en el radio *gauche/trans* que las conforma. Cuando el área superficial disponible por molécula está dentro de un cierto rango, las cadenas no se encuentran completamente desordenadas, pero retienen cierto orden en su orientación similar al estado del líquido cristalino (**Figura 1.6**).

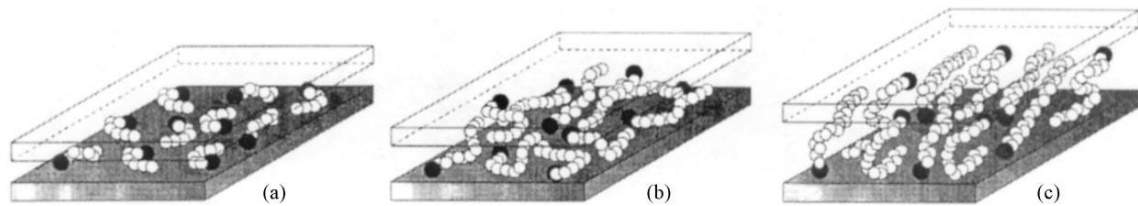


Figura 1.6: Modelos de agregación de cadenas alquil: (a) cadena alquil corta: moléculas aisladas, monocapa lateral; (b) cadena de longitud intermedia: en pleno desorden e integración para formar pseudo-bicapas y (c) cadena de longitud larga: orden de intercapa aumentado, orientación similar al líquido cristalino (extraído de Alexandre y Dubois, 2000).

Esta interpretación ha sido recientemente confirmada por simulación dinámica molecular, donde se encontró una fuerte tendencia a formar capas con un arreglo desordenado del tipo líquido que puede convertirse en un arreglo más ordenado al aumentar la longitud de la cadena. De este modo, a medida que crece la longitud de la cadena, la estructura intercapa se aproxima a una monocapa ordenada hasta alcanzar rápidamente una pseudo-bicapa más desordenada.

Además, dichos cationes orgánicos pueden contener varios grupos funcionales que reaccionan con el polímero para mejorar la interacción entre los silicatos y la matriz polimérica (Ray y Okamoto, 2003). Dependiendo de la funcionalidad, la densidad de empaquetamiento, la capacidad de intercambio catiónico (CIC), la relación de aspecto, el área superficial, la reactividad superficial, las propiedades de adsorción y la extensión de las modificaciones orgánicas, los organosilicatos pueden ser adaptados de manera de optimizar su compatibilidad y reactividad con la matriz polimérica (Barick y Tripathy, 2011).

1.8.3. Obtención de los materiales nanocompuestos reforzados con arcillas

El principal objetivo para el desarrollo exitoso de los nanocompuestos en base a polímero-arcilla es lograr una completa exfoliación del silicato en capas en la matriz polimérica.

Se pueden obtener tres tipos de compuestos cuando el polímero y la arcilla se asocian. El resultado depende de la naturaleza y miscibilidad de la arcilla con la matriz. Cuando el polímero es incapaz de intercalarse entre las capas de arcilla, se obtiene un compuesto de dos fases, denominados también aglomerados o tactoides (**Figura 1.7 (a)**), donde las

propiedades finales alcanzadas son parecidas a las de un microcompuesto. Además, dependiendo de la fuerza de las interacciones entre el polímero y la arcilla, existen otros dos tipos de materiales termodinámicamente posibles: b) intercalados, donde la inserción de las cadenas poliméricas en la estructura de los silicatos ocurre en fases cristalográficas regulares independientemente de la proporción de cargas y con una distancia repetitiva de unos pocos nanómetros, y c) exfoliados, en los cuales las plaquetas de los silicatos son separadas en la matriz polimérica y la distancia promedio entre ellos depende del nivel de carga (**Figura 1.7, b y c**) (Sinha Ray y Bousmina 2005).

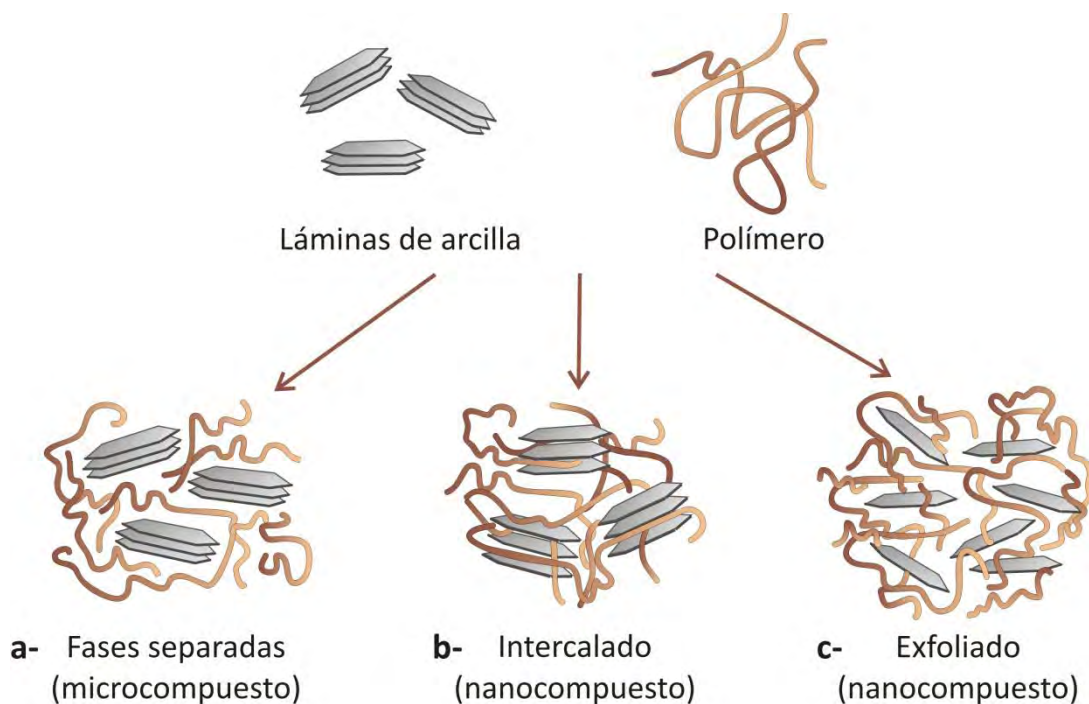


Figura 1.7: Diagrama de los dos posibles tipos de nanocompuestos polímeros- nanosilicatos: intercalados y exfoliados.

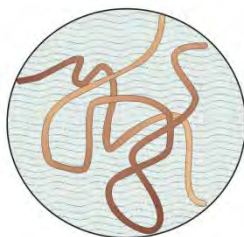
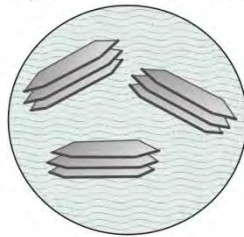
Para poder obtener las nanoestructuras explicadas anteriormente (intercalada y/o exfoliada) se pueden utilizar varias técnicas: por polimerización in-situ, utilizando un solvente o por mezclado físico.

1.8.3.1 Intercalación en solución

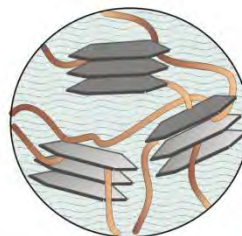
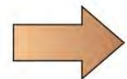
Se basa en un sistema solvente en el que el biopolímero (como por ejemplo el almidón ó proteína) es soluble y las capas de silicatos, se expanden. El silicato en capas es primero

solvatado en un solvente como el agua, el cloroformo, o tolueno. Es sabido que debido a las débiles fuerzas que permiten mantener las distintas capas juntas, dicho silicato en capas suele ser fácilmente dispersable en un disolvente adecuado. Cuando los biopolímeros y la solución de arcillas expandidas se mezclan, las cadenas del polímero se intercalan entre las capas de los silicatos. El paso final consiste en remover el solvente, ya sea por evaporación bajo vacío o por precipitación. Luego de la eliminación del solvente, las capas se reacomodan, intercalando el polímero para formar una estructura nanocompuesta. La principal ventaja de este método es que los nanocompuestos intercalados pueden ser sintetizados en base a polímeros con baja o incluso nula polaridad. Sin embargo, la aplicación de solventes es difícil de aplicar en la industria debido los problemas asociados al uso de grandes cantidades de solventes (Alexandre y Dubois, 2004; Beyer, 2002). Este método se esquematiza en la **Figura 1.8**.

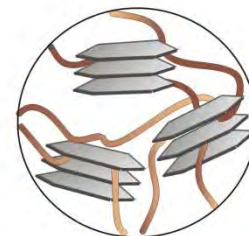
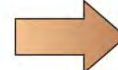
Dispersión de arcilla



Solución de polímero



Intercalación del polímero
en las galerías de la arcilla
dispersa



Evaporación del solvente
y formación del
nanocompuesto

Figura 1.8: Principio de intercalación del polímero en solución.

1.8.3.2. Intercalación in-situ

En esta técnica, la arcilla se incorpora a una solución de monómero. El monómero migra dentro de las galerías del silicato en capas, de modo que la reacción de polimerización puede ocurrir entre las láminas intercaladas. La reacción puede iniciarse o bien por calor o radiación, por la difusión de un iniciador adecuado o por un iniciador orgánico o catalizador

fijado a través de intercambio catiónico en el interior de la interlámina antes de la etapa de hinchamiento por el monómero. La polimerización produce polímeros de cadena larga dentro de las galerías de arcilla. Bajo condiciones en las cuales la polimerización dentro y fuera de las galerías están bien equilibradas, las capas de arcilla son delaminadas y el material resultante posee una estructura desordenada (Alexandre y Dubois, 2004; Beyer, 2002; Solomon y col., 2001). Este método se representa en la **Figura 1.9**.

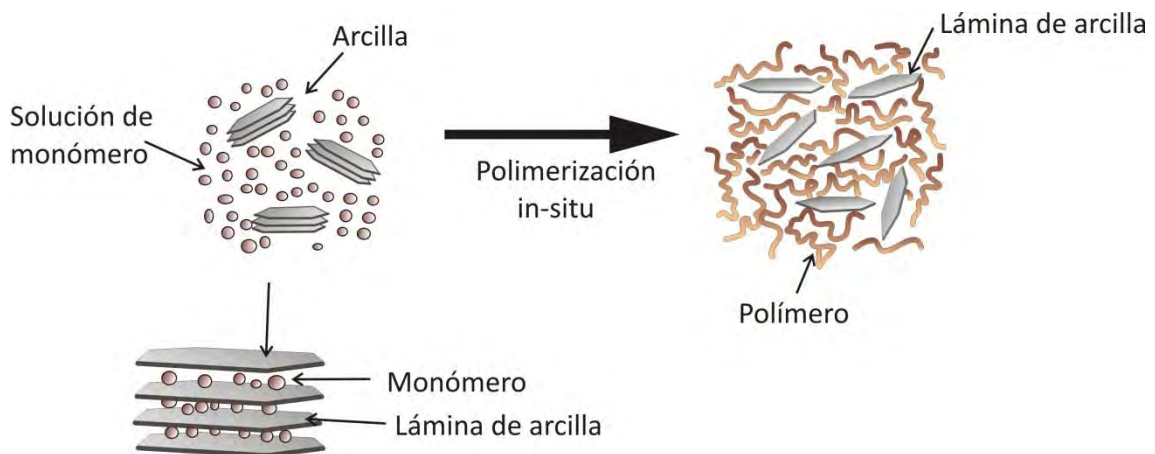


Figura 1.9: Proceso de intercalación in-situ.

1.8.3.3. Intercalación en fundido

Este proceso consiste en mezclar un silicato en capas con un polímero en estado fundido. Mientras se está calentando, las cadenas del polímero difunden desde el bulk del polímero fundido hacia los espacios entre las capas de silicato. Se puede obtener una gama de nanocompuestos con las estructuras que van desde intercaladas a exfoliadas, en función del grado de penetración de las cadenas poliméricas en las capas de silicato (Mallapragada y Narasimhan, 2006; Pandey y col., 2005). El método de intercalación en fundido permite formar materiales nanocompuestos a partir de polímeros que no pueden procesarse por intercalación en solución o polimerización in situ. Este método se representa en la **Figura 1.10**.

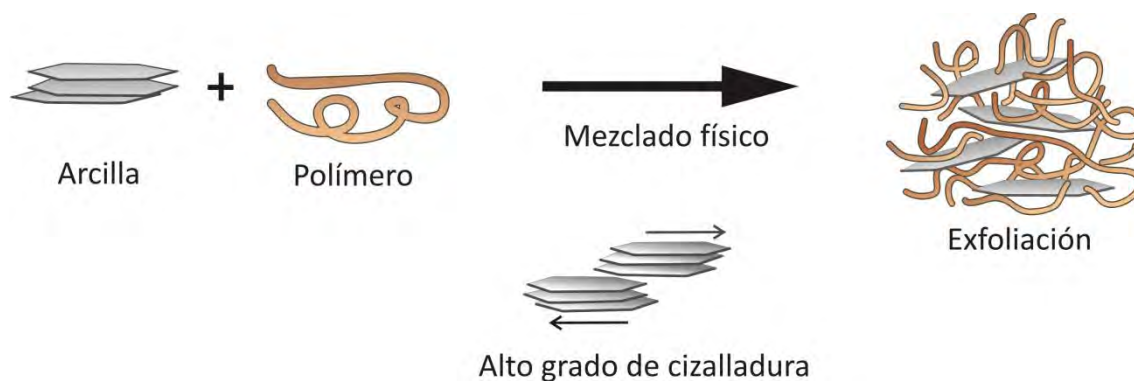


Figura 1.10: Proceso de intercalación en fundido.

Esta técnica de intercalación en fundido se ha convertido en el método estándar para la preparación de nanocompuestos con polímeros sintéticos. Presenta ciertas ventajas respecto a la intercalación en solución y intercalación por polimerización in situ. Por ejemplo, desde la perspectiva de los residuos, la ausencia de solventes orgánicos hace que la intercalación en fundido amigable con el ambiente. Además, es compatible con los procesos industriales actuales para procesar esos materiales, tales como la extrusión y moldeo por inyección (Manias y col., 2001; Shen y col., 2002; Cho y Paul, 2001, Fornes y col., 2001; Schmidt y col., 2002).

1.8.4. Propiedades de los materiales nanocompuestos

La principal razón por la cual estas nanoarcillas mejoran las propiedades de los polímeros son las interacciones superficiales fuertes entre la matriz y la carga (Chen y col. 2002).

Se ha reportado en bibliografía las mejoras que las mismas ejercen en matrices poliméricas sintéticas, tanto termoplásticos como termorrígidos (Kim y col 2005, Aranda y Ruiz-Hitzky 1992, Kojima y col 1993, Lam y col 2005), así como también en polímeros biodegradables como: poliláctico polihidroxibutirato, polibutilen succinato, poliésteres alifáticos, policaprolactonas, polivinilalcoholes, almidón, celulosa, quitosano y gelatina (Zheng y col. 2002, Sinha Ray y Bousmina 2005, Thellen y col 2005, Wanga y col 2005). Entre ellas pueden mencionarse: mayor retardamiento a la llama y estabilidad térmica, menor absorción de agua, mayor resistencia mecánica y módulo elástico, mejores propiedades barrera, mayor estabilidad dimensional, mayor claridad y menor densidad.

En particular, las propiedades barrera de los materiales poliméricos pueden ser mejoradas por incorporación de cantidades pequeñas de nanoarcillas. Los resultados de varios trabajos muestran que la transmisión de oxígeno para películas de poliamida-nanoarcillas es aproximadamente la mitad que para el caso de las no modificados (Hay y Shaw, 2003), y también se ha reportado la disminución del vapor de agua en sistemas reforzados con arcilla. Estos resultados han despertado el interés en la aplicación de nanoarcillas para envases para alimentos, tanto rígidos como flexibles.

La dispersión completa de las capas de arcilla en un polímero optimiza el número de elementos de refuerzo disponibles para soportar la aplicación de una carga y evitar grietas en el material. El acoplamiento entre la gran área superficial de la arcilla y la matriz polimérica facilita una interacción que permite tales mejoras mecánicas. Además, las capas impermeables de la arcilla, generan un camino tortuoso a los permeantes les cuesta más atravesar el nanocompuesto (**Figura 1.11**). Las propiedades de barrera mejoran la resistencia química, disminuyen la absorción de disolvente y provocan el retardamiento a la llama de los nanocompuestos de polímero-arcilla, lo cual surge por la obstaculización de la vía de difusión a través de los nanocompuestos.

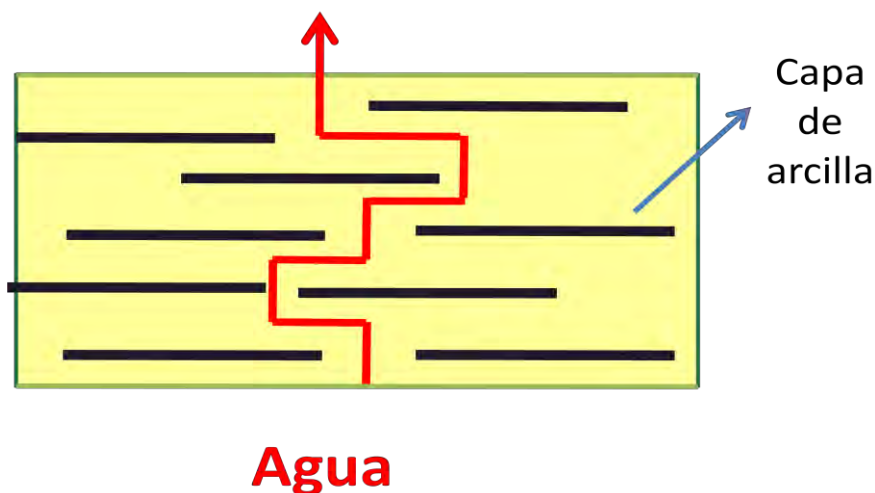


Figura 1.11: Representación esquemática del camino tortuoso que debe recorrer una molécula para atravesar un material nanocompuesto.

Las capas de montmorillonita exfoliadas en la matriz proteica, además de mejorar las propiedades fisicoquímicas de las películas proteicas, podrían llegar a actuar como captosres

de etileno y de humedad -ya que se ha encontrado que otras arcillas presentan estas actividades (Han, 2005). Por otra parte, si estas formulaciones fueran activadas por algún tipo de aditivo con capacidad antioxidante o antimicrobiana, por ejemplo, la presencia de la arcilla en este sistema podría actuar como modulador de la liberación del principio activo (Mascheroni y col., 2010)

Sin embargo, hay muchas dudas acerca de los nanomateriales. El principal riesgo de la exposición del consumidor a las nanopartículas frente al envasado de alimentos es probable que sea a través de la migración potencial de las nanopartículas en los alimentos y bebidas. Hay información científica limitada acerca de la migración de la mayoría de los tipos de nanopartículas (NPs) desde el material de envase hacia los alimentos, como también sobre los consiguientes efectos toxicológicos. Es razonable asumir que la migración puede ocurrir, por eso es imprescindible la información adecuada acerca de los efectos de la exposición crónica de las nanopartículas en la salud humana (de Azeredo, 2009). Hasta la fecha, solo hay un estudio publicado que ha determinado la migración de minerales (Fe, Mg, Si) de películas en base a almidón biodegradable y nanoarcilla (Avella y col., 2005). Los resultados de este estudio mostraron una tendencia no significativa en los valores de Fe y Mg en vegetales envasados, pero un aumento consistente en los niveles de Si (principal componente de las nanoarcillas).

En este contexto el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue:

Estudiar la aplicabilidad de proteínas de soja en la obtención de materiales biodegradables y nanocompuestos con potencial aplicación en envases de alimentos y adhesivos amigables con el medio ambiente

Por qué proteínas de soja?

La elección de las proteínas de soja como materias primas para la formación de los materiales de este trabajo se basa en que:

i) Argentina se encuentra entre los primeros productores mundiales de soja, con una producción de 54 millones de toneladas y 18,5 millones de hectáreas sembradas para la

campana 2009/2010 (datos obtenidos de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación).

ii) por la alta concentración proteica que tiene su semilla (40%, expresado en gramos de proteína por gramo de semilla en base seca (Pearson, 1982)

iii) dentro de las agroproteínas, es de las más económicas

iii) en nuestro laboratorio se cuenta con una vasta experiencia en el estudio de estas proteínas, sus características estructurales y sus propiedades funcionales, y entre ellas la capacidad de formar películas biodegradables y comestibles.

La soja pertenece a la familia de las leguminosas y sus granos contienen aproximadamente un 40 % de proteínas. Estas proteínas se encuentran disponible comercialmente en tres formas que difieren en el contenido proteico, estas son, la harina de soja (\approx 50-59 % de proteína), los concentrados (65-72 % de proteína), y aislados proteicos (SPI, \geq 90%) (Pérez-Gago, 2012). El mayor contenido proteico de los aislados, favorecen su habilidad para la formación de películas (Netravali y col., 2007). Es posible obtener estos aislados a partir de la torta residual de la industria aceite, lo que implicaría un mejor aprovechamiento de este cultivo, y disminuir su precio (Remondetto y col., 2002)

Entre las proteínas de soja se han identificado dos fracciones principales: albúminas -solubles en agua- y globulinas -solubles en soluciones salinas-, 80 % de las cuales son proteínas de almacenamiento con estructura globular - que consisten principalmente de las globulinas 7S (β -conglucina) y 11S (glicina). Las fracciones de proteína de soja han sido caracterizadas por sus coeficientes de sedimentación en gradientes de sacarosa (2S, 7S, 11S y 15S) (Pearson, 1983). La fracción 2S (20 % del total de proteínas) es de bajo peso molecular (8-20 kDa) y se compone principalmente de inhibidores de tripsina (Wolf, 1970). La globulina 7S (35 % del total de proteínas) es un trímero de masa molecular entre 180-200 kDa formado por 4 subunidades, de las cuales la α (72 kDa), α' (68 kDa) y β (52 kDa) son las más importantes mientras que la subunidad γ (con un peso molecular similar a β) es un componente minoritario. Todas estas subunidades tienen secuencias de aminoácidos similares y son pobres en cisteína, metionina y triptofano. La globulina 11S (52 % del total de las proteínas) es un hexámero de peso molecular 320-380 kDa, cuyas 6 subunidades están compuestas de un polipéptido ácido A (pl ácido, \approx 35 kDa) y un polipéptido básico B (pl básico, \approx 20 kDa) unidos covalentemente por enlaces disulfuro, con un contenido mayor de

cisteína, metionina y triptófano que la globulina 7S (Nielsen, 1985 a y b; Thanh y Shibasaki, 1977; Staswick, 1984). Por último, la fracción 15S minoritaria son polímeros de la 11S (Wolf, 1970).

Por otra parte, las películas en base a aislado proteico de soja son más claras, suaves y flexibles en comparación con otras películas en base a otras proteínas vegetales, y además tienen propiedades barrera a los gases muy altas en comparación con aquellas películas preparadas a partir de lípidos y polisacáridos (Guilbert, 1986).

El trabajo de tesis desarrollado se centra en los siguientes objetivos específicos.

Objetivos específicos

1. Estudiar la formación de materiales nanocompuestos en base a proteínas de soja y montmorillonita natural por casting, analizando el efecto de distintas variables de la formulación, tales como:

- i) la concentración de MMT
- ii) el tipo y concentración de plastificante
- iii) el pH de la dispersión inicial

sobre las propiedades de los materiales nanocompuestos resultantes.

2. Estudiar la formación de los materiales nanocompuestos en base a proteínas de soja y montmorillonita por otras técnicas de procesamiento a escala planta piloto:

- i) spread coating
- ii) termocompresión

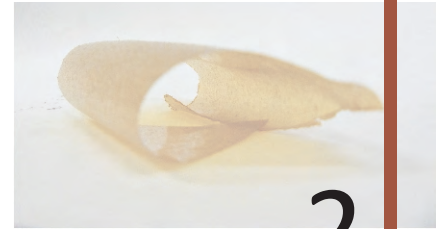
3. Estudiar la formación de polvos nanocompuestos en base a proteínas de soja –MMT como materias primas para la formación de películas.

4. Estudiar el efecto de variar la MMT natural por otras químicamente modificadas en el refuerzo de matrices proteicas de soja

5. Estudiar la activación de los materiales nanocompuestos en base a proteínas de soja y MMT con aceite esencial de clavo.

6. Evaluar la efectividad de las películas en base a proteínas de soja – MMT y aceite esencial de clavo como envase de alimentos, en particular en la conservación de pescado

7. Estudiar la formación de adhesivos en base a proteínas de soja y MMT natural



2

**Películas nanocompuestas en base a
proteínas de soja y montmorillonita natural
obtenidas por casting**



2. Películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y montmorillonita natural obtenidas por casting

2.1. Introducción

En los últimos años, los nanocompuestos de polímero-silicato en capas han sido centro de atención académico e industrial debido a que los materiales finales exhiben con frecuencia mejoras en las propiedades mecánicas, de barrera y térmicas, entre otras, respecto de los polímeros puros, incluso con bajo contenido de arcilla (Giannelis, 1996; Ray y col., 2006; Ray y Okamoto, 2003; Sorrentino y col., 2007). Además, estos refuerzos son ambientalmente amigables, abundantes en la naturaleza y económicos. Se han utilizado diversas matrices poliméricas en la formación de nanocompuestos con montmorillonita, desde polímeros sintéticos no biodegradables como el nylon (Dennis y col., 2001; Kojima y col., 1993 a y b), el poliestireno (Vaia y Giannelis, 1997; Vaia y col., 1995) y el polipropileno (Kurokawa y col., 1996; Usuki y col., 1997), hasta biopolímeros como el poliláctico (Ray y col., 2002), el almidón (Avella y col., 2005; De Carvalho y col., 2001; Pandey y Singh, 2005; Park y col., 2002 y 2003; Wilhelm y col., 2003; Chiou y col., 2007; Cyras y col., 2008) y las proteínas (Chen y Zhang, 2006; Tunc y col., 2007; Kumar y col., 2010; Guilherme y col., 2010; Nayak y col., 2011). Las mejoras antes mencionadas son más importantes cuando las capas de arcilla están dispersas de manera uniforme en la matriz del polímero (formando una estructura intercalada o exfoliada), en lugar de estar formando agregados o tactoides. La dispersión de la montmorillonita en la matriz polimérica depende del proceso utilizado para la preparación del nanocompuesto, así como de la naturaleza del polímero y de la arcilla, y, en consecuencia, de las interacciones entre estos.

Dada la naturaleza hidrofílica de las proteínas y de la montmorillonita de sodio natural (MMT) es posible dispersar ambos compuestos en agua de modo de obtener los respectivos nanocompuestos por *casting*. En este tipo de procesamiento, generalmente es necesario agregar una cierta cantidad mínima de algún plastificante a las formulaciones en base a proteínas con el fin de disminuir la gran fragilidad que presentan las películas y recubrimientos que forman, de manera de facilitar su manipulación y mantener su integridad. Así, por ejemplo, se ha reportado que las películas proteicas de soja necesitan al

menos 17 g de glicerol/100 g de materia seca para poder ser manipuladas (Stuchell y Krochta, 1994). El agregado de plastificantes a las películas proteicas conlleva a modificaciones en la organización molecular tridimensional, ya que disminuye las fuerzas atractivas intermoleculares y aumenta el volumen libre y la movilidad de las cadenas peptídicas (Bakker, 1986; Banker, 1966). La composición química, el tamaño y la estructura de la molécula plastificante influyen en su habilidad para interactuar con las cadenas de proteínas y unirse con moléculas de agua, lo que causa una mayor plastificación debido a que el agua es un plastificante efectivo en películas en base a biopolímeros hidrofílicos (Sothornvit y Krochta 2001). Como resultado de estos cambios estructurales, el agregado de plastificantes implica modificaciones en las propiedades funcionales de las películas al incrementar su extensibilidad y flexibilidad, y disminuir su cohesión, elasticidad, y rigidez. A excepción de las moléculas de agua, los plastificantes más utilizados son polioles, mono, di, y oligosacáridos, en especial el glicerol y el sorbitol que son de uso alimentario (Swain y col., 2004). Pero ambos presentan también ciertos inconvenientes. Las películas plastificadas con glicerol son altamente sensibles al agua y cuando se las acondiciona a altas humedades relativas algo de plastificante migra fuera de la película (Park y col., 1994; Monterrey-Quintero y Sobral, 1999), y el sorbitol, por su parte, puede cristalizar cuando las películas son almacenadas en condiciones de humedad relativa intermedia (Sakanaka y otros 2001). En los materiales nanocompuestos, los plastificantes además de reducir las fuerzas intermoleculares incrementando la movilidad de las cadenas de los biopolímeros (Srinivasa y col., 2007), podrían reducir las interacciones entre capas de MMT natural facilitando la dispersión de la arcilla (Darder y col, 2003) y modificar la habilidad del agua para expandir o “hinchar” esas capas. La interacción entre solventes y arcillas controla la dispersión de las capas de arcilla y, consecuentemente, también determina las propiedades de los nanocompuestos resultantes (Burgentzè y col., 2004).

Otra variable que puede influir tanto en la dispersión de la arcilla como en las interacciones entre la matriz proteica y la arcilla, es el pH de la dispersión inicial. Cambios en esta variable modifican los estados de asociación-disociación de la proteína en una solución acuosa. Se ha reportado la posibilidad de formar películas proteicas de soja en dos rangos de pH 1-3 y 6-12. Cerca del punto isoeléctrico ($pI= 4,5$) las proteínas de soja precipitan en lugar de dispersarse en agua, no permitiendo así la formación de películas por casting. Y en condiciones extremas de acidez o alcalinidad, las fuertes fuerzas repulsivas de las cargas

altamente negativas. Al alejarse del pl, las proteínas de soja pueden desnaturalizarse y exponer sus grupos sulfhidrilos e hidrofóbicos, los cuales pueden auto-asociarse y formar nuevos enlaces durante la formación de la película. Chen y Zhang (2006) informaron que había atracción electrostática e interacciones de puentes de hidrógeno en las interfaces de la proteína de soja y MMT. Es de esperar que la naturaleza de estas interacciones variará dependiendo del pH de la dispersión formadora de película, lo que podría afectar las interacciones proteína-MMT y la dispersión de esta en la matriz proteica. el grado de dispersión de la arcilla.

Teniendo en cuenta que no hay estudios en la literatura sobre el efecto combinado de arcillas y plastificantes, así como de arcillas y pH sobre las propiedades resultantes de las películas en base a proteínas de soja, se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar la formación de películas nanocompuestas por *casting* en base a proteínas de soja y MMT natural, con la intención de mejorar la funcionalidad de las películas proteicas.
- Estudiar el efecto del tipo y concentración de plastificantes (glicerol y sorbitol), así como el del pH de las dispersiones formadoras de películas en la formación de nanoestructuras y en las propiedades de las películas resultantes.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales

Como materias primas se utilizaron un aislado proteico de soja comercial (SPI, SUPRO 500-E) suministrado gentilmente por The Solae-Company (Brasil); y una montmorillonita de sodio comercial sin modificación orgánica (MMT, Cloisite[®]Na⁺), suministrada por Southern Clay Products (Texas, Estados Unidos). En la tabla 2.1 se muestran las propiedades físicas típicas de la montmorillonita Cloisite[®]Na⁺. Como plastificantes se utilizaron glicerol (Anedra, p.a) y

sorbitol (Anedra, p.a). El resto de los reactivos utilizados para llevar a cabo las experiencias que se describen a continuación fueron todos de calidad p.a.

Tabla 2.1: Propiedades físicas típicas de la montmorillonita natural (Cloisite® Na⁺). Datos provistos por el fabricante (Southern Clay Co., Gonzales, TX, Estados Unidos).

Características	Tipo de arcilla: Cloisite® Na⁺
Modificador orgánico	Ninguno
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	92 meq/100 g
Espacio interlaminar	1,17 nm
Tamaño de partícula	2-13 µm
Contenido de humedad	4 - 9 %
Color	Blanquecino
Densidad (g/ml)	1,98 g/ml
Hidrofobicidad relativa	Hidrofílica

2.2.2. Obtención de las películas proteicas y nanocompuestas por *casting*

En este capítulo se estudió la obtención de películas proteicas por *casting* a partir de dispersiones acuosas de aislado proteico, plastificantes y arcilla a diferentes pH. En la **Figura 2.1** se muestra un esquema general con los distintos pasos involucrados en la formación de las películas nanocompuestas. Las dispersiones se formaron mezclando, por un lado 5 g de SPI y concentraciones variables de glicerol o sorbitol (utilizados como plastificantes, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 g plastificante/100 g SPI) en 80 ml de agua destilada con agitación magnética a temperatura ambiente (\approx 30 min), ajustando el pH de la dispersión a 2, 7 ó 10,5 con HCl (2N) o NaOH (2 N). Por otro lado, diferentes cantidades de MMT natural (0; 0,125; 0,25; 0,375 y 0,5 g se dispersaron en 20 ml de agua destilada, inicialmente con agitación magnética por 1 hora aproximadamente y luego aplicando un tratamiento con ultrasonido a 80 % de amplitud durante 1 min en un equipo Sonics Vibra-cell modelo VCX 750 (Sonics & Materials, INC, Estados Unidos). Ambas dispersiones, se mezclaron con agitación magnética

durante 1 hora a temperatura ambiente, se centrifugaron (SORVALL, modelo RC-5B Plus, rotor SS34, Inglaterra) a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar las burbujas. Finalmente, 10 ml de las dispersiones filmogénicas, se colocaron en cajas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron en una estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60 °C durante 3 horas. Las películas resultantes se acondicionaron a 20 °C y 58 % HR (en desecador con una solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.

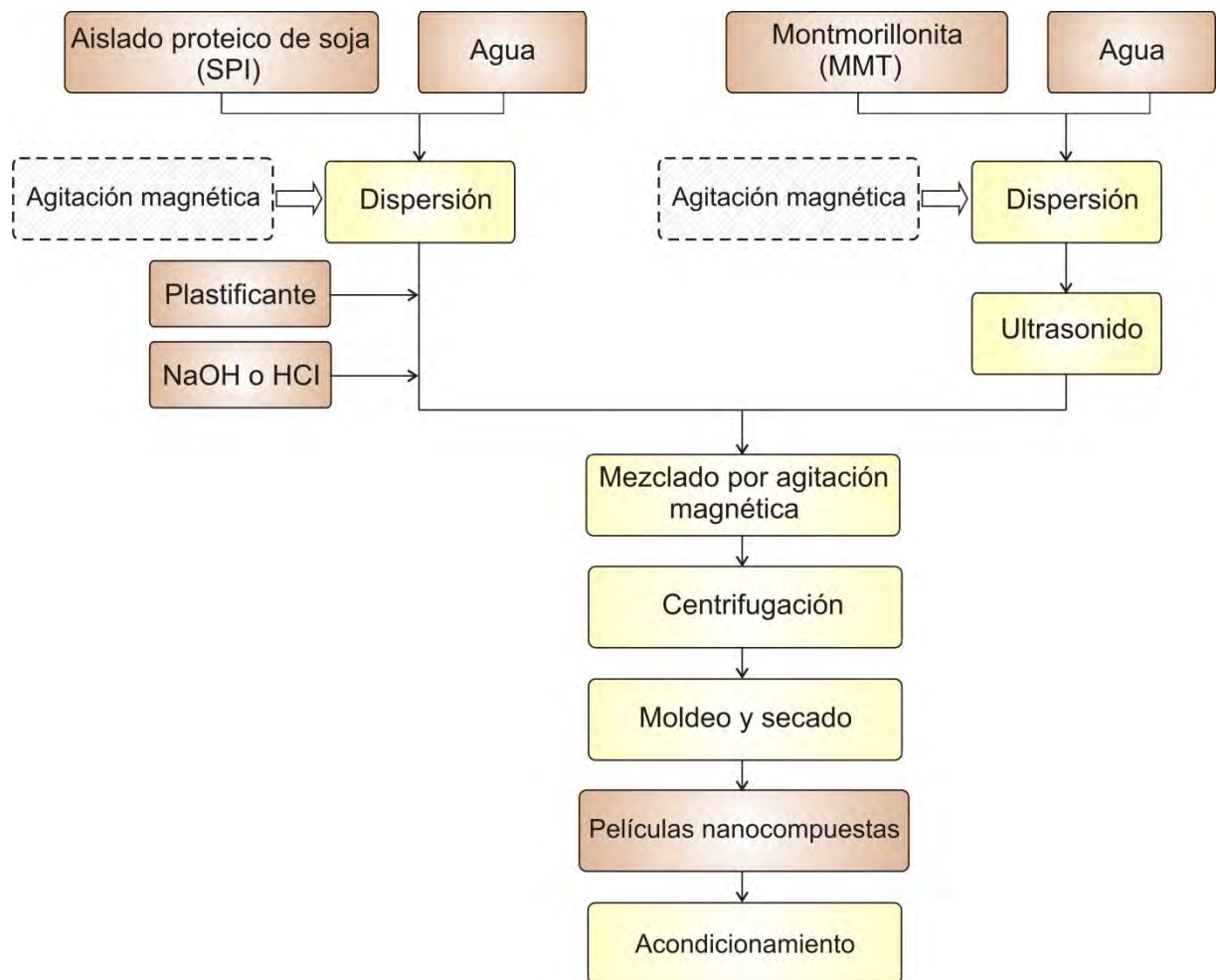


Figura 2.1: Esquema representativo de los pasos involucrados en la formación de las películas nanocompuestas.

2.2.3. Caracterización de las dispersiones filmogénicas mediante ensayos reológicos

El comportamiento de flujo y la viscosidad aparente (η_{app}) de las dispersiones SPI/MMT se evaluaron en un reómetro RheoStress 600 (Thermo Haake, Karlsruhe, Alemania) utilizando un sensor de platos paralelos, de superficie rugosa, con una diferencia de 1 mm entre platos. Las dispersiones de SPI/MMT se mantuvieron a 25 °C por un baño de agua circulante (Circulator DC50 Thermo Haake) conectado a la cubierta que rodea al sistema del sensor durante el testeo. Se realizó un ensayo rotacional, en donde el gradiente de velocidad de deformación se aumentó de 0 a 500 s⁻¹ en 2 minutos, se mantuvo constante a 500 s⁻¹ durante 1 minuto y luego se disminuyó desde 500 hasta 0 s⁻¹ en 2 minutos. Se registró el esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de velocidad de deformación (D) y se obtuvieron las gráficas correspondientes al comportamiento de flujo. A partir de las mismas, y en el rango de velocidad de deformación creciente, se determinó la η_{app} a D= 60, 300 y 500 s⁻¹ de cada dispersión filmogénica. Asimismo, los resultados experimentales se ajustaron al modelo reológico de Ostwald de Waele (**Ecuación 2.1**) (HAAKE RheoWin 3.30.0000, Thermo Scientific, Alemania) para obtener el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n) de cada una de las dispersiones estudiadas. Los ensayos se realizaron por triplicado

$$\tau = K \cdot D^n$$

Ecuación 2.1

Donde: τ : Esfuerzo de corte (Pa); K: índice de consistencia (Pa sⁿ); D: Velocidad de deformación (s⁻¹); n: Índice de flujo

2.2.4. Caracterización de las películas proteicas

2.2.4.1. Contenido de humedad

Después de secar las películas en una estufa a 105 °C durante 48 horas, se determinó el contenido de humedad. Para esto se las cortó en pequeñas piezas que fueron ubicadas en recipientes pequeños de papel aluminio; se pesaron antes y después del secado en la estufa.

El contenido de humedad se calculó como el porcentaje de pérdida de peso respecto del peso original (ASTM D644-94, 1994). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.2.4.2. Espesor

Se utilizó un medidor de espesor digital (Check Line DCN-900, Estados Unidos) para materiales no conductores ni ferrosos. A cada muestra utilizada para determinar propiedades mecánicas y de barrera se le realizaron 9 determinaciones, una en el centro y ocho sobre el perímetro, y se informó el valor promedio.

2.2.4.3. Color

El color de las películas de soja y nanocompuestas se determinó utilizando un colorímetro Minolta Chroma meter (CR 300, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón). Como muestra la **Figura 2.2**, se empleó la escala Hunter-Lab para medir luminosidad (L: 0=negro, 100=blanco) y cromaticidad (a: +a=rojo, -a=verde; b: +b=amarillo, -b=azul). El equipo fue calibrado utilizando un set de tres placas provisto por el fabricante. Las coordenadas de la placa blanca son $L_{placa} = 97,3$; $a_{placa} = 0,14$; $b_{placa} = 1,71$. La diferencia total de color (ΔE) se calculó mediante la **Ecuación 2.2**. Los valores informados son la media de nueve determinaciones sobre cada una de las muestras.

$$\Delta E = \sqrt{(L_{muestra} - L_{placa})^2 + (a_{muestra} - a_{placa})^2 + (b_{muestra} - b_{placa})^2} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde: ΔE : diferencia total de color entre la muestra y la placa blanca. Parámetros Hunter-Lab L: luminosidad, a y b: cromaticidad, de la muestra y de la placa blanca.

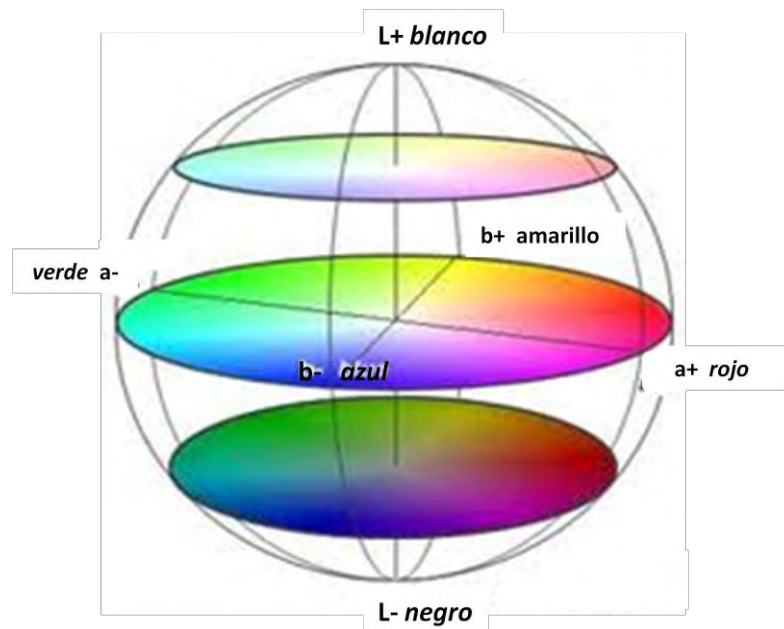


Figura 2.2: Escala de Hunter-Lab para determinar luminosidad y cromaticidad

2.2.4.4. Opacidad

El espectro de absorbancia de las películas se analizó en función de la longitud de onda, entre 400 y 800 nm. Para ello se cortaron porciones de películas con las dimensiones internas de la cubeta y se colocaron cuidadosamente dentro de la misma. Un espectrofotómetro Beckman DU650 (Beckman, Alemania) se empleó para realizar la lectura de absorbancia. Como referencia se utilizó una cubeta vacía. La opacidad de las películas ($UA\text{ mm}^{-1}$) se determinó dividiendo el valor de absorbancia a 500 nm por el espesor de la muestra (expresado en mm) (Cao y col., 2007). Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

2.2.4.5. Solubilidad de las películas en agua

La solubilidad de las películas se determinó mediante la técnica propuesta por Gontard y col. (1992). Se sumergieron tres pedazos de películas, de 2 cm de diámetro cada una, en 50 ml de agua destilada y se agitó lentamente a temperatura ambiente (22-25 °C) durante 24 horas. Luego, las muestras se filtraron a través de un papel de filtro Whatman 1, previamente secado y tarado. La fracción insoluble se secó en una estufa de aire forzado a

105 °C durante 24 horas y luego se pesó. La solubilidad de la película en agua (S, en %) se calculó según la **Ecuación 2.3**.

$$S \% = (m_0 - m_f) \cdot 100 / m_0 \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde: m_0 y m_f son los pesos de antes y después de la solubilización, respectivamente. Los resultados presentados son el promedio de tres determinaciones.

2.2.4.6. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Las determinaciones se realizaron siguiendo el método ASTM E96-80 (1989) con las modificaciones propuestas por Gennadios y col. (1994). Las películas se colocaron en una celda de permeación con una abertura circular de 0,00185 m². La determinación se efectuó a 20°C, colocando las celdas en un desecador. La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de 1753,35 Pa. Para mantener dicha fuerza impulsora se utilizó sílica anhidra ($HR_c=0$) en la celda de permeación, y solución saturada de NaCl ($HR_d=0,75$) en el desecador. La humedad relativa dentro de la celda fue siempre menor que la del desecador, por lo que la permeación de vapor de agua a través de la película fue determinada por la ganancia de peso en la celda de permeación. Luego de alcanzar el estado estacionario (aproximadamente 1 hora), se realizaron 8 determinaciones de peso de la celda de permeación, durante 8 horas. Los cambios en el peso de la celda fueron registrados y graficados en función del tiempo. Se determinó la pendiente del gráfico obtenido por medio de regresión lineal (OriginPro 8 SR0; OriginLab Corporation, Copyright 1991-2007), siendo ésta la velocidad de permeación del vapor de agua. La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la **Ecuación 2.4**

$$WVP = \frac{(\Delta m / \Delta t)}{P_v^{H_2O} \cdot (HR_d - HR_c) \cdot A} \cdot d \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde: WVP: Permeabilidad al vapor de agua (g H₂O Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹); $\Delta m / \Delta t$: Velocidad de permeación del vapor de agua (g H₂O s⁻¹); d: espesor de la película (m); $P_v^{H_2O}$: Presión de

vapor de agua (1753.35 Pa) a la temperatura del ensayo (20 °C); HR_c : Humedad relativa en la celda de permeación; HR_d : Humedad relativa en el desecador; A : Área de permeación (m^2). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

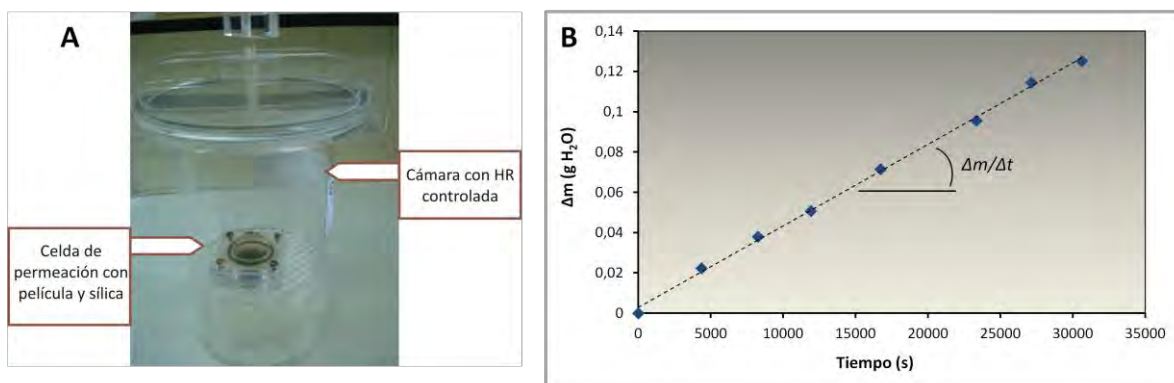


Figura 2.3: Medida de la permeabilidad al vapor de agua. **A)** Dispositivo de medida, en donde se puede observar la película proteica colocada en la celda de permeación (con sílica en su interior, $HR_c=0$) dentro de una cámara con humedad relativa controlada (con solución saturada de NaCl, $HR_d=0,75$). **B)** Determinación de la velocidad de permeación del vapor de agua a través de la película proteica ($\Delta m/\Delta t$).

2.2.4.7. Isotermas de sorción

Las isotermas de sorción de las películas se determinaron por el método estático. Las películas fueron almacenadas a 20°C en atmósferas con diferentes humedades relativas (a_w : 0,07; 0,112; 0,249; 0,332; 0,431; 0,544; 0,655; 0,754; 0,853; 0,907 y 0,972) obtenidas utilizando distintas soluciones salinas saturadas (NaOH, LiCl, $KC_2H_3O_2$, $MgCl_2$, K_2CO_3 , $MgNO_3$, $NaNO_2$, NaCl, KCl, $BaCl_2$ y $CuSO_4$, respectivamente) (Labuza y col., 2000). Se colocaron pequeñas porciones de las en recipientes cerrados a humedades relativas constantes a 20°C y sin circulación de aire, hasta asegurarse alcanzar el equilibrio (21 días). Se determinó la cantidad de agua absorbida por gramo de película seca (X_{eq}) por diferencia entre el peso inicial y el peso final. Para cada formulación se realizaron triplicados.

Los valores experimentales (X_{eq}) se ajustaron con el modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), según la **Ecuación 2.5**.

$$X_{eq} = \frac{X_o \cdot K \cdot C \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot a_w)} \quad \text{Ecuación 2.5.}$$

Donde: X_{eq} : contenido de humedad de las muestras (en base seca) en el equilibrio (g H₂O/g película seca) a determinada actividad acuosa (a_w); X_o : contenido de humedad (en base seca) de la monocapa (g H₂O/g película seca); C: constante de Guggenheim asociada al calor de sorción en la monocapa; y K: Constante asociada al calor de sorción de multicapas.

Los parámetros del modelo (X_o , K y C) se determinaron por regresión cuadrática de a_w/X_{eq} versus a_w , empleando el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

2.4.4.8. Coeficientes de solubilidad y difusividad efectiva del agua en la película

Se determinaron empleando la metodología descrita por Larotonda y col. (2005). El coeficiente de solubilidad del agua en la película proteica (β), se calculó por medio de la **Ecuación 2.6**, que se obtiene de diferenciar el modelo de GAB (**Ecuación 2.5**) respecto de a_w y dividir el resultado por la presión de vapor de agua ($P_v^{H_2O}$) a la temperatura de trabajo (20°C).

$$\beta = \frac{C \cdot K \cdot X_o}{P_v^{H_2O}} \cdot \left[\frac{\frac{1}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)}}{a_w} - \frac{1}{[(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)]^2} \cdot [-K \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w) + (1 - K \cdot a_w) \cdot (-K + C \cdot K)] \right]$$

Ecuación 2.6

Donde: β : coeficiente de solubilidad del agua en la película proteica (g H₂O/Pa g película seca); X_o , C y K: los parámetros del modelo de GAB (a 20 °C); X_o : contenido de humedad (en base seca) de la monocapa (g H₂O/g película seca); C: constante de Guggenheim asociada al calor de sorción en la monocapa; K: constante asociada al calor de sorción de multicapa; $P_v^{H_2O}$: presión de vapor de agua (Pa); a_w : actividad acuosa.

El coeficiente de difusión efectivo del agua en la película proteica (D_{ef}) se determinó mediante la **Ecuación 2.7**.

$$D_{ef} = \frac{WVP}{\rho^s \beta} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Donde: D_{ef} : coeficiente de difusión efectivo del agua en la película proteica ($m^2 s^{-1}$); WVP: permeabilidad al vapor de agua determinada a 75% HR y 20 °C ($g H_2O/Pa s m$); β : coeficiente de solubilidad del agua en la película proteica a $a_w = 0,75$ y 20 °C ($g H_2O/Pa g$ película seca); ρ^s : densidad de la película seca (g película seca/ m^3).

2.2.4.9. Determinación de temperatura de transición vítrea (Tg)

Las temperaturas de transición vítrea (Tg) se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando un calorímetro Q100 V9.8 Build 296 (TA Instrument, New Castle, Del., Estados Unidos). El equipo fue se calibró usando indio, ácido láurico y ácido esteárico como patrones de calor y temperatura. Se colocaron pequeños trozos de las películas proteicas (≈ 10 mg) en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. Las muestras fueron sometidas al siguiente tratamiento térmico: 1 minuto a 20 °C (para equilibrar las muestras), enfriamiento hasta -100 °C a 10 °C/min, isoterma durante un minuto y por último calentamiento entre -100 y 220 °C a 10 °C/min. Para determinar la Tg del aislado proteico se prepararon dispersiones del mismo al 20 % p/p en agua. Entre 15 y 20 mg de dichas dispersiones se colocaron en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. Las muestras fueron analizadas haciendo un barrido de temperaturas a 10°C/min entre 20 y 120°C. La temperatura de transición vítrea (Tg, en °C) fue definida como el punto de inflexión en la línea de base causado por la discontinuidad en el calor específico de la muestra (Gontard y Ring, 1996). Para su determinación se empleó el software Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., Estados Unidos). Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado.

2.2.4.10. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron en ensayos de tracción, de acuerdo al método ASTM D882-91 (1991), empleando un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG. Se ensayaron probetas rectangulares de 80 mm de largo por 6 mm de ancho, utilizando una separación inicial de mordazas de 50 mm y una velocidad de separación de las mismas de 0,5 mm/s. Se registró la curva fuerza vs. distancia, que se transformó en tensión ($\sigma = \text{fuerza}/\text{área transversal de la}$

película) vs. deformación (ϵ = porcentaje de elongación respecto de la separación de mordazas inicial) utilizando el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos). En la **Figura 2.4** se muestra una de estas curvas a modo de ejemplo. De las mismas se obtuvieron la resistencia máxima a la tracción al momento de ruptura (σ_{\max}), el porcentaje máximo de elongación (ϵ_{\max}) y el módulo elástico (E) como la pendiente de la recta tangente a la curva tensión-deformación, en su sección lineal inicial (a bajas deformaciones). Se realizaron seis determinaciones por cada película evaluada, empleando al menos dos películas por formulación.

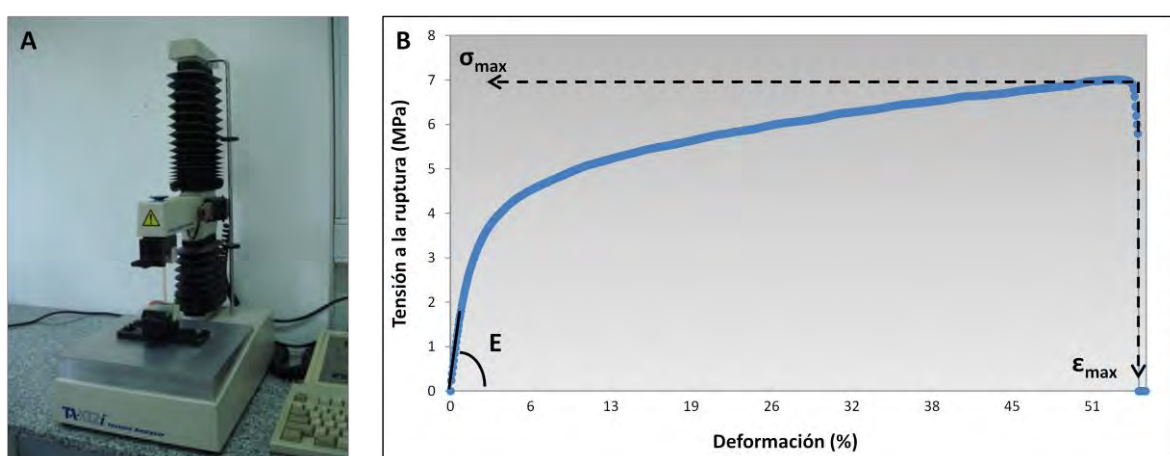


Figura 2.4: Evaluación de las propiedades mecánicas. **A)** Dispositivo empleado en el ensayo de tracción. **B)** Curva tensión vs. deformación para una película proteica de soja, en donde se pueden observar los parámetros evaluados: resistencia máxima a la tracción al momento de ruptura (σ_{\max}), porcentaje máximo de elongación (ϵ_{\max}), y módulo elástico (E),

2.2.4.11. Solubilidad diferencial de proteínas

La solubilidad diferencial de las proteínas presentes en las películas se determinó según el método descrito por Mauri y col. (2006), con algunas modificaciones menores. Pequeñas porciones de las películas (≈ 100 mg) fueron pesadas y colocadas en tubos conteniendo 1 ml de solvente. Se estudió la solubilidad en agua (**A**) y cinco sistemas *buffer* diferentes: i) **BF**: *buffer* fosfato diácido de sodio (NaH_2PO_4) 0,1 M, ii) **BFS**: BF con dodecil sulfato de sodio 0,1% p/v (SDS, Anedra, Argentina), iii) **BFU**: BF con urea 6M (Riedel-deHaën, Alemania), iv) **BFSU**: BF con dodecil sulfato de sodio 0,1% p/v y urea 6M, v) **BFSUM**: BFSU con mercaptoetanol

2,5% v/v (Sigma-Aldrich, Alemania), todos a pH 7,5. Los tubos fueron agitados a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas a 9000 xg durante 20 minutos. La concentración de proteínas en los sobrenadantes fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), realizando curvas de calibración con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) en agua y en cada uno de los sistemas *buffer*, y expresada como porcentaje (%p/p) respecto a la cantidad total de proteína presente en cada película. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.4.12. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida

Las composiciones polipeptídicas del aislado proteico de soja se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), siguiendo el método de Laemmli (1970).

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida al 12 % p/v con geles apiladores al 4% p/v en un sistema de mini-placas (Bio-Rad Mini Protean II Model). Se emplearon los siguientes sistemas *buffer*: Buffer de separación: 0,375 M Tris-HCl, 0,1 % SDS, pH 8,8; buffer de corrida: 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3; buffer de muestra: 0,125 M Tris-HCl, 20 % v/v glicerol, 1 % p/v SDS, 0,05% p/v azul de bromofenol, pH 6,8.

Las muestras se disolvieron en el *buffer* de muestra (muestras sólidas: SPI 1 % p/v; muestras líquidas: relación sobrenadante:buffer 1:3). En particular, para analizarlas en condiciones reductoras, se le agregó 2-β mercaptoetanol (5 % v/v) y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Todas las muestras se centrifugaron 15 minutos a 18000 xg y temperatura ambiente (A 15, B. Braun Biotech International, Estados Unidos). En cada calle se sembró el volumen de sobrenadante correspondiente a 20-30 µg de proteínas. La electroforesis se realizó a voltaje constante (200 V).

Los geles obtenidos se fijaron y colorearon simultáneamente (12 horas) con una solución de metanol, ácido acético y agua (5:5:2) conteniendo 0,1 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina). Posteriormente se decoloraron con una mezcla de agua, etanol y ácido acético (65:25:10). Para estimar la masa molecular de las proteínas, se separaron también en los geles patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Amersham, Inglaterra), conteniendo α- lactoalbúmina (14,4 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa);

ovoalbúmina (43 kDa); seroalbúmina bovina (67 kDa) y fosforilasa b (94 kDa). seroalbúmina bovina (67 kDa) y fosforilasa b (94 kDa). Las imágenes de los geles fueron adquiridas con un scanner HP Scanjet G2710 (Hewlett-Packard).

2.2.4.13. Difracción de rayos X (XRD)

Se llevó a cabo en un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, EE.UU.) equipado con una fuente de radiación Cu K α ($\lambda = 0.154$ nm). La tensión y la corriente utilizada fueron de 40 kV y 40 mA, respectivamente. Los difractogramas se obtuvieron a temperatura ambiente en el rango de $2\theta = 1,5 - 10^\circ$ en un modo de tiempo fijo con un intervalo de paso de $0,01^\circ$. Los valores del espacio interlaminar de la arcilla (d_{001}) fueron calculados a partir del pico de difracción de la MMT según la ley de Bragg (**Ecuación 2.8**).

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

Ecuación 2.8

Donde: λ es la longitud de onda de la radiación (0,154 nm); θ (theta) es el ángulo de incidencia de la radiación; d es la distancia interplanar de los planos paralelos considerados; n es el orden de difracción. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2.4.14. Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM)

Las muestras se seccionaron en piezas menores a $0,5 \text{ mm}^2$. Se realizó una primera fijación con glutaraldehído al 2,5 % en *buffer* fosfato de Sorensen (pH 7,2). Se lavó en el mismo *buffer* durante 30 min por tres veces. Se llevó a cabo una segunda fijación con tetróxido de osmio al 2 % durante una hora. Se lavó con agua destilada tres veces (30 minutos cada lavado). Se procedió a la deshidratación en serie con concentraciones crecientes de acetona (25%, 50%, 75% y 3x100%) y se embebió en resina Spurr (Spurr, 1996) (1:2, 2:2, 2:1) y resina pura toda la noche. Finalmente se polimerizó en estufa a 70°C toda la noche. Las secciones ultrafinas se consiguieron con ultramicrotomo LKB (1983) con cuchilla de diamante. Se realizó la tinción con acetato de uranilo (1 min) y citrato de plomo (40 s). La observación se realizó en un microscopio de Trasmisión marca JEOL 100 CXII (Tokio, Japan) a 80 kV.

2.2.4.15. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El aislado de proteína de soja (SPI) se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se colocaron sobre una cinta adhesiva doble faz, se metalizaron con oro en un Sputter coater (Edwards S150B) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido SEM 505 (Philips, Holanda), con un voltaje de aceleración de 10 kV. Las fotos fueron tomadas con distintos aumentos (500x, 1000x, 2500x y 5000x).

2.2.4.16. Ángulo de contacto

La hidrofobicidad superficial de las películas se evaluó mediante la medición del ángulo de contacto a temperatura ambiente con un goniómetro ramé-hart Model 500 (ramé-hart instrument co., Estados Unidos). Una gota de 5 μ l de agua desmineralizada se colocó sobre la superficie de la película con una jeringa de pistón automático y se fotografió inmediatamente. Con un analizador de imágenes se midió el ángulo formado entre la base, compuesta por la superficie de la película en contacto con la gota de agua, y la tangente a la gota de agua. Para cada película, la hidrofobicidad superficial se obtuvo de los valores de ángulo de contacto inicial (valor medio de ángulos de contacto medidos en ambos lados de la gota). Los resultados informados son los valores promedio de cinco a seis mediciones realizadas en las diferentes áreas de la superficie de la película.

2.2.4.17. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de las películas se realizó con un analizador térmico Thermogravimeter 50 (Shimadzu) con una rampa de calentamiento de 20 °C/min desde temperatura ambiente hasta 800 °C bajo un flujo de aire (50 ml/min). Se calentaron aproximadamente de 5 a 10 mg de muestra en un crisol de platino abierto. Se registró la pérdida de peso de la muestra en función de la temperatura. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

2.2.4.18. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar, y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey con un nivel de significación $\alpha \leq 0,05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Caracterización del aislado proteico de soja

El aislado de soja utilizado en todo el trabajo presentado en esta tesis, presentó un 85 ± 2 % p/p de proteínas (en base seca) determinado por el método de Kjeldahl (AOAC 920.53) utilizando 5,71 como factor de conversión de nitrógeno en proteínas. En la **Figura 2.5** se muestra la morfología de las partículas proteicas de este aislado. Dichas partículas son esféricas, pequeñas y porosas, y son similares a las descritas por Añón y col. (2001) para aislados de soja comerciales, y por Salgado y col. (2009) para aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto y sometidos a secado *spray*.

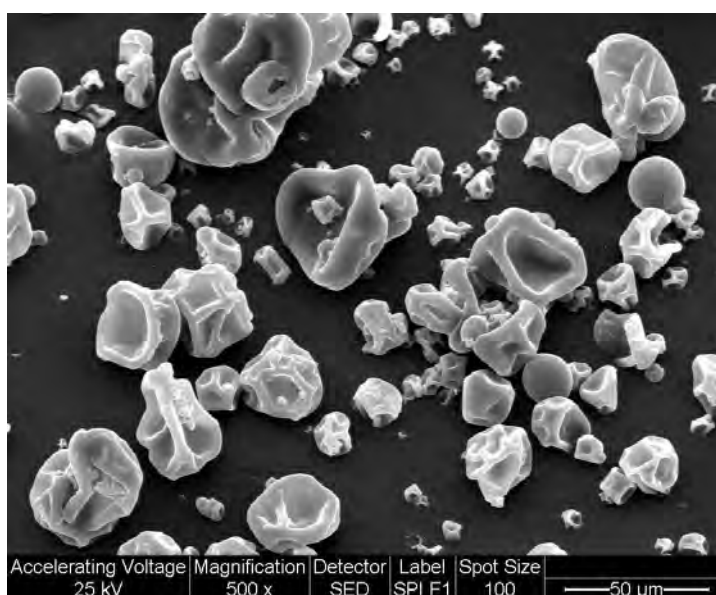


Figura 2.5: Morfología del aislado proteico de soja comercial (SPI) estudiado por microscopía electrónica de barrido (SEM) en 500X.

En la **Figura 2.6** se presenta la composición polipeptídica de dicho aislado analizada por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras y reductoras. En el perfil de SPI se pueden observar las bandas correspondientes a agregados de alto peso molecular (superior a 94 kDa), algunos de ellos que no pudieron entrar en el gel, junto con los polipéptidos característicos de la fracción β -conglucina (α de 68 kDa, α' de 72 kDa y β de 52 kDa), y los polipéptidos ácidos y básicos de glicina (A de \approx 35 kDa y B de \approx 20 kDa) (Nielsen, 1985 a y b). Prácticamente no se aprecia la banda característica de las subunidades AB, lo que sugiere que estos polipéptidos podrían estar disociados y/o formando parte de los agregados de alto peso molecular. Bajo condiciones reductoras, se pudieron observar las bandas características de las subunidades α , α' , β , A y B, la desaparición de las bandas correspondientes a agregados de alto PM, estabilizados por uniones disulfuro, y una cantidad menor de agregados remanentes que no pudieron entrar en el gel. La intensificación de las bandas correspondientes a los polipéptidos A y B de glicina bajo estas condiciones, sugiere que estos estarían involucrados en la formación de agregados en ausencia del agente reductor.

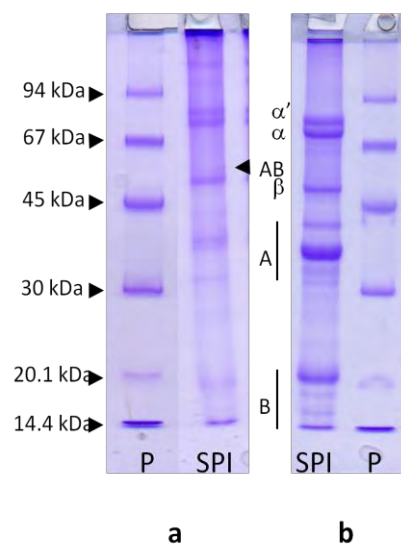


Figura 2.6: Perfiles electroforéticos de las proteínas presentes en el aislado de soja. **a)** SDS-PAGE en condiciones no-reductoras. **b)** SDS-PAGE en condiciones reductoras (con 2- β -mercaptoetanol). En ambos paneles, las calles P corresponden a los Patrones de bajo peso molecular (LMW), y las calles SPI a los aislados proteicos de soja.

La **Figura 2.7** muestra el termograma de SPI obtenido por DSC. La ausencia de las dos endotermas típicas a 78,2 °C y 92,4 °C correspondientes a la desnaturalización de β -conglucina y glicina respectivamente (Mauri y Añón, 2006) estaría indicando que el proceso industrial de obtención del SPI afectó la conformación nativa de las globulinas de soja, encontrándose totalmente desnaturalizadas.

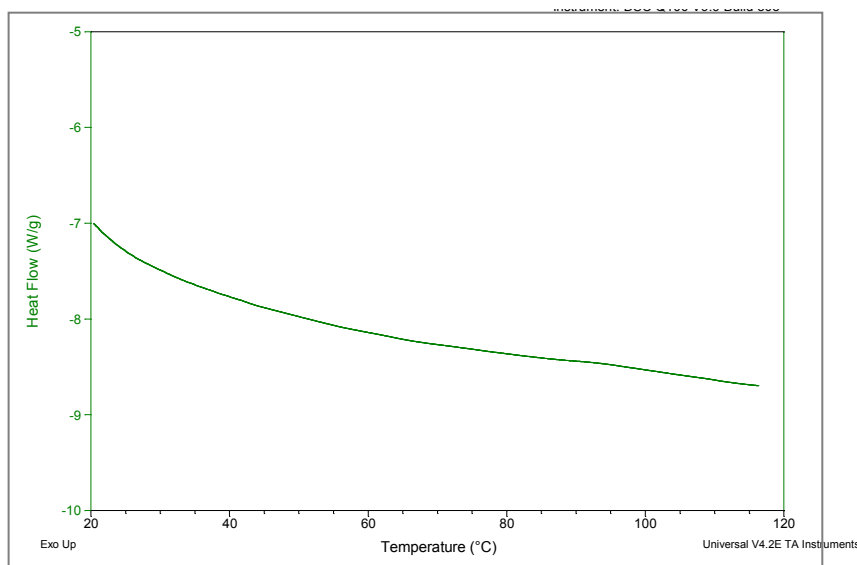


Figura 2.7: Termograma obtenido por DSC del aislado proteico de soja comercial.

2.3.2. Efecto de la concentración de MMT en la funcionalidad de las películas nanocompuestas

Para estudiar el efecto de la MMT sobre la funcionalidad de las películas proteicas de soja (SPI: 5 % p/v; glicerol: 25 g/100 g SPI; pH=10,5, seleccionada en base a estudios previos del grupo de trabajo), se adicionaron concentraciones crecientes de MMT (0; 2,5; 5; 7,5 y 10 g MMT/100 g SPI) a las dispersiones filmogénicas iniciales.

2.3.2.1. Caracterización reológica de las dispersiones filmogénicas

El comportamiento reológico rotacional de las dispersiones filmogénicas de SPI y SPI-MMT se presentan en la **Figura 2.8** y en la **Tabla 2.2**. Los valores experimentales de esfuerzo de

corte en función del gradiente de velocidad de deformación aplicado se ajustaron satisfactoriamente al modelo de Ostwald de Waele, obteniéndose coeficientes de correlación mayores a 0,999 en todos los casos. Todas las dispersiones de SPI y SPI-MMT mostraron un comportamiento de flujo pseudoplástico ($K > 0$, $0 < n < 1$, $\tau_0 = 0$, siendo τ_0 el umbral de fluencia) (**Tabla 2.2**), presentando valores de viscosidad aparente descendentes al aumentar el gradiente de velocidad de deformación (**Tabla 2.2** y **Figura 2.8**). El comportamiento pseudoplástico de las dispersiones fue más pronunciado con el incremento de arcilla en la formulación, ya que al aumentar progresivamente el contenido de esta se produjo una disminución del índice de comportamiento de flujo (n); observándose simultáneamente un incremento en la viscosidad de las dispersiones (mayores valores de K y de viscosidad aparente). Si bien este aumento se dio en todo el rango de velocidades de corte analizadas, el incremento con el contenido de arcilla fue más importante a velocidades de corte bajas.

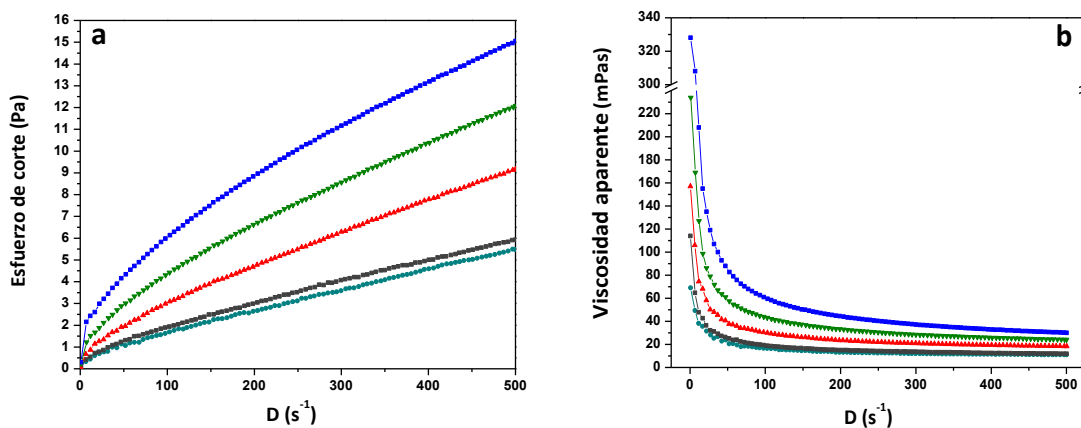


Figura 2.8: **a)** Esfuerzo de corte (τ), y **b)** viscosidad aparente (η_{app}) en función del gradiente de velocidad de deformación (D) de dispersiones de SPI (5 % p/v) con concentraciones crecientes de MMT: 0 (●), 2,5 (■), 5 (▲), 7,5 (▼) y 10 (■) g MMT/100 g SPI.

Tal incremento en la viscosidad aparente a bajas velocidades de corte debido a la introducción de arcilla en la formulación ha sido informado anteriormente por Giannelis (1996), Krishnamoorti y col. (2001) y Manías y col. (1996) en soluciones de polímeros sintéticos. Este comportamiento se atribuyó a (i) los cambios en la orientación preferencial de silicatos en capas y a la conformación del polímero, paralelas a la dirección de flujo

durante el cizallamiento y a (ii) las interacciones entre MMT y las cadenas del polímero. Pero también fue informado para formulaciones en la base a proteínas de gluten de trigo y MMT (Tunc y col., 2007). Resta mencionar que el contenido de sólidos (no totalmente solubles) en las dispersiones filmogénicas aumenta al adicionar MMT, este hecho también podría explicar, al menos en parte, el incremento observado en la η_{app} (para una D fija).

Tabla 2.2: Índices de consistencia (K) y de comportamiento de flujo (n) obtenidos al ajustar los datos experimentales (τ vs. D) con el modelo de Ostwald de Waele, y valores de viscosidad aparente calculados a gradientes de velocidad de 60, 300 y 500 s^{-1} para dispersiones de SPI y de SPI con diferentes concentraciones de MMT.

MMT (g/100 g SPI)	Parámetros de Ostwald de Waele			Viscosidad Aparente (mPa s)		
	K (Pa.s ⁿ)	n	r ²	D=60s ⁻¹	D=300s ⁻¹	D=500s ⁻¹
0	0,055 ± 0,005 ^a	0,747 ± 0,003 ^e	0,9993	20,6 ± 0,8 ^a	12,7 ± 1,1 ^a	11,4 ± 0,6 ^a
2,5	0,072 ± 0,002 ^b	0,709 ± 0,007 ^d	0,9993	23,3 ± 0,8 ^b	13,7 ± 0,1 ^a	12,0 ± 0,2 ^a
5	0,125 ± 0,004 ^c	0,686 ± 0,006 ^c	0,9993	36,6 ± 0,5 ^c	20,7 ± 0,3 ^b	18,3 ± 0,5 ^b
7,5	0,198 ± 0,006 ^d	0,646 ± 0,000 ^b	0,9992	48,7 ± 1,2 ^d	26,0 ± 0,7 ^c	22,2 ± 0,5 ^c
10	0,369 ± 0,009 ^e	0,588 ± 0,003 ^a	0,9992	70,5 ± 0,8 ^e	34,8 ± 0,3 ^d	28,9 ± 0,1 ^d

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Cabe señalar, que las dispersiones filmogénicas conteniendo hasta 10 g MMT/100 g SPI, presentaron viscosidades adecuadas (entre 16 y 61 mPa s, para D = 100 s^{-1}) para permitir la remoción las burbujas presentes en las dispersiones con una leve centrifugación y una fluidez adecuada para su descarga durante la etapa de moldeo. No fue posible obtener películas homogéneas con concentraciones de arcilla superiores a 10 g MMT/100 g SPI. A mayores concentraciones, las viscosidades de las dispersiones aumentaron (87 y 120 mPa s, a D = 100 s^{-1} para concentraciones de 12,5 y 15 g MMT/100 g SPI, respectivamente) de manera tal que complicaron el mezclado, la remoción de burbujas y el moldeo, conduciendo a la presencia de burbujas residuales en las películas.

2.3.2.2. Caracterización de las películas

2.3.2.2.1. Apariencia

Las películas nanocompuestas obtenidas por *casting* fueron homogéneas, translúcidas y amarillentas, presentando una apariencia visual similar al de las películas proteicas control (Figura 2.9). Todas las películas presentaron espesores similares, resultados mostrados en Tabla 2.3.

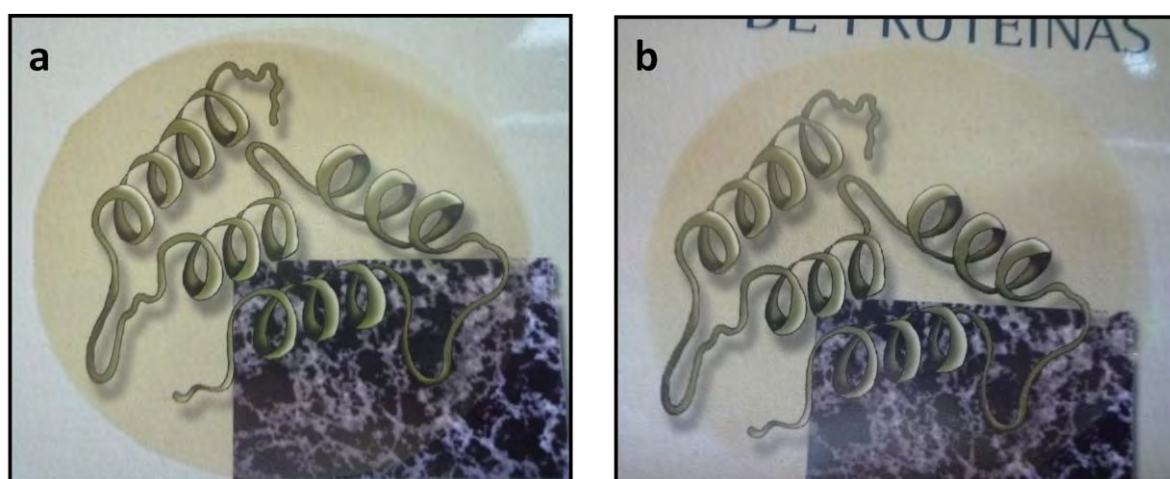


Figura 2.9: Apariencia visual de películas de a) SPI y b) 5 g MMT/100 g SPI a modo de ejemplo.

Tabla 2.3: Espesores de las películas de SPI y de SPI con distintas concentraciones de MMT.

MMT (g /100 g SPI)	Espesor (μm)
0	$74,7 \pm 8,5^a$
2,5	$82,4 \pm 6,2^a$
5	$80,8 \pm 5,5^a$
7,5	$84,9 \pm 6,9^a$
10	$89,0 \pm 9,9^a$

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los superíndices con letras iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

Las propiedades ópticas (color y opacidad) de las películas proteicas y nanocompuestas se muestran en la **Tabla 2.4**. Al agregar concentraciones crecientes de arcilla, disminuyó la luminosidad (L), el parámetro a tendió hacia valores más negativos (más verde) y el b hacia valores más positivos (más amarillo), observándose en consecuencia un aumento en la diferencia de color (ΔE). En la **Tabla 2.4** también se observa que los valores de opacidad disminuyen significativamente al aumentar la concentración de MMT en las películas, y sugiere una buena afinidad de la arcilla con las proteínas. Las diferencias significativas en los parámetros analizados no se reflejaron en la apariencia visual de las películas (**Figura 2.9**), manteniendo una coloración amarillenta típica de películas de proteína de soja (Denavi y col., 2009). La transparencia y coloración débil favorecerían la aplicación de estos materiales en *packaging* donde interese poder visualizar al producto, condición bastante requerida en envases de alimentos (Gontard y col., 2002).

Tabla 2.4: Valores de luminosidad (L), cromaticidad (a y b), diferencia de color (ΔE) y opacidad de las películas de SPI y SPI con diferentes concentraciones de MMT.

MMT (g/100g SPI)	Parámetros de Color Hunter Lab				Opacidad (UA mm ⁻¹)
	L	a	b	ΔE	
0	87,0 ± 0,2 ^c	-0,4 ± 0,1 ^d	11,1 ± 0,5 ^a	13,9 ± 0,4 ^a	2,3 ± 0,02 ^c
2,5	87,1 ± 0,3 ^c	-0,5 ± 0,1 ^{c,d}	11,5 ± 0,6 ^a	14,2 ± 0,6 ^a	ND
5	86,1 ± 0,7 ^b	-0,7 ± 0,3 ^c	13,5 ± 2,3 ^b	16,3 ± 2,2 ^b	1,7 ± 0,1 ^b
7,5	85,7 ± 0,2 ^b	-0,8 ± 0,03 ^b	14,7 ± 0,3 ^b	17,4 ± 0,3 ^b	ND
10	84,8 ± 0,5 ^a	-1,2 ± 0,1 ^a	17,5 ± 1,4 ^c	20,2 ± 1,4 ^c	1,2 ± 0,1 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$. ND: No determinado.

2.3.2.2.2. Susceptibilidad al agua

La susceptibilidad al agua que presentan las películas proteicas, debida a la naturaleza hidrofílica de estas macromoléculas, puede considerarse como una de las características más desventajosas frente a ciertas aplicaciones, y la que más las diferencia de los materiales

derivados de los polímeros sintéticos más utilizados. El aumento de la resistencia al agua de estos materiales constituye uno de los objetivos que se persigue en esta temática. En la **Tabla 2.5** se presenta el contenido de agua y la solubilidad en agua de las películas proteicas y nanocompuestas.

Tabla 2.5: Contenido de agua y solubilidad en agua de películas de SPI y de SPI con diferentes concentraciones de MMT.

MMT (g /100 g SPI)	Contenido de agua (%)	Solubilidad (%)
0	21,7 ± 0,8 ^d	51,2 ± 0,8 ^c
2,5	20,4 ± 0,3 ^c	39,9 ± 2,6 ^b
5	18,6 ± 0,1 ^b	39,5 ± 1,7 ^b
7,5	17,3 ± 0,8 ^a	33,2 ± 0,6 ^a
10	17,0 ± 0,8 ^a	33,6 ± 0,4 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

Se observó que al agregar cantidades crecientes de montmorillonita a la formulación el porcentaje de humedad disminuye progresivamente, hasta en un 22 % para las películas con 10 g MMT/100 g SPI respecto de la película proteica control. Teniendo en cuenta que en general uno puede considerar a la MMT natural con cierto carácter hidrofílico (Sharif y col., 2005; Rhim y Perry, 2007), y con capacidad de interaccionar con el agua a través de puentes de hidrógeno (Huang y col., 2004), la disminución en el contenido de agua observada, sugeriría que las interacciones entre la proteína y la arcilla estarían dejando menos sitios disponibles para retener agua. Teniendo en cuenta que el agua actúa como un plastificante dentro de la matriz proteica, será necesario considerar esta disminución al analizar la funcionalidad de los materiales resultantes.

La solubilidad en agua también se redujo al aumentar el contenido de MMT en la formulación, llegando a disminuir un 52 % para la película nanocompuesta con 10 g MMT/100 g SPI respecto de la película control. El mismo efecto fue observado por otros autores al agregar MMT a películas de agar, quitosano y almidón/carboximetilcelulosa (Rhim, 2011; Casariego y col., 2009; Alamsi y col., 2010), quienes lo atribuyeron a la

formación de puentes hidrógeno entre los grupos -OH de las respectivas matrices poliméricas y la arcilla.

Las isothermas de sorción de las películas proteicas se muestran en la **Figura 2.10**. Todas las isothermas son de forma sigmoidea ($C > 2$), volviéndose asintóticas cuando a_w tiende a 1, lo cual es típico de productos ricos en proteínas o almidón (Salgado y col., 2010). Si bien en todo el rango de actividades acuosas, las películas nanocompuestas presentaron menores valores de absorción de agua que las películas control, las diferencias fueron mayores en ambientes con HR elevada ($a_w > 0,6$). Como se muestra en la figura, el modelo de GAB fue adecuado para describir matemáticamente las isothermas de sorción ($r^2 \approx 0,99$). Sin embargo a altas humedades relativas ($a_w > 0,9$) el modelo se separa de los datos experimentales, debido a que asume adsorción física en multicapas, y en esta zona el sorbato presenta propiedades de agua pura.

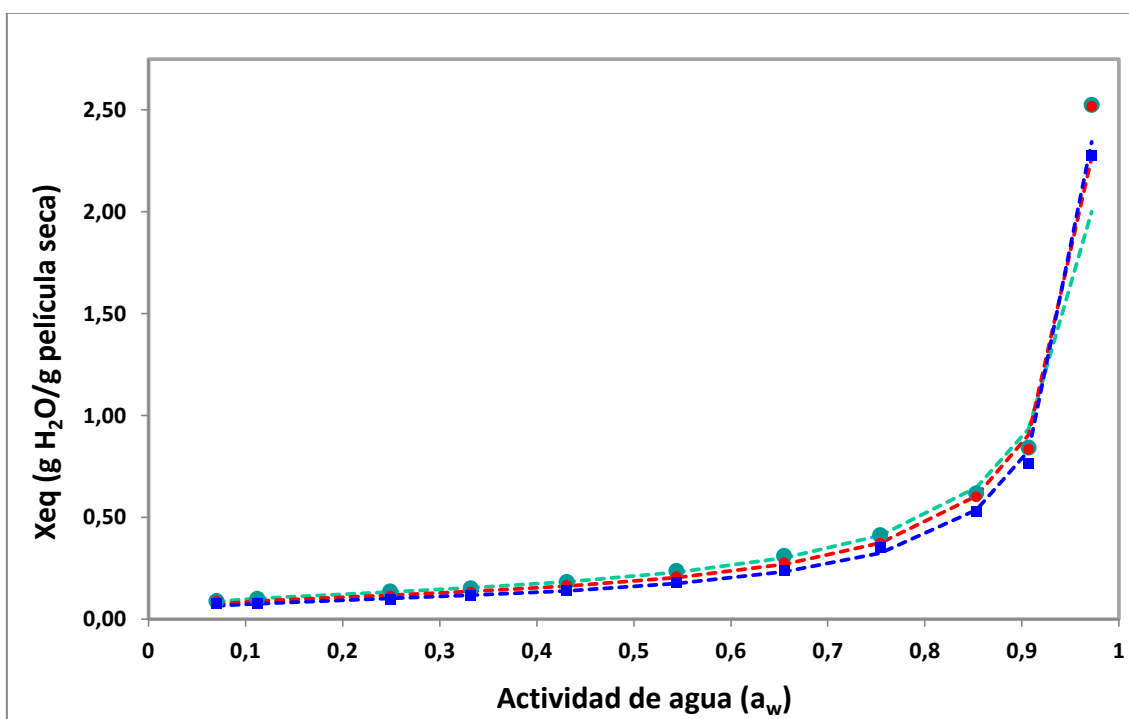


Figura 2.10: Isothermas de sorción de películas preparadas con proteína de soja (●), 5 (●) y 10 (■) g MMT/100 g SPI. Se representan con símbolos los valores experimentales y con línea punteada su ajuste empleando el modelo de GAB.

Los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales con el modelo de GAB se muestran en la **Tabla 2.6**. Se puede observar que el valor de humedad en la monocapa (X_0) disminuye con el incremento de nanoarcilla en las películas, posiblemente debido a la fuerte interacción entre la MMT y la matriz proteica, disminuyendo la cantidad de grupos libres para interactuar con el agua, lo que daría un mayor carácter hidrofóbico a la película nanocompuesta. Los valores de adsorción de agua en las películas proteicas encontrados en este estudio son similares a aquellos reportados por otros autores (Cho y Rhee, 2002; Gennadios y col., 1994; Cuq y col., 1997; Salgado y col., 2010). Al momento no hemos encontrado estudios previos que muestren isothermas de sorción para películas proteicas nanocompuestas con MMT.

Tabla 2.6: Parámetros del modelo de GAB para las isothermas de sorción de las películas proteicas y nanocompuestas.

MMT (g /100 g SPI)	Isothermas de Sorción - Modelo GAB			
	X_0^*	C	K	r^2
0	0,1112	35,1699	0,9717	0,9913
5	0,0971	33,4347	0,9848	0,9901
10	0,0827	38,1817	0,9925	0,9892

*Unidades de X_0 : g H₂O/g película seca

Teniendo en cuenta que una de las funciones de una película es minimizar la transferencia de humedad entre un alimento y la atmósfera que lo rodea, la evaluación de la permeabilidad al vapor de agua es importante y se espera que dicho parámetro presente valores tan bajos como sea posible. En la **Figura 2.11** se muestra la permeabilidad al vapor de agua de las películas estudiadas. El valor de WVP de la película de soja patrón es característico para películas proteicas (Gennadios y col., 1993; Rhim y col., 2000; Mauri y col., 2006; Martelli y col., 2006; Denavi y col., 2009; Salgado y col., 2010). Al agregar arcilla a la formulación se observa una importante disminución en esta propiedad, especialmente para contenidos ≥ 5 g de MMT/100 g de SPI. Si bien con 10 g de MMT/100 g de SPI se llega casi a un orden de magnitud en la mejora y entran en el rango de algunos sintéticos como el celofán ($8,4 \times 10^{-11}$ g/m s Pa), los valores obtenidos siguen siendo superiores a los reportados

para las películas sintéticas más utilizadas en el mercado -polipropileno: $6,5 \times 10^{-13}$, cloruro de polivinilo: $0,7-2,4 \times 10^{-13}$, polietileno de baja densidad: $7,3-9,7 \times 10^{-13}$ y polietileno de alta densidad: $2,4 \times 10^{-13}$ g/m s Pa- (Gennadios y col., 1993; Cuq y col., 1998; Lin y col., 2007).

En general las mejoras en WVP están asociadas a que si se logra dispersar la arcilla en la matriz proteica, esta genera un camino más tortuoso para el paso de las moléculas de agua a través de la película (Zeng y col., 2005; Sun y col., 2008; Kumar y col., 2010; Rhim, 2011), por lo que se puede relacionar con un fenómeno difusional.

Tunc y col. (2007) observaron una disminución importante en WVP al agregar 2,5 % de MMT a películas de gluten de trigo y lo asociaron a las interacciones hidrofílicas que se daban entre las proteínas de gluten y la MMT, resultando en una menor disponibilidad de los sitios hidrofílicos para las moléculas de agua. Pudiendo esto asociarse más a un fenómeno de solubilidad.

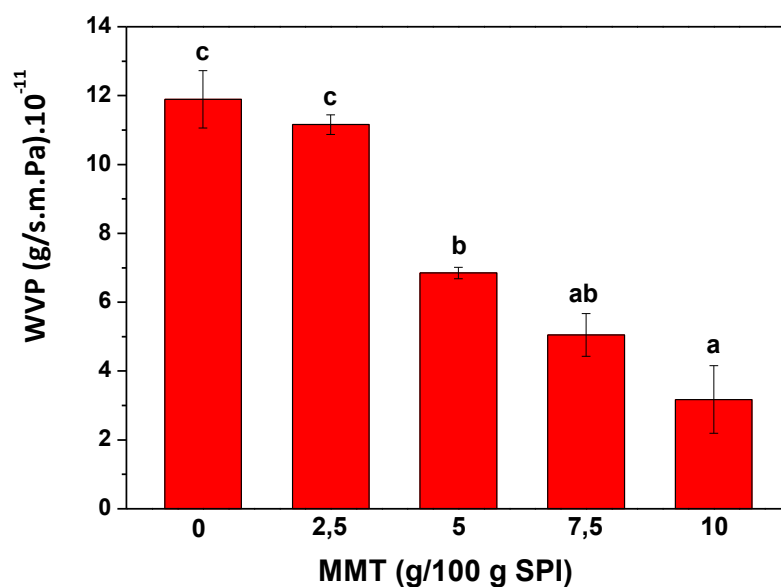


Figura 2.11: Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de proteína de soja y de proteína de soja con distintos contenidos de montmorillonita. Medias con distintas letras son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Dado que la WVP depende, tanto de la solubilidad como de la difusividad efectiva del agua en la película, se calcularon dichos parámetros (β y D_{ef} , respectivamente) para las películas estudiadas en este capítulo. En la **Tabla 2.7** se presentan los valores obtenidos.

Tabla 2.7: Coeficiente de solubilidad (β) y difusividad efectiva (D_{ef}) del agua en las películas proteicas y nanocompuestas.

MMT (g /100 g SPI)	β^* ($\times 10^{-4}$)	D_{ef}^* ($\times 10^{-12}$)
0	6,3	2,15
5	6,0	1,39
10	5,4	0,47

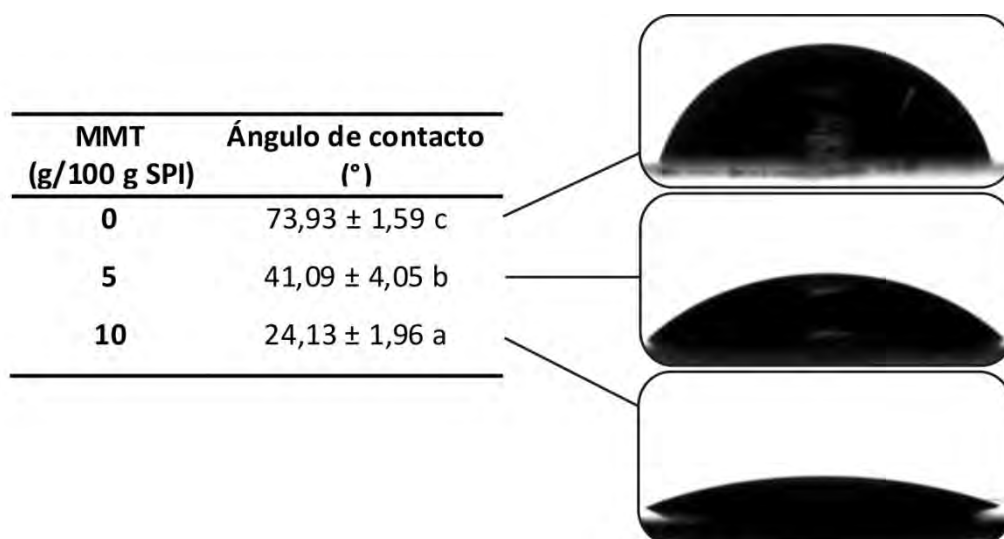
*Unidades de β : g H₂O/Pa g película seca; de D_{ef} : m² s⁻¹

Al aumentar el contenido de arcilla ambos parámetros disminuyeron progresivamente. Para las películas con 10 g MMT/100 g SPI el coeficiente β disminuyó un 14 % y la difusividad efectiva un 78 % respecto de la película proteica. Estos resultados evidencian que la mejora alcanzada en WVP con el agregado de MMT a la matriz proteica, pueden atribuirse tanto a la disminución en la difusión como en la solubilidad del agua en la película, pareciendo ser más significativo el efecto en la difusión.

En la **Figura 2.12** se puede apreciar las imágenes obtenidas al depositar una gota de agua sobre la superficie de la película proteica y las formadas con 5 y 10 g de MMT/ 100 g SPI. Las películas proteicas mostraron el mayor ángulo de contacto ($\approx 74^\circ$). Este valor, situado entre los de polietileno ($105,1^\circ$) y acetato de celulosa ($54,3^\circ$) (Van Oss, 1994), da idea de ambas naturalezas hidrofílica (debido a los aminoácidos polares) e hidrofóbica (debido a aminoácidos no polares) de las proteínas de soja (Kumar y Zhang, 2009; Zhang y col., 2001). Al aumentar el contenido de arcilla se observó una disminución del ángulo de contacto, indicando una disminución de la hidrofobicidad superficial de las películas nanocompuestas. Resultados similares fueron encontrados por otros autores (Huang y col., 2004; Cyras y col., 2008; Almasi y col., 2010). Esto puede atribuirse a las capas de sílica con grupos hidroxilos que hacen a la MMT un compuesto hidrofílico. Tunc y col. (2007) también informaron la disminución en el ángulo de contacto al agregar MMT a películas de gluten de trigo, paralelo a una disminución en la velocidad de absorción de agua. La presencia de cantidades crecientes de MMT tendió a favorecer el esparcimiento de la gota sobre la superficie de la película y a limitar la penetración de la gota dentro de la misma, resultando en una

reducción de ambas tasas de hidrofobicidad y absorción. Estos resultados indicaron que las propiedades de hidratación estáticas y dinámicas no están necesariamente relacionadas, como ha descripto Karbowski y col. (2006) para películas en base a lota carragenano.

Figura 2.12: Valores e imágenes de ángulos de contacto iniciales al depositar una gota de agua sobre las películas proteicas y nanocompuestas de SPI y MMT. Medias con distintas letras son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.



El análisis de todas estas propiedades demuestra que si bien el agregado de MMT a las películas proteicas de soja aumenta el carácter hidrofílico superficial, las películas nanocompuestas formadas son más resistentes al agua y sugieren la existencia de importantes interacciones entre la matriz proteica y la arcilla.

2.3.2.2.3. Propiedades mecánicas

También se estudiaron las propiedades mecánicas de los materiales proteicos y nanocompuestos obtenidos. La importancia de este estudio radica en que una película biodegradable debe soportar la tensión normal encontrada durante su aplicación y posterior manipulación para mantener su integridad y propiedades barrera (Bourtoom, 2008). En la

Figura 2.13 se presentan las curvas tensión-deformación obtenidas en ensayo de tracción. Para la película proteica control se observaron propiedades moderadas - tensión (≈ 3 MPa), elongación a lo rotura (≈ 38 %) y módulo elástico ($\approx 1,2$ MPa)- que se encuentran en el rango de las reportadas en bibliografía para otras películas proteicas (Aydt y col., 1991; Gennadios y col., 1993; Rhim y col, 2000; Sobral y col., 2001; Ou y col., 2005; Moore y col., 2006; Tapia-Blácido y col., 2007; Denavi y col., 2009; Salgado, 2009).

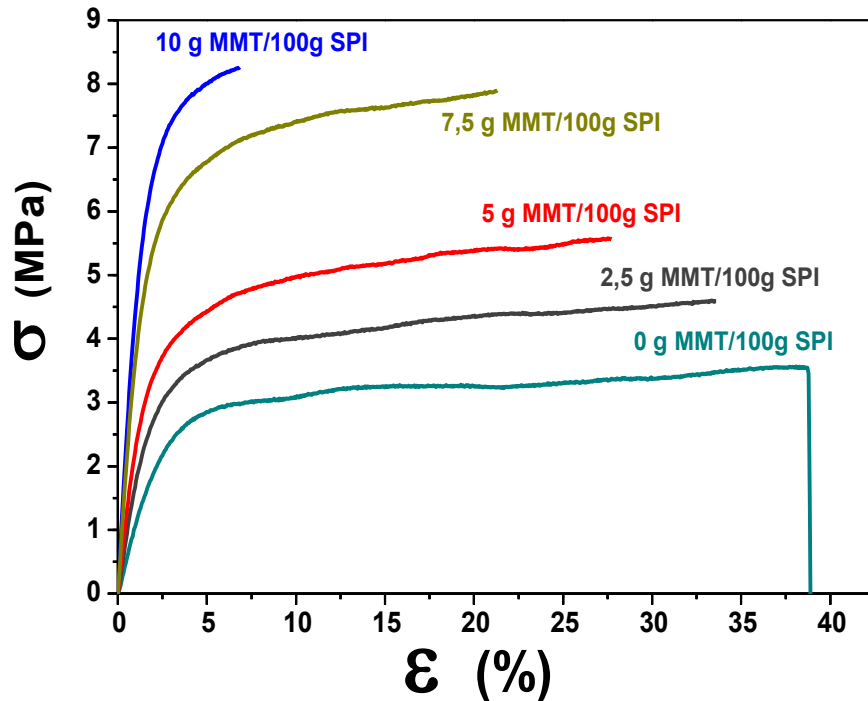


Figura 2.13: Propiedades mecánicas (obtenidas en ensayos de tracción) de las películas de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonita.

Con el agregado de arcilla se observó una mejora progresiva en la resistencia a la rotura y en el módulo elástico y una disminución en la elongación respecto de las películas proteicas control, que llegó a ser de 137, 327 y 79 % respectivamente para las películas con 10 g de MMT/100 g de SPI (**Tabla 2.8**). Las capas de silicato de la arcilla actúan como un refuerzo mecánico de la matriz proteica. Las películas nanocompuestas mostraron una mejora notable en las propiedades mecánicas, especialmente en el módulo de Young. La razón

principal de esta mejora en tales propiedades es la fuerte interacción interfacial entre la matriz proteica y la MMT, debido a la gran superficie expuesta por las capas de la arcilla.

Tabla 2.8. Tensión a la ruptura (σ_{\max}), deformación a la ruptura (ϵ_{\max}) y módulo elástico (**E**) de las películas de proteína de soja con distintos contenidos de montmorillonita, medidas en tracción.

MMT (g /100 g SPI)	σ_{\max} (MPa)	ϵ_{\max} (%)	E (MPa)
0	3,7 ± 0,8 ^a	41,9 ± 8,7 ^c	1,2 ± 0,4 ^a
2,5	6,0 ± 1,1 ^b	37,4 ± 6,8 ^c	2,3 ± 0,4 ^b
5	7,2 ± 1,5 ^{bc}	34,6 ± 8,6 ^{bc}	3,2 ± 0,7 ^{bc}
7,5	8,3 ± 1,8 ^{bc}	25,9 ± 3,7 ^b	3,9 ± 0,8 ^c
10	8,9 ± 1,7 ^c	8,6 ± 1,2 ^a	5,2 ± 0,9 ^c

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Esta interacción se debe principalmente al tipo de unión entre las proteínas de soja y la arcilla. Se ha señalado con bastante anterioridad (Ensminger y Gieseking, 1939 y 1941) que la formación de complejos entre la proteína y la montmorillonita principalmente involucra un intercambio entre los grupos catiónicos ($-\text{NH}_3^+$) en las cadenas laterales de aminoácidos de la proteína y el ion Na^+ ocupando los sitios de intercambio en la superficie de la montmorillonita. Otros autores (Zhang y col., 2001; Chen y Zhang, 2006) atribuyen estas mejoras a las fuertes interacciones electrostáticas y de enlace puente de hidrógeno entre las proteínas de soja y las capas de MMT muy desordenadas en la matriz proteica. Estas interacciones son importantes para restringir el movimiento de las proteínas de soja, y esta restricción lleva a la mejora de la resistencia a la tracción y módulo de las películas nanocompuestas, disminuyendo su elongación.

El efecto observado, es el contrario al que se encuentra cuando se aumenta la concentración de plastificante (Cuq y col., 1997; Bourtoom, 2008; Dias y col., 2011). Si bien en este trabajo, todas las películas contenían la misma concentración de glicerol, anteriormente se mostró

que al incrementarse el contenido de arcilla disminuía el contenido de agua. Dado que el agua actúa como un plastificante fuerte en la matriz proteica, este efecto puede adicionarse al efecto refuerzo que generan las arcillas.

Algunos autores encontraron una cantidad óptima de MMT necesaria para lograr la mayor mejora en las propiedades mecánicas, por sobre la cual ya no se observan mejoras en la tensión y/o módulo elástico (Cyras y col., 2008; Tunc y col., 2007). Esto podría estar relacionado con la formación de una red de nanoarcillas que puede percolar la matriz proteica a mayores concentraciones de MMT. En el presente estudio, la película con mayor contenido de MMT fue la que presentó mejores propiedades mecánicas.

2.3.2.2.4. Propiedades térmicas

Tabla 2.9: Temperaturas de transición vítrea (Tg) obtenidas por DSC de películas de SPI con distintas concentraciones de MMT.

g MMT/100 g SPI	Transición Vítrea	
	Tg ₁ (°C)	Tg ₂ (°C)
0	-74,4 ± 8,9	-40,6 ± 0,1 a
2,5	--	-39,6 ± 0,9 a
5	--	-39,8 ± 1,4 a
7,5	--	-39,7 ± 1,3 a
10	--	-40,7 ± 0,1 a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con letras iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

En la **Tabla 2.9** se muestran las Tg obtenidas por DSC de las películas proteicas y nanocompuestas. En el termograma correspondiente a las películas proteicas (sin agregado de MMT) se observaron dos temperaturas de transición vítrea, a -74 °C y -40 °C, la primera atribuible a una fase rica en glicerol y la segunda a una fase más rica en proteínas (Sobral y col., 2001; Tapia-Blácido y col., 2007). Se han informado en bibliografía dos valores de Tg para películas proteicas de soja (Chen y col., 2006), de gluten de trigo plastificadas con

glicerol y mezclas de glicerol y sacarosa (Cherian y col., 1995) y de gelatina (Sobral y col., 2001), mientras que otros autores sólo informaron una Tg en películas de proteínas de suero de leche (Anker y col., 1991; Shaw y col., 2002), de gluten de trigo (Gontard y col., 1996) y de soja (Denavi y col., 2009), todas plastificadas con glicerol. Se sabe que la fuerte carga y las interacciones polares entre las cadenas laterales de las moléculas de proteína de soja restringen la movilidad molecular de las mismas (Zhang y col., 2001), y que el agregado de glicerol reduce la interacción entre las moléculas de proteínas generando una Tg en los dominios ricos en este plastificante.

Al agregar concentraciones variables de MMT a las películas proteicas de soja, sólo se observó una sola Tg, alrededor de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, que se correspondería con la de la fase más rica en proteínas, no observándose corrimientos respecto al control. El hecho que no se observe la transición de la zona rica en glicerol por DSC podría estar sugiriendo una distinta distribución del plastificante en la matriz, debida a la presencia de la arcilla, y a la capacidad de ambos componentes (proteínas y plastificantes) de interaccionar con la arcilla. Si esa Tg representa a la matriz proteica (bulk), por lo que no se modifica con el agregado de arcilla, es inesperado que tampoco se modifique al disminuir el contenido de agua.

Hedenqvist y col. (2006) informaron un aumento de 5 a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la Tg de películas nanocompuestas en base a proteína de suero y MMT con la adición de MMT en la formulación. Rimdusit y col. (2008) informaron que el valor de Tg de los nanocompuestos en base a carboximetilcelulosa-MMT aumentó de $176\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $182\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el incremento en el contenido de arcilla, y atribuyeron ese aumento al movimiento térmico restringido de la metilcelulosa debido a las nanoarcillas. Se ha informado en bibliografía incrementos similares en la Tg de bionanocompuestos determinados por DSC (Chang y col., 2009; Krishnamachari y col., 2009; Azeredo y col., 2010).

Comparados con los materiales orgánicos, los materiales inorgánicos tienen mejores propiedades de resistencia y estabilidad térmica, debido a su configuración química característica (Huang y col., 2004). Por consiguiente, la introducción de partículas inorgánicas como la MMT mejoraría en gran medida la estabilidad térmica de las películas proteicas. Las películas proteicas de soja y nanocompuestas se analizaron mediante TGA para determinar si la adición de arcilla producía algún cambio en la estabilidad térmica de las películas. Los termogramas de TGA de la MMT, de las películas proteicas y nanocompuestas hasta una temperatura de $750\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones oxidantes se muestran en la **Figura 2.14**.

En el termograma de la arcilla natural, se observan dos etapas, la primera debida a la pérdida del agua absorbida en la arcilla, y la segunda pérdida de peso dada por la deshidroxilación de la MMT, a 550 - 700 °C (Ding y col., 2004), siendo la masa residual luego de la degradación de 85 %. Resultados que coinciden con los descritos por otros autores (Mangiacapra y col., 2006; Kumar y col., 2010, Tunc y col, 2007).

Las curvas termogravimétricas de las películas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI bajo atmósfera oxidativa constan básicamente de 3 etapas de degradación. Para todas las películas la primera etapa ocurre de 70 a 120 °C, que corresponde al agua adsorbida por las proteínas de soja y la MMT, siendo levemente menor para las películas nanocompuestas. La segunda etapa abarca desde los 200 a los 450 °C, la cual corresponde a la degradación de las proteínas de soja y del glicerol agregado. Finalmente la tercera etapa de 475 a 750 °C puede deberse a la oxidación de la proteína de soja bajo flujo de aire. Estos resultados coinciden con los propuestos por otros autores (Cyras y col., 2009; Kumar y col., 2010; Tunc y col., 2007). Las masas residuales para las películas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI fueron de 2, 6 y 9 %, respectivamente. Cabe destacar que en todo el rango de temperatura estudiado, las curvas de degradación correspondientes a las películas nanocompuestas se mantuvieron por encima de la curva de las películas de proteína de soja, evidenciando que la arcilla actúa como una barrera térmica, mejorando así la estabilidad térmica de las películas.

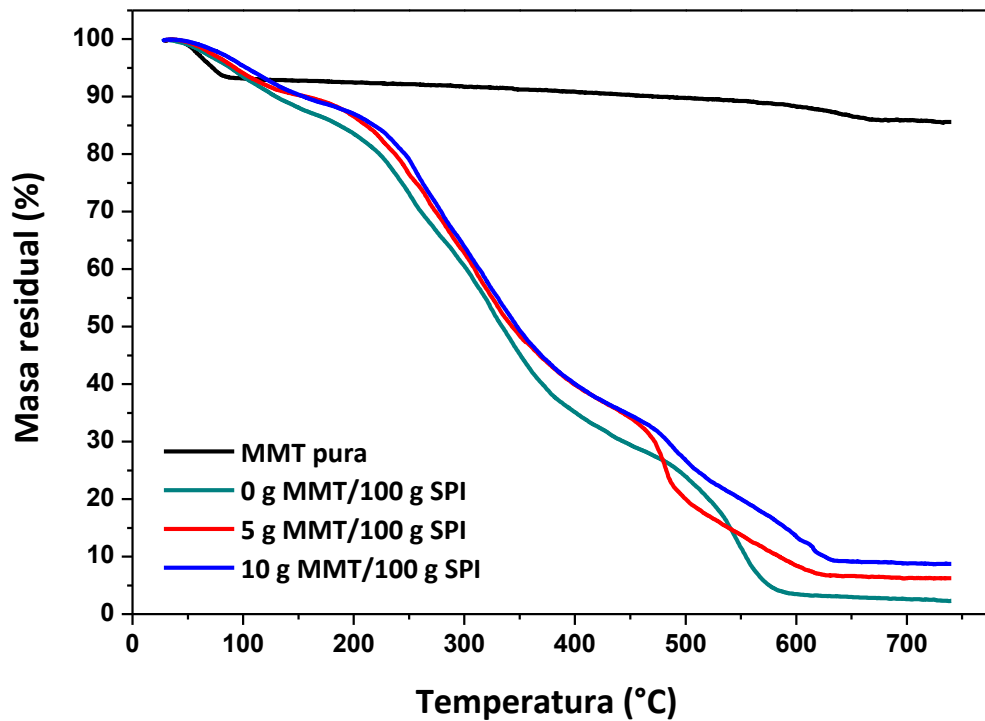


Figura 2.14: Curvas de análisis termogravimétrico de la MMT pura, de la película proteica y de las películas nanocompuestas 5 y 10 g MMT/100 g SPI.

2.3.2.2.5. Morfología

La estructura y morfología de los materiales proteicos y nanocompuestos en base a aislado proteico de soja y cantidades variables de MMT se analizaron por difracción de rayos X (que analiza la estructura de la arcilla en la matriz polimérica) y por TEM (que analiza el tipo de estructura del nanocompuesto y el grado de dispersión de la arcilla en la matriz polimérica). El estudio se completó con el análisis del tipo de interacciones que mantenían estabilizadas las distintas películas estudiadas a través de un ensayo de solubilidad diferencial en *buffers* con distinta actividad química.

En la **Figura 2.15** se presentan los espectros de difracción de rayos X de la MMT natural, y de las películas proteicas y nanocompuestas. La MMT natural de sodio tiene una estructura cristalográfica que la caracteriza (Ke y Stroeve, 2005), exhibiendo un pico de difracción alrededor de $2\theta = 7,2^\circ$, el cual corresponde a un espacio interlaminar $d_{001} = 1,2$ nm.

En general, la intercalación de las cadenas del polímero entre las capas de la arcilla aumenta el espacio interlaminar y conduce a un desplazamiento del pico de difracción hacia ángulos

menores (los valores del ángulo y del espacio interlamilar están relacionados mediante la ecuación de Bragg, **Ecuación 2.8**). En lo que se refiere a una estructura exfoliada, no se observa el pico de difracción en los patrones de difracción de rayos X porque el espacio entre las capas es mayor que en el intercalado (excediendo los 8 nm en el caso de una estructura exfoliada) o porque los nanocompuestos no presentan una estructura ordenada (Alexandre & Dubois, 2000).

Como se puede observar en la **Figura 2.15**, la película proteica no muestra ninguna transición en el rango analizado. En los espectros de difracción correspondientes a las películas nanocompuestas no aparece el pico característico de la MMT ni tampoco otro pico a ángulos menores. Solamente se observa un ensanchamiento o levantamiento de la línea base al acercarse a $2\theta = 2^\circ$, que se hace más importante al incrementarse la concentración de MMT en la formulación. Si bien no se observa ningún hombro bien definido, este levantamiento podría tal vez estar relacionado con cierto grado de intercalación de las cadenas proteicas en las galerías de las capas de MMT, lo cual causa un aumento en el espaciado de las capas de la MMT comparado con aquellas de la MMT pura. Al mismo tiempo algunas capas pueden ser apartadas de las demás y exfoliadas, distribuyéndose al azar en la matriz proteica (Quilaqueo Gutierrez y col., 2011). Estos resultados estarían señalando un alto grado de intercalación/exfoliación de la arcilla en la matriz proteica.

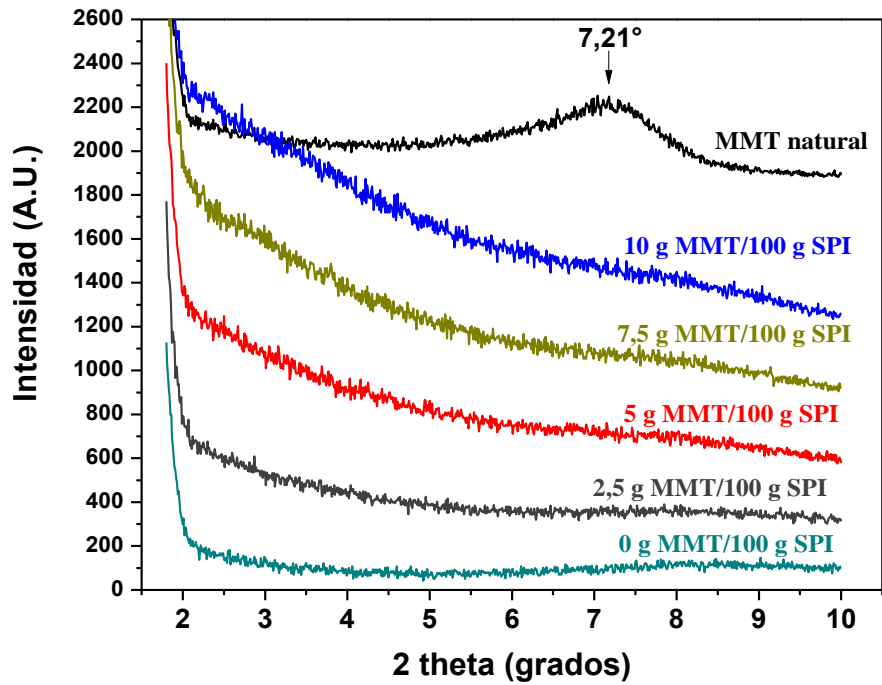


Figura 2.15: Patrones de difracción de rayos X de la MMT pura, de la película proteica y de las películas nanocompuestas.

Con el fin de verificar lo observado en los estudios de la microestructura de las películas por rayos X, se analizaron las mismas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la **Figura 2.16** se muestran las fotos de la MMT natural, y las de las películas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g de SPI. De las mismas se puede observar que la MMT se encuentra bien dispersa en la matriz proteica. A pesar que las capas de MMT aún conservan su orientación en alguna medida, el ordenamiento tactoide de las mismas está muy delaminado por las proteínas de soja. Estos resultados confirman el alto grado de exfoliación/intercalación alcanzado, observado por rayos X.

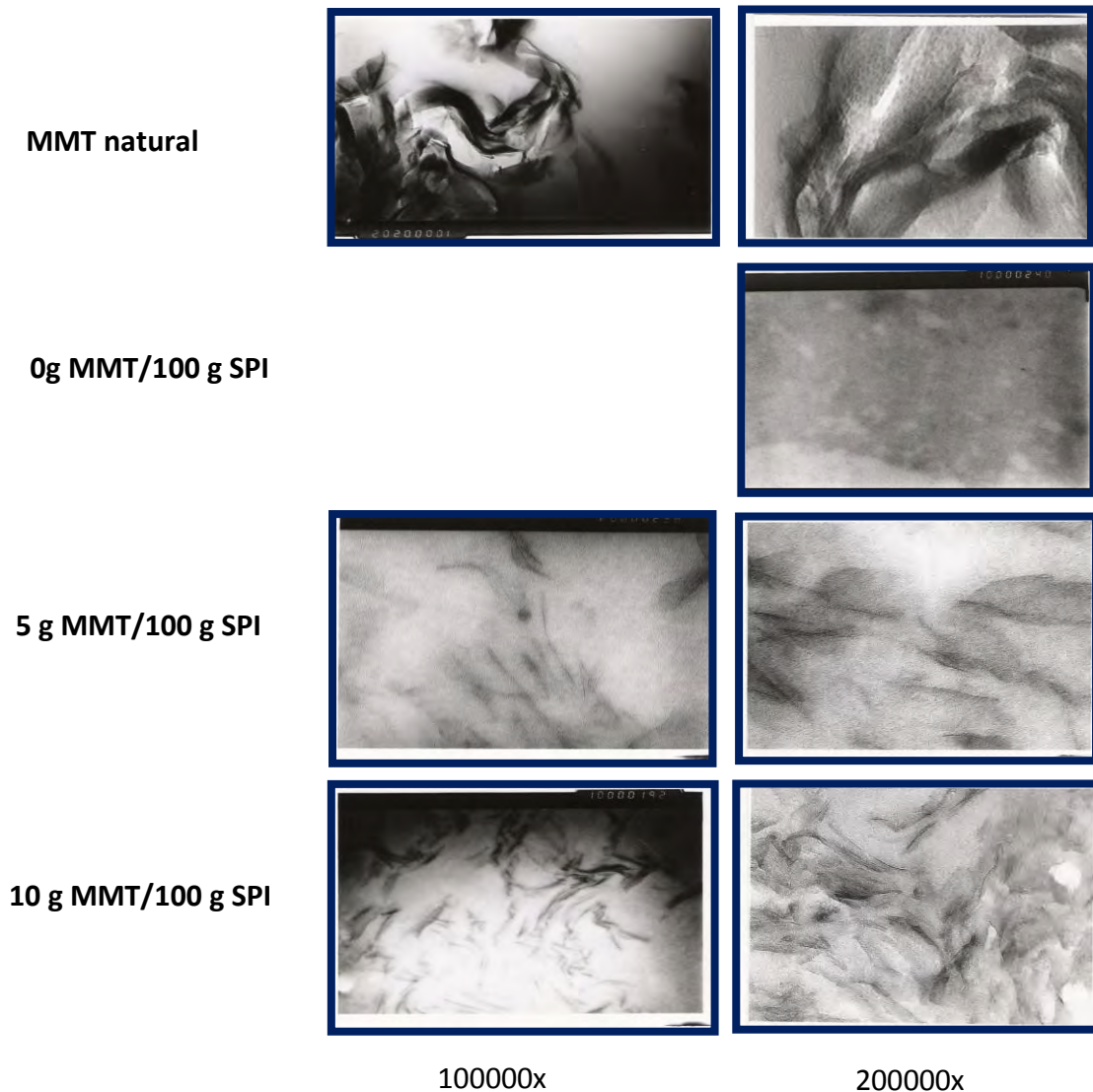


Figura 2.16: Microscopía Electrónica de Transmisión de la arcilla natural y de las películas nanocompuestas.

Las mejoras observadas en las propiedades mecánicas, en la resistencia al agua y a la degradación térmica con el agregado de MMT a películas proteicas de soja pueden estar relacionadas con el grado de intercalación/exfoliación alcanzado por el material. Y a su vez, esto puede ser atribuido al uso de un procedimiento apropiado para dispersar la arcilla, así como a las importantes interacciones generadas entre la MMT y la proteína de soja en las películas. Teniendo en cuenta que al distribuir uniformemente las laminas de arcilla en la matriz, se incrementa la superficie de contacto proteína/arcilla, esto mejora la funcionalidad de los materiales resultantes.

Según Majdzadeh-Ardakani y col. (2010), la combinación de mezclado mecánico y ultrasonido favorece la buena dispersión de la arcilla. Por su parte Chen y Zhang (2006) postularon que existían dos tipos de interacciones en el sistema proteína de soja/MMT que eran beneficiosas para la intercalación/exfoliación de las capas de MMT en la matriz proteica, una es la interacción electrostática en la superficie entre la carga positiva de la proteína y la carga negativa de las capas de MMT, así como también entre los grupos -NH y Si-O.

Con el fin de intentar ahondar en el tipo y la proporción de interacciones involucradas en la estabilización de la red proteica, se estudió la solubilidad diferencial de las proteínas de las películas en sistemas buffers que tienen la capacidad de romper distintos tipos de interacciones. En la **Figura 2.17** se muestran los resultados obtenidos.

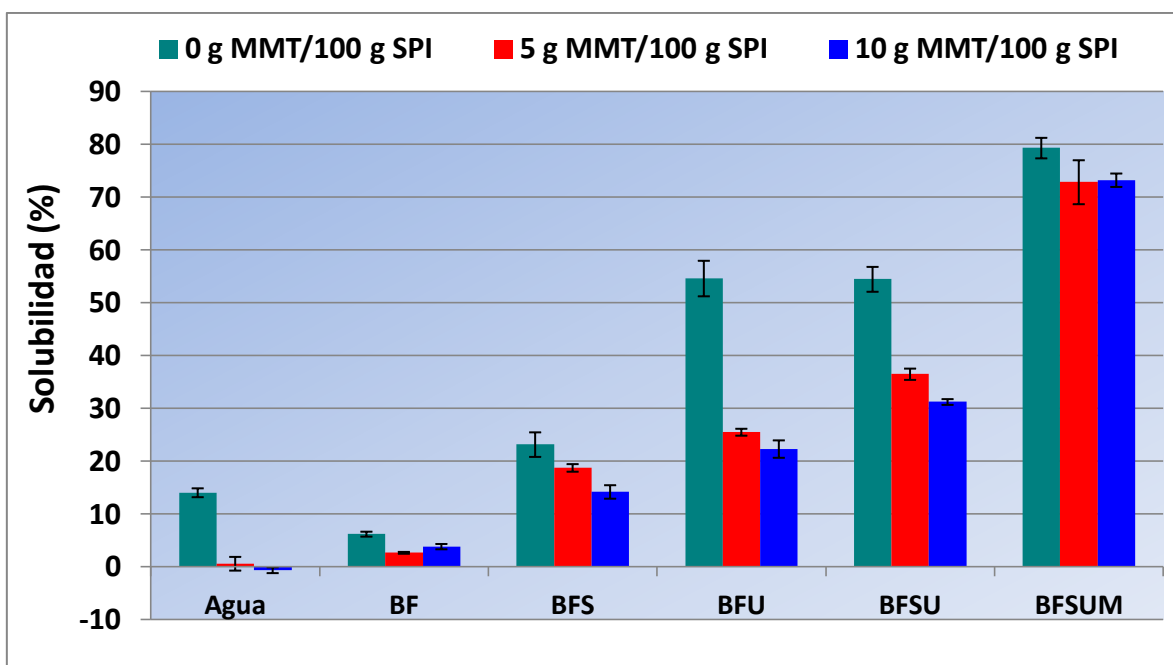


Figura 2.17: Solubilidad diferencial de las películas proteicas (0 g MMT/100 g SPI) y nanocompuestas (5 y 10 g MMT/100 g SPI). Se muestran los porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer Fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFS), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFSU), BFU con β - mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFSUM), todos a pH 7,5.

La película control en base a proteína de soja mostró un perfil de solubilidad parecida a la que informó Salgado y col. (2010) para películas formadas con el mismo aislado proteico. Esta película presentó una baja solubilidad proteica en agua ($\approx 15\%$). En este sistema se cuantifican los polipéptidos libres que no están fuertemente ligados a la red proteica. Esta solubilidad proteica disminuyó aproximadamente un 55 % en *buffer* fosfato (BF, 0,1 M, pH 7,5) con respecto al agua, y esto puede deberse a que el *buffer* favorece las interacciones iónicas entre las proteínas, produciendo un efecto *salting out*. El detergente SDS tiene la capacidad de romper las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas polipeptídicas y la urea (BFU) modifica la capacidad de formar puentes de hidrógeno. El aumento de solubilidad con los *buffers* que contienen estos compuestos estaría indicando que las uniones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno estarían estabilizando la estructura de las películas, siendo más importantes el rol de las uniones puente de hidrógeno (la solubilidad proteica aumenta hasta un 54% en BFU). Esto puede evidenciarse también al tratar las proteínas con ambos buffers, SDS y urea (BFSU), ya que la solubilidad no varía con respecto al tratado sólo con urea (BFU). La adición de 2- β mercaptoetanol evidencia la presencia de puentes disulfuro. En particular, estos enlaces covalentes tienen una importancia significativa en la estabilización de estas películas, ya que al romper dichos enlaces la solubilidad aumenta hasta un 80% (BFSUM). Se ha mostrado en bibliografía que aquellos materiales con mayor capacidad de unirse por este tipo de interacciones forman matrices más resistentes y elongables (Pérez-Gago y col., 2001; Choi y col., 2003), y además la formación de estas interacciones está favorecida cuando las proteínas se encuentran desnaturalizadas (Darby y col., 1995).

Al agregar MMT a la formulación, la solubilidad de las proteínas de las películas nanocompuestas disminuye significativamente, independientemente de la concentración de arcilla, en todos los *buffers* estudiados respecto de la película proteica control. La disminución de la solubilidad proteica en agua es muy notoria, evidenciando que la presencia de arcilla disminuye la disponibilidad de polipéptidos libres. También es muy importante el menor efecto de la urea en la solubilización de las proteínas (BFU), observándose para las películas nanocompuestas un efecto aditivo del efecto del SDS y de la urea al solubilizar las proteínas en el buffer que contiene ambos reactivos (BFSU). Las diferencias con la película control se vuelven menos importantes en presencia del agente reductor (BFSUM), sugiriendo que la ruptura de los puentes disulfuros además de favorecer

la solubilización debe permitir la acción de los otros reactivos con capacidad de romper las otras interacciones.

Es evidente que en las películas nanocompuestas los puentes disulfuro juegan un papel más importante en la estabilización de la matriz, y que una proporción importante de los grupos que están interaccionando por puentes de hidrógeno en la matriz proteica sin MMT, están involucrados en otros tipos de interacciones, posiblemente con la arcilla, que no se desestabilizan fácilmente.

Los estudios realizados evidencian que existen fuertes interacciones entre las proteínas de soja y la MMT -que se encuentra bien dispersa y con un grado de exfoliación interesante en la matriz proteica-, de forma que la arcilla actúa como un verdadero refuerzo para las películas proteicas. Este efecto de refuerzo se manifiesta en la funcionalidad de las películas mejorando su resistencia mecánica, al agua y a la degradación térmica, siendo la película con mayor cantidad de arcilla analizada (10 g de MMT/100 g de SPI), la que presentó el mejor comportamiento.

2.3.3. Efecto del plastificante en las propiedades de las películas nanocompuestas

Teniendo en cuenta que por su naturaleza hidrofílica, los plastificantes típicos usados en la formación de películas de biopolímeros, como glicerol y sorbitol, tienen la capacidad de interaccionar tanto con las proteínas como con la arcilla, se estudió el efecto de variar la concentración de glicerol y sorbitol en las películas nanocompuestas SPI-MMT.

Se formaron películas a partir de dispersiones que contenían 5 % p/v de SPI, concentraciones variables de glicerol (15, 20, 30, 40 y 50 g/100 g de SPI) o sorbitol (20, 30, 40, 50, 60 g/100 g de SPI), y 0, 5 ó 10 g de MMT/100 g de SPI), a pH 10,5, según el procedimiento descrito en la **sección 2.2.2**. Las concentraciones de plastificantes se escogieron teniendo en cuenta trabajos publicados (Cho y Rhee, 2002) y los límites que permiten una adecuada manipulación para las películas proteicas y nanocompuestas.

2.3.3.1. Morfología de las películas

En la **Figura 2.18** se comparan los espectros de difracción de rayos X de la MMT natural y de las películas proteicas y nanocompuestas con 5 y 10 g MMT/100 g SPI plastificadas con concentraciones variables de glicerol **(A)** ó sorbitol **(B)**. En ambas figuras se observa que la MMT pura tiene un pico característico a $7,21^\circ$ correspondiente al ordenamiento cristalino de la arcilla con un espacio interlaminar (d_{001}) de 1,2 nm según la ley de Bragg (**Ecuación 2.8**). Con respecto a los espectros de las películas sin arcilla (plastificadas con glicerol ó sorbitol), no se observa ningún pico de difracción en el rango 2θ desde $1,5$ a 10° , mostrando que la proteína de soja no tiene una estructura ordenada en este rango y tampoco que el sorbitol se encuentre cristalizado al momento de la caracterización.

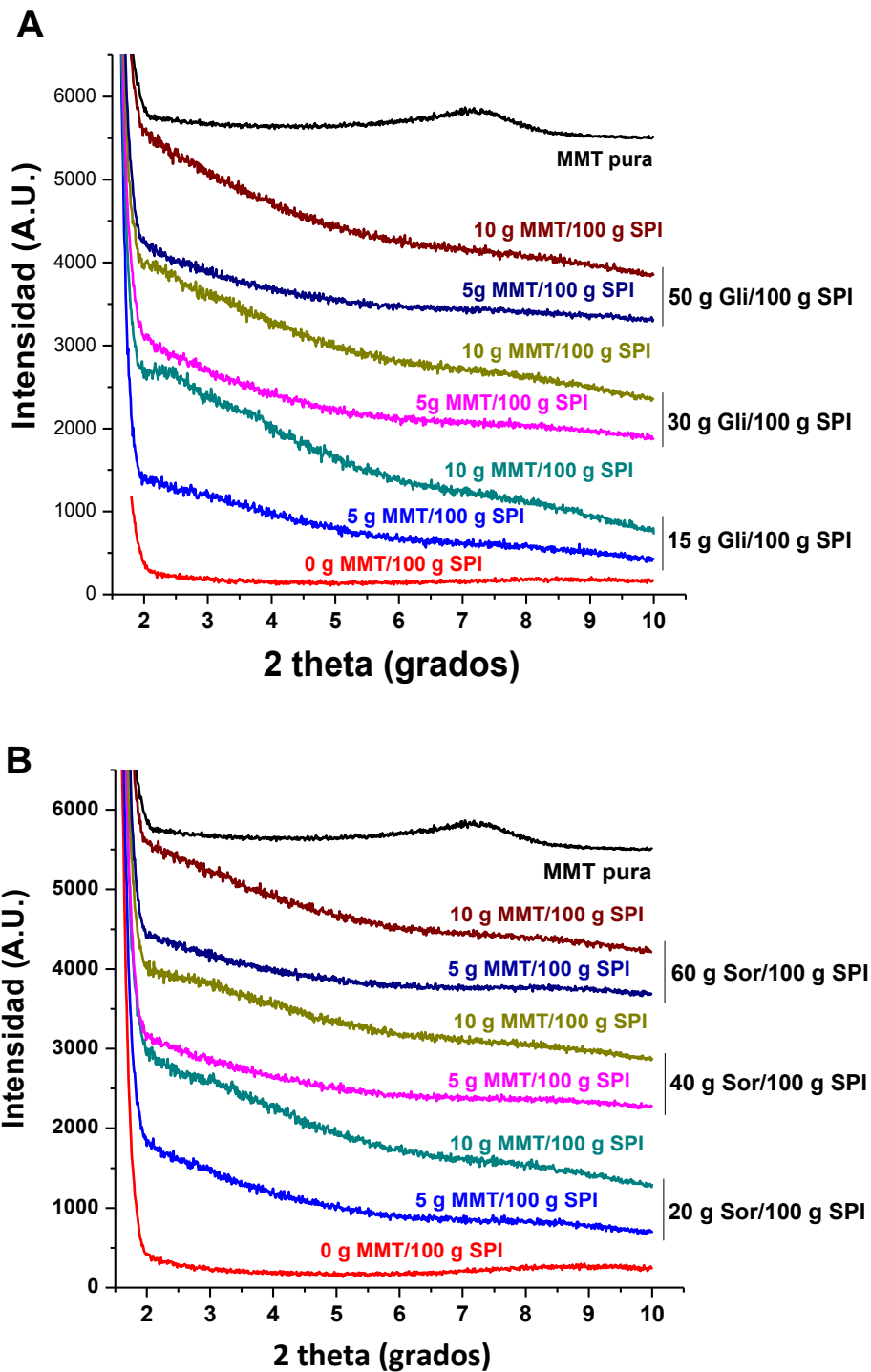


Figura 2.18: Efecto del contenido de glicerol (A) y sorbitol (B) sobre los espectros de difracción de rayos X de películas de SPI (0 g MMT/100 g SPI) y SPI con concentraciones variables de MMT (5 y 10 g MMT/100 g SPI).

En los espectros de las películas nanocompuestas no se observa el pico característico de la MMT indicando que la arcilla se logró dispersar en la matriz. En los correspondientes a las películas con 5 g MMT/100 g SPI, no se observa ningún otro pico, sólo un pequeño levantamiento en la línea de base al acercarse 2θ a $1,5^\circ$, siendo esta observación menos marcada al incrementarse la concentración de ambos plastificantes. Pero para las películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI, la elevación en la línea de base se hace más importante observándose hombros a distintos ángulos (inferiores a los típicos de la MMT) que estarían indicando la intercalación de las proteínas entre las capas de arcilla. Estos hombros se hacen menos marcados y se corren a menores ángulos al incrementarse la concentración de ambos plastificantes tal como se presenta en la **Tabla 2.11**. También de los difractogramas de las películas plastificadas con sorbitol es posible observar que solo aparece un hombro, menos marcado que los correspondientes a películas plastificadas con glicerol, lo que dificulta en parte la asignación de un valor de 2θ . Es evidente que el proceso de obtención de las películas permite dispersar bien las arcillas, que a concentraciones menores e iguales a 5 g MMT/100 g SPI la misma alcanza un importante grado de exfoliación, que a concentraciones superiores coexisten nanoestructuras exfoliadas e intercaladas dentro de la película, y que ambos fenómenos se ven favorecidos al incrementarse la concentración de plastificante. Por otro lado, pareciera que el sorbitol favorecería aún más que el glicerol la intercalación/exfoliación.

Tabla 2.11: Ángulos 2θ y espacio interlaminar d_{001} calculados a partir de los espectros de difracción de rayos X para las películas nanocompuestas con distinto tipo y concentración de plastificante.

Tipo de plastificante	Concentración de plastificante (g/100 g SPI)	Ángulo 2θ	Espacio interlaminar d_{001} (nm)
Glicerol	15	3,74	2,36
		2,38	3,71
	30	3,23	2,73
		2,29	3,85
	50	2,22	3,97
	Sorbitol	20	3,06
40		2,70	3,27
60		2,37	3,72

Chen y Zhang (2006) obtuvieron resultados similares para películas nanocompuestas de proteína de soja y MMT con un contenido de glicerol de 30 % y concentraciones con 16 y 24 %p/p MMT, adjudicando este desplazamiento del pico a que la arcilla se encuentra intercalada en la matriz. El efecto de los plastificantes difiere al estudiado usando almidón como matriz. Tang y col. (2008) estudiaron el efecto del glicerol para películas nanocompuestas MMT-almidón y observaron que para 6 %p/p MMT a bajas concentraciones de glicerol (5 %) la MMT se encontraba exfoliada mientras que a concentraciones más altas del plastificante (10, 15 y 20 %) la MMT se encontraba intercalada. Resultados similares fueron encontrados por Chiou y col. (2007), los cuales atribuyeron este hecho a que incorporando suficiente glicerol en las películas de almidón/nanoarcilla se inhibía la intercalación hasta cierto punto, ya que el incremento en las interacciones glicerol-almidón podía competir con las interacciones entre glicerol, almidón y la superficie de la arcilla. Otros autores (Lavorgna y col., 2010) han informado que en películas nanocompuestas en base a quitosano/MMT sin glicerol la intercalación de las capas de MMT era mínima, mientras que en presencia del glicerol la intercalación era tal que el espacio interlaminar entre las capas de MMT aumentaba al doble.

2.3.3.2. Susceptibilidad al agua

Todas las películas proteicas y nanocompuestas, plastificadas con glicerol y/o sorbitol presentaron espesores similares (**Figura 2.19**), independientemente de la concentración de arcilla y de plastificante. Las plastificadas con sorbitol, parecieran tener espesores algo superiores a las plastificadas con glicerol y una cierta tendencia a aumentar el espesor al incrementar la concentración de plastificante.

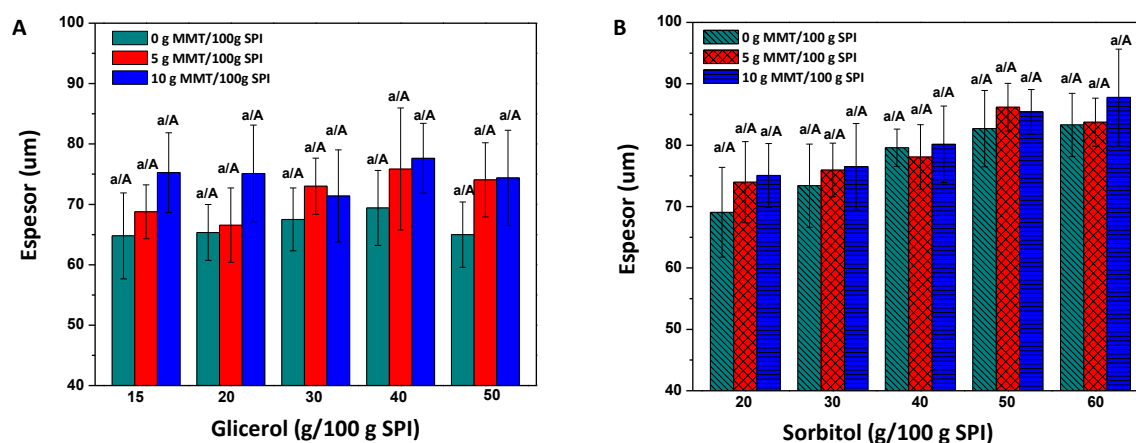


Figura 2.19: Espesores las películas proteicas y nanocompuestas (5 y 10 g MMT/100 g de MMT) plastificadas con distintas proporciones de glicerol (**A**) o sorbitol (**B**). Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de MMT en función de la concentración de plastificante ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de plastificante en función de la concentración de MMT ($p \leq 0,05$).

El contenido de humedad de las películas proteicas y nanocompuestas plastificadas con distinta concentración de glicerol y sorbitol se presenta en la **Figura 2.20**. Al agregar cantidades crecientes de ambos plastificantes a las formulaciones en base a aislados proteicos de soja, aumentó progresivamente el contenido de humedad final de las películas, siendo el efecto del glicerol más intenso que el de sorbitol. Kowalczyk y Baraniak (2011) y Shaw y col. (2002) estudiaron la plastificación de películas formadas a partir de proteínas de arvejas y de suero respectivamente, con glicerol y sorbitol, y observaron que el contenido de humedad de las películas resultantes aumentaba progresivamente con el agregado de

glicerol, y no se modificaba al variar la concentración de sorbitol. En general las películas conteniendo glicerol absorbieron más agua y a una velocidad superior durante el almacenamiento comparado con las películas con sorbitol debido a que el glicerol presenta un mayor efecto plastificante que el sorbitol. Este comportamiento ha sido observado también por Cuq y col. (1997) con proteínas miofibrilares de sardina y por Gennadios y col. (1996) en películas de albúmina de huevo, debido al peso molecular más bajo del glicerol y a su mayor higroscopicidad.

En las películas nanocompuestas SPI-MMT también aumenta el contenido de agua al aumentar la concentración de los plastificantes, y se observa el mayor efecto plastificante del glicerol respecto del sorbitol. Para todas las concentraciones de plastificantes se observa una disminución del contenido de agua con el incremento de la cantidad de MMT. En el caso de las películas plastificadas con glicerol, esta disminución es independiente de la concentración de arcilla agregada (5 o 10 g MMT/100 g de SPI) y aumenta al incrementarse la concentración del plastificante (0,8 y 13 % al agregar 10 g de MMT/100 g SPI a películas con 15 y 50 g glicerol/100 g SPI respectivamente); mientras que para las películas plastificadas con sorbitol la disminución respecto de las películas proteicas control es prácticamente constante ($\approx 8\%$) para todas las concentraciones de sorbitol y solo significativa con el agregado de 10 g MMT/100 g SPI. El mayor efecto en esta propiedad al aumentar el contenido de glicerol es coherente con el mayor grado de exfoliación/intercalación mostrado anteriormente para estos sistemas.

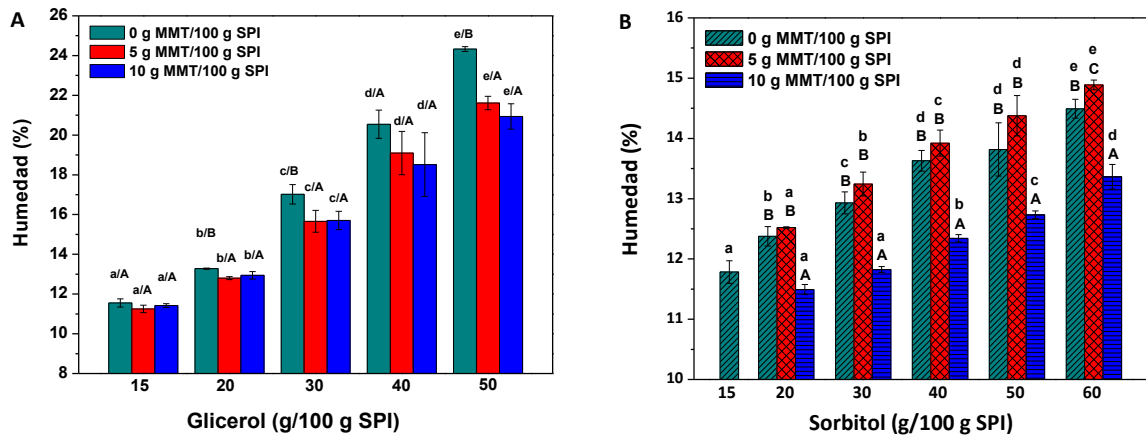


Figura 2.20: Contenido de agua de películas proteicas reforzadas con MMT plastificadas con distintas concentraciones de glicerol (A) y sorbitol (B). Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de MMT en función del % de plastificante ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de plastificante en función del % de MMT ($p \leq 0,05$).

En la **Tabla 2.12** se muestra la solubilidad en agua de las películas plastificadas con distintas concentraciones de glicerol y sorbitol. La solubilidad en agua de todas las películas plastificadas con glicerol aumentó al incrementarse la concentración de plastificante, y para cada una de estas concentraciones, disminuyó significativa y gradualmente con el agregado de arcilla a la formulación (entre 27-33 % para las películas con 10 g de MMT/100 g de SPI respecto de las películas proteicas control). Para las películas plastificadas con sorbitol, sólo se observó el aumento en la solubilidad al incrementarse la concentración de plastificante para las películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI, pero la solubilidad de estas películas también disminuyó con el agregado de MMT, siendo este efecto más marcado a bajas concentraciones de plastificantes (49 y 21 %) al agregar 10 g MMT/100 g SPI a formulaciones con 20 y 60 g sorbitol/100 g SPI respectivamente.

Tabla 2.12: Solubilidad en agua de las películas proteicas y nanocompuestas plastificadas con distintas concentraciones de glicerol y sorbitol.

MMT (g /100 g SPI)	Solubilidad (%)					
	% Glicerol			% Sorbitol		
	15	30	50	20	40	60
0	48,2 ± 1,6 c/A	52,8 ± 2,0 c/A	57,9 ± 0,4 c/B	65,18 ± 0,21 c/A	57,3 ± 5,0 b/A	64,5 ± 7,1 b/A
5	38,3 ± 2,1 b/A	42,5 ± 1,3 b/A	48,3 ± 0,5 b/B	43,8 ± 3,9 b/A	46,6 ± 7,1 a/A	54,2 ± 3,9 a,b/A
10	32,8 ± 1,2 a/A	35,1 ± 1,0 a/A	42,2 ± 1,2 a/B	33,2 ± 1,8 a/A	43,1 ± 1,4 a/B	50,7 ± 1,5 a/C

Se informan valores promedio ± desviación estándar. Medias en la misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Medias en la misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

En la **Figura 2.21** se presenta la permeabilidad al vapor de agua de las películas proteicas y nanocompuestas plastificadas con glicerol (**A**) y sorbitol (**B**). Para todos los sistemas, las películas plastificadas con glicerol presentaron WVP mayores que para las plastificadas con sorbitol, debido a la mayor higroscopicidad del glicerol, en concordancia con estudios previos ya publicados con otras películas proteicas (Gontard y col., 1993; Gennadios y col., 1994; Jangchud y col., 1999; Coupland y col., 2000; Alvarez Hayes y col., 2003; Tapia-Blácido y col., 2007) o de polisacáridos (García y col., 1999; Mali y col., 2005; Müller y col., 2008). Para ambos plastificantes, WVP aumentó significativamente al aumentar la concentración de los mismos (Sothornvit y Krochta, 2000; Gontard y col., 1993; Cuq y col., 1997; Sobral y col., 2001) y disminuyó significativamente con el agregado de 10 g MMT/100 g SPI. Siendo estas disminuciones superiores para las películas plastificadas con sorbitol, especialmente a concentraciones bajas de este plastificante.

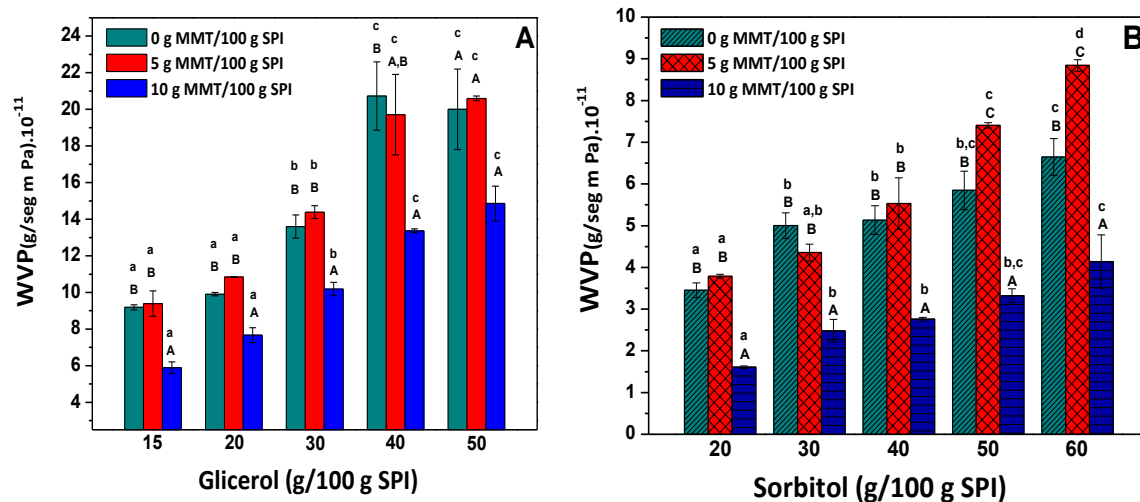


Figura 2.21: Permeabilidad al vapor de agua de películas proteicas reforzadas con MMT plastificadas con distintas concentraciones de glicerol (A) y sorbitol (B). Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de MMT en función de la concentración de plastificante ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de plastificante en función de la concentración de MMT ($p \leq 0,05$).

Es evidente que si bien el agregado de plastificantes favorece la intercalación/exfoliación de las arcillas, su presencia aumenta el carácter hidrofílico de las matrices y favorecen el paso del agua. Lavorgna y col. (2010) observaron una disminución en WVP con el agregado de MMT a matrices de quitosano que la atribuyeron a la dispersión y orientación de las capas de silicatos en la matriz y a las posibles interacciones entre la matriz y la arcilla. Ellos también observaron una reducción menor en WVP en presencia de glicerol y lo atribuyeron al efecto plastificante de este compuesto que reduce las interacciones puentes de hidrógeno entre el quitosano y la MMT, dificultando la floculación y dejando a las plaquetas de MMT orientadas al azar (*random*), mientras que en ausencia del plastificante ocurría una alineación y floculación de las plaquetas de arcilla, según resultados obtenidos por análisis más complejos de difracción de rayos X. Tal suposición la graficaron como se muestra en la **Figura 2.22** extraída de la respectiva publicación.

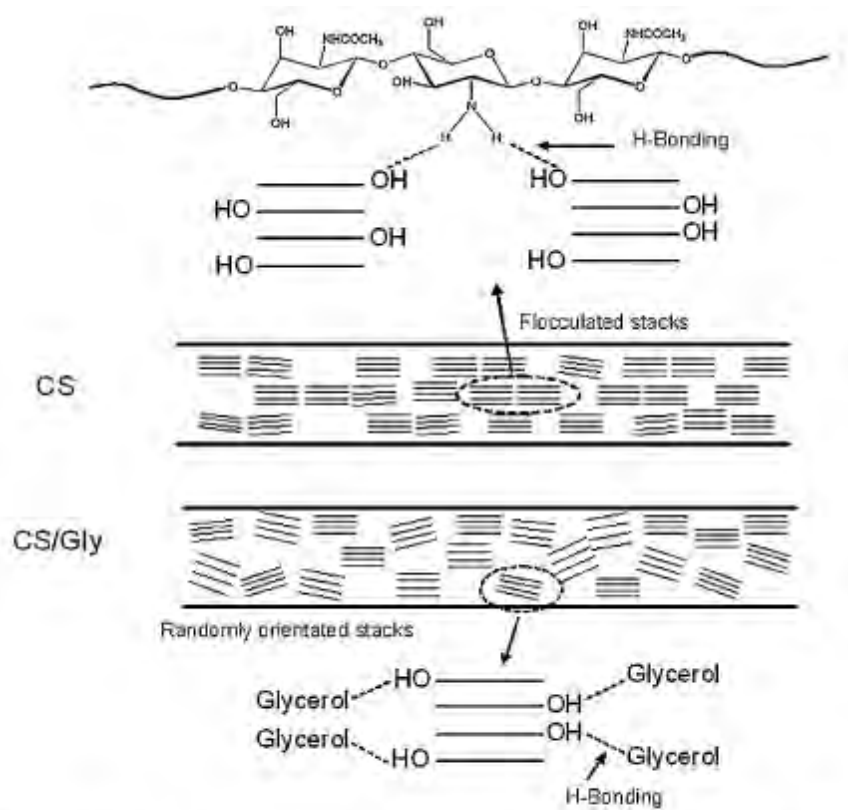


Fig. 3. XRD schematic representation of the Na-MMT stacks orientation as ruled by the presence of glycerol plasticizer.

Figura 2.22: Representación esquemática de la orientación de las plaquetas de MMT debido a la presencia de glicerol, donde CS es quitosano y CS/Gly es quitosano/glicerol (Extraído de Lavorgna y col., 2010).

Es evidente que el grado de intercalación/exfoliación alcanzado en las películas con 10 g MMT/100 g SPI, dificulta más el paso del agua por la matriz que en las películas con menor concentración de arcilla. Y el agregado de glicerol, si bien puede favorecer aun más la exfoliación, también incrementa la hidrofiliidad de la matriz favoreciendo la solubilización de las películas. Con el fin de ahondar aun más en la hidrofiliidad/hidrofobicidad de las películas, se analizó el ángulo de contacto formado al depositar una gota de agua sobre las mismas. En la **Tabla 2.13** se muestran los resultados encontrados para las películas nanocompuestas con diferentes concentraciones de glicerol o sorbitol. Las películas proteicas plastificadas con sorbitol, mostraron menores ángulos de contacto que las de glicerol, a pesar de haber presentado menores WVP evidenciando nuevamente que las propiedades humectantes estáticas y dinámicas no necesariamente están relacionadas (Tunc

y col, 2007). La mayor hidrofiliidad superficial provocada por el sorbitol, podría relacionarse con el mayor número de grupos oxhidrilos (-OH) por molécula, capaces de interactuar con el agua. El agregado de concentraciones crecientes de plastificantes a las películas proteicas y nanocompuestas provocó una disminución en el ángulo de contacto, siendo más marcado el efecto para el glicerol y dando indicio de una mayor hidrofiliidad superficial provocada por los plastificantes. Pero al agregar MMT a las formulaciones el efecto fue contrario según el plastificante utilizado. En las matrices que contenían glicerol, la presencia de la arcilla aumentó aún más la hidrofiliidad superficial, mientras que para las películas que contenían sorbitol, el ángulo de contacto aumentó al incrementarse la concentración de MMT, lo que daría indicio de una mayor hidrofobicidad superficial. Posiblemente el sorbitol interactúa con la arcilla de manera tal que además de favorecer el grado de exfoliación e intercalación de la arcilla, deja menos grupos hidrofílicos en la superficie.

Tabla 2.13: Ángulo de contacto de las películas proteicas (0 g MMT/100 g SPI) y nanocompuestas (5 y 10 g MMT/100 g SPI) plastificadas con glicerol o sorbitol en distintas concentraciones.

MMT (g /100 g SPI)	Angulo de contacto					
	% Glicerol			% Sorbitol		
	15	30	50	20	40	60
0	61,0 ± 1,5 b/C	51,6 ± 3,6 b/B	32,4 ± 2,7 b/A	35,7 ± 1,1 a/C	23,2 ± 0,9 b/B	18,7 ± 0,2 b/A
5	48,4 ± 1,7 a/C	40,2 ± 1,4 a/B	23,4 ± 1,7 a/A	40,0 ± 1,0 b/C	31,5 ± 0,7 a/B	26,7 ± 0,9 a/A
10	50,9 ± 0,9 a/C	40,1 ± 2,6 a/B	23,8 ± 1,6 a/A	41,6 ± 1,8 b/C	33,7 ± 1,6 a/B	26,3 ± 1,2 a/A

Se informan valores promedio ± desviación estándar. Para cada plastificante: medias en la misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$); medias en la misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

2.3.3.3. Propiedades mecánicas

En la **Figura 2.23** se muestran las propiedades mecánicas medidas con ensayos en tracción - resistencia (σ_{max}) y elongación (ϵ_{max}) a la rotura, y el módulo elástico (**E**)- de las películas SPI y SPI/MMT plastificadas con distintas concentraciones de glicerol y sorbitol. Es evidente que los plastificantes y la montmorillonita tienen efectos inversos. En todos los sistemas estudiados al aumentar la concentración de glicerol y/o sorbitol aumenta la elongación de las películas en detrimento de la tensión máxima a la rotura y el modulo elástico.

El efecto del glicerol resultó más marcado que el del sorbitol, en concordancia como muchos estudios que figuran en la bibliografía (Thomazine y col., 2005; Cuq y col., 1997; Tapia-Blácido y col., 2011; Shaw y col., 2002; Al-Hassan y Norziah, 2011; Ryu y col., 2002; Bourtoom, 2008; Dias y col., 2010 y 2011), y puede atribuirse al mayor poder plastificante de este compuesto de menor peso molecular y con mayor capacidad de retener agua en la matriz (Dias y col., 2010). Las películas proteicas plastificadas con concentraciones de sorbitol inferiores a 20 g/100 g SPI no pudieron ser totalmente caracterizadas debido a la fragilidad que presentaban. Cho y Rhee (2002) reportaron la formación de películas proteicas de soja plastificadas con 50 % de glicerol y sorbitol con tensiones a la rotura similares a las de este trabajo, pero con elongaciones menores.

Al agregar MMT a todas las formulaciones en base a SPI con distintas concentraciones de glicerol o sorbitol, se observó un aumento en la resistencia a la rotura (σ_{max}) y el módulo elástico (**E**) y una disminución en la elongación a la rotura (ϵ_{max}) de las respectivas películas. Así, el agregado de arcillas a formulaciones con bajas concentraciones de sorbitol, provocó una fragilidad que no permitió la manipulación de las películas nanocompuestas. Para ambos plastificantes el efecto refuerzo sobre el módulo elástico resultó ser más significativo al aumentar la concentración de plastificante, como se demuestra en la **Tabla 2.14** y esto podría ser atribuido al mayor grado de exfoliación/intercalación alcanzado en los sistemas más plastificados.

Tabla 2.14: Aumento en los módulos elásticos al agregar 10 g MMT/100 g SPI para las formulaciones plastificadas con distinta concentración de glicerol o sorbitol respecto de las películas proteicas con igual concentración de plastificante.

Plastificante (g/100 g SPI)	ΔE glicerol (%)	ΔE sorbitol (%)
15	148	-
20	178	-
30	282	201
40	336	208
50	310	283
60	-	329

Por otro lado, para todos los sistemas plastificados con glicerol (con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI) se observó el mismo grado de disminución en la tensión a la rotura (≈ 73 %) y en el modulo elástico (≈ 93 %) al aumentar la concentración de plastificante entre 15 y 50 g/100 g SPI. Mientras que para los sistemas plastificados con sorbitol, la disminución en la tensión fue del 48, 37 y 13 % para los sistemas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI al aumentar la concentración de sorbitol de 40 a 60 g/100 g SPI, y la disminución en el modulo elástico fue de 56, 48 y 39 % respectivamente. Estos resultados estarían indicando que la MMT incorporada en la formación enmascara en parte el efecto plastificante del sorbitol, lo que estaría relacionado con una distribución diferencial de este plastificante en presencia de la arcilla, tal vez relacionada con una mayor afinidad por la arcilla.

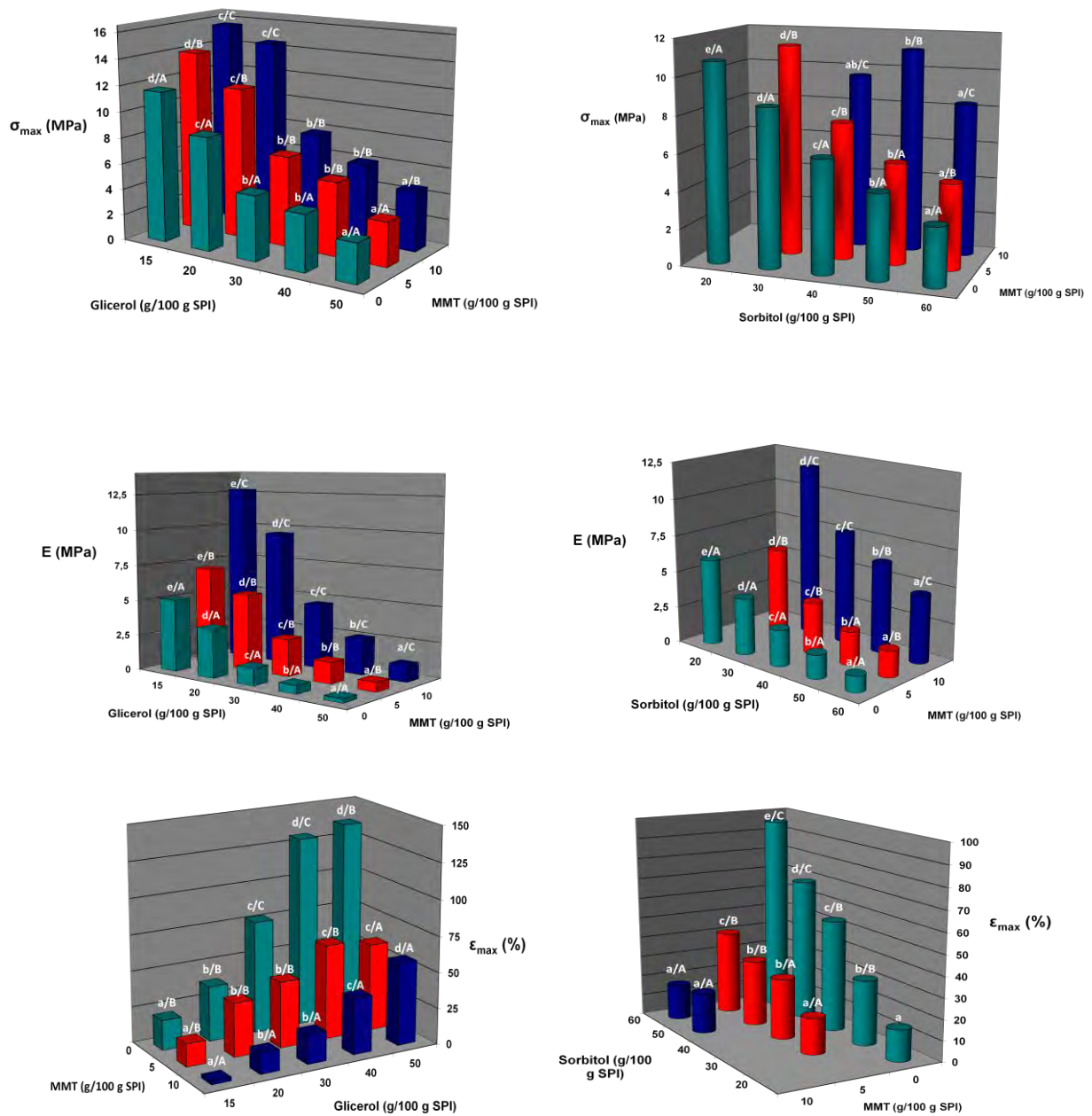


Figura 2.23: Propiedades mecánicas -medidas en tracción- de películas proteicas reforzadas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI (verde, rojo y azul, respectivamente) plastificadas con distintas concentraciones de glicerol o sorbitol. Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferente para cada concentración de MMT en función de la concentración de plastificante ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferente para cada concentración de plastificante en función de la concentración de MMT ($p \leq 0,05$).

2.3.3.4. Apariencia

No se observaron diferencias notorias en la apariencia visual de las películas proteicas y nanocompuestas plastificadas con glicerol o sorbitol. Todas las películas analizadas resultaron ser homogéneas y flexibles, con un espesor similar. En la **Figura 2.24** se muestra una película plastificada con glicerol y otra con sorbitol, a modo de ejemplo. Los parámetros de color de Hunter Lab, así como la opacidad de las películas se presentan en la **Figura 2.25**.

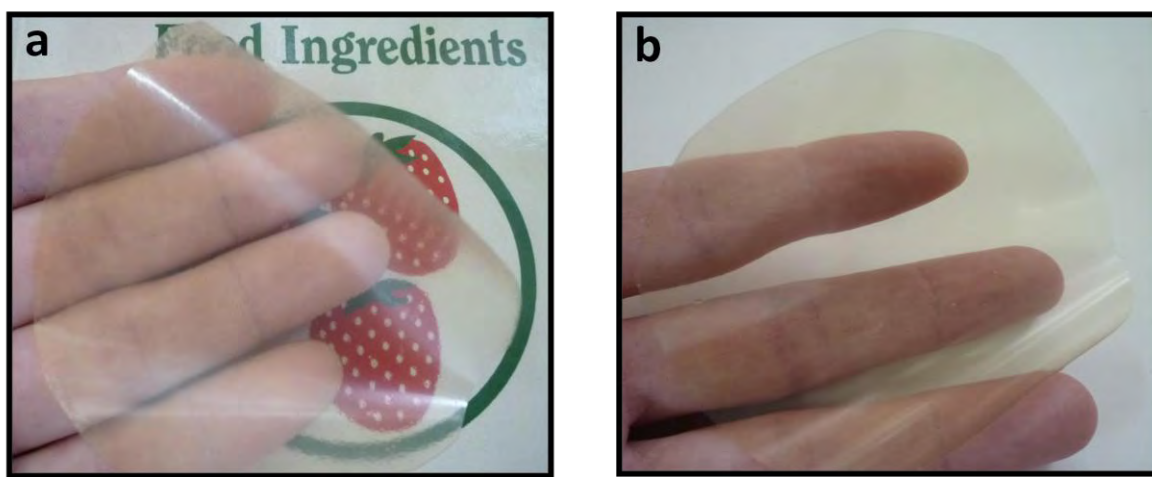
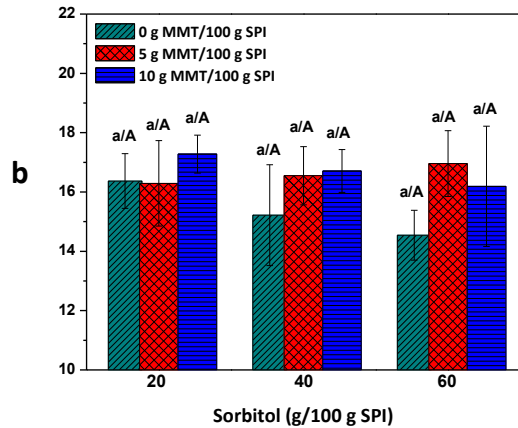
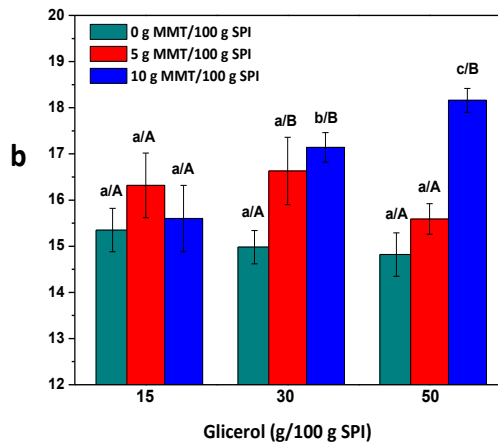
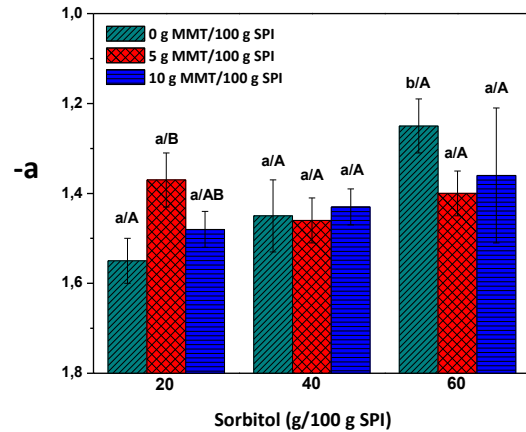
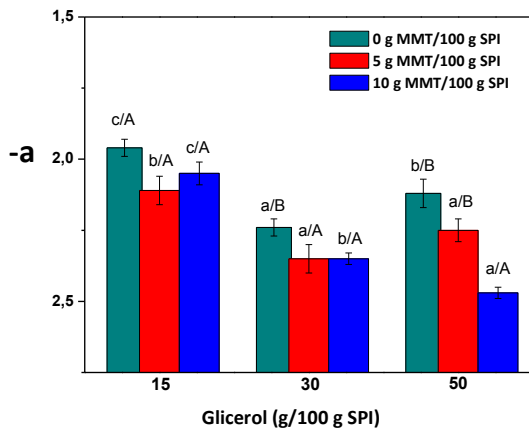
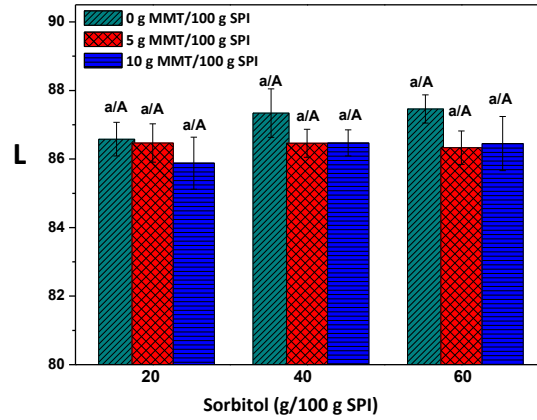
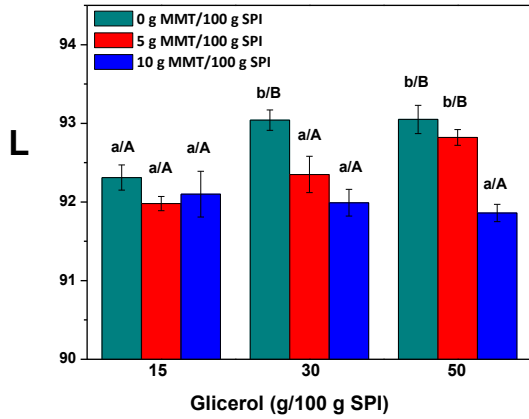


Figura 2.24: Apariencia visual de películas con 5 g MMT/100 g SPI plastificadas con (a) 30 % de glicerol y (b) 40 % de sorbitol.

En general las películas plastificadas con sorbitol mostraron una menor claridad (menores valores de L) y similares valores de a, b y ΔE que las de glicerol. Independientemente de la concentración de arcilla y de sorbitol, todas las películas presentaron una claridad, coloración y opacidad similar, sólo las películas proteicas con baja concentración de sorbitol mostraron una mayor opacidad que el resto de las películas plastificadas con el mismo plastificante.

Por otra parte, los sistemas plastificados con glicerol tampoco mostraron diferencias importantes. Al aumentar la concentración de glicerol en los sistemas pareciera haber un aumento en la luminosidad, y un pequeño aumento en la coloración de las películas nanocompuestas (b más positiva y a más negativa, para los sistemas con 10 g MMT/100 g de SPI); así como un aumento en la coloración y una disminución de la opacidad al incrementarse la concentración de MMT en los sistemas con 30 y 50 g de glicerol/100 g SPI.

Cabe señalar que la magnitud de los cambios fue pequeña, tal que realmente no se lograron visualizar y no implicarían un cambio en la posible aplicación de los materiales por su apariencia.



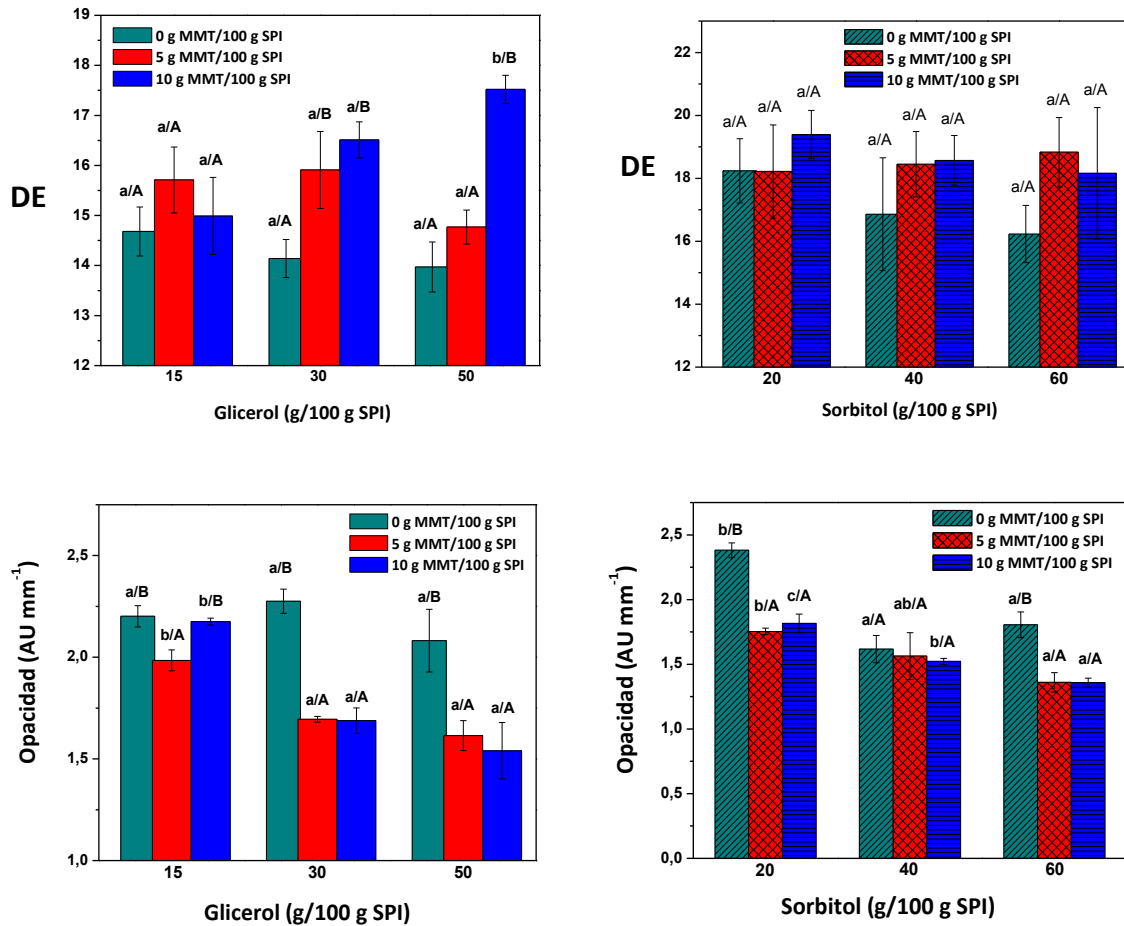


Figura 2.25: Valores de luminosidad (L), cromaticidad (a y b), diferencia de color (ΔE) y opacidad de las películas nanocompuestas con diferentes concentraciones de MMT, plastificadas con diferentes concentraciones de glicerol o sorbitol. Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de MMT en función de la concentración de plastificante ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de plastificante en función de la concentración de MMT ($p \leq 0,05$).

Los resultados analizados demuestran que el agregado de concentraciones crecientes de plastificantes favorece la exfoliación/intercalación de las arcillas en la matriz proteica, y esto genera un mayor efecto refuerzo en las propiedades mecánicas de los materiales compuestos a mayores concentraciones de arcilla, aunque menores propiedades relacionadas con la sensibilidad al agua de las películas. El efecto de la MMT pareciera ser más marcado en los sistemas plastificados con sorbitol, lo que permitiría pensar en una mayor afinidad de este

plastificante por la arcilla, o de ser similar la diferencia de pesos moleculares respecto del glicerol haría que menos sorbitol quede disponible para interaccionar con la proteína. Dado el efecto inverso de las arcillas (refuerzo) y del sorbitol y glicerol (plastificante), la variación de las concentraciones de estos compuestos permitió obtener materiales con propiedades diferenciales, que podrían utilizarse para distintas aplicaciones.

2.3.4. Efecto del pH de la dispersión filmogénica sobre las propiedades de películas nanocompuestas

Como se anticipó en la introducción de ese capítulo, el pH es una variable que además de variar la conformación de las proteínas afecta también su carga, lo que seguramente afectará las posibles interacciones con la MMT, y se reflejará en la funcionalidad de los materiales resultantes. En esta sección se estudió el efecto de la variación del pH de las dispersiones proteicas iniciales (pH= 2, 7 y 10,5) en las propiedades de las películas nanocompuestas resultantes.

2.3.4.1. Formación de las películas

Se estudio la formación de películas por casting a partir de dispersiones de aislado proteico al 5 % p/v, plastificadas con glicerol (25 g/100 g SPI) y con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI a pH 2, pH 7 y pH 10,5 según el procedimiento detallado en la sección 2.2.2. Las condiciones de pH se escogieron en función de lo descrito en bibliografía para películas proteicas (Mauri y Añón, 2006; Gennadios y col., 1993; Flint y Johnson, 1981; Sian y Ishak, 1990; Song y col., 2011). En todos los casos se obtuvieron películas homogéneas, de espesores similares ($\approx 71 \mu\text{m}$) que fueron fácilmente removibles de las placas y mostraron superficies suaves al tacto.

2.3.4.2. Caracterización de las películas

2.3.4.2.1. Morfología

En la **Figura 2.26** se muestran los patrones de difracción de rayos X correspondientes a la MMT natural y a la de las películas proteicas y nanocompuestas formadas a partir de dispersiones a distintos pH. Nuevamente, el espectro de la MMT natural presenta su pico característico $2\theta = 7,21^\circ$ ($d_{001} = 1,2$ nm) y los de las películas proteicas de soja, que no contienen ningún componente cristalino en su formulación, no presentan ningún pico a los tres pH evaluados. En los espectros de las películas proteicas con 5 y 10 g MMT/100 g SPI a pH 2 y 10, 5 no se observa el pico característico de la MMT, ni la aparición de algún otro pico a ángulos menores, solo el levantamiento de la línea de base sin lograrse diferenciar al menos algún hombro. Este levantamiento de la línea de base, que estaría asociado a una estructura intercalada/exfoliada, se intensifica al aumentar la concentración de arcilla en la formulación, y también pareciera ser más importante para las películas a pH ácido que básico. Para las películas con 5 g MMT/100 g SPI este levantamiento es aún más pronunciado a pH 7, mientras que para las películas que contienen 10 g MMT/100 g SPI sí aparece un pico a $2\theta = 3^\circ$, correspondiente a una estructura intercalada en la que la proteína penetró entre las laminas de arcilla logrando una separación interlaminar (d_{001}) igual a 2,94 nm. Es evidente que a pH extremos (más alejados del pI de las proteínas de soja), las cadenas proteicas más cargadas (positiva o negativamente) son capaces de interpenetrar entre las láminas de arcilla de manera tal de llegar incluso a exfoliarlas. A pH neutros, y especialmente a mayores concentraciones de arcilla, aún coexisten con esas estructuras más exfoliadas otras intercaladas.

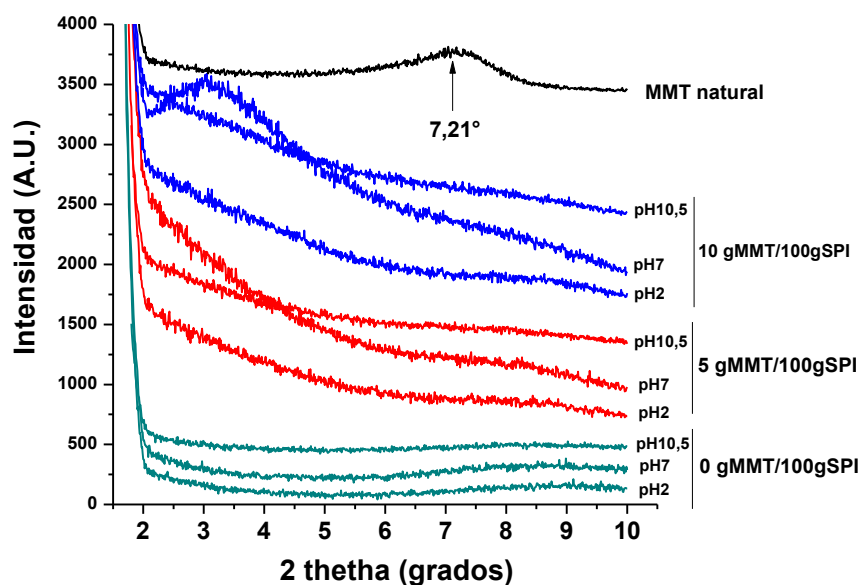


Figura 2.26: Espectros de difracción de rayos X de arcilla natural y de películas hechas a partir de SPI reforzadas con distintas concentraciones de MMT (0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI) a diferentes pH (2, 7 y 10,5).

2.3.4.2.2. Susceptibilidad al agua

En la **Tabla 2.15** se presenta el contenido de agua y la solubilidad de las películas proteicas de soja con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI formadas a partir de dispersiones a pH 2, 7 y 10,5. La humedad de las películas proteicas formadas a pH ácido y neutro no mostraron diferencias significativas en ninguna de estas propiedades y resultaron ser significativamente menores que las formadas a pH alcalino. Estos resultados difieren de los publicados por Mauri y Añón (2006) que al trabajar con películas formadas a partir de un aislado proteico de soja nativo, observaron que las películas ácidas presentaban mayor carácter hidrofílico que las formadas a pH neutro o básico, pero cabe resaltar que las proteínas usadas en este trabajo se encontraban totalmente desnaturalizadas desde el inicio. Teniendo en cuenta que el pI de las proteínas de soja se encuentra a pH \approx 4,5, las películas a pH 10,5 presentarán mayor densidad de carga que las otras (a pH 7) por estar el pH más alejado al pI, y este podría ser uno de los motivos por el cual esta película presente un mayor contenido de agua. Para todas las formulaciones, el agregado de arcillas produjo una gradual disminución en el valor de humedad de las películas, siendo este efecto más importante en las películas alcalinas.

Así al agregar 10 g MMT/100 g SPI, el contenido de agua disminuyó 17,2, 18,7 y 22 % para las películas a pH 2, 7 y 10,5.

Tabla 2.15: Contenido de agua y solubilidad en agua de películas proteicas de soja con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI formuladas a pH ácido, neutro y alcalino.

MMT (g /100 g SPI)	Contenido de agua (%)			Solubilidad (%)		
	pH			pH		
	2	7	10,5	2	7	10,5
0	17,7 ± 0,4 c/A	17,7 ± 0,2 c/A	21,7 ± 0,8 c/B	42,0 ± 0,7 a/A	41,9 ± 0,9 a/A	51,2 ± 0,8 c/B
5	16,5 ± 0,6 b/A	15,6 ± 0,3 b/A	18,6 ± 0,1 b/B	40,8 ± 1,8 a/A	42,7 ± 1,8 a/A	39,5 ± 1,7 b/A
10	14,7 ± 0,2 a/A	14,4 ± 0,5 a/A	17,0 ± 0,8 a/B	39,8 ± 2,6 a/A	40,8 ± 2,7 a/A	33,6 ± 0,4 a/A

Se informan valores promedio ± desviación estándar. Medias en la misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Medias en la misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

El agregado de arcilla no modificó la solubilidad en agua de las películas a pH 2 y 7 respecto de sus respectivos controles, pero sí disminuyó en un 34 % la solubilidad de la película con 10 g MMT/100 g SPI a pH 10,5.

En la **Tabla 2.16** se muestran los valores de los ángulos de contacto para las películas nanocompuestas a distintos pH. Los valores en el ángulo de contacto de las películas proteicas a pH 2 y 7 dan idea de una superficie mucho más hidrofílica (10,1° y 21,8° respectivamente) que la correspondiente a pH 10,5 (73,9°). Es evidente que a ese pH, durante el secado ocurre un entrecruzamiento tal que los grupos hidrofóbicos de la proteína quedan más expuestos a la superficie, mientras que los grupos hidrofílicos seguramente hacia el interior de la película, y por eso esta película sea más soluble y contenga más agua. Tal como se describió en las secciones anteriores, las películas nanocompuestas a pH 10,5, presentaron ángulos de contacto inferiores a los de las respectivas películas proteicas. Pero a diferencia de estas, al agregar arcilla a las películas ácidas y neutras, el ángulo de contacto aumentó (70 y 35 % al pasar de 0 a 10 g MMT/100 g SPI en las formulaciones a pH 2 y 7

respectivamente) indicando una mayor hidrofobicidad superficial que los controles. Es evidente, que en estos sistemas las interacciones iónicas juegan un papel importante, y al variar la carga de la proteína se generan distintas interacciones entre la arcilla, las cadenas de proteínas y el glicerol, acompañadas de cambios conformacionales que pueden modificar el grado de hidrofiliidad-hidrofobicidad de la superficie. Por último, también para las películas nanocompuestas con 5 y 10 g MMT/100 g SPI, se observó un aumento de la hidrofobicidad -dado por un aumento en el ángulo de contacto- al alcalinizar progresivamente el pH de la dispersión formadora de película.

Tabla 2.16: Ángulo de contacto de películas nanocompuestas formuladas a pH ácido, neutro y alcalino.

MMT (g/100 g SPI)	Angulo de contacto		
	pH		
	2	7	10,5
0	10,12 ± 1,08 a/A	21,80 ± 0,83 a/B	73,93 ± 1,59 c/C
5	12,36 ± 0,60 b/A	25,74 ± 0,80 b/B	41,09 ± 4,50 b/C
10	17,18 ± 1,04 c/A	29,53 ± 1,98 c/B	24,13 ± 1,96 a/B

Se informan valores promedio ± desviación estándar. Medias en la misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Medias en la misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Se estudió también el efecto del pH de la formulación inicial sobre las propiedades barrera al vapor de agua de películas de SPI/MMT (**Figura 2.27**). Las películas proteicas presentaron mejores propiedades barrera al vapor de agua a pH alcalino que a pH ácido, en concordancia con resultados de otros autores (Genadios y col, 1993; y Mauri y Añón, 2006), quienes lo atribuyeron al tipo de interacciones que estabilizaban la red proteica, siendo más importantes los puentes de hidrógeno y menos las hidrofóbicas a pH ácido.

Para los tres pH estudiados, el agregado de arcilla disminuyó la WVP, obteniéndose las mejores propiedades barrera a pH neutro y alcalino (32 % y 38 % respectivamente, para 10 g MMT/100 g SPI). Es evidente que hay dos factores importantes que están jugando un papel fundamental: el grado de intercalación/exfoliación de la arcilla en la matriz, y el tipo de interacciones involucradas en la estabilización de la matriz proteica (entre proteínas, arcilla y

plastificante). Las películas nanocompuestas alcalinas que presentaron el mayor grado de exfoliación por difracción de rayos X, y las nanocompuestas neutras que fueron las que mayor grado de intercalación presentaron, mostraron permeabilidades similares. Para poder llegar a comprobar esta deducción, otros análisis deberían realizarse con la intención de dilucidar el tipo de interacciones presentes en cada película.

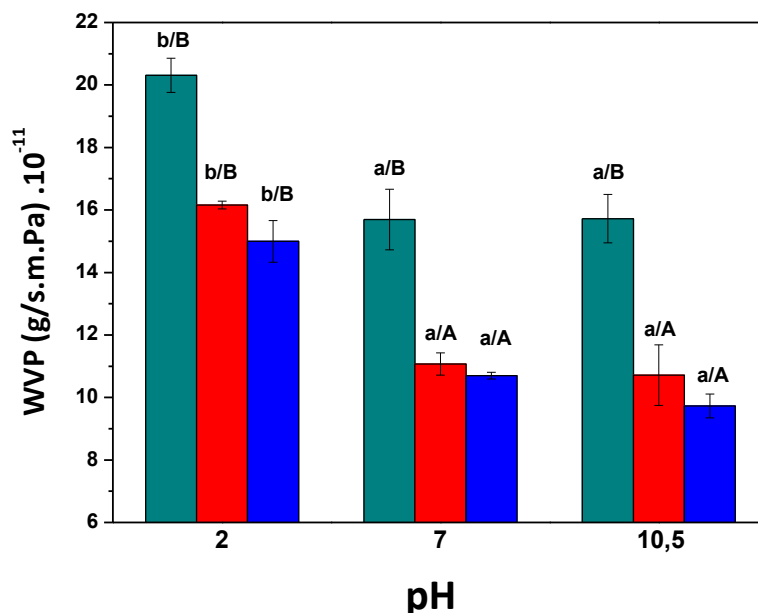


Figura 2.27: Permeabilidad al vapor de agua de películas de SPI (■) y de SPI con 5 (■) y 10 (■) g MMT/100 g SPI en función del pH. Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de MMT en función del pH ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferentes para cada pH en función del % de MMT ($p \leq 0,05$).

2.3.4.2.3. Propiedades mecánicas

En la **Figura 2.28** se muestran las propiedades mecánicas de las películas proteicas y nanocompuestas formadas a partir de dispersiones a distinto pH. Las películas proteicas a pH neutro y alcalino, mostraron mejores propiedades mecánicas (tensión y elongación a la rotura, y módulo elástico) que las películas ácidas. Gennadios y col. (1993) al estudiar el efecto del pH de la solución filmogénica sobre las propiedades mecánicas de películas en base a SPI, también encontraron que las películas preparadas de pH 6 a 9 tenían mayor resistencia a la tracción y mayor elongación a la ruptura que aquellas preparadas de pH 1 a 3. Posiblemente los puentes disulfuros, cuya formación se favorece a pH alcalinos, pueden

estar jugando un papel importante en la estabilización de estas matrices, y contribuir a estas propiedades mecánicas.

Para todos los pH evaluados, al agregar arcilla a la formulación aumentó la resistencia a la tracción y el módulo elástico, a la vez que disminuyó significativamente la elongación. Y al igual que para las películas de soja, las reforzadas con arcilla a pH 7 y 10,5 presentaron mayores resistencia a la tracción, elongación y módulo elástico que las de pH 2. Siendo el efecto refuerzo otorgado por la arcilla superior a pH neutros y alcalinos.

Al igual que se discutió al analizar WVP, es evidente que a pH neutros y alcalinos, las interacciones entre la matriz y la arcilla, además del grado de exfoliación/intercalación alcanzado, son las responsables del importante efecto refuerzo que ejerce la MMT sobre la matriz proteica de soja.

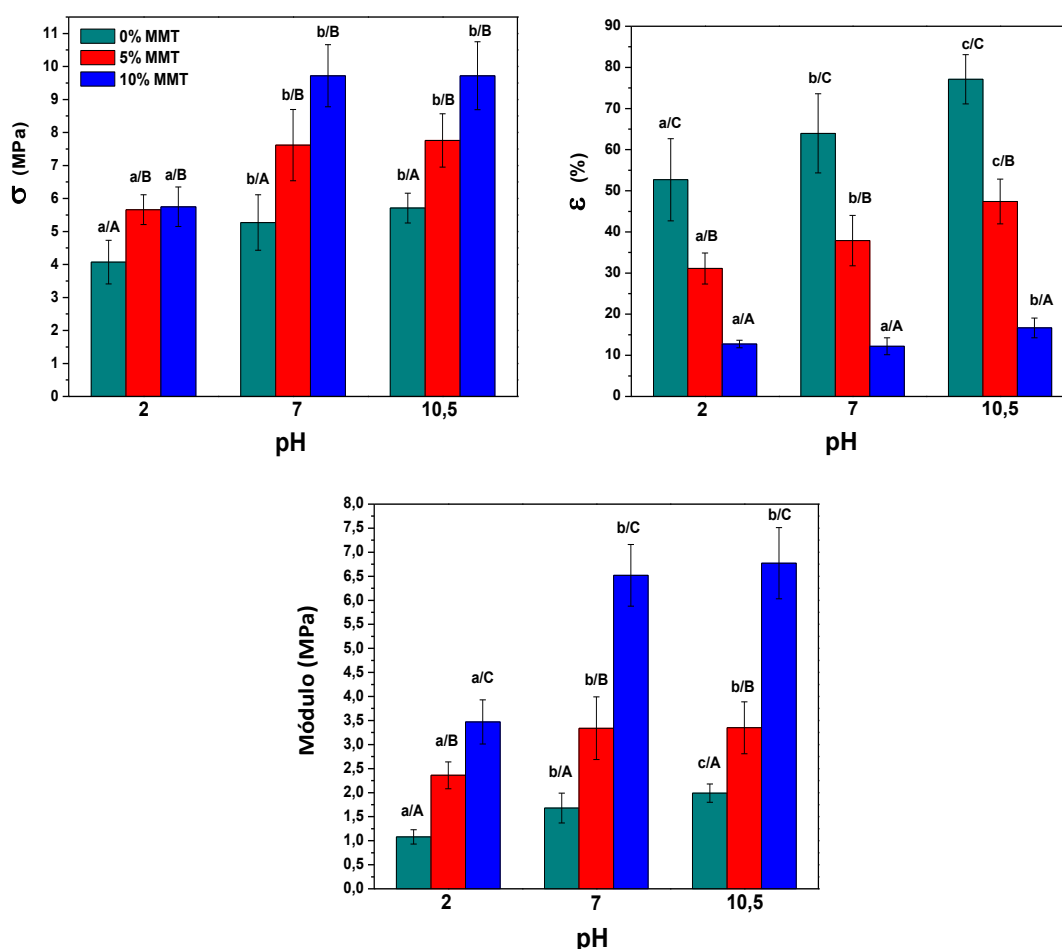


Figura 2.28: Propiedades mecánicas (medidas en tracción) de películas de SPI (■) y de SPI con 5 (■) y 10 (■) g MMT/100 g SPI en función del pH. Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de MMT en función del pH ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferentes para cada pH en función del % de MMT ($p \leq 0,05$).

2.3.4.2.4. Apariencia

En la **Figura 2.30** se muestran los parámetros de color y la opacidad de las películas estudiadas.

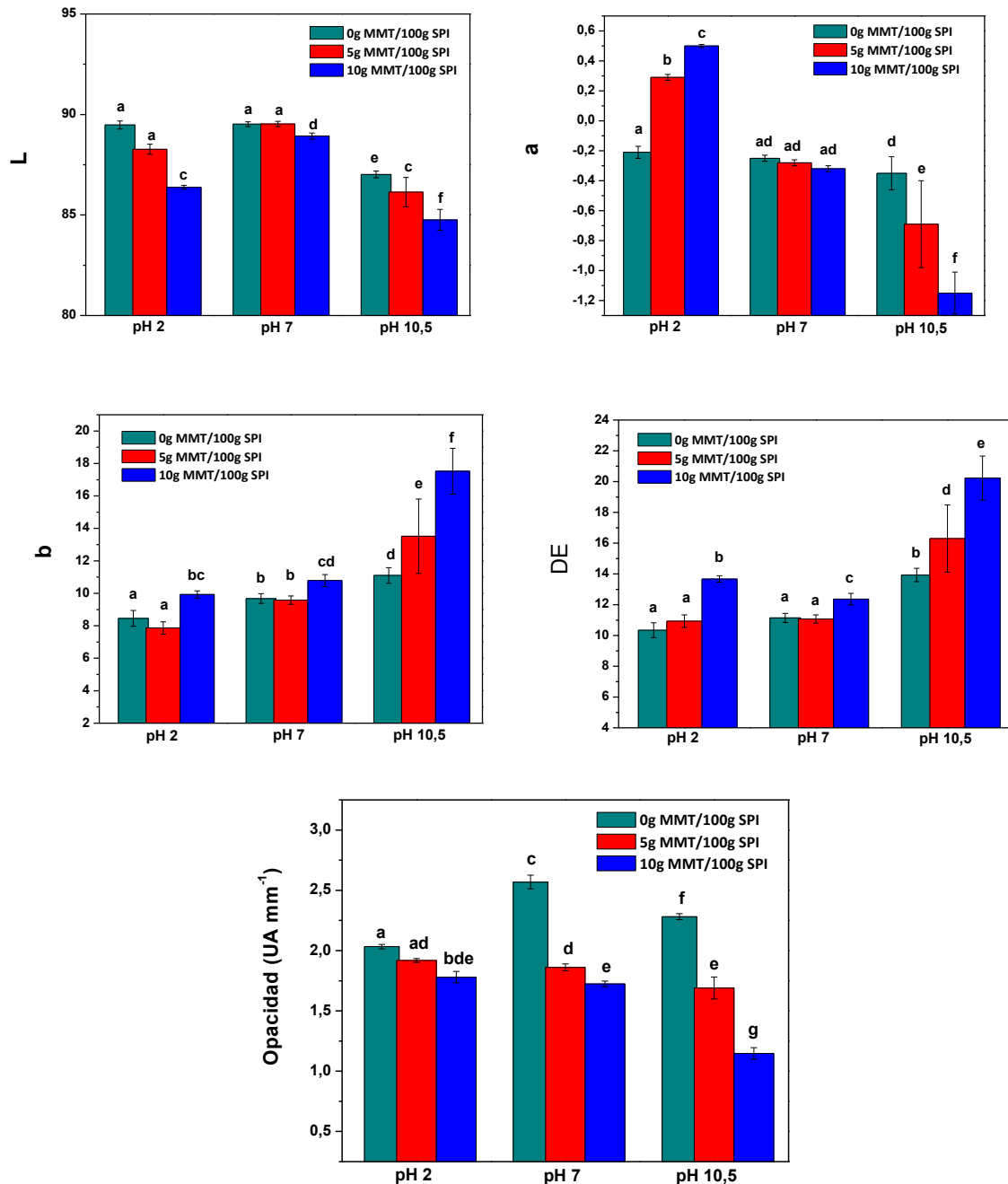


Figura 2.30: Valores de luminosidad (L), cromaticidad (a y b), diferencia de color (ΔE) y opacidad de las películas nanocompuestas con diferentes concentraciones de MMT preparadas a diferentes pH. Medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de MMT en función de la concentración de plastificante ($p \leq 0,05$). Medias con letras mayúsculas distintas son significativamente diferentes para cada concentración de plastificante en función de la concentración de MMT ($p \leq 0,05$).

Del análisis de esos parámetros se observa que la coloración aumenta al alcalinizar la dispersión filmogénica, obteniéndose películas más oscuras ($< L$ y a), y más coloreadas ($> \Delta E$) con una tonalidad más amarillenta ($> b$). No se encontraron diferencias muy importantes entre la coloración de las películas ácidos y neutras. Inclusive, a pH alcalino, se observaron también las diferencias más importantes debidas al agregado de arcilla (mientras que L , a y la opacidad disminuyen, b y ΔE aumentan). Pero a pesar de las variaciones encontradas en estos parámetros, las diferencias en la apariencia visual de estos materiales, no son lo suficientemente importantes como para llegar a excluir a alguna formulación para determinada aplicación. Janchud y Chinnan (1999) estudiaron el efecto de la variación del pH (6 y 9) de las soluciones filmogénicas sobre películas de proteínas de maní, observando la misma tendencia en los parámetros de color.

A pH neutro y alcalino la arcilla logró reforzar a la matriz proteica más eficientemente que a pH ácido, reflejándose en mejores propiedades mecánicas, barrera al vapor de agua, solubilidad e hidrofobicidad superficial, lo que puede relacionarse con la buena dispersión de la arcilla en la matriz (por exfoliación y/o intercalación de la misma) y por las interacciones proteína-proteína y proteína-arcilla.

2.4. Conclusiones

a. Se prepararon películas nanocompuestas flexibles de matriz proteica de soja reforzadas con distintas concentraciones de montmorillonita (hasta un 10 g MMT/100 g SPI), mediante la técnica de *casting*. Estas películas resultaron homogéneas, amarillentas y transparentes, no observándose diferencias visuales importantes en comparación con las películas proteicas.

b. El proceso utilizado para la formación de las películas, que incluye agitación mecánica y un tratamiento con ultrasonido, así como la alta afinidad de la MMT con las proteínas de soja, favorecieron la dispersión de la arcilla, alcanzando un muy buen grado de exfoliación/intercalación de las capas de la MMT entre las proteínas.

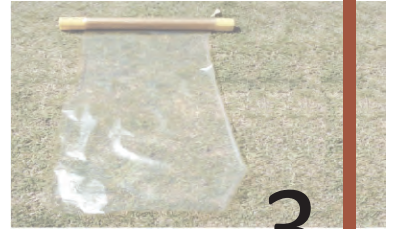
c. La buena dispersión y distribución de la MMT en las películas generó un efecto refuerzo importante que se visualizó en un aumento en su resistencia a la rotura y módulo elástico, y en una disminución de su elongación, contenido de humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua.

d. Las interacciones entre proteínas que estabilizan a las matrices nanocompuestas variaron respecto de las proteicas. En presencia de MMT los puentes disulfuro mostraron una mayor importancia, mientras que los grupos capaces de interactuar por puentes de H estarían involucrados en otros tipos de interacciones de mayor estabilidad, posiblemente con la arcilla.

e. El aumento de la concentración de glicerol o sorbitol, además de plastificar a las matrices proteicas y nanocompuestas, favoreció la exfoliación: intercalación de la arcilla, pareciendo ser más efectivo el efecto refuerzo de la arcilla en sistemas plastificados con sorbitol que con glicerol.

f. Dado el efecto inverso en las propiedades de las películas que tienen los plastificantes respecto al de la arcilla, la variación conjunta de la concentración de sorbitol o glicerol y de MMT posibilitó la formación de una serie de materiales con propiedades diferenciales.

g. Las películas nanocompuestas obtenidas a partir de dispersiones de SPI y MMT a pH neutros y básicos, mostraron mejor funcionalidad que aquellas formadas a pH ácido.



3

Obtención de películas nanocompuestas a escala planta piloto



3. Obtención de películas nanocompuestas a escala planta piloto

3.1. Introducción

En el capítulo anterior, se estudió la formación de películas flexibles en base a proteínas de soja y montmorillonita natural por *casting*. Si bien el método de *casting* es el más utilizado a escala de laboratorio por la mayoría de los investigadores, no se puede convertir en una técnica de fabricación de películas a gran escala (Larotonda, 2007).

La técnica de *spread coating* (SC), empleada en la industria plástica para la fabricación de telas de PVC reforzadas, fue adaptada por el grupo de técnicos y profesionales del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI-Plásticos) para dar lugar al diseño y desarrollo de un equipamiento de planta piloto, que permite la obtención de películas a partir de soluciones filmogénicas a escala superior a la obtenida por *casting*. El equipo desarrollado permite obtener películas (40 cm de ancho x 4-6 metros de largo aproximadamente) en forma continua.

Por otra parte, para la mayoría de los polímeros con importancia tecnológica, el método de intercalación por fundido directo es el más versátil y ambientalmente amigable entre todos los métodos de preparación de nanocompuestos de polímero y arcilla (Ray y Bousmina, 2005). Las ventajas de la formación de nanocompuestos por intercalación en estado fundido son muy atractivas, lo que hace que esta técnica sea muy prometedora para lograr mejorar en gran medida la aplicación comercial de la tecnología de nanocompuestos a partir de matrices proteicas. La estructura química y viscosidad de fundido de los polímeros influyen en la difusión molecular y el esfuerzo de corte durante la mezcla, que regula la morfología de la nanoestructura de los nanocompuestos (Barick y Tripathy, 2011). El estudio de las condiciones de procesamiento de películas a partir de proteínas empleando esta técnica, la evaluación de las propiedades de las mismas en función de las condiciones de proceso, permitirá adquirir el conocimiento necesario para lograr aumentar el potencial comercial de las películas proteicas, proporcionando una serie de ventajas sobre el *casting*, como por ejemplo, trabajar en un sistema continuo con mejor control de las variables de proceso tales como temperatura, humedad y esfuerzo de corte.

Otra técnica utilizada para la formación de películas flexibles es la termocompresión o termoprensado. Estas proteínas presentan propiedades termoplásticas, por lo que también resulta posible su procesamiento por metodologías más cercanas a las de los plásticos sintéticos, entre ellas termoprensado, inyección, moldeo y extrusión (Orliac y col., 2003; Rouilly y col., 2006), con las que es posible obtener materiales, entre ellos películas, a nivel de escala piloto.

En este capítulo se propone estudiar la obtención de películas nanocompuestas, a partir de proteína de soja reforzadas con montmorillonita natural, empleando técnicas de procesamiento normalmente empleadas en la industria plástica. Y con este objetivo se eligieron los siguientes procesos:

- Procesamiento a partir de soluciones filmogénicas empleando un equipo de *spread coating* (SC)
- Intercalación en fundido empleando mezclador discontinuo y posterior termocompresión

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

Se utilizaron los mismos materiales (aislado proteico, glicerol y montmorillonita natural) descritos en la sección 2.2. Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

3.2.2 Obtención de las películas nanocompuestas por *spread coating* (SC)

Las películas se obtuvieron a partir de dispersiones acuosas que contenían 5 % p/v de SPI, 25 g glicerol/100 g SPI, y distintas proporciones de MMT: 0, 2,5, 5, 10 y 12,5 g /100 g SPI de manera de evaluar el efecto de la concentración de MMT sobre las películas resultantes. Primero se mezclaron el SPI, glicerol y agua destilada con un agitador de paletas a temperatura ambiente (\approx 30 min), ajustando el pH a 10,5. Estas dispersiones se trataron 5 min en ultrasonido y luego se desgasificaron al vacío para eliminar las burbujas. Las

dispersiones filmogénicas resultantes se procesaron en un equipo de spread coating a 60 °C, con una velocidad de cinta de 2 m/h, siendo el tiempo total del proceso 180 min. Las películas obtenidas se acondicionaron a 20 °C y 58 % HR (solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.

3.2.3 Obtención de las películas nanocompuestas por termocompresión

Las películas se formaron por mezcla directa de todos los ingredientes: 22 g de aislado de soja (SPI, SUPRO 500E, The Solae Co.), 8 g de glicerol, 10 g de agua y distintas proporciones de MMT (Cloisite®Na⁺, Southern Clay Products): 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI. Este proceso se realizó en una mezcladora Brabender Plasti-Corder (**Figura 3.1, A**), la cual está equipada con un sistema de monitoreo de los principales parámetros del proceso tales como la temperatura y el torque. Este mezclado se realizó por 5 min a 80 °C, calentándose la proteína hasta el punto de fundido. Las muelas que posee el equipo aplicaron un torque máximo de 30 Nm/Kgm a la muestra generándole fuerza de cizalla y logrando una buena mezcla de todos los componentes. La mezcla obtenida se separó en fracciones de aproximadamente 6 g cada una (**Figura 3.1-C**). Estas piezas se colocaron entre las placas de una prensa hidráulica (**Figura 3.1- B**) con una guía para ajustar el espesor. El prensado posterior se realizó en dos etapas: 1) 50 MPa a 120 °C durante 5 min, y 2) 120 MPa a 90 °C durante 10 min. Las películas resultantes se acondicionaron a 20 °C y 58 % HR (en desecador con una solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.



Figura 3.1: Las fotos muestran los equipos utilizados en el proceso de obtención de películas nanocompuestas por termocompresión, siendo: **A-** Mezcladora Brabender Plasti-Corder y **B-** Prensa hidráulica de moldeado, **(C)** muestra las fracciones obtenidas de la mezcladora a modo de ejemplo.

3.2.4. Caracterización de las películas proteicas

Las películas proteicas obtenidas a partir del aislado proteico de soja y montmorillonita por la técnica de *spread-coating* (SC) y *termocompresión* fueron caracterizadas mediante la determinación del espesor, contenido de agua, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, propiedades térmicas y mecánicas, morfología y estructura empleando difracción de rayos X, DMA, Microscopía Electrónica de Transmisión, como se describió en la sección 2.2.4.

3.2.3. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medidas fueron evaluadas por el Test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha \leq 0,05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Materiales nanocompuestos en base a proteínas de soja-montmorillonita obtenidos por spread coating

3.3.1.1. Apariencia

Se obtuvieron películas flexibles y homogéneas a partir de las dispersiones de SPI con distintas concentraciones de MMT por *spread coating*. Las películas presentaron un color amarillento y translucido, independientemente del contenido de MMT. En la **Figura 3.2**, se presenta la película proteica (sin agregado de MMT) a modo de ejemplo.



Figura 3.2: Fotografía de película proteica de soja (0 g MMT/100 g SPI) formada por *spread coating*.

Por esta metodología fue posible lograr obtener películas nanocompuestas homogéneas con un contenido de hasta 12,5 g MMT/100 g SPI. Con concentraciones de arcilla superiores la dispersión se volvía muy viscosa, dificultándose la manipulación y la eliminación de burbujas.

Las propiedades ópticas de las películas obtenidas se muestran en la **Tabla 3.1**. Al agregar concentraciones crecientes de arcilla, no se observan diferencias importantes en la apariencia visual de las películas, aunque existen pequeñas diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de color (L , a , b y ΔE). Las tendencias en estos parámetros fueron similares a las obtenidas para las películas formadas por casting, sólo que la diferencia en la disminución (L y a) o aumento (b y ΔE) de los parámetros se hace más marcada para las películas con 12,5 g MMT/100 g SPI.

Tabla 3.1: Propiedades ópticas de las películas proteicas obtenidas a partir de SPI con distintos contenidos de MMT por spread coating (SC).

MMT (g /100 g SPI)	Parámetros de Color Hunter Lab			
	L	a	b	ΔE
0	88,70 ± 0,07 ^c	0,04 ± 0,01 ^c	7,59 ± 0,05 ^b	10,28 ± 0,07 ^c
2,5	89,19 ± 0,15 ^d	0,09 ± 0,03 ^d	6,99 ± 0,20 ^a	9,68 ± 0,20 ^b
5	89,42 ± 0,12 ^d	0,09 ± 0,04 ^d	6,33 ± 0,24 ^a	9,14 ± 0,20 ^d
10	88,18 ± 0,05 ^b	-0,10 ± 0,02 ^b	8,84 ± 0,14 ^c	11,57 ± 0,12 ^a
12,5	85,26 ± 0,05 ^a	-0,73 ± 0,03 ^a	17,92 ± 0,13 ^e	20,21 ± 0,13 ^e

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

3.3.1.2. Susceptibilidad al vapor de agua

Los resultados de las mediciones de espesor y contenido de agua de las películas obtenidas se muestran en la **Tabla 3.2**. No se observó una diferencia significativa en los valores de espesor de las películas obtenidas, respecto de la película control, hasta el agregado de 10 g MMT/100 g SPI. Para las películas obtenidas empleando 12,5 g MMT/100 g SPI, el espesor

aumentó significativamente. Este aumento podría tener alguna influencia en la coloración, explicando la variación tan marcada en los parámetros de color al alcanzar esta concentración.

Tabla 3.2: Espesor y contenido de agua de las películas de SPI con distintos contenidos de MMT obtenidas por spread coating (SC).

MMT (g /100 g SPI)	Espesor (μm)	Contenido de agua (%)
0	48,70 \pm 1,39 ^a	18,81 \pm 0,12 ^e
2,5	41,59 \pm 4,49 ^a	17,54 \pm 0,23 ^d
5	49,85 \pm 3,12 ^a	14,89 \pm 0,25 ^c
10	44,48 \pm 7,16 ^a	13,31 \pm 0,13 ^b
12,5	66,22 \pm 2,23 ^b	12,23 \pm 0,20 ^a

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

El contenido de agua de las películas (**Tabla 3.2**) disminuyó progresivamente al aumentar el contenido de MMT, alcanzando para las películas de 12,5 g MMT/100 g SPI una disminución del 35 % respecto de la película control sin arcilla. La **Figura 3.3** muestra la disminución porcentual del contenido de agua para las películas nanocompuestas respecto del control, fabricadas por casting y por SC. Se observa una disminución porcentual mayor para el caso de las películas nanocompuestas obtenidas por SC. Esta diferencia podría atribuirse a cierta orientación de las moléculas proteicas en la dirección de máquina, durante el procesamiento por SC. Esta orientación preferencial podría favorecer la interacción proteína –proteína y proteína –MMT en detrimento de las interacciones proteína-agua, siendo esta más fácilmente eliminada durante el proceso de secado de las películas

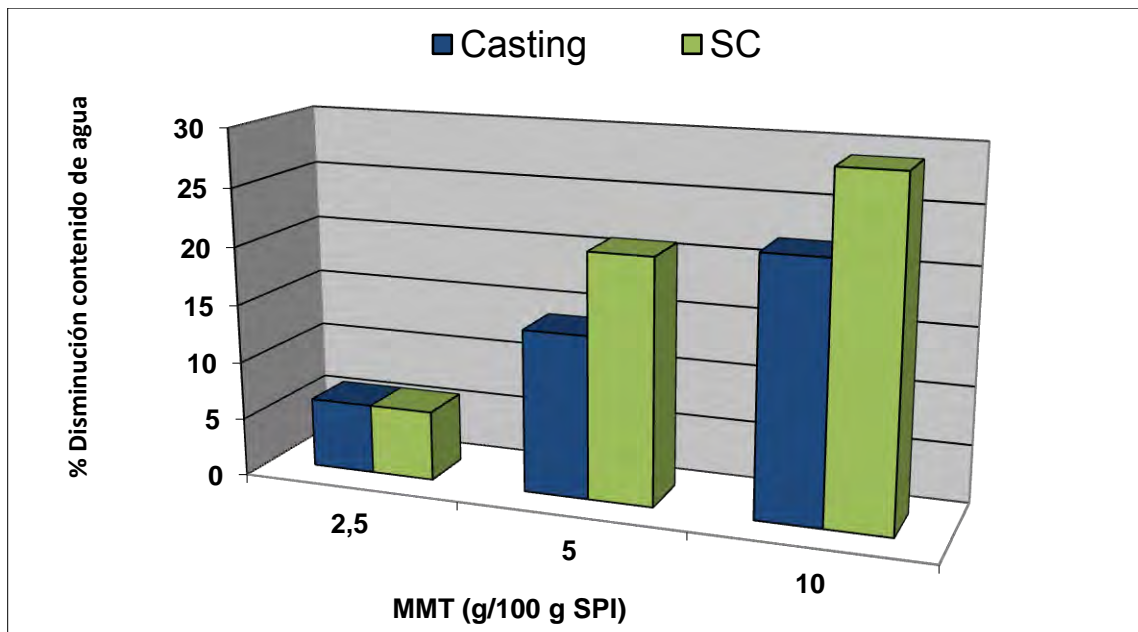


Figura 3.3: Disminución porcentual del contenido de agua de las películas nanocompuestas respecto del control (0 g MMT/100 g SPI).

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas proteicas y nanocompuestas en función de la concentración de arcilla se muestran en la **Figura 3.4**. Se puede observar que la mejora en WVP se alcanza a partir de concentraciones de MMT de 2,5 g MMT/100 g SPI, no encontrándose diferencias significativas en los valores obtenidos para las películas nanocompuestas a partir de 5 g MMT/100 g SPI MMT. La disminución alcanzada con 5 g MMT/100 g SPI es del 35 %, manteniéndose prácticamente constante hasta 12,5 g MMT/100 g SPI. Estos valores de WVP son similares a los de las películas obtenidos por casting con 5 y 7,5 g MMT/100 g SPI. Teniendo en cuenta que las películas proteicas obtenidas por SC presentaron menores WVP que las obtenidas por casting, la mejora en esta propiedad debido al incremento de arcilla en la matriz fue más marcada en las películas estudiadas en el capítulo anterior.

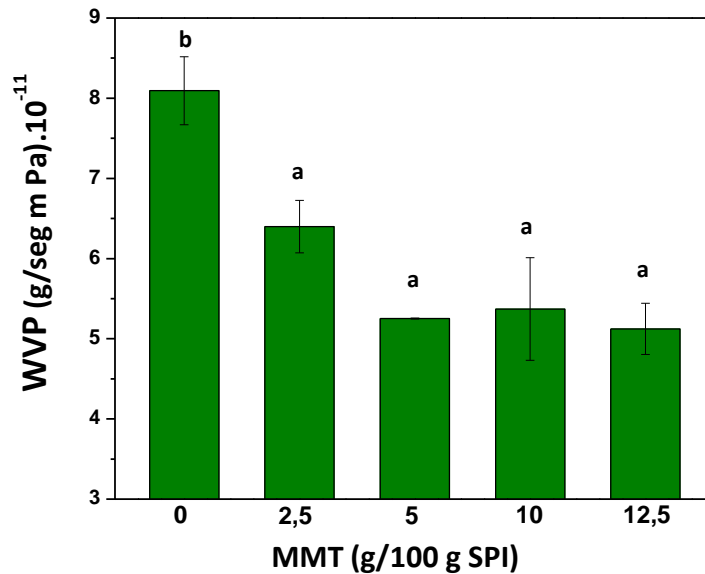


Figura 3.4: Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonita. Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

3.3.1.3. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas de soja y nanocompuestas, medidas en tracción se muestran en la **Tabla 3.3**. Como se observó con los materiales obtenidos por casting, al aumentar el porcentaje de arcilla en la formulación la elongación a la rotura (ϵ_{max}) disminuyó, mientras que la tensión a la ruptura (σ_{max}) y el módulo elástico (**E**) aumentaron progresivamente. La incorporación de solo 5 g MMT/100 g SPI produjo un incremento de aproximadamente 156 % en la tensión a la ruptura y 273 % en el módulo de las películas nanocompuestas. La tensión y módulo siguen mejorando con el agregado de arcilla, obteniendo un aumento máximo para 10 g MMT/100 g SPI de 200 % y 428 % respectivamente. Estas mejoras encontradas en las propiedades mecánicas son mayores que aquellas obtenidas por el proceso de casting. Si bien la disminución en la elongación al alcanzar un contenido de 10 g MMT/100 g SPI fue de 96 %, no fue muy diferente de la disminución obtenida por casting (80 %). Esta diferencia observada en las propiedades mecánicas respecto a las películas obtenidas por *casting* podrían atribuirse a la orientación de las macromoléculas en la dirección de máquina, que da lugar a un aumento en la resistencia a la tensión en esa misma dirección (que es la dirección ensayada en la medición

de las propiedades mecánicas) y como consecuencia del menor contenido de agua (plastificante) (**Tabla 3.2**) de las películas obtenidas por SC.

Para 12,5 g MMT/100 g SPI no pudieron determinarse la tensión y elongación a la ruptura ya que la probeta no resistía la tracción, rompiéndose al inicio del ensayo, pero sí alcanzó a censarse el módulo en la parte lineal al inicio de la curva, el cual aumentó hasta un 473 % respecto del control.

Tabla 3.3: Tensión a la ruptura (σ_{max}), deformación a la ruptura (ϵ_{max}) y módulo elástico (E) - medidas en tracción- de las películas de proteína de soja con distintos contenidos de montmorillonita, obtenidas por spread coating (SC)

MMT (g/100 g SPI)	σ_{max} (MPa)	ϵ_{max} (%)	E (MPa)
0	5,46 ± 0,33 ^a	98,92 ± 10,96 ^c	2,06 ± 0,19 ^a
2,5	7,10 ± 0,51 ^b	22,79 ± 8,95 ^b	4,12 ± 0,14 ^b
5	13,96 ± 1,00 ^c	19,79 ± 5,40 ^b	7,68 ± 0,68 ^c
10	16,40 ± 1,14 ^d	3,86 ± 0,74 ^a	10,88 ± 0,57 ^d
12,5	ND	ND	11,81 ± 0,95 ^e

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$. ND = No Determinado

Las **Figuras 3.5, A, B y C** muestran la tensión máxima, elongación a la rotura y módulo elástico, respectivamente, de las películas obtenidas por casting y SC, para su comparación. Claramente las diferencias más significativas se observan en la resistencia a la tensión y el módulo elástico de las películas obtenidas empleando los dos procesos descriptos. Las películas obtenidas por SC muestran una mejora significativa en la capacidad de resistir tensión, sin detrimento significativo en la elongación a la rotura, respecto de las películas obtenidas por casting.

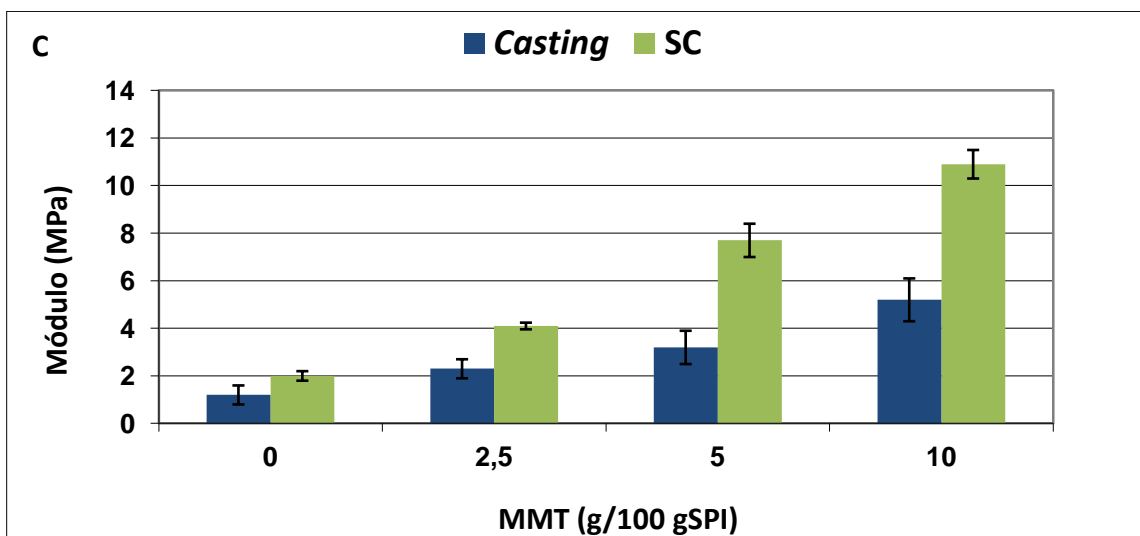
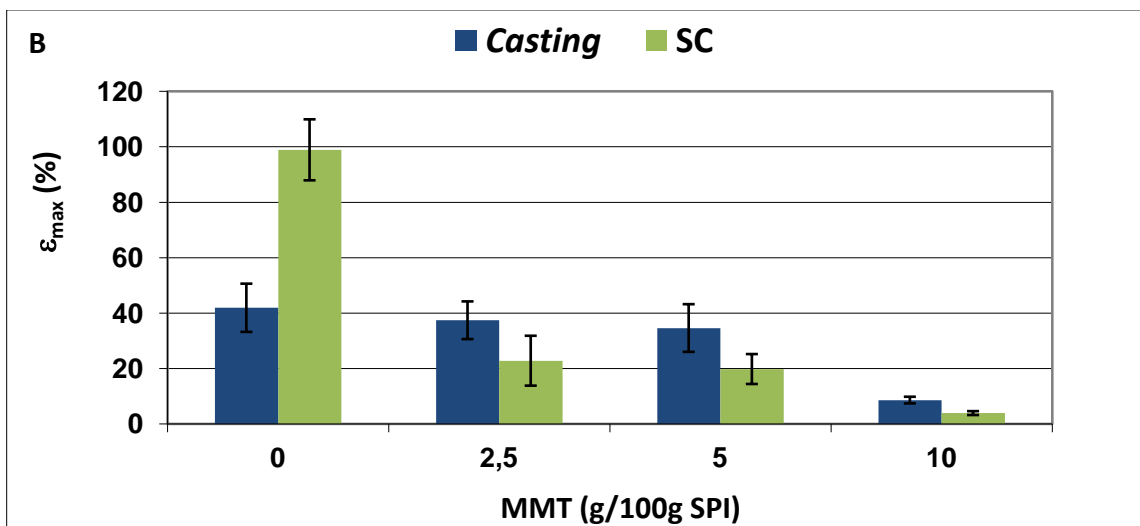
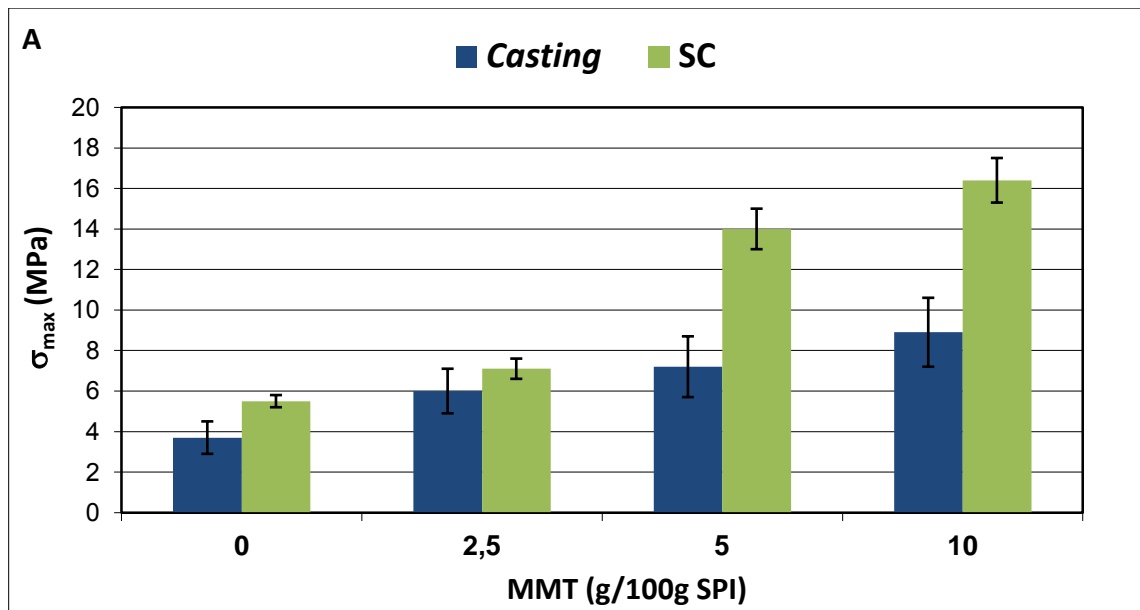


Figura 3.5: Comparación de: **A)** la tensión a la ruptura (σ_{max}), **B)** deformación a la ruptura (ϵ_{max}) y **C)** módulo elástico (E) para películas obtenidas por *casting* y *spread coating* (SC)

3.3.1.4. Morfología

El espectro de difracción de rayos X para la arcilla pura, la película proteica y las películas nanocompuestas obtenidas por spread coating se muestran en la **Figura 3.6**. Los espectros obtenidos para las películas nanocompuestas muestran la ausencia del pico característico de la MMT ($2\theta = 7,21^\circ$; $d_{001} = 1,2$ nm) y tienen el aspecto de los espectros reportados para sistemas con alto grado de exfoliación de las arcilla en las matrices proteicas de soja (Zhang y col., 2007). En particular, en los espectros correspondientes a las películas conteniendo 2,5 y 12,5 g MMT/100 g SPI de arcilla se observa un pico desplazado hacia la izquierda respecto del pico de la MMT pura, que corresponde a espacios interlaminares (d_{001}) de 2,84 y 3,32 nm respectivamente. Estos valores indicarían que en estas formulaciones, la arcilla se encuentra intercalada y parcialmente exfoliada en la matriz proteica. Ray y Okamoto (2003) reportaron que las estructuras nanocompuestas, intercalada o exfoliada, dependen también del contenido de MMT en la matriz, y en general al aumentar la concentración de arcilla en los sistemas pueden co-existir ambas estructuras ya que la MMT no llega a exfoliarse totalmente.

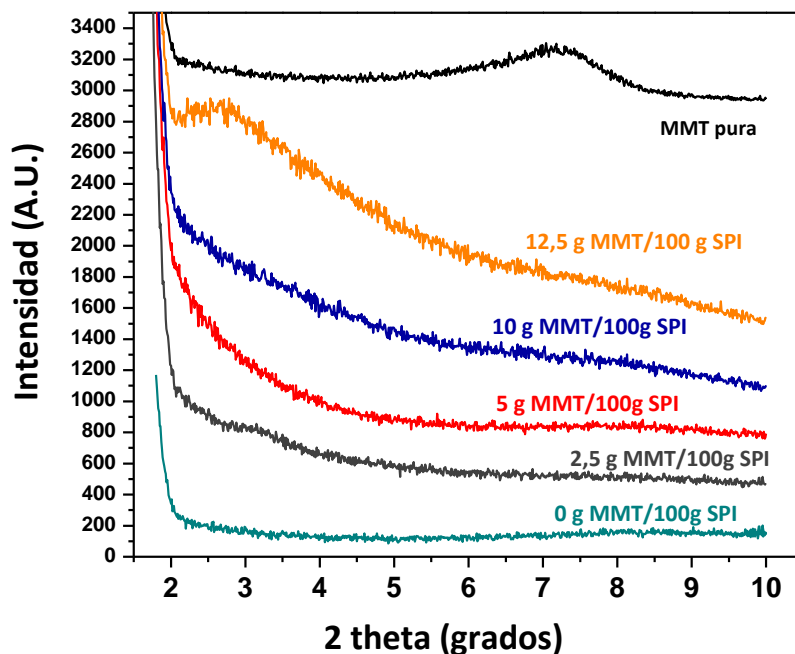


Figura 3.6: Espectros de rayos X de la MMT pura, de la película proteica (control, 0 g MMT/100 g SPI) y las reforzadas con arcilla (2,5 a 12,5 g MMT/100 g SPI)

Los resultados obtenidos por rayos X fueron confirmados por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la **Figura 3.7** se muestran las fotos de microscopías obtenidas de la arcilla pura, de la película proteica y de las reforzadas. En las películas nanocompuestas se llegan a apreciar la presencia de laminas de MMT exfoliadas y dispersas en la matriz proteica, así como el efecto de aumentar su concentración.

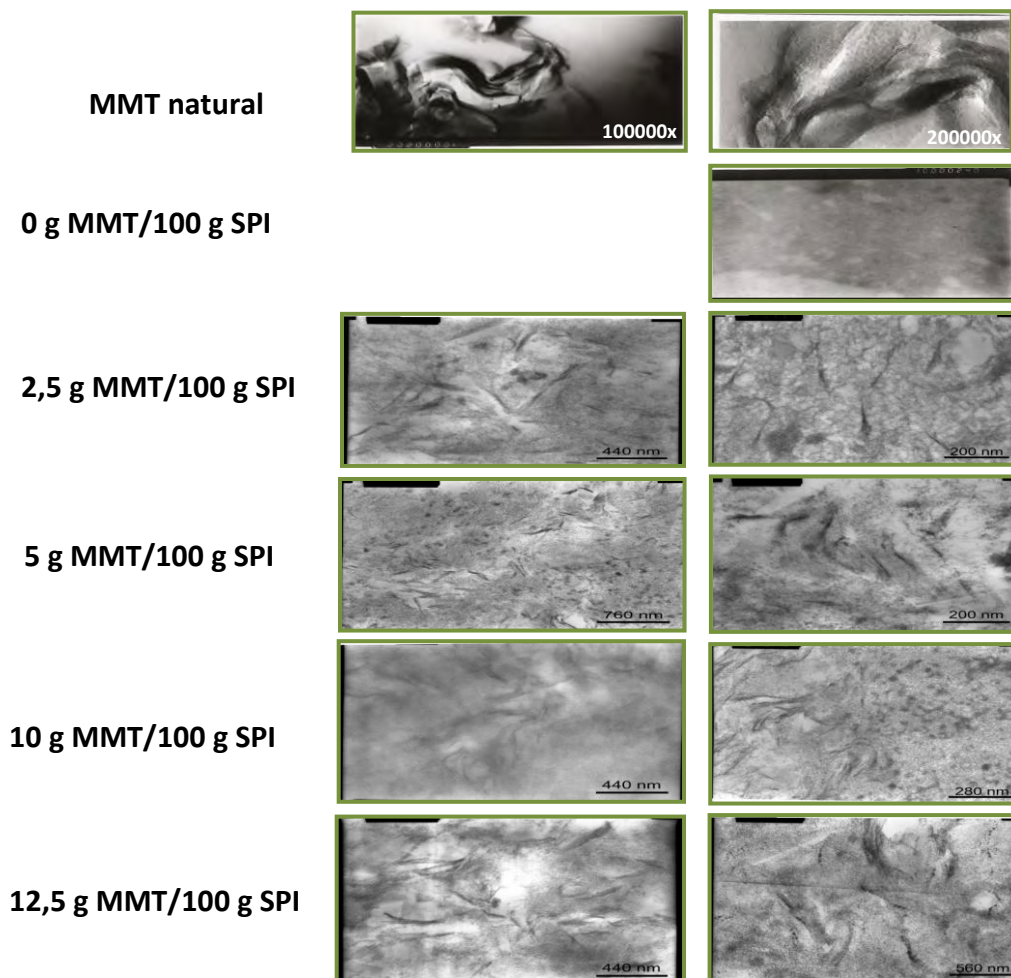


Figura 3.7: Microscopía Electrónica de Transmisión de la arcilla natural y de las películas nanocompuestas.

El alto grado de exfoliación alcanzado en la matriz proteica, debido en parte a la importante afinidad de las proteínas de soja y la MMT, y al procesamiento de las muestras, fue verificado por ambas técnicas y explica la mejora en las propiedades mecánicas y en la disminución al vapor de agua de las películas.

3.3.2. Materiales nanocompuestos obtenidas a partir de proteína de soja y montmorillonita natural obtenidos por termocompresión

3.3.2.1. Apariencia

Se obtuvieron películas homogéneas y flexibles a partir de SPI con 5 y 10 g MMT/100 g SPI. Visualmente todas resultaron amarillentas y con cierto grado de transparencia, aunque esto varió entre las películas con arcilla y el control (**Figura 3.8**). Esta diferencia visual de las películas se cuantificó mediante los parámetros de color de Hunter Lab (L , a , b y ΔE) y la opacidad (**Tabla 3.4**).



Figura 3.8: Apariencia visual de películas de A) SPI y B) 10 g MMT/100 g SPI obtenidas por termocompresión, a modo de ejemplo.

Al aumentar el contenido de MMT en las películas, se volvieron más claras (mayor L) y con una coloración menos amarillentas (disminuyen los parámetros a y b), lo cual se reflejó en la disminución del parámetro ΔE (menor coloración). Por otro lado, la opacidad de las películas aumentó al incrementar la concentración de arcilla en la formulación. Esta mayor opacidad y menor coloración de estas películas formadas por termocompresión comparadas con las de casting podría deberse al mayor espesor que tienen las primeras.

Tabla 3.4: Valores de luminosidad (L), cromaticidad (a y b), diferencia de color (ΔE) y opacidad de las películas de SPI y nanocompuestas.

MMT (g/100 g SPI)	Parámetros de Color Hunter Lab				Opacidad (UA mm ⁻¹)
	L	a	b	ΔE	
0	75,95 ± 0,27 ^a	1,62 ± 0,08 ^c	38,16 ± 0,15 ^c	42,27 ± 0,19 ^c	1,03 ± 0,004 ^a
5	78,57 ± 0,25 ^b	0,58 ± 0,07 ^b	33,10 ± 0,34 ^b	36,56 ± 0,41 ^b	1,57 ± 0,01 ^b
10	80,28 ± 0,30 ^c	0,00 ± 0,07 ^a	28,84 ± 0,41 ^a	32,03 ± 0,50 ^a	1,70 ± 0,02 ^c

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

En la **Tabla 3.5** se presentan los espesores y los contenidos de agua de las películas proteicas y nanocompuestas obtenidas por termocompresión. Al igual que con las películas obtenidas por otras técnicas de procesamiento, no se observaron diferencias significativas en los espesores de las películas con el agregado de arcilla - aunque presentaron espesores mucho mayores ($\approx 265 \mu\text{m}$). El contenido de agua disminuyó progresivamente con la concentración de MMT, siendo esta disminución del 30 % al pasar de 0 a 10 g MMT/100 g SPI, la cual fue superior a la obtenida por casting (22 %). Según indica Sothornvit y col. (2003), las películas elaboradas con el método de moldeo por compresión deberían perder más humedad durante el propio proceso de elaboración, comparadas con las películas elaboradas por el método de *casting*, lo cual concuerda con lo sucedido en este estudio.

Tabla 3.5: Espesor y contenido de agua de películas de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonita obtenidas por termocompresión.

MMT (g/100 g SPI)	Espesor (μm)	Contenido de agua (%)
0	278 ± 8 ^a	23,94 ± 0,71 ^c
5	251 ± 15 ^a	21,76 ± 0,22 ^b
10	265 ± 15 ^a	16,85 ± 0,75 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los superíndices con letras iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$. Test de Tukey.

3.3.2.2. Susceptibilidad al agua

El efecto del contenido de MMT sobre la solubilidad y WVP de las películas nanocompuestas en estudio se muestran en la **Tabla 3.6**.

Tabla 3.6: Solubilidad y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de proteína de soja con distinto contenido de MMT obtenidas por termocompresión.

MMT (g/100 g SPI)	Solubilidad (%)	WVP . 10 ⁻¹⁰ (g/seg m Pa)
0	42,59 ± 0,57 ^c	1,92 ± 0,16 ^c
5	38,13 ± 0,11 ^b	1,63 ± 0,01 ^b
10	34,64 ± 0,46 ^a	1,07 ± 0,14 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los superíndices con letras iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

El agregado de concentraciones crecientes de MMT disminuyó la solubilidad de las películas hasta un 23 % la película con 10 g MMT/100 g SPI respecto del control, al igual que se observó con las películas procesadas por casting. Para las películas proteicas los resultados son similares a los de Escobar y col. (2009) quienes informaron que películas en base a proteína de suero lácteo formadas por moldeo por compresión presentaban menor solubilidad que las obtenidas por casting.

Las películas de SPI formadas por termocompresión mostraron una WVP de $1,92 \times 10^{-10}$ g/m s Pa, superiores a las obtenidas por casting ($1,19 \times 10^{-10}$ g/m s Pa). Estas diferencias entre otras razones podrían atribuirse al mayor espesor de las películas, ya que se ha reportado que en películas hidrofílicas, como las de pectina, almidón, celulosa y proteínas entre ellas las de soja, WVP aumenta con esta variable (McHugh y col., 1993; Ghorpade y col., 1995).

Las películas nanocompuestas presentaron valores de WVP significativamente más bajos que las películas control. El agregado de 5 g MMT/100 g SPI redujo la WVP en un 15 %, mientras que un contenido de 10 g MMT/100 g SPI la disminuye un 44 %. Estos resultados son similares a los de Kumar y col. (2010) que trabajaron con películas en base a SPI y MMT obtenidas por extrusión y casting, sin embargo estos autores obtienen una disminución del 43 % en la WVP respecto al control, recién con el agregado de 15 % MMT. Si bien el

porcentaje de disminución en la permeabilidad al vapor de agua con el agregado de MMT es significativo para las películas por termocompresión, cabe destacar que no es tan importante como el alcanzado en las películas hechas por casting para cantidades equivalentes de arcilla (**Figura 3.9**), lo cual podría deberse al mayor espesor obtenido en las películas por termocompresión mencionado anteriormente (McHugh y col., 1993).

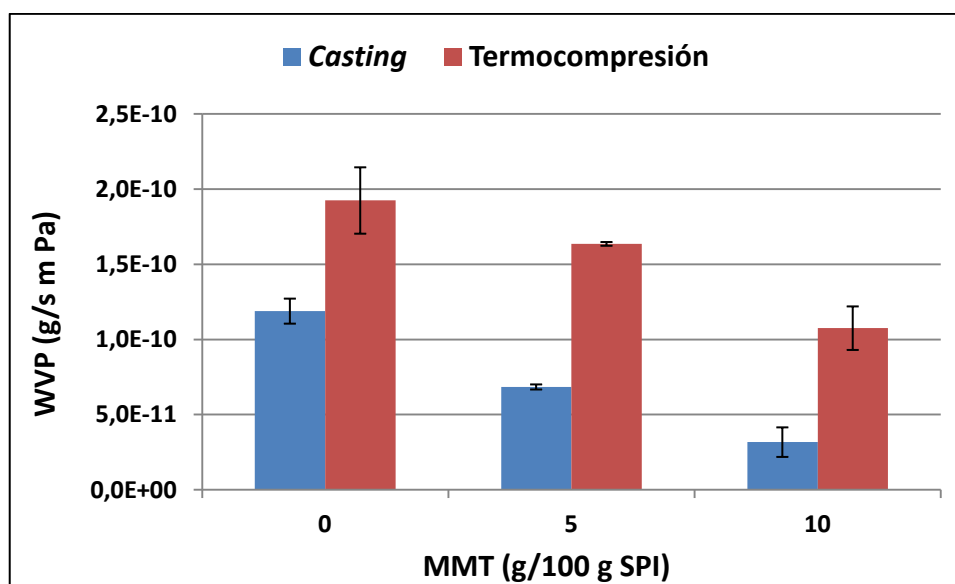
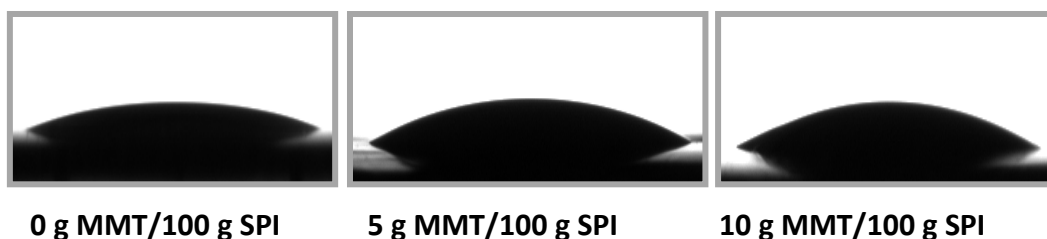


Figura 3.9: Comparación de de permeabilidad al vapor de agua (WVP) para películas obtenidas por *casting* y termocompresión.

En la **Figura 3.10** se puede apreciar la fotografía de las gotas de agua depositadas sobre las películas, de donde se obtuvieron los ángulos de contacto correspondientes a las películas proteicas y las nanocompuestas. El ángulo de contacto de las películas nanocompuestas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI fueron 14°, 16° y 15° respectivamente, no habiendo diferencia significativa entre los mismos. Estos ángulos obtenidos para estas películas fueron inferiores a aquellos de las películas formadas por casting, dando indicios que la obtención de películas por termocompresión genera películas con superficies más hidrofílicas, que posiblemente enmascaren el efecto de la arcilla notado anteriormente.

Figura 3.10: Fotografía de las gotas de agua depositadas sobre las películas proteicas (0 g MMT/100 g SPI) y nanocompuestas (5 y 10 g MMT/100 g SPI) para obtener los ángulos de contacto.



3.3.2.3. Temperatura de Transición Vítrea

La temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas con distinto contenido de MMT, medidas por DMA como la temperatura en el pico máximo en la curva de $\tan \delta$ se muestra en la **Tabla 3.7**. No se observan diferencias significativas entre las T_g de las películas nanocompuestas respecto al control (0 g MMT/100 g SPI) tal como se observó en el capítulo anterior para las películas obtenidas por casting (determinada por DSC), a pesar del menor contenido de agua presente en las películas y de las interacciones entre la arcilla y la proteína.

Tabla 3.7: Temperaturas de transición vítrea (T_g) obtenidas por DMA de las películas nanocompuestas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI.

MMT (g/100 g SPI)	T_g (°C)
0	$-44,68 \pm 0,80^a$
5	$-46,34 \pm 2,16^a$
10	$-42,11 \pm 0,35^a$

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los superíndices con letras iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

3.3.2.4. Propiedades mecánicas

También se estudiaron las propiedades mecánicas de estos materiales en tracción. En la **Figura 3.12** se presentan los valores de tensión y elongación a la rotura y módulo elástico de las películas en estudio. De la misma se puede observar que a medida que aumentó la concentración de arcilla la tensión a la ruptura aumentó recién para 10 g MMT/100 g SPI en un 17 % respecto a la película proteica (0 g MMT/100 g SPI), que el módulo se incrementó en un 70 % para la película con 5 g MMT/100 g SPI y en un 116 % para la que contiene 10 g MMT/100 g SPI, mientras que la elongación de las mismas disminuyó un 41 % para las nanocompuestas, no habiendo diferencias significativas al variar el contenido de arcilla.

Estos resultados son similares a los presentados por Xiang y col. (2009), quienes observaron en sus películas nanocompuestas de SPI/MMT un aumento en la resistencia a la tracción de 33 % y del módulo de 54 % hasta una concentración de 5 wt % MMT respecto a la de 0 wt % MMT, sin embargo estos autores encontraron una disminución de la tensión hasta un valor igual a la inicial y módulo un poco mayor que el inicial para la concentración de 9 wt % MMT. Respecto de la elongación, siempre disminuyó al aumentar la concentración de MMT en las películas. Estos cambios en las propiedades mecánicas lo atribuían a las capas de MMT que se encontraban intercaladas y exfoliadas, a la buena dispersión de la MMT en la matriz proteica y a la fuerte interacción interfacial entre la proteína y la arcilla. También atribuían la disminución en el módulo y tensión para concentraciones mayores al 5 wt % a que las capas de MMT tendían a formar agregados. Este comportamiento no fue observado en nuestro estudio, las películas obtenidas con la concentración de 10 g MMT/100 g SPI presentaron mejores resultados en tensión y modulo elástico.

Si bien estas películas no mejoraron tanto la resistencia a la tracción y el módulo respecto de aquellas obtenidas por casting o spread coating, la disminución en la elongación con el agregado de MMT fue mucho menor (41 % respecto de 80 y 96 %, respectivamente. Park y col. (2008) compararon las propiedades mecánicas de películas gelatina de piel de cerdo producidas por extrusión/termoprensado y por casting encontrando que las primeras tenían menores valores de resistencia a la tracción y módulo y mayor elongación que las correspondientes por casting. Explicaban estas diferencias en términos de la tasa de evaporación de humedad, la cual era menor en las películas por casting, y la presencia de microporos en las películas formadas por extrusión.

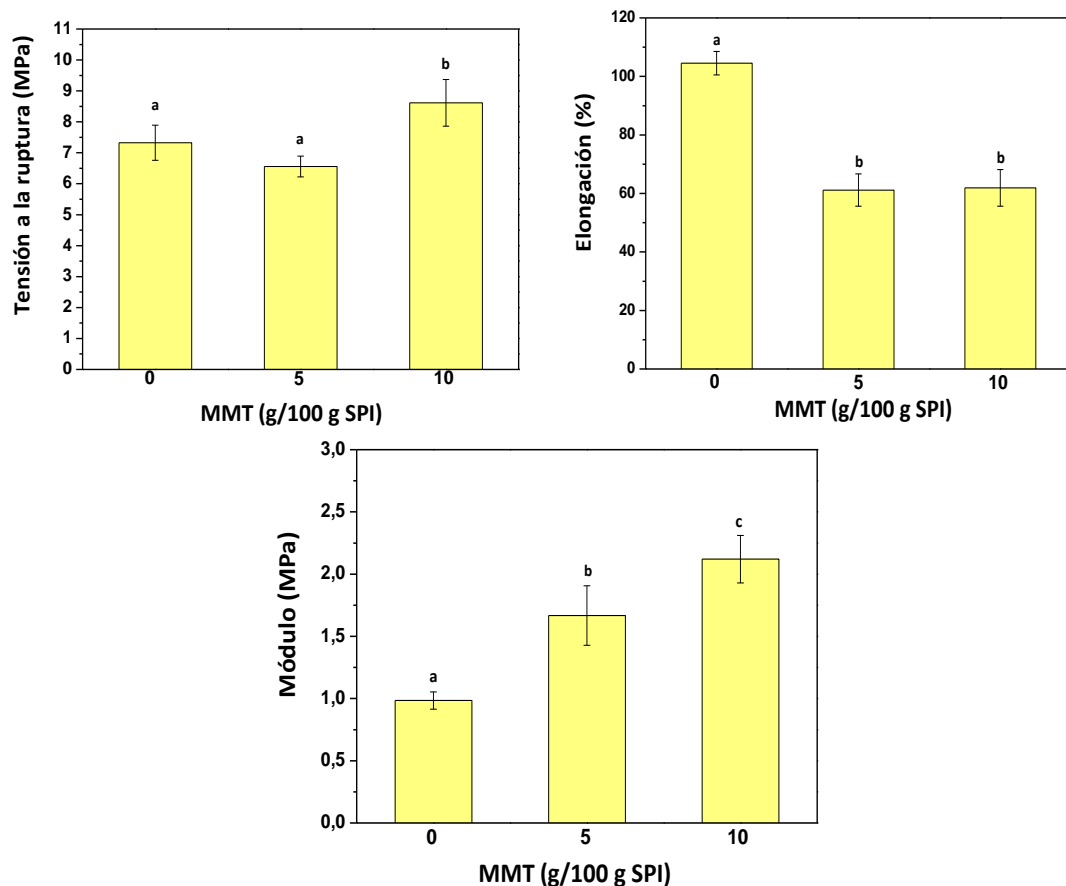


Figura 3.11: Propiedades mecánicas de las películas de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonita. Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

3.3.2.5. Morfología

De manera de intentar dilucidar la estructura de las películas nanocompuestas obtenidas por termocompresión se realizaron estudios mediante difracción de rayos X. La **Figura 3.12** muestra los espectros de difracción de las películas nanocompuestas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI y la MMT pura. El espacio interlaminar (d_{001}) de la arcilla pura se ha calculado en 1,23 nm a partir de un pico de difracción a $2\theta = 7,21^\circ$ con la función de Bragg. El pico característico de la arcilla desaparece en los espectros de difracción de rayos X de los nanocompuestos SPI/MMT, lo cual significa la formación de una estructuras nanocompuestas de la arcilla dentro de la matriz proteica. Para la película con 5 g MMT/100 g SPI pareciera que existe un pico desplazado hacia ángulos menores, aunque no es posible poder determinar su espacio interlaminar porque el mismo no está bien definido, pero que

no se visualiza para la película con mayor concentración de arcilla. Esto confirma que la MMT puede ser fácilmente intercalada y exfoliada en la proteína de soja mediante la técnica de intercalado en fundido. Estos resultados coinciden con lo reportado por Xiang y col. (2009), quienes prepararon películas nanocompuestas en base a SPI-MMT mediante intercalación en fundido y observaron que para todas las concentraciones ensayadas (0, 3, 5, 7 y 9 wt % MMT) la arcilla se encontraba exfoliada en la matriz proteica. Chen y Zhang (2006) lograron obtener películas nanocompuestas a partir de SPI y distintas concentraciones de MMT (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 wt %) mediante intercalado en solución, extrusión y posterior moldeo por compresión a 140 °C y 20 MPa. Al estudiar la estructura por rayos X observaron que las películas con concentraciones de 0, 4, 8, 12 y 16 wt % MMT presentaban una estructura nanocompuesta exfoliada, mientras que para concentraciones mayores (20 y 24 wt % MMT) presentaban un pico a bajos ángulos ($2\theta = 1,45^\circ$ y $2\theta = 1,42^\circ$ respectivamente) lo que denota una estructura nanocompuesta intercalada. Ellos explicaron que el proceso de intercalación en fundido se encuentra involucrado en el proceso de extrusión y moldeo por compresión y es el responsable de las nanoestructuras encontradas.

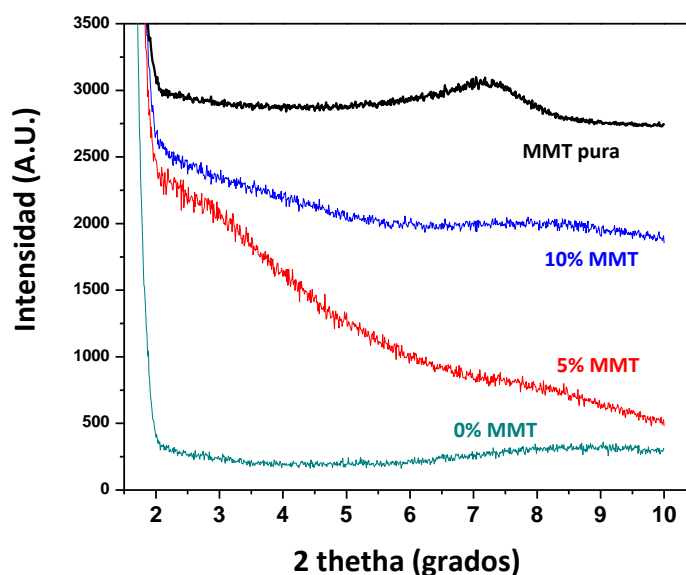


Figura 3.12: Espectros de difracción de rayos X de la MMT pura, de la película proteica y de las películas nanocompuestas obtenidas por termocompresión.

El grado de intercalación/exfoliación alcanzado durante la intercalación por fundido permitió obtener películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y MMT con mejores

propiedades que las películas proteicas. Aunque estas mejoras parecieran ser menos importante que en los procesos húmedos.

3.5. Conclusiones

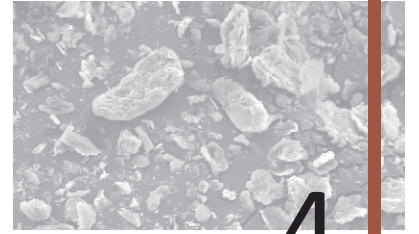
a. Se prepararon películas proteicas y nanocompuestas a un mayor escalado que en el laboratorio por la técnica de *spread coating*. Estas películas resultaron homogéneas, amarillentas y con un cierto grado de transparencia, no observándose diferencias visuales entre las reforzadas y el control.

b. Se prepararon películas proteicas y nanocompuestas homogéneas y flexibles por intercalación en fundido y termocompresión.

c. Para las películas formadas por ambas técnicas de procesamiento, el agregado de MMT permitió mejorar la resistencia mecánica y disminuir la susceptibilidad al agua de las películas proteicas, debido al buen grado de exfoliación/intercalación de la arcilla en la matriz proteica.

d. El grado de mejora alcanzado fue superior para los materiales por procesos húmedos (*casting* y *spread coating*) que para las películas obtenidas por un proceso seco (termocompresión). Estas diferencias pudieron atribuirse al mayor grado de intercalación/exfoliación de la arcilla en la matriz proteica, alcanzadas en los procesos húmedos.

e. Las películas nanocompuestas obtenidas por *spread coating* presentaron mejores propiedades mecánicas que las obtenidas por *casting*, como consecuencia de una orientación preferencial de las macromoléculas y/o de la arcilla en la dirección de máquina y también por el alto grado de exfoliación de la arcilla en la matriz proteica.



4

**Polvos nanocompuestos en base a proteínas
de soja y montmorillonitas como materias
primas para la formación de materiales**



4. Polvos nanocompuestos en base a proteínas de soja y montmorillonita como materias primas para la formación de materiales

4.1. Introducción

En los capítulos anteriores se formaron películas nanocompuestas de matriz proteica de soja reforzadas con MMT por distintas técnicas de procesamiento, con mayor resistencia al agua y mejores propiedades mecánicas que las respectivas películas proteicas. El efecto refuerzo otorgado por la nanoarcilla, resultó ser más importante en los sistemas formulados con MMT-Na⁺ y con técnicas de procesamiento húmedas (a partir de dispersiones proteicas), dado que en estos sistemas se logró un alto grado de intercalación/exfoliación de la arcilla en la matriz proteica. Esto puede atribuirse, en parte, a la muy buena compatibilidad de la arcilla y las proteínas de soja, y a los procedimientos utilizados en su obtención. A diferencia de lo reportado por otros autores (Tunc y col., 2007), en este trabajo no se encontró una concentración de arcilla intermedia y óptima. La película con la máxima concentración de arcilla analizada (10 g/100 g SPI) fue la que presentó el efecto refuerzo más alto, porque a pesar del alto contenido de MMT, esta logró dispersarse homogéneamente en las películas con un buen grado de exfoliación. Cabe recordar, que no se evaluaron concentraciones superiores de arcilla, dado que el manipuleo de la formulación se complicaba y repercutía en la homogeneidad del material resultante.

A partir de estos resultados, se plantearon los siguientes objetivos:

- Obtener materias primas nanocompuestas en base a SPI-MMT con buen grado de dispersión de la arcilla en la proteína, aptas tanto para metodologías húmedas y secas, con el fin de facilitar el procesamiento de los materiales.
- Estudiar la formación de películas por *casting* y termocompresión a partir de estas materias primas, comparando su funcionalidad con las de películas formadas por mezcla directa (MD) (analizadas en los capítulos anteriores).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

Se utilizaron un aislado proteico de soja (SPI, SUPRO 500E, The Solae Co.), glicerol (Anedra) y montmorillonita natural (MMT, Cloisite®Na⁺, Southern Clay Products), ya descritos en la sección 2.2.1.

4.2.2. Obtención de polvos nanocompuestos de soja y MMT

Los polvos nanocompuestos se obtuvieron liofilizando dispersiones acuosas compuestas por el aislado proteico de soja y distintas proporciones de MMT a pH 10,5 (similares a las dispersiones proteicas formadoras de películas utilizadas en la sección 2.2.2). Las dispersiones se formaron mezclando por un lado, 5 g de SPI en 80 ml de agua destilada a temperatura ambiente, bajo agitación magnética (\approx 30 min) ajustando el pH a 10,5 con NaOH 2 N. Y por otro, se mezclaron diferentes cantidades de MMT (0,125, 0,25, 0,375, y 0,5 g) en 20 ml de agua destilada; en primer lugar se mezclaron con agitación magnética por 1 hora aproximadamente y luego se aplicó un tratamiento con ultrasonido a 80% de amplitud, durante 1 min en un equipo Sonics Vibra-cell modelo VCX 750 (Sonics & Materials, INC, Estados Unidos). A continuación, la dispersión de SPI y la suspensión de MMT se mezclaron con agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente, se congelaron a -80°C, se liofilizaron, se molieron y se almacenaron a 4°C en envases herméticamente cerrados hasta su utilización. A estas materias primas nanocompuestas SPI-MMT, las denominaremos polvos nanocompuestos (PN_x, siendo x el contenido de arcilla expresado en g MMT/100 g SPI) para facilitar su diferenciación con el resto de los materiales desarrollados en esta tesis. De esta manera se obtuvieron polvos nanocompuestos con 2,5, 5, 7,5 y 10 g MMT/100 g SPI (PN_{2,5}, PN₅, PN_{7,5}, PN₁₀ respectivamente).

4.2.3. Caracterización de los polvos nanocompuestos

Los polvos nanocompuestos fueron caracterizados mediante difracción de rayos X y SEM, según la metodología descrita en la sección 2.2.4; y mediante hidrofobicidad superficial, tal como se describe a continuación.

4.2.3.1. Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) de las muestras se determinó siguiendo el método propuesto por Cardamone y Puri (1992). Se utilizó la sonda fluorescente 8-anilino-1-naftalensulfonato de amonio (ANS, Aldrich Chemical Co., Estados Unidos). La fluorescencia de esta sustancia aumenta al encontrarse adherida a un sitio hidrofóbico, cualidad que se utiliza para la cuantificación de los sitios hidrofóbicos expuestos superficiales de las proteínas. Para realizar las determinaciones de H_o , una alícuota del sobrenadante obtenido se diluyó con agua destilada, alcanzando una concentración final de proteínas cercana a 0,5 mg/ml. Por otro lado se preparó una solución de ANS 10 mM en agua. Se agregaron cantidades crecientes de la solución de ANS a una cubeta conteniendo agua (blanco) y a una cubeta conteniendo la muestra de proteína (muestra). Las concentraciones de ANS barridas durante el ensayo estuvieron comprendidas entre: 0 y 100 μ M. Para cada una de las concentraciones de ANS utilizadas, se midió la intensidad de fluorescencia de la muestra en contacto con la sonda. Para ello, la cubeta conteniendo la mezcla blanco/ANS ó muestra/ANS fue excitada con luz UV ($\lambda = 350$ nm) y se registró el espectro de emisión entre 370 y 540 nm, utilizando un espectrofluorómetro PerkinElmer Luminescence Spectrometer LS50B (Perkin-Elmer, MA, Estados Unidos). Luego de restar al espectro de emisión de cada muestra el de su blanco correspondiente (blanco con la misma concentración de ANS que la muestra), se graficó la intensidad de fluorescencia (IF) detectada a 470 nm (máximo de emisión del complejo proteína-ANS) en función de la concentración de ANS (en μ M). Los datos experimentales se ajustaron a la **Ecuación 4.1**.

$$IF = A \cdot ANS / (B + ANS)$$

Ecuación 4.1

Donde: "A" es la intensidad de fluorescencia máxima para la concentración de proteína empleada, en este caso la superficie de la proteína está completamente saturada con la sonda (IF_{max}); y "B" es la inversa del valor de la constante de asociación del complejo proteína-ANS ($1/K_a$).

La hidrofobicidad superficial (H_o , en UA.ml/mg) es proporcional a la máxima intensidad de fluorescencia obtenida por mg de proteína, y fue estimada a partir de la ecuación anterior

realizando el cociente entre “A” y la concentración de proteínas (en la cubeta) expresada en mg/ml. La concentración proteica se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.2.4. Obtención de películas nanocompuestas por *casting* a partir de polvos nanocompuestos

Las películas se obtuvieron por *casting* a partir de dispersiones acuosas que contenían la cantidad de SPI o PN_x necesaria para que las dispersiones filmogénicas quedaran con 5 % p/v de SPI y las cantidades correspondientes y variables de MMT (0, 2,5, 5, 7,5 y 10 g/100 g SPI), y 25 g glicerol/100 g SPI. Las dispersiones se formaron mezclando ambos componentes (SPI o PN_x y plastificante) con agitación magnética durante 24 h a temperatura ambiente, hasta total dispersión de los materiales y eliminación de las burbujas de la dispersión filmogénica. En caso de ser necesario, se reajustó el pH a 10,5 con NaOH 2 N. Finalmente, 10 ml de las dispersiones filmogénicas, se colocaron en cajas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron en una estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60 °C durante 3 horas. Las películas resultantes se acondicionaron a 20 °C y 58 % HR (en desecador con una solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.

4.2.5. Obtención de películas nanocompuestas por *termocompresión* a partir de polvos nanocompuestos

Las películas se formaron mezclando: la cantidad necesaria de SPI o PN_x correspondiente para tener 22 g de SPI y las concentraciones variables de MMT (0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI MMT) con 8 g de glicerol y 10 g de agua. El procedimiento utilizado para obtener las películas fue el mismo que se describió anteriormente en la sección 3.2.3.

4.2.6. Caracterización de las películas obtenidas a partir de polvos nanocompuestos

Las películas proteicas y nanocompuestas obtenidas por *casting* o termocompresión fueron caracterizadas mediante la determinación de su espesor, contenido de agua, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, propiedades mecánicas y difracción de rayos X. Los polvos nanocompuestos y las películas obtenidas por *casting*, también se caracterizaron por

SEM, según se describió en la sección 2.2.4.

4.2.7. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medidas fueron evaluadas por el Test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha \leq 0,05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Caracterización de los polvos nanocompuestos

En la **Figura 4.1**, se presentan las micrográficas electrónicas de barrido correspondientes a la MMT- Na^+ , del aislado proteico de soja y de los polvos nanocompuestos conteniendo cantidades variables de MMT (2,5, 5, 7,5 y 10 g MMT/100 g SPI). Mientras que las partículas de SPI son esféricas, pequeñas y porosas, los polvos nanocompuestos tiene una apariencia laminar con superficies lisas. Es evidente que la solubilización y posterior liofilización cambia la apariencia del aislado proteico. Teniendo en cuenta la baja concentración de arcilla agregada, y que la microscopía electrónica de barrido no es adecuada para el análisis de dispersión de la arcilla, no es posible hacer suposiciones del estado de la MMT en los polvos a partir del análisis de estas imágenes.

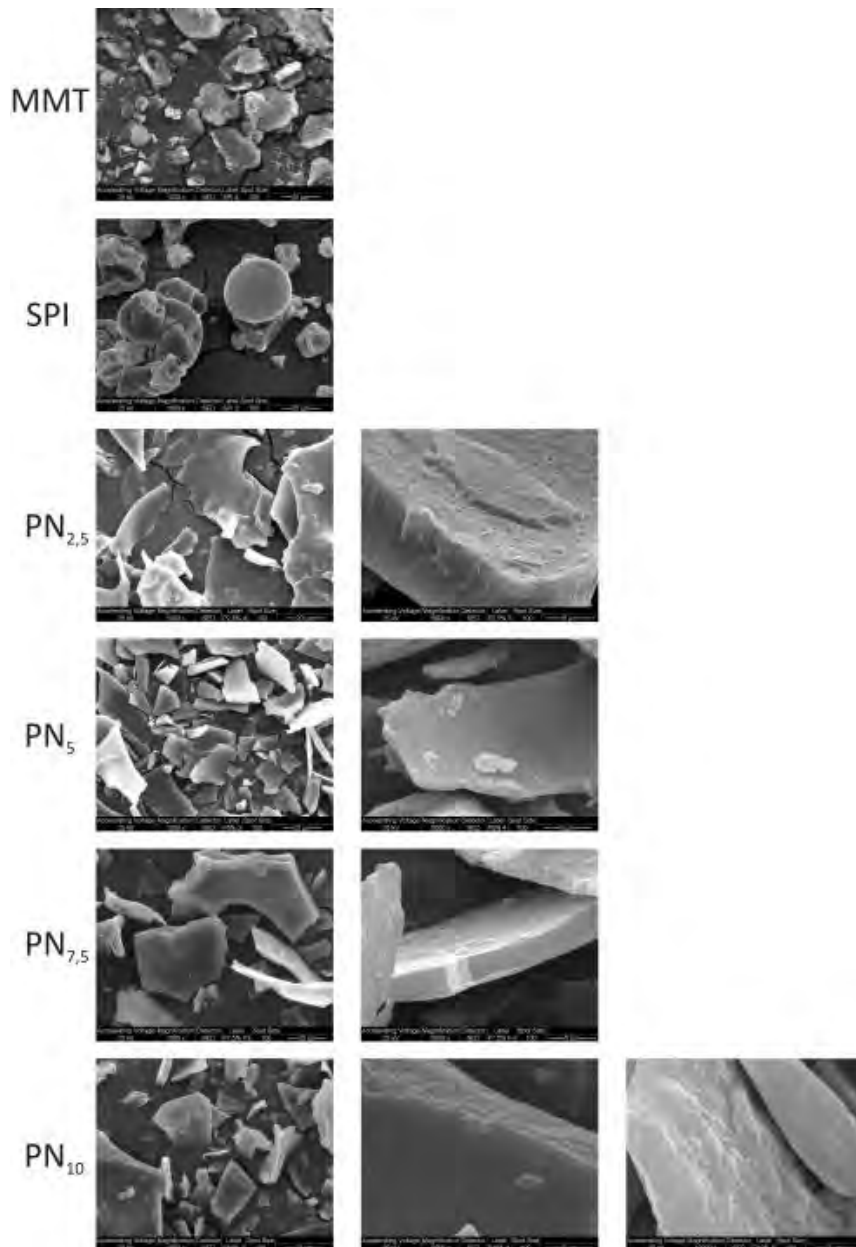


Figura 4.1. Micrográficas obtenidas por SEM de la MMT pura, del aislado proteico (SPI) y de los polvos nanocompuestos liofilizados con 2,5, 5, 7,5 y 10 g MMT/100 g SPI (PN_{2,5}, PN₅, PN_{7,5}, PN₁₀ respectivamente). Los aumentos empleados fueron 1000x, 5000x y 10000x.

Por esta razón se estudiaron los polvos por difracción de rayos X. En la **Figura 4.2** se presentan los espectros de difracción de rayos X de los polvos nanocompuestos y se los compara con los correspondientes a los del aislado proteico de soja y los de la MMT natural. En los espectros de los polvos, no aparece ningún pico, ni el característico de la MMT a $2\theta = 7,21^\circ$ ni otros a menores ángulos. Sólo se observa un levantamiento en la línea de base al

acercarse a $2\theta = 1,5^\circ$, que se acentúa al aumentar la concentración de arcilla en las formulaciones. Cabe señalar que estos levantamientos de la línea de base podrían estar enmascarando algunos picos de baja intensidad característicos de estructuras intercaladas. Aún así es evidente que en estos polvos la MMT se encuentra con un alto grado de exfoliación/intercalación dentro de la proteína.

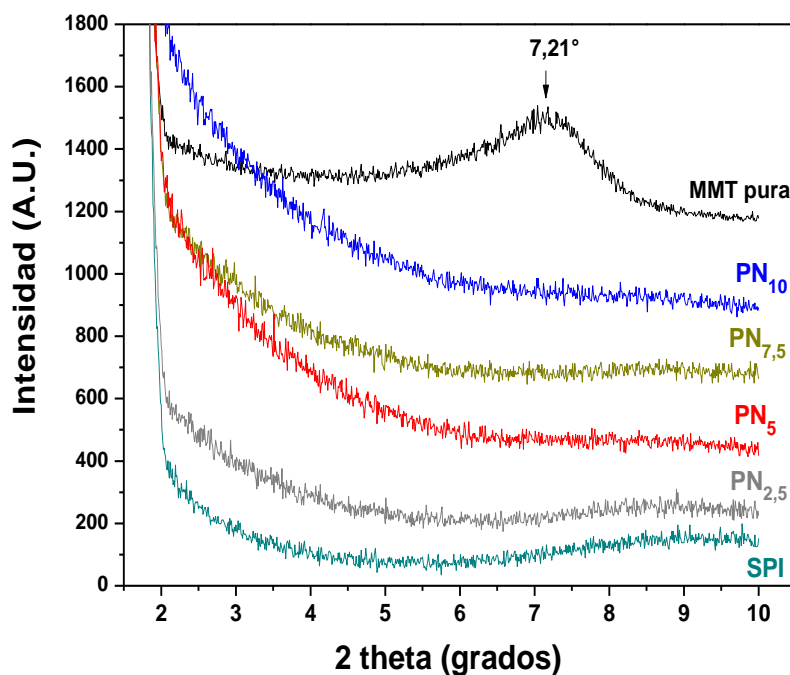


Figura 4.2: Espectros de difracción de rayos X de la MMT pura, del aislado proteico (SPI) y de los polvos nanocompuestos liofilizados con 2,5, 5, 7,5 y 10 g MMT/100 g SPI (PN_{2,5}, PN₅, PN_{7,5}, PN₁₀ respectivamente).

En la **Figura 4.3** se presenta la hidrofobicidad superficial de las proteínas presentes en cada producto. Las proteínas presentes en los polvos nanocompuestos presentaron hidrofobicidades superficiales inferiores a las del aislado proteico, independientemente de la concentración de MMT presente en la formulación. Es evidente que las proteínas sufrieron cambios conformacionales durante el proceso de formación de los polvos nanocompuestos, posiblemente relacionados con su dispersión en agua y con la formación de interacciones con la arcilla y con el posterior secado por liofilización. Estos cambios se reflejaron en un cambio en la morfología de los productos así como en una disminución de la hidrofobicidad

superficial de las proteínas. Evidentemente, a pesar que la arcilla interactúa con los residuos más polares e hidrofílicos de las proteínas, estas se pliegan de manera tal que los sitios hidrofóbicos no quedan expuestos para reaccionar con la sonda.

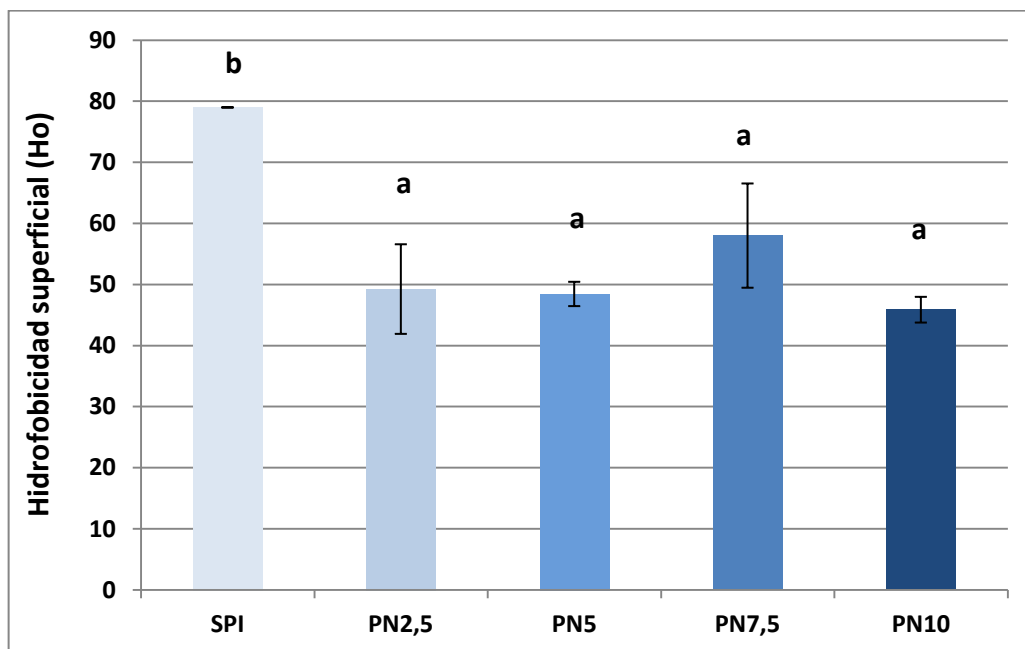


Figura 4.3: Hidrofobicidad superficial las proteínas presentes en los aislados proteicos y en los polvos nanocompuestos SPI-MMT. Valores con letras diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$).

Se logró preparar materias primas que puedan facilitar las técnicas de procesamiento (húmedas o secas) para la formación de materiales nanocompuestos biodegradables en base a SPI-MMT, en donde ya inicialmente la arcilla presenta un alto grado de intercalación/exfoliación dentro de la proteína. Pero en estas materias primas, las proteínas presentan cambios conformacionales respecto de los aislados proteicos utilizados lo que podría llegar a modificar la funcionalidad de los materiales resultantes.

4.3.2. Películas nanocompuestas en base a SPI-MMT obtenidas a partir de los polvos nanocompuestos por *casting*

4.3.2.1. Apariencia

Todas las películas obtenidas a partir de los polvos nanocompuestos resultaron flexibles, transparentes y amarillentas, similares a las obtenidas también por *casting* pero a partir de dispersiones mezcla de todos los componentes. En la **Figura 4.4** se muestra la fotografía de la película formada a partir del PN₅ (con 5 g MMT/100 g SPI) a modo de ejemplo.



Figura 4.4: Apariencia visual de películas formadas con el polvo nanocompuesto que contiene 5 g MMT/100 g SPI (PN₅).

Todas las películas formadas a partir de los polvos nanocompuestos presentaron espesores similares entre sí, independientemente del contenido de arcilla, y a su vez similares a los de las películas formadas por el aislado proteico de soja (estudiada en el capítulo 2).

Tabla 4.1: Espesor de películas formadas a partir del aislado proteico (SPI) y de los polvos nanocompuestos liofilizados con 2,5, 5, 7,5 y 10 g MMT/100 g SPI (PN_{2,5}, PN₅, PN_{7,5}, PN₁₀ respectivamente).

Muestra	Espesor (μm)
SPI	74,7 ± 8,5 ^a
PN _{2,5}	66,8 ± 7,3 ^a
PN ₅	68,0 ± 8,1 ^a
PN _{7,5}	67,4 ± 8,9 ^a
PN ₁₀	67,9 ± 9,5 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los superíndices con letras iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

4.3.2.2. Susceptibilidad al agua

Se estudió la susceptibilidad al agua de las películas obtenidas a partir de los polvos nanocompuestos (PN_x) a través de la determinación de su contenido de agua, su solubilidad en agua y su permeabilidad al vapor de agua (WVP), y los valores obtenidos se compararon con los de las películas nanocompuestas estudiadas en el capítulo 2, formadas por *casting* a partir de la mezcla directa de sus componentes (MD) y que presentan el mismo contenido de SPI y de MMT.

En la **Figura 4.5** se muestra el contenido de agua de las películas proteicas y nanocompuestas. Al aumentar la concentración de arcilla en la formulación, el contenido de agua disminuyó progresivamente, tanto para las películas PN_x como para las MD. Pero para las distintas concentraciones de MMT, las películas formadas a partir de los polvos presentaron contenidos de agua superiores a las preparadas por mezcla directa.

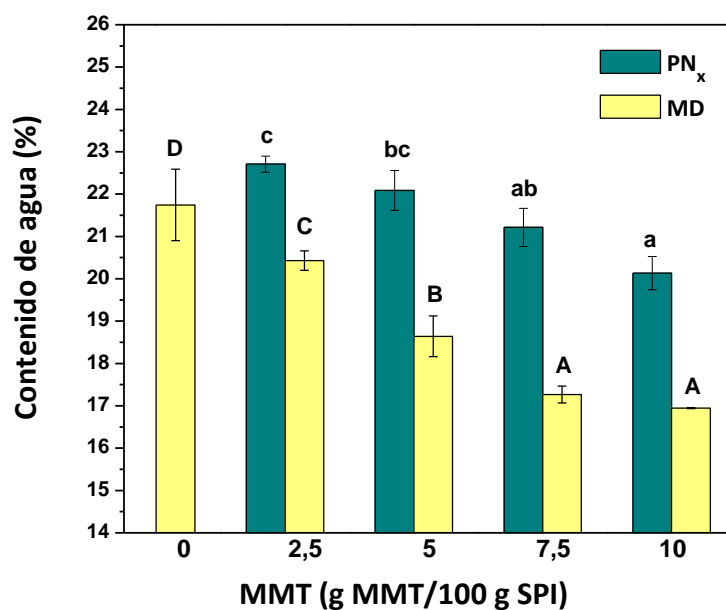


Figura 4.5: Contenido de agua de películas en base a SPI y distintos contenidos de MMT formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y mezcla directa de los componentes (MD) por *casting*. Medias con letras minúsculas diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$) para las películas formadas a partir de PN_x. Medias con letras mayúsculas diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$) para las películas formadas a partir de MD.

En la **Figura 4.6** se presenta la solubilidad en agua de ambos tipos de películas. La solubilidad en agua de las formuladas por los polvos nanocompuestos disminuyó significativamente a partir de 5 g MMT/100 g SPI, no variando con el agregado de mayor cantidad de arcilla, mientras que las películas formadas por MD mostraron una reducción escalonada en esta propiedad al incrementarse la concentración de MMT en la formulación. Al igual que para el contenido de agua, las solubilidades de las películas formadas por polvos fueron superiores a las preparadas con MD, con excepción de la formulación con 5 g MM/100 g SPI que no mostró diferencias para ambos tipos de películas

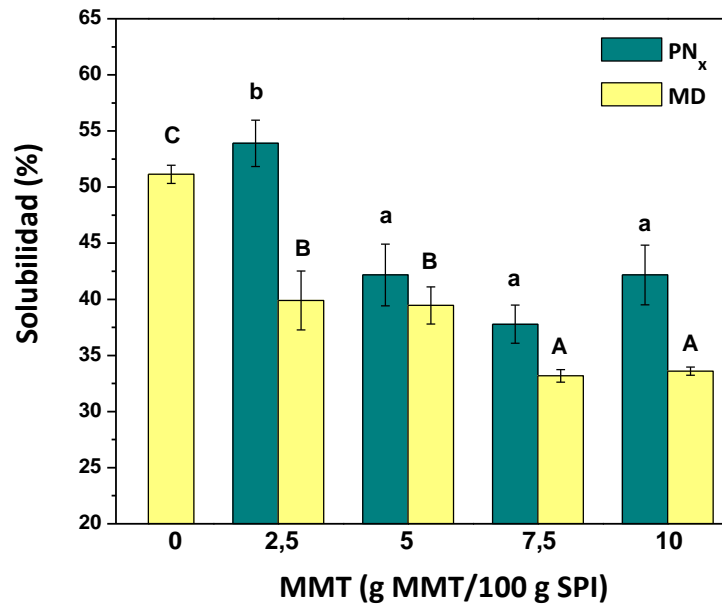


Figura 4.6: Solubilidad en agua de películas en base a SPI y distintos contenidos de MMT formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y mezcla directa de los componentes (MD) por *casting*. Medias con letras minúsculas (PN_x) ó mayúsculas (MD) diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$).

La WVP de las películas formadas con PN_x, presentada en la **Figura 4.7**, disminuyó significativamente respecto de la película de SPI, no observándose diferencias al aumentar el contenido de arcilla de la formulación. Mientras que para las películas formuladas por MD la disminución es significativa para concentraciones superiores o iguales a 5 g MMT/100 g SPI, y sigue disminuyendo progresivamente al aumentar el contenido de arcilla. En consecuencia, al incrementarse la concentración de MMT (por encima del 2,5 g MMT/100 g de SPI), las diferencias en esta propiedad se agrandan entre los dos tipos de películas siendo menores las permeabilidades al vapor de agua de las formadas por mezcla directa.

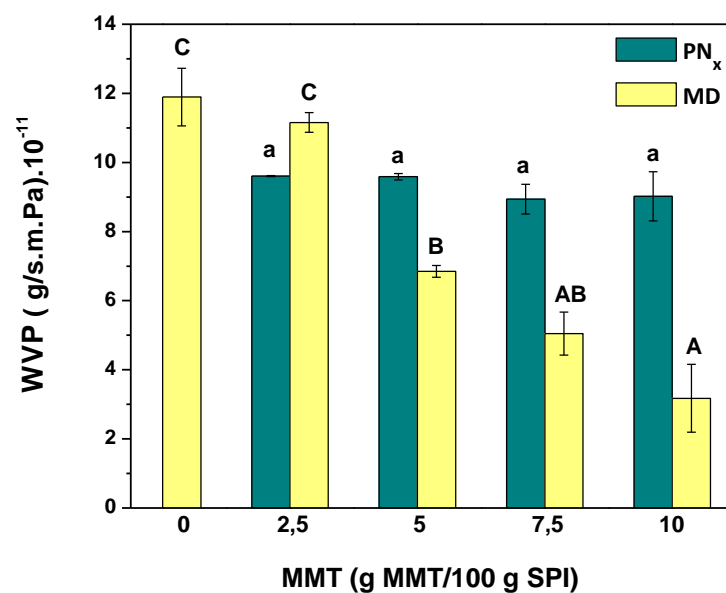


Figura 4.7: Permeabilidad al vapor de agua de películas en base a SPI y distintos contenidos de MMT formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y mezcla directa de los componentes (MD) por *casting*. Medias con letras minúsculas (PN_x) ó mayúsculas (MD) diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$).

4.3.2.3. Propiedades mecánicas

Se estudiaron las propiedades mecánicas en tracción de las películas obtenidas a partir de los polvos nanocompuestos, las cuales se muestran en la **Figura 4.8**. De la misma se puede observar que al aumentar el contenido de arcilla en las películas la tensión a la ruptura y el módulo de Young aumentaron un 124 % y 294 % para 10 g MMT/100 g SPI respectivamente, mientras que la elongación disminuyó en un 61 %. Esta mejora en el refuerzo de las películas nos da idea que la exfoliación obtenida en los polvos se mantiene una vez obtenidas las películas.

Si bien las películas obtenidas por MD por *casting* (estudiadas en el capítulo 2) tuvieron una mejora en la tensión máxima a la ruptura y módulo mayores que estas películas de PN_x, la disminución en la elongación fue mucho menor en estas últimas (61 % respecto de 79 %), lo cual podría ser debido al mayor porcentaje de humedad obtenido en las películas de PN_x.

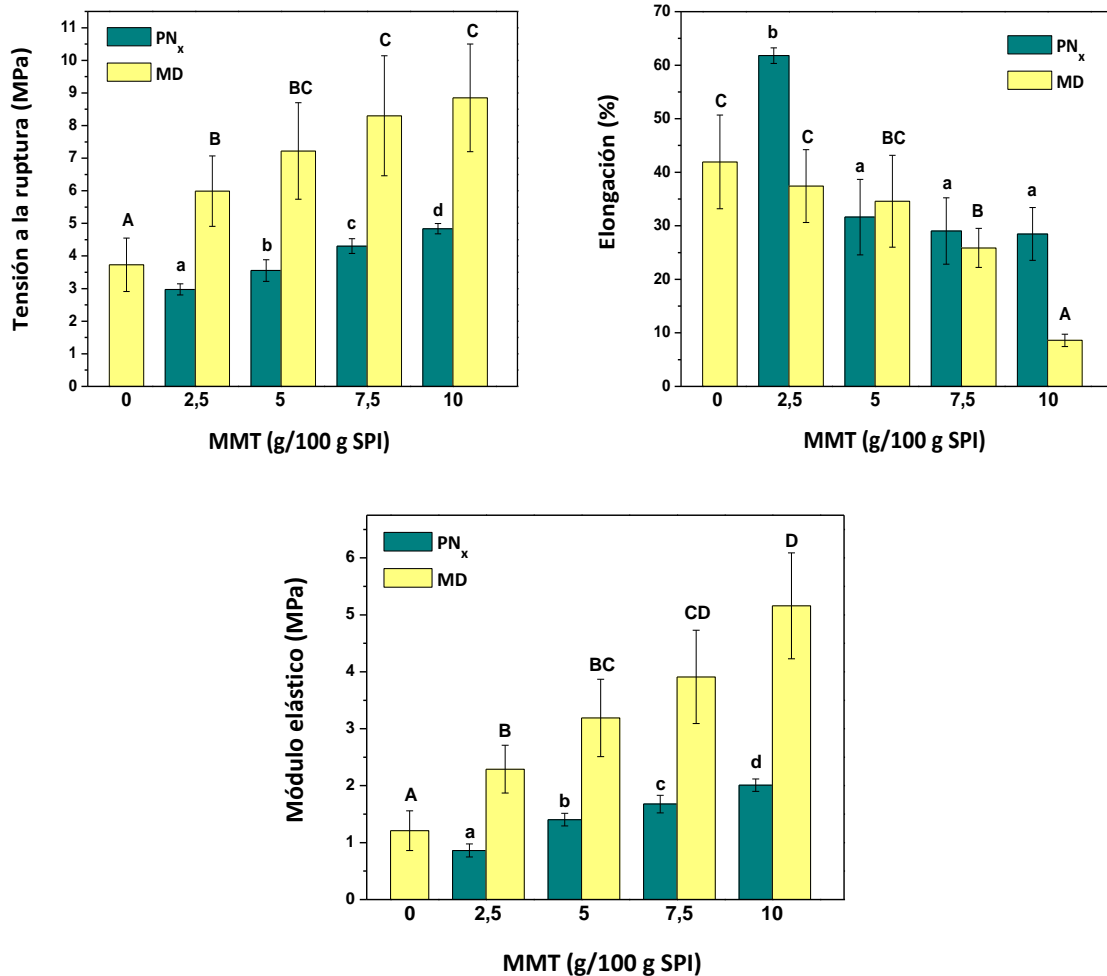


Figura 4.8: Tensión a la ruptura, elongación y módulo elástico de películas en base a SPI y distintos contenidos de MMT formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y mezcla directa de los componentes (MD) por *casting*. Medias con letras minúsculas (PN_x) ó mayúsculas (MD) diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$).

Dados los análisis de rayos X de las películas formadas por MD y por PN_x, es de esperar que en ambos tipos de películas las láminas de arcilla se encuentran con un grado de exfoliación importante, lo que explica el efecto refuerzo obtenido en ambos tipos de películas. El mayor refuerzo obtenido en los procesos de mezcla directa permite suponer que en estos sistemas la dispersión en la matriz proteica puede ser más homogénea. Tal vez, al reintentar solubilizar los polvos nanocompuestos no se logra dispersar adecuadamente la arcilla por la existencia de fuertes interacciones entre la arcilla y las cadenas proteicas formadas previamente. Nuevos estudios se realizarán con la finalidad de verificar esta hipótesis.

4.4.3. Caracterización de películas a partir de polvos nanocompuestos obtenidas por termocompresión

Las películas que se obtuvieron por termocompresión a partir de polvos nanocompuestos resultaron todas homogéneas y flexibles, presentando espesores menores respecto del control, que se presentan en la **Tabla 4.2**. Esta es una diferencia significativa ya que al estudiar la formación de películas por termocompresión por mezcla directa de sus componentes, no se observaron diferencias significativas en este valor con el agregado de cantidades crecientes de arcilla. Dado que el espesor de las películas es determinante en el valor de sus propiedades, habrá que considerar este punto en el análisis.

Tabla 4.2: Espesor de películas de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonita obtenidas por termocompresión a partir de los PN_x y por MD.

MMT (g/100 g SPI)	Espesor (μm)	
	MD	PN _x
0	278 ± 8 ^a	--
5	251 ± 15 ^a	115 ± 8 ^a
10	265 ± 15 ^a	132 ± 15 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los superíndices con letras iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

En la **Figura 4.9** se presenta el contenido de humedad de las películas proteicas y nanocompuestas formadas a partir de los PN_x. De la misma es posible observar que las películas formadas con polvos nanocompuestos con concentraciones diferentes de MMT, no presentan variaciones en el contenido de humedad mientras que las películas a partir de MD sufren una importante disminución en esta propiedad a pesar de su mayor espesor.

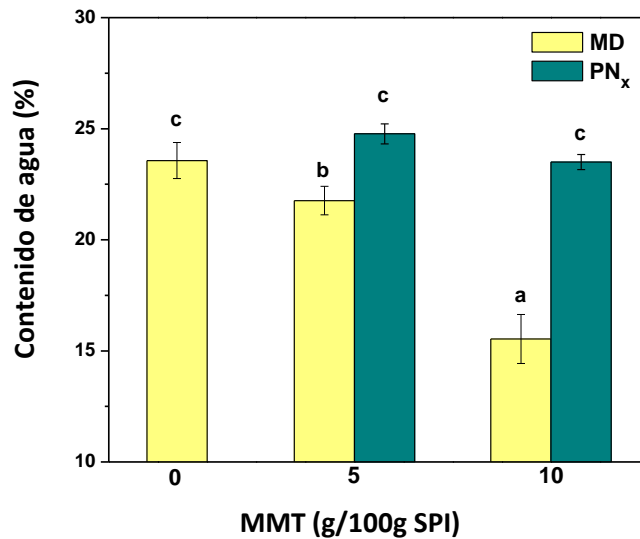


Figura 4.9: Contenido de humedad de películas en base a SPI y MMT formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y mezcla directa (MD) por termocompresión. Medias con letras diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$).

La solubilidad de las películas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) disminuye significativamente recién con el agregado de 10 g MMT/100 g SPI en un 7 % (**Figura 4.10.A**). Esta disminución no es tan marcada como se observó para las películas obtenidas por mezcla directa de los componentes, donde fueron disminuyendo progresivamente con el aumento de MMT en la formulación.

Todos los materiales nanocompuestos presentaron permeabilidades al vapor de agua inferiores a los de las películas proteicas (**Figura 4.10.B**). Si bien la disminución progresiva con el aumento del contenido de arcilla solo se observó para los materiales formados por mezcla directa, la disminución de la WVP con el agregado de 5 g MMT/100 g SPI fue significativamente mayor para las películas a partir de PN_x.

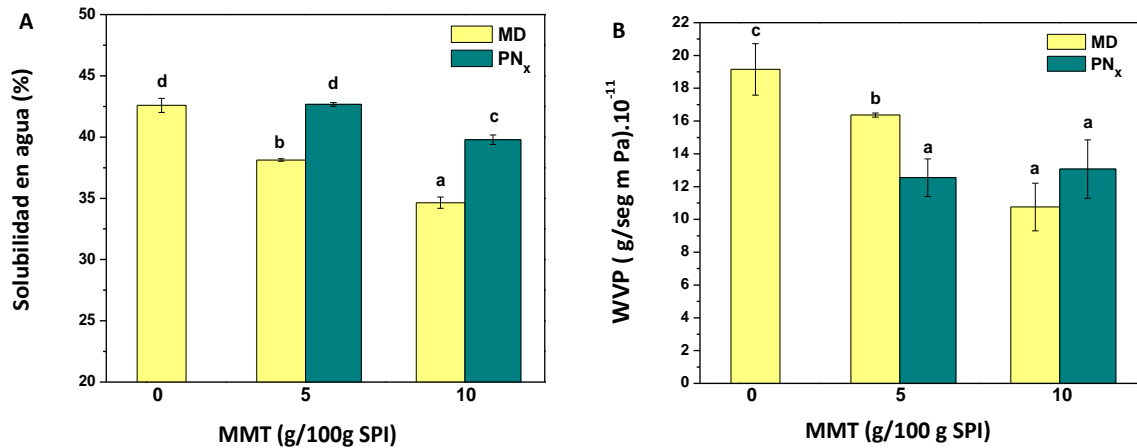


Figura 4.10: Solubilidad en agua (**A**) y permeabilidad al vapor de agua (**B**) de películas en base a SPI y MMT formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y por mezcla directa (MD). Medias con letras diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$).

Las propiedades mecánicas medidas en tracción de las películas se muestran en la **Figura 4.11**. Al aumentar el contenido de arcilla en los polvos nanocompuestos que formaron las películas se observa que el módulo elástico aumenta, mientras que la tensión y la deformación disminuyen comparados con las películas control, no observándose las mejoras encontradas para películas obtenidas por mezcla directa. Estas propiedades mecánicas podrían estar sugiriendo inhomogeneidades o imperfecciones que estarían anticipando la ruptura, y serían responsables de las propiedades encontradas.

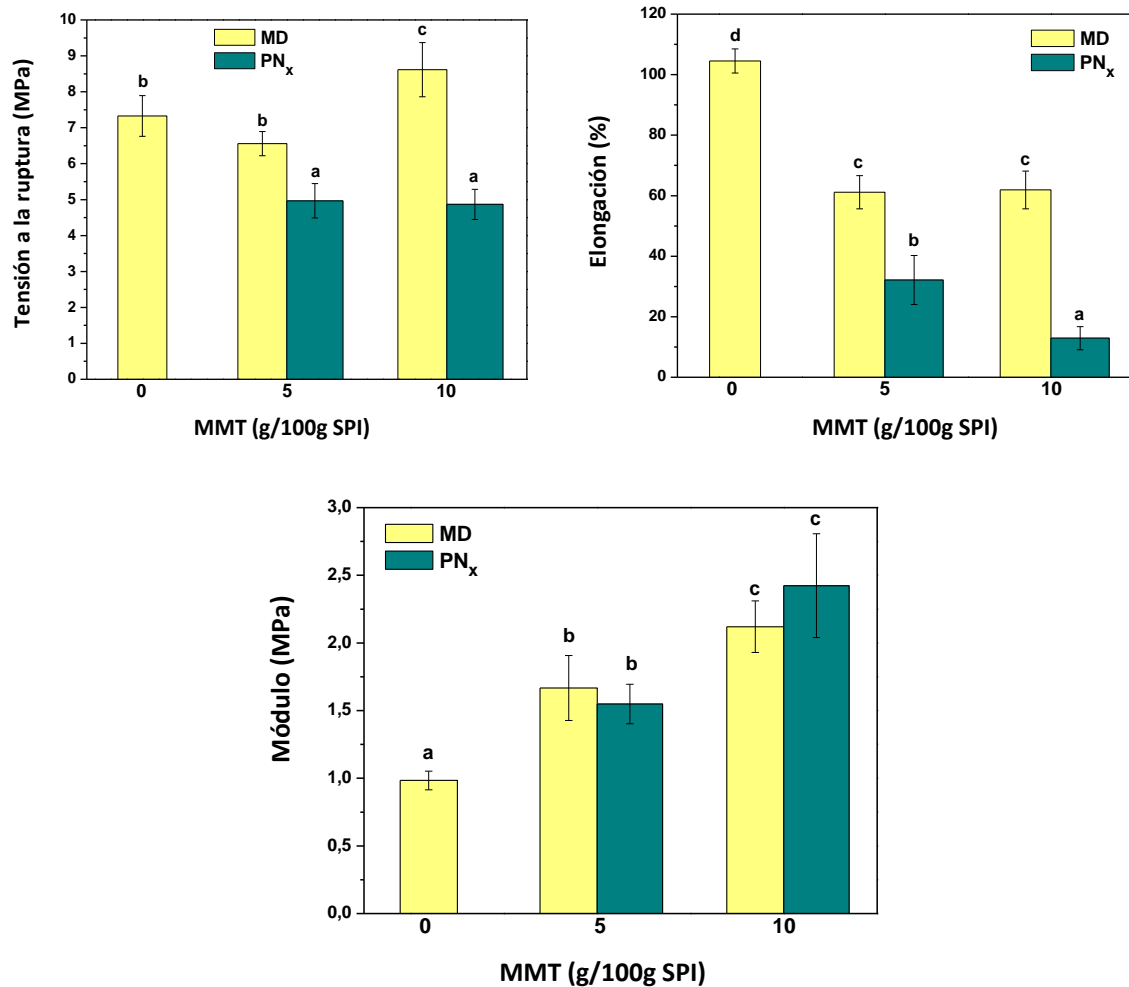


Figura 4.11: Tensión a la ruptura, elongación y módulo elástico de películas en base a SPI y MMT formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y por mezcla directa (MD). Medias con letras minúsculas diferentes corresponden a medias diferentes ($p \leq 0,05$).

La estructura de los materiales proteicos y nanocompuestos obtenidos por termocompresión a partir de polvos nanocompuestos se analizaron por difracción de rayos X, resultados que se muestran en la **Figura 4.12**. No se observó el pico característico de la MMT natural en ninguna de las películas formadas con PN_x, aunque sí se puede ver un ensanchamiento de la curva correspondiente a 10 g MMT/100 g SPI a un ángulo 2θ alrededor de 3° . Esto nos podría estar indicando que la arcilla se encuentra intercalada en la matriz proteica. El hecho de que no haya ningún pico en los patrones de difracción de rayos X para las películas obtenidas a partir de los PN_x nos está indicando que la arcilla se mantiene con un grado de desorden similar a como se encuentra en los PN_x. Es necesario

analizar la microestructura de estos materiales por TEM (estudios en realización) con el fin de analizar el grado de dispersión de las arcillas en las matrices.

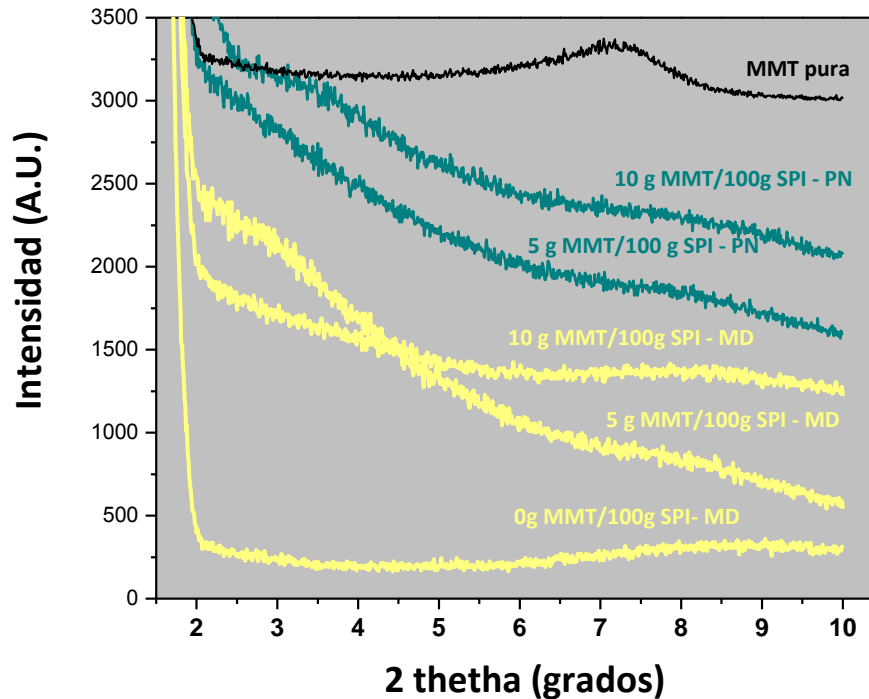


Figura 4.12: Patrones de difracción de rayos X de la MMT pura, de la película proteica y de las películas nanocompuestas formadas a partir de polvos nanocompuestos (PN_x) y mezcla directa (MD).

Si bien los polvos nanocompuestos se prepararon con la intención de tener un material de partida, en donde la arcilla se encontrara totalmente exfoliada, para así lograr mejores refuerzos en los materiales obtenidos por las distintas metodologías de procesamiento, los resultados mostraron que las películas resultantes no alcanzaron las propiedades de aquellas formadas por mezcla directa. Evidentemente al realizar la mezcla directa durante el procesamiento de las películas se logra una mayor dispersión de la arcilla, lo que se traduce en un mayor efecto refuerzo. Posiblemente durante la liofilización se estén favoreciendo fuertes interacciones entre la arcilla y la proteína, que impliquen que los materiales formados con estos polvos presenten inhomogeneidades. La gran disminución en el espesor podría llegar a estar dando idea de estas fuertes interacciones. Será necesario seguir estudiando estos sistemas, con el fin de llegar a comprender este comportamiento inesperado.

4.4. Conclusiones

- a.** Se prepararon polvos nanocompuestos en base a proteínas de soja y montmorillonita en donde la arcilla se encuentra dispersa con un buen grado de exfoliación para facilitar el procesamiento de materias nanocompuestas.

- b.** Las películas formadas a partir de estos polvos por casting y termocompresión presentaron propiedades mecánicas inferiores, menores elongaciones y resistencia a rotura que las obtenidas por mezcla directa de los componentes, debido a una menor homogeneidad de los materiales resultantes.

- c.** Aún así, la utilización de polvos nanocompuestos constituye una alternativa interesante para ser utilizada en procesamientos donde la dispersión de la arcilla puede ser un limitante.



5

**Películas nanocompuestas
de matriz proteica de soja reforzadas con
montmorillonitas orgánicamente modificadas**



5. Películas nanocompuestas de matriz proteica de soja reforzadas con montmorillonitas orgánicamente modificadas

5.1. Introducción

En general las mejores propiedades en los sistemas nanocompuestos reforzados con arcilla se alcanza cuando estas se encuentran exfoliadas en la matriz polimérica (Zeng y col, 2001). Pero en general es difícil lograr la exfoliación de las arcillas, ya que estos materiales en capa tienen tendencia a aglomerarse por su carácter hidrofílico. Este estado puede alcanzarse más fácilmente si se logra separar la distancia interlaminar entre las capas de arcilla, porque de esta manera se facilita la entrada de las cadenas de polímeros en las galerías de arcilla (LeBaron y col., 1999). La distancia interlaminar puede aumentarse por una reacción de intercambio de los iones Na presentes en las arcillas naturales con cationes orgánicos tales como sales de amonio primarias o cuaternarias unidas a cadenas alquílicas (Vaia y col, 1994; Li y col, 2006). Esta modificación superficial además de aumentar el espaciado sirve como compatibilizante entre las arcillas hidrofílicas y algunos polímeros hidrofóbicos. Existen pocos estudios en la bibliografía sobre las propiedades de los biopolímeros con montmorillonitas orgánicamente modificadas (Sothornvit y col., 2009 y 2010, Kumar y col., 2010).

Es de esperar que polímeros que tengan segmentos polares y no polares, como es el caso de las proteínas, podrían llegar a lograr una buena dispersión de la arcilla orgánicamente modificada, un dominio podría interactuar con la superficie de la capa de silicato con el fin de promover la compatibilidad entre el polímero y la arcilla, mientras que el otro dominio debería rechazar la arcilla orgánica para exfoliar las capas de MMT (Barick y Tripathy, 2011). En este punto se intentó reforzar a las matrices proteicas de soja con tres montmorillonitas orgánicamente modificadas, Cloisite® 10A que es una MMT modificada con una sal de amonio cuaternaria y en una de las cadenas alquílicas contiene un anillo aromático, Cloisite® 30B que es una MMT modificada con una sal de amonio cuaternaria y en dos de sus cadenas alquílicas contiene grupos OH, y Cloisite® 15A que es una MMT modificada con una sal de amonio cuaternaria y en dos de sus cadenas alquílicas tienen al menos 14 C. Las distintas MMT se diferencian en los grupos funcionales diferentes que contienen, por lo que cada una

tendrá una disposición diferente a interactuar con las cadenas proteicas. Estas distintas interacciones deberían reflejarse en las propiedades de los materiales resultantes.

En este marco, los objetivos de este capítulo fueron:

- Obtener películas nanocompuestas de matriz proteica de soja reforzadas con montmorillonitas orgánicas modificadas, por termocompresión.
- Caracterizar las propiedades estructurales, físicas, mecánicas y de barrera de estos materiales.
- Estudiar el efecto que tiene variar la concentración de arcilla sobre las propiedades de los materiales nanocompuestos resultantes.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materiales

Se utilizaron los mismos materiales (aislado proteico, glicerol y montmorillonita natural) descritos en la sección 2.3.1. Además se utilizaron montmorillonitas modificadas químicamente, las cuales se describen a continuación.

5.2.1.1. Montmorillonitas modificadas

Se utilizaron montmorillonitas comerciales modificadas químicamente, Cloisite® 30B, Cloisite® 10A, Cloisite® 15A, provistas por Southern Clay Products (Texas, Estados Unidos), cuyas fichas técnicas se presentan en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1: Montmorillonitas orgánicamente modificadas. Datos provistos por el fabricante (Southern Clay Co., Gonzales, TX, EE.UU.).

Características	Tipo de arcilla		
	Cloisite® 30B	Cloisite® 10A	Cloisite® 15A
Modificador orgánico (ID)	Methyl-tallow-bis,2-hidroxiethyl ammonium chloride (MT2EthOH) ^a	Dimethyl benzyl hydrogenated tallow ammonium chloride (2MBHT) ^a	Dimethyl dihydrogenated tallow ammonium chloride (2M2HT) ^a
Fórmula estructural	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{T} \quad \text{Cl}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{HT} \end{array} \quad \text{Cl}^-$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{HT} \quad \text{Cl}^- \\ \\ \text{HT} \end{array}$
Tamaño de partícula (µm)	2-13	2-13	2-13
Espacio interlaminar (nm)	1,85	1,92	3,15
Concentración de modificador (meq/100g arcilla)	90	125	125
Contenido de humedad (%)	< 2	< 2	< 2
Color			
Densidad (g/ml)	1,98	1,90	1,66
Hidrofobicidad relativa	Menos hidrofóbica	Hidrofobicidad media	Fuertemente hidrofóbica
ID	30B	10A	15A

^a Tallows están hechos de aproximadamente 65% C18, 30% C16 y 5% C14. Excepto 30B, el resto son colas hidrogenados.

5.2.2. Obtención de las películas

Las películas proteicas y nanocompuestas se obtuvieron por *termocompresión* usando el mismo protocolo descrito en la sección 2.4.1. Se trabajó con los mismos materiales de partida, sólo que se utilizaron MMT modificadas en vez de la MMT natural (Cloisite® 30B, Cloisite® 10A, Cloisite® 15A, que de ahora en más serán nombradas como MMT 30B, MMT 10A y MMT 15A respectivamente). Las películas resultantes se acondicionaron a 20 °C y 58 % HR (en desecador con una solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.

5.2.3. Caracterización de las películas proteicas

Las películas proteicas y nanocompuestas obtenidas por *termocompresión* fueron caracterizadas mediante la determinación del espesor, contenido de agua, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, propiedades mecánicas, difracción de rayos X y DMTA, como se describió en la sección 2.2.4.

5.2.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medidas fueron evaluadas por el Test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Morfología de las arcillas modificadas

La caracterización de la estructura de las arcillas modificadas se realizó por rayos X. La **Figura 5.1** muestra los espectros de difracción de rayos X de las arcillas estudiadas. El pico de difracción característico de la arcilla Cloisite® 30B se encuentra en $2\theta = 4,86^\circ$, el de la Cloisite® 10A a $4,61^\circ$ y el de la Cloisite® 15ª a $2,83^\circ$, correspondiendo a espacios interlaminares (d_{001}) de 1,82, 1,92 y 3,15 nm respectivamente. Los valores encontrados se corresponden con los informados en la ficha técnica de estos productos. Pero cabe señalar que en el difractograma de la MMA 15 A también aparece un pequeño pico a en $2\theta = 7,04^\circ$, que podría estar insinuando la presencia de algo de la MMT-Na natural remanente del proceso de la modificación de la arcilla.

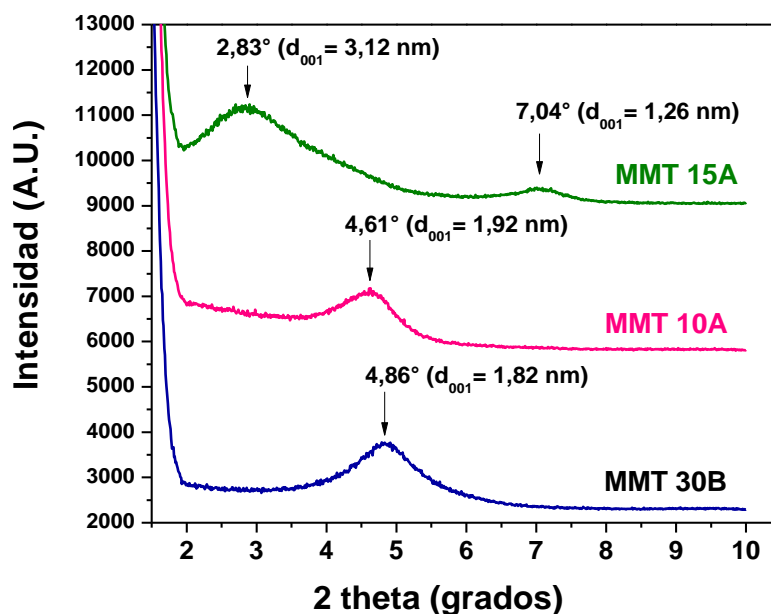


Figura 5.1: Espectros de difracción característicos de las MMT modificadas.

5.3.2. Materiales nanocompuestos en base a proteínas de soja y montmorillonita orgánicamente modificadas obtenidos por termocompresión

Dada la baja solubilidad de las arcillas modificadas en agua, solo se estudió su formación por termocompresión.

5.3.1. Apariencia

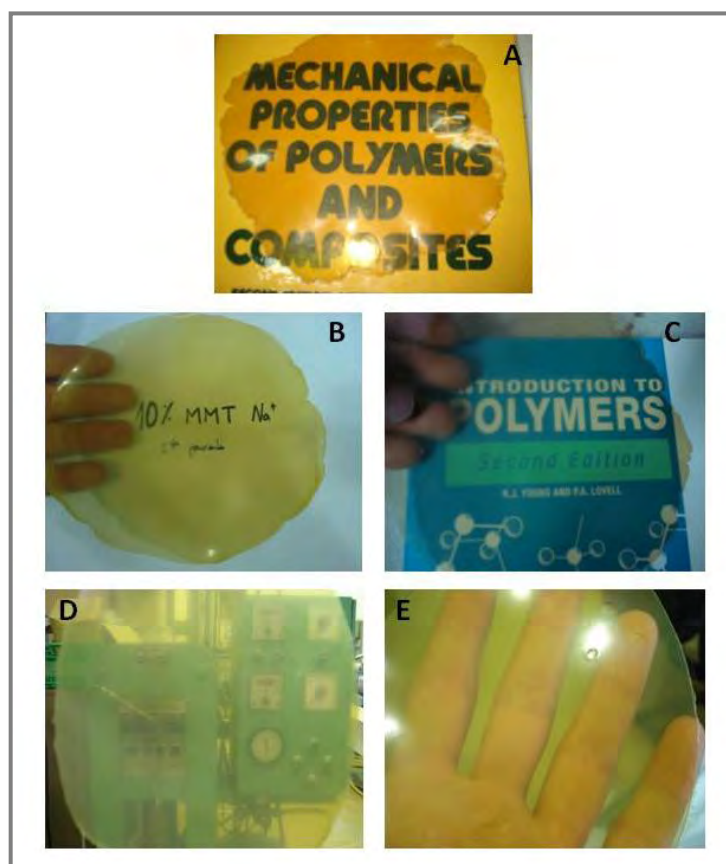


Figura 5.2: Apariencia visual de películas con SPI (A) y con 10 g arcilla/100 g SPI, siendo: (B) MMT natural, (C) MMT 30B, (D) MMT 10A y (E) MMT 15A.

Se lograron obtener películas homogéneas y flexibles a partir de SPI y MMT modificadas. Visualmente todas resultaron amarillentas y con un cierto grado de transparencia (**Figura 5.2**), presentando espesores similares (**Tabla 5.2**). Los resultados obtenidos para las películas nanocompuestas a partir de MMT natural se incluyen con el objetivo de compararla con las MMT modificadas.

Tabla 5.2: Espesores de películas de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonitas natural y modificadas.

Tipo de arcilla	% MMT	Espesor (μm)
	0	278 \pm 8 ^a
MMT Na	5	251 \pm 15 ^a
	10	265 \pm 15 ^a
MMT 30B	5	248 \pm 18 ^a
	10	266 \pm 17 ^a
MMT 10A	5	274 \pm 23 ^a
	10	262 \pm 7 ^a
MMT 15A	5	272 \pm 9 ^a
	10	278 \pm 13 ^a

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

Se cuantificaron las propiedades ópticas de las películas mediante los parámetros de color de Hunter Lab (L , a , b y ΔE) y la opacidad (**Tabla 5.3**). Las propiedades ópticas de las películas variaron según el tipo de arcilla utilizada.

Las películas obtenidas con la arcilla 30B muestran que al aumentar el contenido de arcilla aumenta progresivamente el valor de luminosidad (mayor L), volviéndose menos amarillentas (menor a y b) que el control, lo cual se ve reflejado en el parámetro ΔE (menor coloración). Este comportamiento también fue observado para las películas con MMT natural discutidas en el capítulo 3, aunque la variación en los parámetros fue menos marcada. De la misma manera, las películas formadas con la arcilla 15A mostraron la misma tendencia de aumentar el parámetro L y disminuir los parámetros de cromaticidad a y b , mostrando una menor coloración general al aumentar el contenido de arcilla, sólo que no hubo diferencias significativas entre el agregado de 5 y 10 g MMT 15A/100 g SPI. Por otro lado, las películas obtenidas con la MMT 10A mostraron otro comportamiento respecto de

las demás arcillas modificadas y la natural. La diferencia para los valores de luminosidad, cromaticidad y diferencia de color recién se hicieron significativamente diferente con el agregado de 10 g MMT 10A/100g SPI, siendo las películas menos claras (menor *L*), más amarillentas (mayores valores de *a* y *b*) y con una mayor coloración general (mayor ΔE).

Cabe destacar que si bien hay diferencia significativa entre los valores con el agregado de arcillas, esta diferencia no es distintivamente diferente a simple vista.

Respecto de la opacidad de las películas, se puede observar de la **Tabla 5.3** que, independientemente del tipo de arcilla utilizada, al aumentar su concentración, la opacidad se incrementa, siendo menos marcado este aumento para las arcillas modificadas que para la natural.

Tabla 5.3: Propiedades ópticas de las películas proteicas obtenidas a partir de aislados proteicos de soja y montmorillonitas modificadas.

Tipo de arcilla	MMT (g/100g SPI)	Parámetros de Color Hunter Lab				Opacidad (UA mm ⁻¹)
		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE	
	0	75,9 ± 0,3 ^b	1,6 ± 0,1 ^d	38,2 ± 0,2 ^f	42,3 ± 0,2 ^f	1,0 ± 0,004 ^a
MMT	5	78,6 ± 0,3 ^d	0,6 ± 0,1 ^b	33,1 ± 0,3 ^c	36,6 ± 0,4 ^c	1,6 ± 0,01 ^{bce}
Na	10	80,3 ± 0,3 ^e	0,0 ± 0,1 ^a	28,8 ± 0,4 ^a	32,0 ± 0,5 ^a	1,7 ± 0,02 ^b
MMT	5	77,8 ± 0,4 ^c	0,9 ± 0,2 ^c	34,5 ± 0,6 ^d	38,2 ± 0,7 ^d	1,2 ± 0,02 ^{ad}
30B	10	79,0 ± 0,6 ^d	0,4 ± 0,2 ^b	32,1 ± 0,8 ^b	35,5 ± 0,9 ^b	1,4 ± 0,1 ^{cdf}
MMT	5	76,3 ± 0,2 ^b	1,5 ± 0,1 ^d	38,0 ± 0,3 ^f	41,9 ± 0,4 ^f	1,1 ± 0,03 ^a
10A	10	74,5 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,1 ^e	40,5 ± 0,2 ^g	45,0 ± 0,2 ^g	1,4 ± 0,02 ^{deg}
MMT	5	77,4 ± 0,5 ^c	1,1 ± 0,2 ^c	35,6 ± 0,7 ^e	39,3 ± 0,8 ^e	1,1 ± 0,01 ^a
15A	10	77,4 ± 0,4 ^c	0,9 ± 0,2 ^c	35,9 ± 0,5 ^e	39,6 ± 0,6 ^e	1,6 ± 0,2 ^{bfg}

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

5.3.2. Susceptibilidad al agua

El contenido de agua de las películas obtenidas se muestra en la **Tabla 5.4**. La incorporación de arcillas orgánicamente modificadas produjo una disminución significativa en el contenido

de agua de las películas compuestas, respecto del control, no observándose diferencias entre el tipo y el contenido de arcilla agregada (5 y 10 g arcilla/100 g SPI). Cabe mencionar que para el caso de la MMT natural el contenido de agua de las películas disminuye progresivamente al aumentar la concentración de arcilla hasta 10 g MMT/100 g SPI, como se discutió en el capítulo 3. Respecto de la arcilla natural, las películas con 5 g MMT modificada/100 g SPI presentaron menor contenido de agua, pero esta diferencia que podría atribuirse al mayor carácter hidrofóbico de las arcillas modificadas, no se visualizó en los sistemas con 10 g MMT/100 g SPI.

Tabla 5.4: Contenido de agua de películas de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonitas natural y modificadas.

Tipo de arcilla	MMT (g/100 g SPI)	Contenido de agua (%)
	0	23,94 ± 0,71 ^d
MMT Na	5	21,76 ± 0,22 ^c
	10	16,85 ± 0,75 ^a
MMT 30B	5	18,12 ± 0,10 ^{ab}
	10	17,27 ± 0,05 ^{ab}
MMT 10A	5	18,61 ± 0,63 ^b
	10	18,12 ± 0,54 ^{ab}
MMT 15A	5	18,01 ± 0,28 ^{ab}
	10	18,12 ± 0,23 ^{ab}

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

La **Tabla 5.5** muestra la solubilidad en agua, la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y el ángulo de contacto de las distintas películas.

Tabla 5.5: Solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y ángulo de contacto de películas obtenidas a partir de aislado de proteína de soja con distinto contenido de montmorillonitas modificadas, por termocompresión.

Tipo de arcilla	% MMT	Solubilidad (%)	WVP . 10 ⁻¹⁰ (g seg ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)	Ángulo de contacto (°)
	0	42,59 ± 0,57 ^d	1,92 ± 0,22 ^{be}	14,56 ± 2,97 ^a
MMT Na	5	38,13 ± 0,11 ^b	1,63 ± 0,01 ^b	16,38 ± 1,51 ^a
	10	34,64 ± 0,46 ^a	1,07 ± 0,14 ^a	15,19 ± 1,03 ^a
MMT 30B	5	39,31 ± 0,49 ^c	2,62 ± 0,12 ^c	25,24 ± 1,87 ^b
	10	39,19 ± 0,91 ^c	2,73 ± 0,17 ^c	32,57 ± 1,45 ^c
MMT 10A	5	39,48 ± 0,27 ^c	3,62 ± 0,06 ^d	37,62 ± 3,06 ^d
	10	39,29 ± 0,96 ^c	3,43 ± 0,41 ^d	37,29 ± 2,08 ^d
MMT 15A	5	40,09 ± 0,71 ^c	2,57 ± 0,14 ^e	33,96 ± 2,93 ^{cd}
	10	39,89 ± 0,71 ^c	2,37 ± 0,13 ^{ce}	ND

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

La solubilidad en agua de las películas formadas con arcillas modificadas disminuyó levemente respecto de las películas proteicas, independientemente de la concentración y del tipo de arcilla agregada. A diferencia de estos resultados, como se mostró en el capítulo 2, la MMT natural disminuyó la solubilidad de las películas progresivamente con el agregado de mayores concentraciones de MMT. Es importante destacar, que a pesar que los valores de solubilidad son importantes, todas las películas mantuvieron su integridad después de 24 h de estar agitándose en agua (condiciones del ensayo). En la **Figura 5.3** se muestran estas observaciones para la película control y con 5 % MMT 10A a modo de ejemplo.

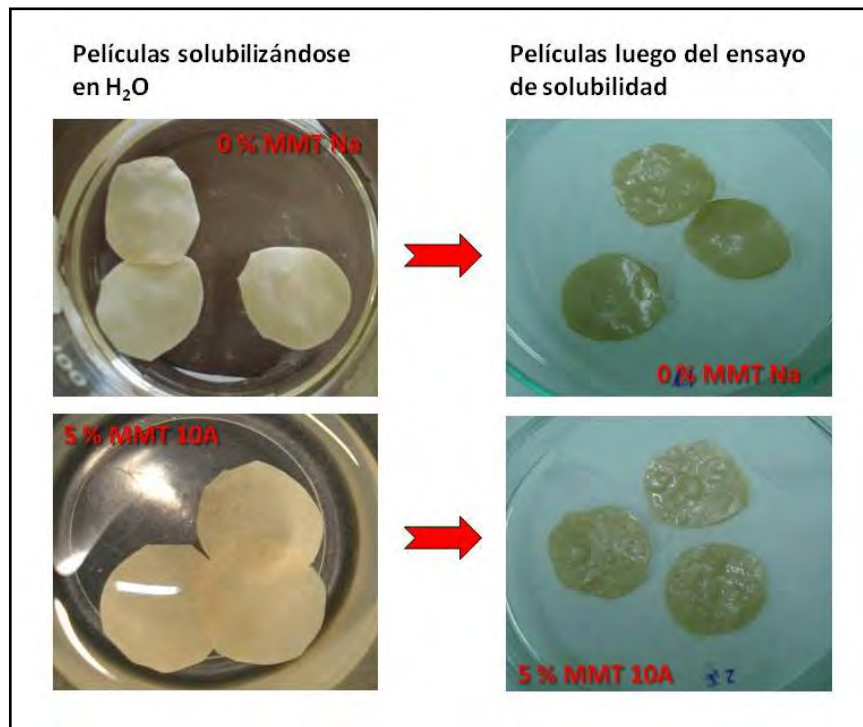


Figura 5.3: Solubilidad de películas en agua. Se muestra a modo de ejemplo los discos de películas antes y después de la agitación en agua, para las películas control (0 g MMT/100 g SPI) y con 5 g MMT 10A/100 g SPI).

Los resultados de WVP muestran un aumento en la misma para las películas fabricadas con MMT 30B y MMT 10A, respecto del control (0 g MMT/100 g SPI) y de las películas formuladas con MMT natural, sin variaciones dependientes del contenido de las arcillas agregadas. Para las arcillas MMT 15A, se observó un valor semejante al de la película proteica control (0 g MMT/100 g SPI) para ambas concentraciones de arcillas. En general las mejoras en las propiedades barrera se logran en los sistemas donde las arcillas logran un grado importante de exfoliación y/o intercalación en la matriz polimérica, lo que da lugar a un camino mas tortuoso en el transporte de las moléculas de agua a través de la matriz proteica (Choudalakis y Gotsis, 2009). Los resultados obtenidos sugieren un bajo y heterogeneo grado de exfoliacion/intercalación de la arcilla en la matriz proteica.

EL grado de hidrofobicidad o hidrofiliidad superficial de las películas fue evaluada por estudios de ángulo de contacto. Los valores de los ángulos para las películas con la MMT natural, que resultaron similares a los de las películas proteicas, fueron aproximadamente la mitad de los correspondientes a las películas con arcillas modificadas (**Tabla 5.5**), indicando un aumento de la hidrofobicidad superficial de las películas. Pero esta propiedad no

correlacionó con la hidrofobicidad de las arcillas, ya que la MMT 10A, que tiene una hidrofobicidad intermedia entre las tres utilizadas (**Tabla 5.1.**) fue la que presentó los mayores ángulos de contacto.

5.3.3. Propiedades mecánicas

En la **Figura 5.4** se presentan las propiedades mecánicas de las películas nanocompuestas obtenidas con distintos tipos de arcillas modificadas, medidas con ensayos de tracción. Si bien el agregado de todas las arcillas mejoró el módulo elástico y disminuyó la elongación de los materiales resultantes en forma creciente con el agregado de las diferentes MMT, solo se logró mejorar la resistencia mecánica con el agregado de 10 g de MMT natural/100 g SPI, ya que para iguales concentraciones de arcillas modificadas la resistencia disminuyó muy significativamente respecto del control. El aumento del módulo acompañado con disminuciones en las tensiones podrían ser indicativos de la generación de imperfecciones o inhomogeneidades por una distribución desigual de las arcillas en las matrices proteicas que podría estar anticipando la ruptura.

Sothornvit y col. (2010) obtuvieron películas nanocompuestas por casting a partir de proteínas del lactosuero (WPI) y dos arcillas modificadas (5 % p/p), Cloisite® 30B y Cloisite® 20A (una arcilla modificada con una sal de amonio cuaternario que le da un mayor carácter hidrofóbico que la Cloisite® 30B y 10A, pero menor que 15A). Para las películas con Cloisite® 30B no encontraron diferencias significativas en las propiedades mecánicas respecto al control, en cambio aquellas formuladas con Cloisite® 20A disminuyeron la resistencia a la tracción, la elongación y el módulo en un 54, 33 y 43 % respecto del control. Estos autores atribuyeron estos resultados a la incompleta dispersión de la arcilla (Cloisite® 20A) en la matriz polimérica a causa de cierta incompatibilidad de la arcilla más hidrofóbica con la proteína más hidrofílica. En este trabajo, que se intentó generar las nanoestructuras por intercalación en fundido, debido a dicha incompatibilidad, no se logró mejorar las propiedades mecánicas con el agregado de estas arcillas más hidrofóbicas a la matriz proteica.

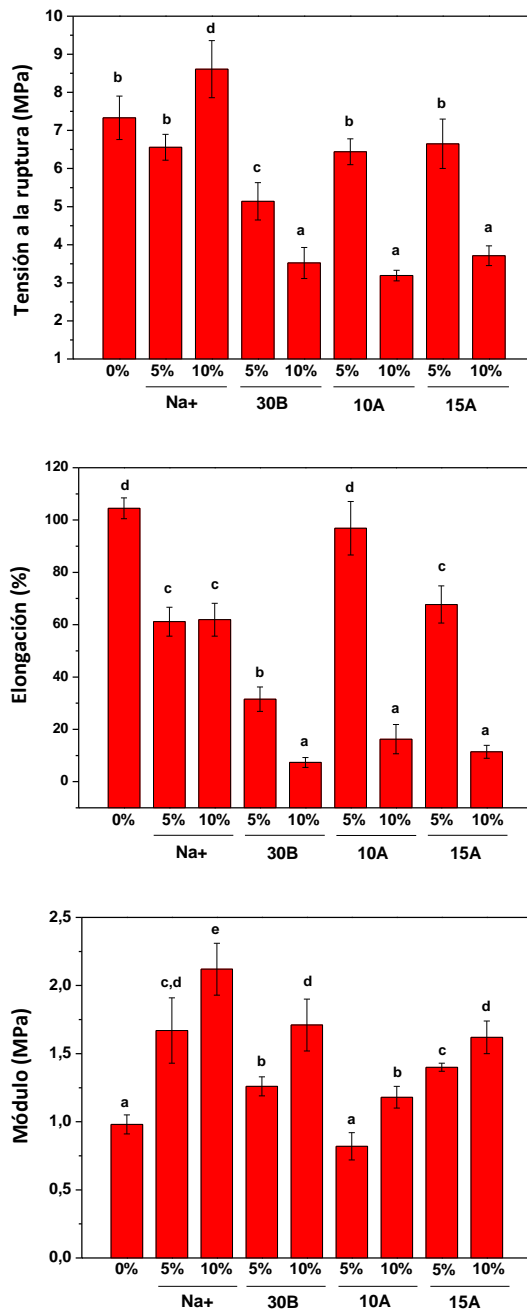


Figura 5.4: Propiedades mecánicas de las películas de proteína de soja con distinto contenido y tipo de montmorillonita modificada. Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$ según el test de Tukey.

5.3.4. Morfología

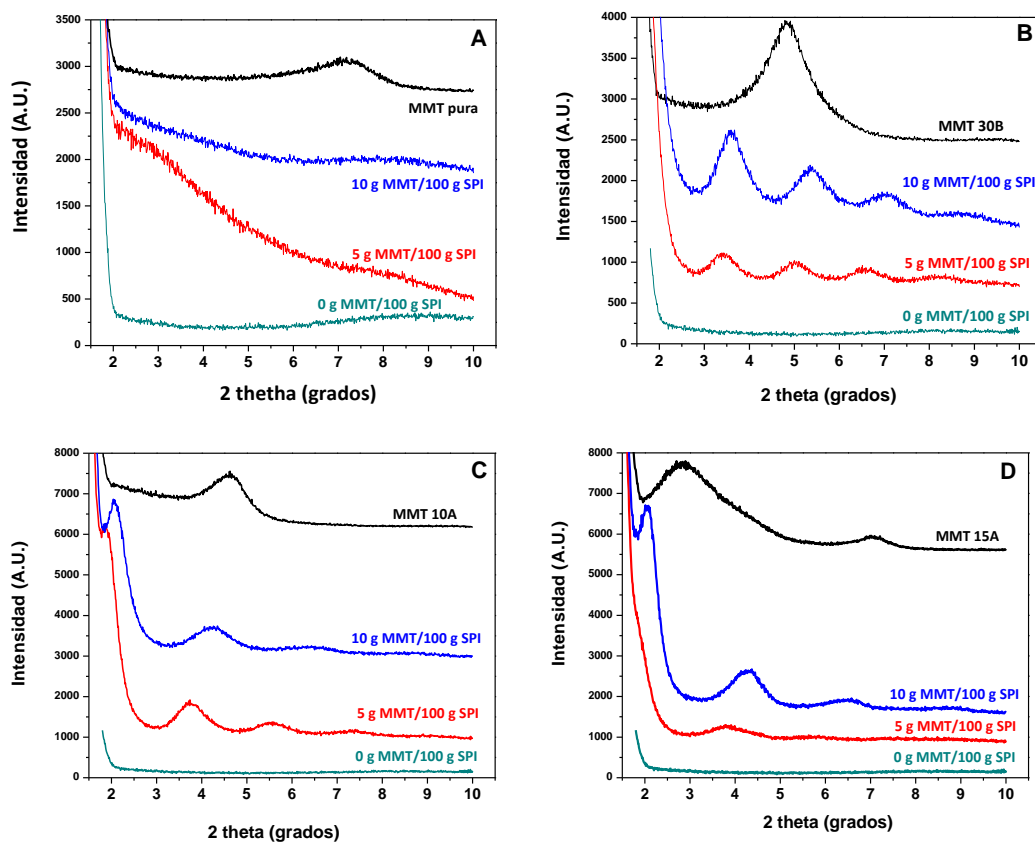


Figura 5.5: Difractometría de rayos X de las arcillas modificadas y de sus respectivas películas nanocompuestas, para **A)** MMT natural; **B)** MMT 30B, **C)** MMT 10A y **D)** MMT 15A.

Con el fin de analizar el grado de dispersión de la arcilla en las matrices proteicas se analizaron las películas por difracción de rayos X. En la **Figura 5.5** se muestran los espectros de las arcillas puras y de las películas proteicas con distinto contenido de esas arcillas y en la **Tabla 5.6** se resumen los valores de 2θ ($^{\circ}$) y d_{001} (nm) de los picos que aparecen en esos difractogramas. En el caso de las películas formadas a partir de SPI y MMT natural (**Figura 5.5. A**), se observa un importante grado de intercalación/exfoliación, especialmente para el sistema con 10 g MMT/100 g SPI, ya que en el espectro correspondiente a una concentración inferior de esta arcilla (5 g/100 g SPI) se observa un mayor levantamiento de línea de base con un hombro identificable a $2\theta \approx 3$, indicativo de la existencia de estructuras nanocompuestas intercaladas. El mayor grado de exfoliación alcanzado en las matrices con 10 g MMT/100 g SPI, explica las mejores propiedades mecánicas y resistencia al agua de las películas preparadas con esta formulación.

En general, en los espectros de las películas formadas a partir de SPI y las distintas arcillas modificadas (**Figuras 5.5. B, C y D**) se observaron varios picos de menor intensidad y mayor definición correspondientes a mayores y menores valores de 2θ o distancias interlaminares (**Tabla 5.6.**), que los de las respectivas MMT puras que en general presentan picos intensos y anchos.

En el caso de las películas con MMT 30 B, se observa el pico característico de la arcilla pura levemente desplazado (a $2\theta = 5,05^\circ$ - $5,38^\circ$) y la aparición de dos nuevos picos a $2\theta = 3,4^\circ$ - $3,58^\circ$ y $6,55^\circ$ - $7,07^\circ$ que se mueven a mayores ángulos a medida que la concentración de la arcilla aumenta. Es evidente que parte de la arcilla queda como tal, parte es intercalada por cadenas proteicas y otra parte flocula o se agrega.

Tabla 5.6: Valores de los ángulos 2θ y del espacio interlaminar (d_{001}) correspondientes a los picos observados en los espectro de difracción de rayos X de las películas de SPI-MMT modificadas con 5 y 10 g arcilla/100 g SPI.

MMT orgánicamente modificada	MMT (g/100 g SPI)	2θ ($^\circ$); (d_{001} , nm)	2θ ($^\circ$); (d_{001} , nm)	2θ ($^\circ$); (d_{001} , nm)
30B	5	3,4 (2,60)	5,05 (1,75)	6,55 (1,35)
	10	3,58 (2,47)	5,38 (1,64)	7,07 (1,25)
10 A	5	1,88 (4,69)	3,75 (2,35)	5,50 (1,61)
	10	2,07 (4,26)	4,24 (2,07)	6,50 (1,36)
15A	5	-	3,78 (2,34)	-
	10	2,06 (4,28)	4,31 (2,05)	6,50 (1,36)

En los espectros de difracción de las películas con MMT 10A, (**Figura 5.5-C**) se observa el pico característico ($2\theta = 4,61^\circ$ correspondiente a un espacio interlaminar $d_{001} = 1,92$ nm) para MMT 10A, que en las películas compuestas se encuentra desplazado hacia ángulos 2θ menores, generándose dos picos a $1,88^\circ$ ($d_{001} = 4,69$ nm) y $3,75^\circ$ ($d_{001} = 2,35$ nm) para 5 g MMT 10A/100 g SPI. Se puede observar un aumento importante del espaciamiento interlaminar, producto de la intercalación/exfoliación heterogénea de la arcilla MMT 10A en

presencia de la proteína. Para la película conteniendo 10 g MMT 10A/100 g SPI, se observa un pico a $2,07^\circ$ ($d_{001} = 4,26$ nm), otro a $4,24^\circ$ ($d_{001} = 2,07$ nm). Pero para ambas concentraciones también se observan picos a ángulos mayores. El espacio interlaminar es levemente mayor para los nanocompuestos con 5 g MMT 10A/100 g SPI, lo cual nos daría una idea de que a esa concentración de MMT la intercalación de las proteínas entre las capas de arcillas fue mejor. Los picos a mayores ángulos pueden atribuirse a la formación de agregados, lo cual entorpece la dispersión de la misma en la matriz proteica y generaría mayor dificultad para que la proteína se intercale entre las capas de la arcilla.

En la **Figura 5.3-D** se muestran los espectros de difracción de rayos X para las películas reforzadas con MMT 15A. El pico característico de la MMT 15A pura aparece a $2,83^\circ$, correspondiente a un $d_{001} = 3,12$ nm. Para las películas con 5 g MMT 15A/100 g SPI sólo se observa un pico a $3,78^\circ$ de poca intensidad respecto de la arcilla pura, que corresponde a un espacio interlaminar de 2,34 nm. Para 10 g MMT 15A/100 g SPI aparecen dos picos a $2,06^\circ$ ($d_{001} = 4,28$ nm), donde el aumento del espaciado interlaminar es importante, indicativo de un alto grado de intercalación/exfoliación de la arcilla en la matriz proteica. Aparece también un pico a mayor ángulo $4,31^\circ$ ($d_{001} = 2,05$ nm). Esto podría atribuirse a una buena intercalación para la concentración de 5 g MMT 15A/100 g SPI y a una menor intercalación y dispersión para la concentración de 10 g MMT 15A/100 g SPI. Los resultados obtenidos para las películas de 10 g MMT 15A/100 g SPI (importante aumento de distancia interlaminar respecto de la arcilla modificada) podría sugerir que para el caso de 5 g MMT 15A/100 g SPI, la no presencia de pico a bajo ángulo, sería indicativo de exfoliación de la arcilla como en el caso de las películas modificadas con MMT natural.

El hecho de que aparezcan distintos picos diferentes al característico de las arcillas nos podría estar indicando de que la dispersión de la arcilla en la matriz no fue homogénea y que por eso existen zonas tactoides diferentes con distintos ordenamientos en una misma película. Asimismo, podrían formarse estructuras donde la interacción de la proteína y la arcilla podrían dar lugar a un sistema intercalado-floculado, que involucra capas de la arcilla intercaladas en la matriz interaccionando a través de las puntas hidroxiladas de otras capas intercaladas en la matriz (Lavorgna y col., 2010, Silvestre y col., 2011).

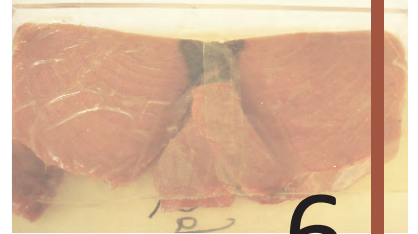
Es evidente que las arcillas modificadas no se encuentran en un estado de exfoliación total como sucedió cuando se utilizó la MMT natural (Capítulo 3). En estas películas coexisten

estructuras tactoides, agregados y intercalados, que varían en proporción de acuerdo a la concentración y al tipo de arcilla utilizado. Estas estructuras, posiblemente dispersas de modo no homogéneo en la matriz proteica, no provocan el efecto refuerzo esperado y esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua. Es evidente que la afinidad de las proteínas de soja con estas arcillas modificadas es inferior a la alcanzada con la MMT natural (más hidrofílica).

5.4. Conclusiones

a. Se prepararon películas flexibles de matriz proteica de soja con distinto contenido de arcillas orgánicamente modificadas por mezclado en fundido y posterior termocompresión. Las películas resultaron homogéneas, amarillentas y con un cierto grado de transparencia.

b. No fue posible alcanzar un nivel de exfoliación/intercalación de la arcilla suficiente como para que estas ejercieran un efecto refuerzo de las películas proteicas, posiblemente debido a la menor afinidad de las proteínas de soja con estas arcillas más hidrofóbicas, ya que coexisten estructuras intercaladas junto con agregados de la arcilla distribuidos en la matriz proteica.



6

**Películas nanocompuestos en base a proteínas
de soja y montmorillonita activadas con
aceite esencial de clavo con potencial
aplicación en envase de alimentos**



6. Películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y montmorillonita activadas con aceite esencial de clavo con potencial aplicación en envase de alimentos

6.1. Introducción

Una ventaja de los materiales en base a biopolímeros es que pueden ser usados como vehículos de aditivos tales como agentes antioxidantes y/o antimicrobianos, vitaminas, aromas, colorantes, sales, entre otros, con el fin de incrementar su funcionalidad, mejorar su apariencia, y extender la vida útil de los alimentos que puedan proteger (Han, 2002 y 2005, Han y Krochta, 2007; Gómez-Estaca y col., 2009 y 2010; Sultanbawa, 2011).

La tendencia actual en estos materiales activos aplicables en *packaging* para alimentos es incorporar aditivos naturales, entre los que se encuentran algunos aceites esenciales con actividad antioxidante y/o antimicrobiana, que además pueden ser comestibles, como por ejemplo los de ajo, lavanda, salvia, orégano, pimiento, tomillo, romero y clavo (Shelef y col., 1980; Yildirim y col., 2000; Seydim y Sarikus 2006, Kong y col., 2007; Rojas-Graü y col., 2007, Sánchez-González y col., 2011; Kuorwel y col., 2011). La ventaja de utilizar tales aceites esenciales incorporados en las películas, en vez de aplicarlos directamente sobre los alimentos, es que de esta manera es posible alcanzar el objetivo deseado con menores concentraciones de aceite, y así evitar conferirle aromas y sabores indeseados en los alimentos (Gutierrez y col., 2009; Sánchez-González y col., 2011).

En particular, el aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.), el cual contiene principalmente eugenol (**Figura 6.1**), es un inhibidor efectivo del crecimiento de *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *E. coli* y *S. aureus* en varios medios (Cressy y col., 2003; Mytle y col., 2006). Algunos grupos de investigación han evaluado la actividad antimicrobiana *in vitro* de películas comestibles activadas con aceite esencial de clavo y han obtenido resultados prometedores, pero cabe señalar que tales resultados no siempre representan el comportamiento en sistemas reales (Gómez-Estaca y col., 2010).

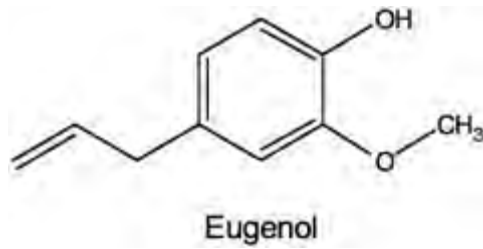


Figura 6.1: Estructura química de la molécula del eugenol, principio activo mayoritario del aceite esencial de clavo

El uso potencial de un sistema polímero/silicato en capas está comenzando a ser explorado como portador o vehículo de compuestos activos en el campo del envasado de alimentos. Mascheroni y col. (2010) desarrollaron un sistema de liberación para el carvacrol basado en una matriz de gluten de trigo reforzadas con MMT ($\geq 5\%$) que fue claramente eficiente en retener y proteger al agente antimicrobiano activo durante la etapa de procesamiento. Quilaqueo y col. (2011), estudiaron la funcionalidad de films nanocompuestos a base a CMC-MMT activados con extracto de murta, y observaron que mientras el agregado de MMT mejoró significativamente las propiedades mecánicas y barrera (al vapor de agua, O₂ y CO₂) de las películas de CMC (carboximetilcelulosa), el extracto de murta le otorgó importantes propiedades antioxidantes, plastificó la matriz y modificó las propiedades barrera a gases de manera diferencial según el contenido de arcilla presente en la película. Las arcillas en estas películas podrían modular la liberación de ingredientes activos. En este sentido Giménez y col. (2012) observaron que la incorporación de sepiolita en películas proteicas de gelatina y clara de huevo activadas con aceite esencial de clavo, aumentó la liberación de algunos componentes proteicos y también del eugenol, lo que significó una liberación controlada de la actividad antioxidante así como una mayor actividad antimicrobiana.

Por otro lado, el atún rojo (*Thunnus thynnus*) tiene un gran valor comercial y nutricional (Chini y col., 2008), su carne es muy requerida y apreciada por los consumidores (en especial para su consumo en crudo tipo “sashimi” o “sushi”), pero tiende a deteriorarse principalmente por reacciones de autooxidación lipídica y crecimiento microbiano. Estas características propias de la especie, convierten al atún rojo en un sistema interesante para evaluar a las películas desarrolladas como material de envase de alimentos.

Actualmente, en Estados Unidos no hay una regulación específica para la aplicación y utilización de nanotecnología en alimentos y, aunque en la Unión Europea (UE) se haya

recomendado su regulación, las leyes todavía no han cambiado. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos afirma que regula “productos, no tecnología” y anticipa que muchos productos de nanotecnología caerán bajo la jurisdicción de centros múltiples dentro de la FDA y por eso serán reguladas por la Oficina de Productos de Combinación. La FDA regula producto a producto y enfatiza que muchos productos actualmente regulados producen partículas de un rango de tamaño nano. La FDA afirma que “el tamaño de las partículas no es un problema” y acentúa que nuevos materiales, sin importar la tecnología utilizada para crearlos, serán sujetos a las pruebas de seguridad estándar (<http://www.fda.gov/nanotechnology/regulation.html>).

Contrario a la visión de la FDA acerca del tamaño de la partícula, un informe reciente del Instituto de Ciencia de la Alimentación y la Tecnología (IFST) –un organismo calificado de profesionales independientes para científicos y tecnólogos de alimentos con base en el Reino Unido- afirma que el tamaño sí importa y recomienda que las nanopartículas sean tratadas como material nuevo y potencialmente dañino hasta que las pruebas demuestren que son seguras. No obstante, la Comisión Europea intenta usar las leyes existentes de alimentos para con los productos alimenticios derivados de nanotecnologías cuando es posible, pero reconoce que la tecnología posiblemente haga que se modifiquen las leyes (Weiss y col, 2006).

En este marco, los objetivos planteados para este capítulo fueron:

- Activar las películas nanocompuestas en base a proteínas de soja – MMT natural con agregado de aceite esencial de clavo a la formulación, para lograr un material con propiedades antimicrobianas y antioxidantes.
- Analizar el efecto del agregado de aceite esencial de clavo en la funcionalidad de las películas proteicas y nanocompuestas desarrolladas.
- Evaluar la aplicación de las películas desarrolladas en un sistema alimenticio real, como lo es el envasado de filetes de músculo de atún rojo (*Thunnus thynnus*) durante el almacenamiento refrigerado.
- Evaluar si la arcilla difunde al alimento.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Materiales

Se utilizaron el aislado proteico de soja (SPI, SUPRO 500E, The Solae Co.) y la montmorillonita natural (MMT, Cloisite®Na⁺, Southern Clay Products), ya descritos en la sección 2.2.1.; y un aceite esencial de clavo comercial (AEC, Eladiet SA., Barcelona, España) para activar las películas.

Con el fin de realizar ensayos en un sistema real, se usó atún rojo (*Thunnus thynnus*), comprado congelado en un mercado local (Tarragona, España).

6.2.2. Obtención de las películas proteicas y nanocompuestas aditivadas con aceite esencial de clavo

Las películas se obtuvieron por *casting* a partir de dispersiones acuosas de aislado proteico, plastificante y arcilla. Las dispersiones se formaron mezclando, por un lado, 5 g de SPI y 1,25 g de glicerol como plastificante en 80 ml de agua destilada a temperatura ambiente, bajo agitación magnética (≈ 30 min), ajustando el pH a 10,5 con NaOH 2 N; y por otro, diferentes cantidades de MMT (0, 0,25 y 0,5 g) se dispersaron en 20 ml de agua destilada, inicialmente con agitación magnética (aproximadamente por 1 hora) y luego aplicando un tratamiento con ultrasonido a 80% de amplitud en un equipo Sonics Vibra-cell modelo VCX 130 (Sonics & Materials, INC, Estados Unidos). Ambas dispersiones se mezclaron con agitación magnética durante 1 h a temperatura ambiente, y se agregó 0,5 ml de aceite esencial de clavo (AEC) agitando durante 30 min más. Finalmente, 25 ml de las dispersiones filmogénicas, se colocaron en cajas de Petri de poliestireno (144 cm²) y se secaron en una estufa con convección forzada (Binder FD240, Tuttlingen, Alemania) a 60 °C durante 3 horas. Las películas resultantes se acondicionaron a 20 °C y 58 % HR (en desecador con una solución saturada de NaBr) durante 48 h previo a su caracterización. De esta manera se obtuvieron películas proteicas y nanocompuestas con 5 y 10 g MMT/100 g SPI, con y sin aceite esencial de clavo.

Cabe señalar, que si bien el procedimiento seguido para la formación de las películas es casi idéntico al utilizado en el capítulo 2, el equipamiento utilizado fue diferente (especialmente conviene resaltar que la estufa y el equipo de ultrasonido fueron distintos).

6.2.3. Caracterización de las películas proteicas y nanocompuestas aditivadas con aceite esencial de clavo

Las películas proteicas obtenidas por casting a partir del aislado proteico de soja y montmorillonita con o sin aceite esencial de clavo, fueron caracterizadas mediante la determinación del contenido de agua, espesor, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, propiedades mecánicas, TEM y XRD, según se describió en la sección 2.2.4, pero utilizando distinto equipamiento, ya que parte de este trabajo se realizó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC, Madrid, España). Además se analizó la actividad antioxidante de las películas - mediante la evaluación del poder secuestrante de radicales (ABTS), y el poder reductor del Fe (FRAP), y la determinación del contenido de fenoles totales, y la actividad antimicrobiana, como se describe a continuación.

6.2.3.1. Propiedades antioxidantes

Las propiedades antioxidantes se determinaron mediante los ensayos de ABTS y FRAP, sobre las soluciones liberadas de las diferentes matrices formuladas al tratarlas durante 16 h en agua. De igual manera se determinó el contenido en fenoles en estas fracciones.

Determinación del radical ABTS^{•+} (capacidad de secuestrar radicales catiónicos): Una solución stock del radical ABTS^{•+} fue obtenida por reacción del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) (7mM, Sigma) con persulfato de potasio (2,45 mM, Sigma)) incubados en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h. Previo al ensayo, una alícuota de la solución stock del radical ABTS^{•+} fue diluida con agua destilada hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm (Shimadzu spectrophotometer CPS-240 model, Japón). Las diferentes muestras (20 μ L) fueron mezcladas con 980 μ L de la solución del radical ABTS^{•+}, se incubó a 30 °C durante 10 min y se midió la absorbancia a 734 nm. Los

resultados fueron expresados mg ác. ascórbico por g de película soluble, basado en la curva standard que relaciona la concentración de Vitamina C (Sigma-Aldrich) con el grado de disminución de la absorbancia provocada por la acción de dicha vitamina. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

Método FRAP (poder reductor del hierro): En esta técnica se utilizan a los antioxidantes como reductores en una reacción redox, y está ligada a una reacción colorimétrica en la que se emplea un exceso de un sistema oxidante que se reduce fácilmente. Para llevar a cabo este ensayo se incubaron 30 μL de muestra a 37 °C con 90 μL de agua destilada y 900 μL del reactivo FRAP (2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ, Sigma-Aldrich) y $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en buffer acetato de sodio pH 3,6). Luego de 30 min se midió la absorbancia a 595 nm (Shimadzu spectrophotometer CPS-240 model, Japón) y los resultados fueron expresados como mmoles equivalentes de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por g de película soluble, basado en la curva standard de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, la cual relaciona la concentración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (μM) con la absorbancia a 595 nm. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

Contenido de fenoles totales: Los polifenoles se cuantificaron espectrofotométricamente a 750 nm (UV-1601, model CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japón) usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido gálico como estándar (Montreau, 1972). Los resultados se expresan como mg de ácido gálico/g película soluble, siendo la media de al menos tres determinaciones.

6.2.3.2. Propiedades antimicrobianas

La actividad antimicrobiana de las películas proteicas y nanocompuestas se determinaron por el método de difusión en agar contra 26 cepas microbianas (Gómez-Estaca y col., 2010). Las cepas, seleccionadas por su importancia en la salud (tales como probióticos o patógenos) o por ser responsables del deterioro de alimentos, fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Salmonella cholerasuis* CECT 4300, *Listeria innocua* CECT 910, *Citrobacter freundii* CECT 401, *Escherichia coli* CECT 515, *Shigella sonnei* CECT 4887, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110, *Yersinia enterocolitica* CECT 4315, *Brochothrix thermosphacta* CECT 847, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Bacillus*

cereus CECT 148, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Clostridium perfringens* CECT 486, *Aeromonas hydrophila* CECT 839T, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T, *Bacillus coagulans* CECT 56, *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* DSMZ 10140, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215, *Enterococcus faecium* DSM 20477, *Lactobacillus helveticus* DSM 20075, *Debaryomyces hansenii* CECT 11364, *Aspergillus niger* CECT 2088, *Penicillium expansum* DSMZ 62841. Después de la incubación de las placas sembradas con los distintos microorganismos conteniendo los discos de películas (1,5 cm de diámetro), se midió el área de inhibición -considerada como la actividad antimicrobiana- con Adobe Acrobat® 9 Professional software. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto a la superficie total de la placa. Cada determinación se realizó por duplicado.

6.2.3.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con esta metodología se evaluó la morfología de las películas de soja con 10 g MMT/100 g SPI en presencia o ausencia de AEC.

Preparación de muestras para estudio mediante TEM: Con el fin de obtener secciones ultrafinas (50-100 nm) la muestra debió ser previamente tratada. El medio de inclusión usado fue Spurr, el cual consiste en una resina epoxi que polimeriza uniformemente y no contiene elementos que puedan alterar la naturaleza de los compuestos presentes en las muestras. La misma es estable a las condiciones de trabajo empleadas y a los haces de electrones. La inclusión se realizó en un molde de silicona con la muestra posicionada sobre uno de sus extremos y la polimerización se llevó a cabo en una estufa de secado por 120 h a 50 °C. Una vez completado el proceso de curado se obtuvo un bloque con la muestra completamente rodeada por la resina, y el extremo donde se encontraba la misma fue tallado en forma de pirámide truncada. Las secciones ultrafinas se realizaron usando un ultramicrotomo modelo Reichert-Jung Ultracut-K con un cuchillo de diamante Diatome. Secciones de 50, 90 y 100 nm de espesor se ubicaron en una malla de cobre.

Examinación por TEM: se usó un microscopio de transmisión electrónica modelo JOEL JEM2100 con un voltaje de aceleración de 200 kV. El microscopio presenta una resolución

punto a punto de 2,4 Å y está equipado con un espectrómetro OXFORD modelo INCA X-ray de energía dispersiva que permite una resolución desde 136 eV a 5,39 keV.

6.2.3.4. Determinación de metales

La liberación de metales de las películas se determinó sobre las soluciones de las diferentes matrices formuladas al tratarlas durante 16 h en agua.

Las muestras líquidas se digirieron por triplicado en un Sistema de Digestión por Microondas (Microwave Digestión Labstation) marca Milestone, mod. Ethos 1. (Milestone Inc. 25 Controls Drive – Shelton, CT 06484 – Estados Unidos). La digestión se realizó dentro de vasos cerrados fabricados en teflón de alta densidad TFM, utilizando como reactivos ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (Panreac). El producto de la reacción se llevó a un matraz aforado de 100 ml y se enrasó con agua desionizada (Tipo I).

Luego se midió la concentración de metales por Espectroscopía de Absorción Atómica, mediante un Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin-Elmer, mod. 5100 PC Zeeman (Perkin-Elmer, 761 Main Ave., Norwalk, CT 06859-0010 – Estados Unidos). El calcio, magnesio y cinc se determinaron por llama de aire-acetileno utilizando una lámpara de cátodo hueco trielemental (Ca, Mg, Zn). El sodio y potasio se determinaron por llama de aire-acetileno sin utilización de lámpara (Espectroscopía de Emisión). El hierro, cobre y manganeso se determinaron con lámparas de cátodo hueco monoelementales.

Cada metal se determinó por separado, con una recta de calibración de diferentes concentraciones, preparada a partir de un patrón comercial específico de cada metal (Panreac).

6.2.4. Aplicación de las películas proteicas y nanocompuestas en la preservación de pescado

El atún fue comprado en estado congelado. La composición química aproximada del músculo fue analizada de acuerdo a los métodos de la Association of Official Analytical Chemists para humedad (método 24003), cenizas (método 1821), y proteína (método 24024) (AOAC, 1989).

La grasa cruda fue determinada acuerdo al método de Bligh and Dyer (1959). EL resultado de los análisis fue 18,9 % proteínas, 9,1 % lípidos, 0,7 % cenizas y 71,3 % de agua. Una vez que el pescado alcanzó temperatura ambiente, se cortaron los filetes de un tamaño aproximado de 10 cm x 10 cm x 1 cm, y se los colocó sobre placas acrílicas envueltos en las películas proteicas y nanocompuestas activadas o no con el aceite esencial. En paralelo se realizó un control en el que los filetes se recubrieron con polietileno. Las muestras se conservaron a 2 °C (± 1 °C) y se muestrearon periódicamente para realizar los análisis de conservación que se describen a continuación.

6.2.4.1. Determinación de pH

Se tomaron 5 g de los filetes y se homogeneizaron con 50 ml de agua destilada empleando un Osterizer (1 min a 5000 rpm). El pH de la mezcla se midió utilizando un pHmetro MeterLab (modelo pH M93, Dinamarca). Las determinaciones se realizaron por duplicado

6.2.4.2. Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT)

La determinación de NBVT se basa en el método descrito por Antonacopoulos y Vyncke (1989). El fundamento de este método es la destilación en medio alcalino de los compuestos nitrogenados volátiles asociados al deterioro de productos pequeños y su posterior cuantificación por titulación. Se tomaron 10 g de los filetes de atún y se homogeneizaron con 90 ml de ácido perclórico (6%) en Osterizer (1 min a 5000 rpm) con el fin de precipitar las proteínas. La mezcla obtenida se filtró sobre papel Wathman N° 1, se lavó con 5 ml de ácido perclórico y se llevó a 100 ml. El filtrado se destiló en Tecator AB (Kjeltec System modelo 1002, Suecia). El destilado se colectó sobre ácido bórico (0,3 % p/v) y se tituló con ácido clorhídrico 0,05 N. Los resultados se expresaron en mg de NBVT por 100 g de muestra. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

6.2.4.3. Índice de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

La determinación de TBARS se desarrolló según el método descrito por Vyncke (1970). Este método se basa en la gran reactividad del ácido tiobarbitúrico con los grupos carbonilos de aldehídos y cetonas, que se incrementan como consecuencia de la oxidación lipídica. Se

tomaron 15 g de los filetes y se homogeneizaron con 30 ml de ácido tricloroacético 7,5 % p/v (TCA; Panreac Química S.A.U., Barcelona, España) en Osterizer (1 min a 5000 rpm). La mezcla obtenida se dejó en reposo durante 30 min y luego se filtró sobre papel Whatman N°1. El filtrado (o diluciones adecuadas con TCA) se sometió a la colorimetría con el ácido tiobarbitúrico (TBA; Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Estados Unidos). La reacción se llevó a cabo a 90 °C durante 40 min, inmediatamente después se determinó la absorbancia a 538 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (modelo CPS-240, Japón). Se realizó una curva de calibración empleando 1,1,3,5-tetraetoxipropano (TEP; Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, Estados Unidos) como patrón. Los resultados se expresaron en mg de malonaldehído por kg de muestra. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

6.2.4.4. Índice de Peróxidos (IP)

Para la extracción de los lípidos un total de 100 g de músculo de pescado se homogeneizaron con 100 ml de cloroformo y 200 ml de metanol durante 2 min. Se adicionaron 100 ml más de cloroformo y se homogeneizaron por 30 segundos más. Luego se adicionaron 100 ml de agua destilada y se homogeneizaron por 1 min más. El resultado de la homogeneización se filtró con filtro (Resma) en un embudo de decantación. Se recogió la capa inferior la cual contenía los lípidos extraídos más el cloroformo (extracto).

Para determinar el índice de peróxido se colocaron 25 ml del extracto en un erlenmeyer esmerilado y se le añadieron 10 ml de ácido acético glacial y 1 ml de yoduro de potasio. Esta mezcla se dejó reposar en oscuridad por 30 min. Luego se agregaron 30 ml de agua destilada y 1 ml de almidón al 1 %, como indicador. Esta solución se valoró con tiosulfato de sodio 0,05 N. El IP se calculó según la siguiente ecuación:

$$IP = (\text{ml tiosulfato} \times N \times 100) / \text{peso de la grasa}$$

Donde N: normalidad del tiosulfato de sodio; 100: factor de la solución de tiosulfato. Los resultados se expresaron como miliequivalentes de peróxidos por Kg de grasa, y son resultado de dos determinaciones.

6.2.4.5. Ensayos microbiológicos

Un total de 10 g de músculo picado fueron recogidos y colocados en una bolsa de plástico estéril (Sterilin, Stone, Staffordshire, Reino Unido) con 90 ml de agua peptona al 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), trabajando en una cabina de flujo laminar (mod. AV 30/70 Telstar, Madrid, España). Luego de homogeneizar las muestras durante 1 minuto en mezclador Stomacher (modelo 400 Colworth, Seward, Londres, Reino Unido) se realizaron las diluciones apropiadas para realizar los recuentos de: i) bacterias totales viables (TBC) (Iron Agar 1% NaCl, 15°C-3 días), ii) microorganismos productores de H₂S (Iron Agar, 15°C-3 días), iii) colonias luminiscentes (Iron Agar, 15°C-5 días), iv) *Enterobacteriaceae* (VRBG Agar, 30°C-48 horas); v) *Pseudomonas* spp. (PAB Agar+CFC suplemento, 25 °C - 48 horas) y vi) bacterias lácticas (MRS Agar, 30 °C - 72 horas) (López-Caballero y col., 2005). Todos los recuentos microbiológicos se expresaron como log de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log CFU/g). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.2.4.6. FTIR-Espectroscopía de Reflectancia Total Atenuada (ATR)

Se registraron los espectros infrarrojos entre 4000 y 650 cm⁻¹ utilizando un espectrómetro de infrarrojo Perkin Elmer Spectrum 400 (Perkin–Elmer Inc, Waltham, MA, USA) equipado con un prisma de cristal ATR. Para cada espectro se realizó el promedio de 16 espectros con una resolución espectral de 4 cm⁻¹. Los espectros fueron analizados con Spectrum software versión 6.3.2 (Perkin–Elmer Inc.). Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente, sobre 25 mg de grasa del pescado previamente extraída según la técnica de Bligh y Dyer (1959), la cual fue extendida sobre la superficie del cristal ATR y presionada con un émbolo de punta plana hasta lograr un espectro estable y con los picos adecuados. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

6.2.4.7. Determinación de metales

La determinación de metales en el pescado se realizó con el mismo procedimiento que lo descrito en la sección 6.2.3.4, pero esta vez se llevó a cabo a partir de muestras sólidas.

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1 Efecto del agregado de aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum* L.) sobre la funcionalidad de las películas nanocompuestas SPI-MMT

6.3.1.1. Apariencia

Todas las películas estudiadas resultaron flexibles y traslúcidas. En particular aquellas obtenidas con el agregado de aceite de clavo resultaron con mayores espesores y con una tonalidad más anaranjada y brillante que las películas sin el agregado de este aceite esencial, independientemente del contenido de MMT utilizado en la formulación. En la **Figura 6.2** se muestran a modo de ejemplo dos películas, una proteica y otra nanocompuesta, ambas con aceite esencial de clavo en su formulación.

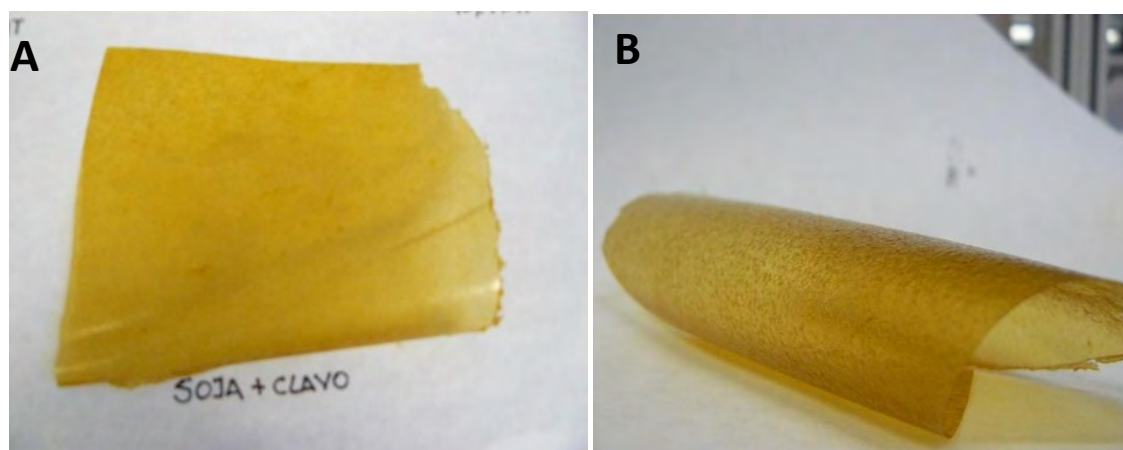


Figura 6.2: Fotos ilustrativas de películas proteicas (A) y con 10 g MMT/100 g SPI (B), ambas con agregado de aceite esencial de clavo.

En la **Tabla 6.1** se presentan los parámetros de color de Hunter Lab (L , a , b y ΔE) y la opacidad de las películas. Al igual que lo mostrado en el capítulo 2, en las películas nanocompuestas los parámetros L y a disminuyeron ligeramente y el b se incrementó a medida que aumentaba el contenido de MMT, induciendo una mayor diferencia en el color (ΔE). Al incorporar aceite esencial de clavo a las películas proteicas también se incrementó notoriamente la coloración amarillenta (aumentó el parámetro b), pero al incorporarlo en

los sistemas nanocompuestos se observó el efecto contrario: los parámetros L y a aumentaron mientras que b y ΔE disminuyeron -con menor intensidad- al incrementar el porcentaje de MMT. En esta misma tabla también se puede observar que la opacidad disminuyó con concentraciones crecientes de MMT (de acuerdo a lo presentado en el capítulo 2), mientras que aumento 3, 3,9 y 4,3 veces con el agregado de AEC para las películas con 0,5 y 10 g MMT/100g SPI, respectivamente.

Tabla 6.1: Parámetros de Hunter Lab (L , a y b), diferencia de color (ΔE) y opacidad de las películas proteicas y nanocompuestas con y sin el agregado de clavo.

	MMT (g/100 g SPI)	Parámetros de Color Hunter Lab			ΔE	Opacidad (UA mm ⁻¹)
		L	a	b		
	0	92,13± 0,12 ^c	0,53± 0,01 ^e	1,79 ± 0,07 ^a	5,18 ± 0,12 ^a	2,25 ± 0,01 ^c
SPI	5	90,52± 0,24 ^b	0,05± 0,03 ^b	6,98 ± 0,37 ^e	8,59 ± 0,34 ^c	1,68 ± 0,03 ^b
	10	89,98± 0,16 ^a	-0,09±0,02 ^a	14,70 ± 0,47 ^f	14,92 ± 0,49 ^d	1,49 ± 0,03 ^a
SPI	0	90,36±0,14 ^b	0,05± 0,02 ^b	6,58 ± 0,22 ^d	8,48 ± 0,14 ^c	6,87 ± 0,01 ^f
+	5	91,96±0,19 ^c	0,15± 0,02 ^c	3,52 ± 0,19 ^c	5,64 ± 0,17 ^b	6,56 ± 0,03 ^e
AEC	10	92,54± 0,07 ^d	0,41± 0,01 ^d	2,51 ± 0,03 ^b	4,84 ± 0,07 ^a	6,40 ± 0,03 ^d

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

6.3.1.2. Susceptibilidad al vapor de agua

En la tabla **Tabla 6.2** se presentan los espesores, contenido de humedad y actividad acuosa de las películas proteicas y nanocompuestas sin y con agregado de AEC.

El espesor de las películas no se modificó al aumentar el contenido de MMT ($p \leq 0,05$), pero se incrementó aproximadamente en un 35 % con el agregado de AEC.

El contenido de agua de las películas proteicas disminuyó significativamente con el agregado de arcilla en un 16 y 12 % para los sistemas sin y con AEC respectivamente (independientemente de la concentración de MMT), y aumentó con el agregado de aceite esencial tanto para las películas proteicas como para las nanocompuestas en un 15 y 20 % respectivamente. Por su parte, todas las películas presentaron actividades acuosas menores que 0,6, lo que daría indicio de que el desarrollo microbiano en las mismas estaría impedido

(Fennema, 1996). El agregado de arcilla sólo disminuyó significativamente la actividad acuosa de las películas con AEC, y si bien la adición de AEC no modificó la a_w de las películas proteicas, si la disminuyó al agregar arcilla a la formulación. Es evidente que la presencia conjunta de MMT y AEC disminuye significativamente la actividad acuosa, insinuando un mayor efecto del aceite esencial en presencia de la arcilla. Este menor valor de a_w indicaría que el agua se encuentra más retenida en la matriz. Teniendo en cuenta la naturaleza oleosa del aditivo, es evidente que éste debe estar interaccionando con los grupos más hidrofóbicos de la proteína provocando cambios conformacionales tales que los grupos hidrofílicos queden más disponibles tanto para retener agua como para interaccionar con la arcilla. Estos cambios conformacionales probablemente sean los que provocan el importante aumento en el espesor.

Tabla 6.2: Espesores, contenido de agua y actividad acuosa de películas proteicas y nanocompuestas con y sin el agregado de clavo.

Película	MMT (g/100 g SPI)	Espesor (μm)	Contenido de agua (%)	Actividad acuosa (a_w)
	0	77,4 \pm 5,9 ^a	15,36 \pm 0,19 ^b	0,565 \pm 0,012 ^b
SPI	5	73,2 \pm 4,7 ^a	13,49 \pm 0,42 ^a	0,563 \pm 0,011 ^b
	10	74,4 \pm 6,3 ^a	12,85 \pm 0,12 ^a	0,535 \pm 0,009 ^{b,d}
SPI	0	104,0 \pm 3,4 ^b	17,69 \pm 0,66 ^c	0,541 \pm 0,013 ^{b,d}
+	5	104,8 \pm 4,9 ^b	16,26 \pm 0,22 ^b	0,510 \pm 0,014 ^{c,d,a}
AEC	10	100,1 \pm 5,3 ^b	15,54 \pm 0,03 ^b	0,495 \pm 0,012 ^a

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

En el caso de las películas activas, la solubilidad es una propiedad importante ya que seguramente podrá afectar la liberación del aditivo contenido en la matriz (Papadokostaki y col., 1997). En la **Figura 6.3** se observa que la solubilidad en agua de las películas proteicas estudiadas disminuye significativamente al aumentar la concentración de arcilla (corroborando la información que se había observado en el capítulo 2) en presencia o ausencia del aceite esencial, y que solo aumenta con el agregado de AEC para la formulación que contiene 10 g MMT/100 g SPI. A diferencia de estos resultados, Salgado y col, (2012),

observaron disminuciones en la solubilidad de películas proteicas de girasol al activarlas con aceite esencial de clavo. Por su parte, Gómez-Estaca y col. (2010) encontraron diferencias en la solubilidad entre matrices de gelatina/quitosano y gelatina aditivadas con aceite de clavo, y sugirieron que estas variaciones podrían determinar diferencias en la actividad biológica de las películas, ya que se estaría modificando la velocidad de liberación del principio activo. En este caso, el agregado de arcilla -que disminuye la solubilidad- posiblemente hará más lenta la liberación del activo, de manera que será posible mantener una cierta concentración remanente en las películas durante un período de tiempo mayor alargando su efectividad.

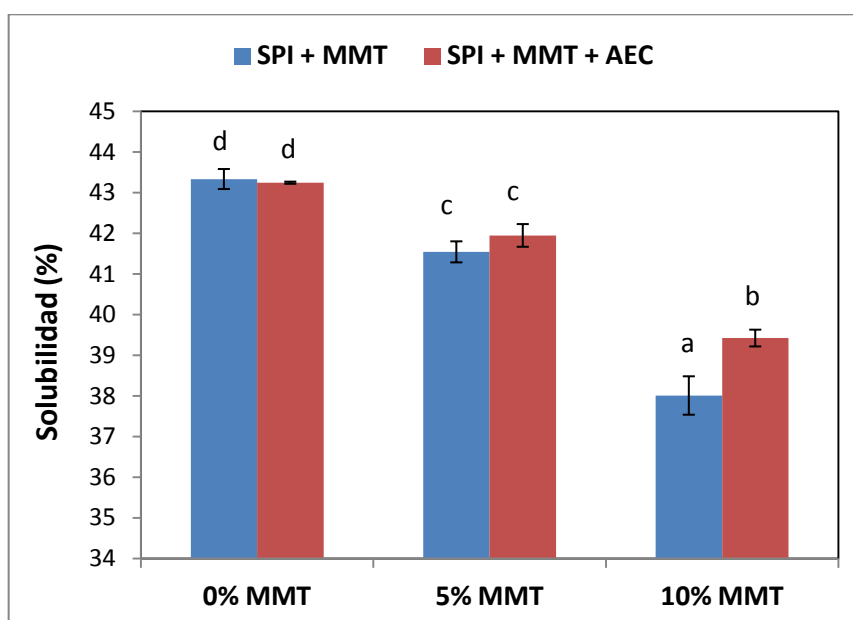


Figura 6.3. Solubilidad en agua de las películas proteicas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI con y sin el agregado de aceite esencial de clavo. Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

En la **Figura 6.4** se muestran las permeabilidades al vapor de agua de las películas estudiadas. El agregado de MMT a las películas proteicas disminuyó gradualmente ($p \leq 0,05$) la WVP (tal como se discutió en el capítulo 2) debido a la mayor tortuosidad del camino que deben recorrer las moléculas de agua para atravesar la película y por las interacciones entre la proteína y la arcilla. El agregado de AEC a las películas proteicas y nanocompuestas no modificó las WVP, a pesar de su naturaleza oleosa, y esto podría atribuirse a la buena

dispersión del aceite en la matriz proteica y nanocompuesta, ya que es sabido que en general los lípidos generan una barrera importante al vapor de agua cuando logran formar fases continuas. Este comportamiento fue también observado en películas de proteína de girasol activadas con aceite esencial de clavo (Salgado y col., 2012) y en películas de proteína de suero con agregado de aceite esencial de orégano (Zinoviadou y col., 2009).

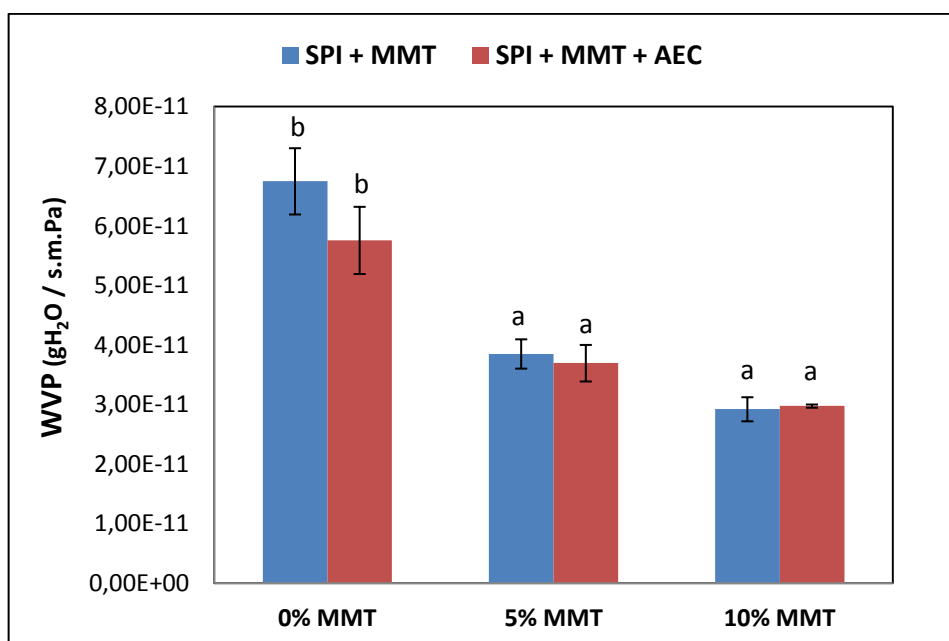


Figura 6.4: Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas proteicas de soja y nanocompuestas (SPI-MMT) con o sin la adición de AEC. Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Es evidente que el agregado de aceite esencial de clavo, no contribuye a la resistencia al agua de las películas nanocompuestas a pesar de su naturaleza oleosa, aunque su presencia pareciera producir cambios conformaciones en las proteínas que la llevan a interaccionar de una forma diferencial con el agua retenida y con la arcilla.

6.3.1.3. Propiedades mecánicas

Se analizaron las propiedades mecánicas de las películas en orden de analizar el efecto del agregado de AEC sobre las películas nanocompuestas. Estas propiedades se presentan en la

Tabla 6.3. Se observó que el agregado de MMT a las formulaciones produjo un efecto de refuerzo muy importante en las películas proteicas que se manifestó en un aumento significativo en la resistencia a la rotura y el módulo de Young, aunque perdieron elongación a la rotura. El agregado de AEC a las formulaciones proteicas y nanocompuestas, ejerció el efecto contrario, disminuyendo la resistencia a la rotura y el módulo de Young y aumentando la elongación. Varios autores han mostrado que algunos aceites pueden actuar como plastificantes en películas de matriz proteica (Andreuccetti y col., 2009; Bertan y col., 2005, Monedero y col., 2009 y 2010), mientras que otros han reportado mejoras en las propiedades mecánicas (Fabra y col., 2008; Pereda y col. 2010). Tal como Fabra y col. (2008) han reportado, las propiedades dependerán del lípido y de la matriz utilizados, así como de las interacciones que se den entre ellos.

En este trabajo, es importante señalar que a pesar de la plastificación ejercida por el aceite de clavo, se pudo comprobar un refuerzo de la matriz generado por la MMT incluso más importante en presencia de AEC. Mientras que para las películas nanocompuestas, el agregado de 10 g MMT/100 g SPI generó un aumento de 105 % en σ_{max} y de 200 % en E y una disminución de 340 % en ϵ_{max} , para las películas con AEC fue de 230 %, 345 % y 290 %, respectivamente.

Tabla 6.3: Propiedades mecánicas de películas proteicas de soja reforzadas con MMT con y sin el agregado de aceite esencial de clavo, medidas en tracción.

	% MMT	σ_{max} [MPa]	ϵ_{max} [%]	E [MPa]
	0	5,7 ± 0,3 ^c	42,3 ± 3,1 ^d	4,1 ± 0,3 ^c
SPI	5	9,8 ± 0,5 ^e	31,2 ± 3,7 ^c	9,1 ± 0,8 ^e
	10	11,7 ± 0,5 ^f	9,6 ± 0,3 ^a	13,3 ± 0,6 ^f
SPI	0	2,5 ± 0,2 ^a	50,0 ± 3,3 ^e	1,1 ± 0,1 ^a
+	5	4,4 ± 0,1 ^b	40,8 ± 1,2 ^d	2,5 ± 0,2 ^b
AEC	10	8,2 ± 0,3 ^d	12,8 ± 0,5 ^b	4,9 ± 0,4 ^d

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

6.3.1.4. Morfología

Se realizaron estudios de rayos X de manera de analizar el grado de dispersión de las capas de MMT en la matriz proteica, y asimismo analizar si el agregado de AEC a las películas favorece o no la dispersión. La **Figura 6.5** muestra los patrones de difracción de rayos X de la MMT natural y de las películas proteicas con 0, 5 y 10 g MMT/100 g SPI, activadas o no por el AEC. Al igual que se ha visto en capítulos anteriores, la MMT natural tiene un pico característico a $2\theta \approx 7,21^\circ$, que corresponde a un espacio interlaminar de $d_{001} = 1,2$ nm, mientras que las películas proteicas con y sin AEC no tienen estructura cristalinas por lo tanto no presentan pico alguno. En las películas con MMT (5 y 10 g/100 g SPI) sin agregado de AEC se observa que el pico característico de la MMT se ha desplazado hacia ángulos menores generando dos picos contiguos, para ambas concentraciones de MMT. Los correspondientes a 5 g MMT/100 g SPI aparecen a $2,61^\circ$ ($d_{001} = 3,38$ nm) y $2,02^\circ$ ($d_{001} = 4,37$ nm), mientras que para 10 g MMT/100 g SPI se encuentran a $3,24^\circ$ ($d_{001} = 2,72$ nm) y $2,34^\circ$ ($d_{001} = 3,77$ nm). Este desplazamiento del pico estaría indicando la existencia de estructuras intercaladas de proteína en la arcilla (Silvestre y col., 2011). El espaciamiento interlaminar en las películas nanocompuestas disminuyó con el aumento de la concentración de arcilla de 5 a 10 g MMT/100 g MMT. Pero las curvas siguen levantadas a medida que 2θ se acerca a 0° , dando indicio de que estas estructuras intercaladas coexisten con otras exfoliadas. Tunc y Duman (2011) también observaron disminuciones en las distancias interlaminares al incrementar la concentración de arcilla y lo atribuyeron a que el proceso de dispersión de la arcilla se dificulta al aumentar su concentración en la dispersión filmogénica. Cabe señalar que si bien las películas nanocompuestas se hicieron con el mismo aislado y MMT que las estudiadas en el capítulo 2, el equipo de ultrasonido utilizado en el trabajo que aquí se describe presentaba una potencia inferior para exfoliar la arcilla. Este mayor grado de intercalación o el menor grado de exfoliación alcanzado explican porque el efecto refuerzo por agregado de arcilla en estas películas fue de menor magnitud que el reportado en el capítulo 2.

En las películas nanocompuestas con agregado de AEC también se observó en los espectros de difracción de rayos X que el pico característico correspondiente a la arcilla natural estaba desplazado hacia ángulos menores y ensanchado. Para la películas con 5 g MMT/100 g SPI el pico tiene un máximo a $2\theta = 3^\circ$ que corresponde a una distancia interlaminar $d_{001} = 2,94$ nm,

mientras que este pico crece, se ensancha y se corre a mayores ángulos al aumentar la concentración de la arcilla a 10 g MMT/100 g SPI. Y al igual que en los espectros de las películas sin clavo, en estos pareciera haber indicios de la existencia de estructuras exfoliadas. A diferencia de lo observado en el capítulo 2, en donde al aumentar la concentración de plastificantes (sorbitol y glicerol) se favorecía la intercalación-exfoliación de la arcilla, el aceite esencial de clavo, que mostró un efecto plastificante en las propiedades mecánicas, presentó un menor grado de intercalación que los mismos sistemas sin su agregado. Mascheroni y col., (2010) reportaron que el agregado de un agente activo como el carvacrol a un sistema nanocompuesto en base a proteína del suero y MMT, provocó un aumento en la distancia interlaminar de la arcilla respecto a sus controles y sugirieron que la interacción entre las proteínas y el carvacrol favorecía la intercalación de la proteína entre las capas de la arcilla. Por el contrario los resultados encontrados en este estudio hacen suponer que las posibles interacciones entre las proteínas de soja y el aceite esencial de clavo dificultan en alguna medida la intercalación de las cadenas proteicas entre las capas de MMT.

Park y col. (2008) reportaron una mejor retención de los compuestos activos por la MMT si los mismos se intercalan entre las capas de la arcilla. La naturaleza hidrofóbica del aceite esencial de clavo hace suponer que la intercalación de los compuestos fenólicos presentes, mayoritariamente eugenol, ácido gálico y ácido cafeico, entre los espacios interlaminares de la arcilla puede estar poco favorecida. Pero aún así, la presencia de la arcilla, con un grado de exfoliación-intercalación importante dentro de la matriz proteica activada con AEC modificará la liberación de los componentes activos.

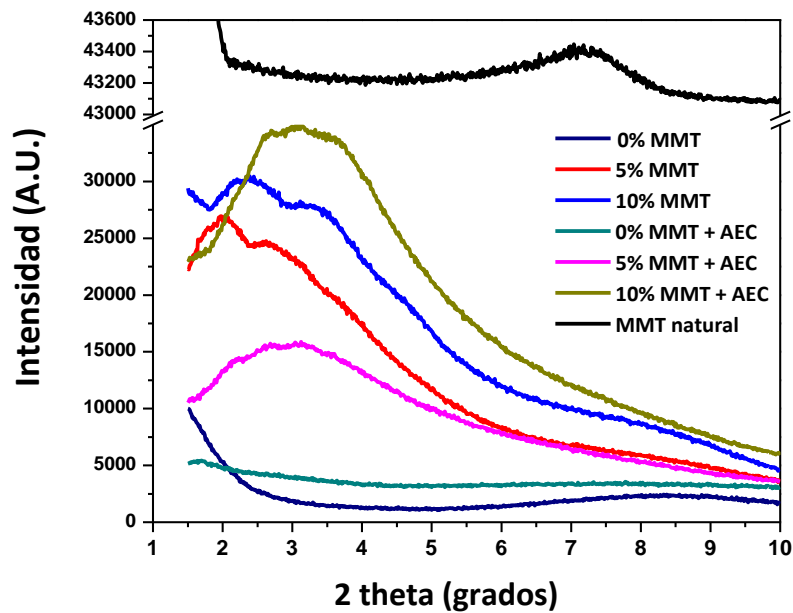


Figura 6.5: Espectros de difracción de rayos X de MMT pura y películas de SPI-MMT, con y sin AEC.

Para estudiar mejor la morfología de la nanoestructura de las películas se realizaron mediciones de microscopía electrónica de transmisión (TEM), que se muestran en la **Figura 6.6**. De la misma se observa que en las películas nanocompuestas (con 10 g MMT/100 g SPI) con y sin agregado de aceite esencial de clavo coexisten los estados intercalado y exfoliados como se suponía del análisis de rayos X. Y del análisis realizado es posible aseverar que en las películas con clavo pareciera existir más láminas exfoliadas que en ausencia del aceite esencial (**Figura 6.6. C y D**). Teniendo en cuenta los resultados de los rayos X en estos materiales existe un importante grado de exfoliación a la par de estructuras intercaladas con menores distancias interlaminares que las de las películas nanocompuestas sin clavo. Por otra parte, en la **Figura 6.6.D** se aprecia en la zona más densa que la montmorillonita está embebida en proteína y AEC, mostrando por tanto que existe interacción entre los tres componentes de la película, lo que explica algunas propiedades antes mencionadas, y hace suponer que seguramente en estos sistemas la arcilla modulará la liberación de los principios activos.

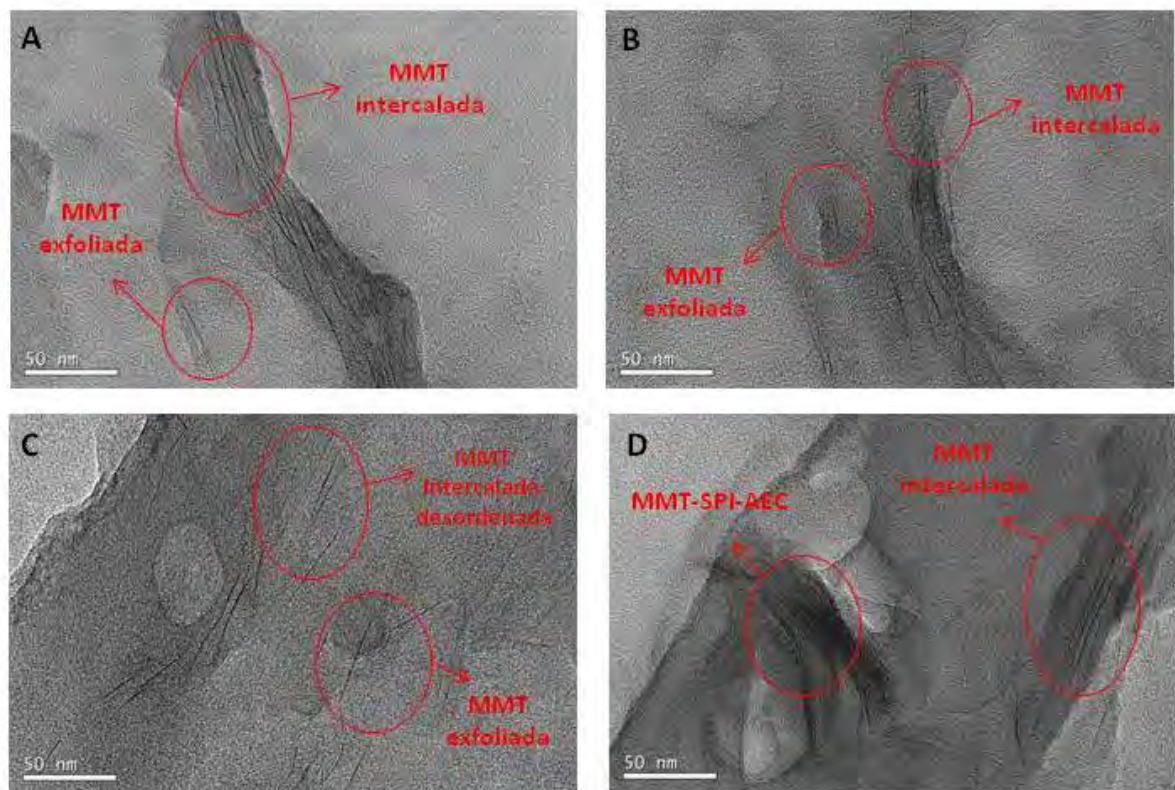


Figura 6.6: Microscopía Electrónica de Transmisión de las películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI sin (A y B) y con (C y D) agregado de aceite de clavo.

6.3.1.5. Propiedades antioxidantes

Se determinaron las propiedades antioxidantes *in vitro* liberadas de las películas nanocompuestas con y sin agregado de AEC mediante las técnicas actividad antiradicalaria (ABTS) y poder reductor del Fe (FRAP), y además se cuantificó el contenido de fenoles totales liberados medido por Folin-Ciocalteu. Estos resultados se muestran en la **Tabla 6.4**. Es importante recordar que para realizar las determinaciones las muestras se disuelven en agua, cuando las muestras tienen los mismos fenoles, las diferencias son debidas a que se liberen o no, es decir que estén más dispuestos para actuar.

Como se puede apreciar las películas proteicas apenas muestran actividad antioxidante, lo cual fue reportado por Salgado y col. (2010). La actividad antioxidante de los aislados de soja se debe principalmente a los compuestos polifenólicos tales como isoflavonas, ácido clorogénico, cafeico y ferúlico -que en su mayoría están glicosidados- y en alguna medida a las proteínas mismas o a algunos péptidos que de ellas derivan (Prat y Birac, 1979). El

agregado de 5 g MMT/100 g SPI a las formulaciones proteicas, no modificó significativamente la actividad antioxidante de las películas –tanto por ABTS como por FRAP–, sin embargo sí se apreció un aumento ($p \leq 0,05$) para concentraciones más elevadas de MMT (10 g/100 g MMT), debido a una liberación de los compuestos polifenólicos ($p \leq 0,05$) presentes en la proteína aislada de soja, lo cual pone de manifiesto que la arcilla facilita su liberación. Estos resultados inesperados y prometedores en cuanto a la activación del propio aislado de soja, hacen suponer ciertas hipótesis que futuros experimentos deberían comprobar. Por ejemplo, los iones salinos de la MMT podrían llegar a interferir en algún tipo de interacción de los fenoles presentes en el aislado con la proteína y facilitar así su liberación. En un sistema diferente, formado por proteínas, aceite esencial de clavo y sepiolita como arcilla, Giménez y col. (2012) observaron que la presencia de la sepiolita favorecía la liberación gradual de los compuestos fenólicos presentes.

El agregado de aceite esencial de clavo a la formulación permitió activar a las películas proteicas y nanocompuestas con importantes propiedades antioxidantes. Esta actividad del AEC es atribuida a los compuestos fenólicos presentes en el mismo, principalmente eugenol, y ácidos gálico y cafeico (Dudonné y col., 2009). Sólo en las determinaciones del radical ABTS^{•+} de las películas activas, se observa un aumento en la actividad antioxidante de al menos el 17 % en las películas nanocompuestas respecto de las proteicas, aunque el contenido en fenoles totales liberados es similar ($p \leq 0,05$). El poder reductor determinado por FRAP no mostró diferencias por la presencia de MMT a ambas concentraciones. Este hecho pone de manifiesto que la MMT dispone a los polifenoles con los que interacciona y/o libera de manera que los hace más activos frente al secuestro de radicales. Cabe señalar que la medida de polifenoles no es una medida directa de actividad antioxidante sino complementaria, ya que al compararla con la actividad se sabe si el efecto observado se debe a la concentración o a un mayor o menor poder antioxidante.

Tabla 6.4. Capacidad antioxidante -determinada según la capacidad de capturar al radical ABTS y por el poder reductor del Fe (FRAP)- y liberación de fenoles totales para películas proteicas con distinto contenido de arcilla activadas o no con aceite esencial de clavo.

Tipo de película	% MMT	Capacidad Antioxidante		Fenoles Totales*** (medidos por Folin-Ciocalteu)
		ABTS *	FRAP **	
	0	18,7 ± 0,24 ^a	0,08 ± 0,01 ^a	9,8 ± 0,4 ^a
SPI	5	18,2 ± 0,68 ^a	0,07 ± 0,01 ^a	7,2 ± 0,7 ^a
	10	34,9 ± 2,00 ^a	0,40 ± 0,04 ^a	28,7 ± 1,6 ^b
SPI	0	380,6 ± 11,4 ^b	6,41 ± 0,72 ^b	327,8 ± 8,4 ^c
+	5	444,4 ± 35,3 ^c	6,64 ± 0,96 ^b	333,9 ± 3,2 ^c
AEC	10	452,5 ± 11,1 ^c	6,59 ± 0,38 ^b	332,6 ± 7,7 ^c

*mg ác. ascórbico/g película soluble; ** moles equivalente de Fe/g película soluble; ***mg ác. gálico/g película soluble

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

Teniendo en cuenta que la solubilidad de las películas disminuye con el agregado de MMT, la mayor o igual actividad presentada por los sistemas nanocompuestos respecto de los proteicos -ambos con AEC- estarían reforzando la posibilidad de que en estos sistemas la presencia de la arcilla favorece la liberación de los compuestos activos. Y esto podría ser muy significativo al momento de evaluar las películas como material de envase en un sistema real, ya que muchas veces películas con propiedades in vitro interesantes, no muestran tal actividad en los sistemas alimenticios reales porque los compuestos activos no llegan a liberarse. En este sentido, considerando que el agua a veces se utiliza como sistema alimenticio modelo para determinar la liberación de compuestos, los resultados encontrados darían indicio de resultados positivos al evaluar alguna aplicación en sistemas hidrofílicos.

6.3.1.6. Propiedades antimicrobianas

En la **Tabla 6.5** se muestra la actividad antimicrobiana in vitro de las películas proteicas y nanocompuestas sin y con el agregado de aceite esencial de clavo. Los porcentajes de inhibición mostrados corresponden al tanto por ciento que supone el diámetro del halo de una película en particular frente al diámetro total de la placa. Vale aclarar que la desviación en los porcentajes de inhibición de las películas control, dentro de cada microorganismo y entre ellos, se debe a pequeñas variaciones en el tamaño de los discos y por tanto a la medida del diámetro obtenida por el programa, y no a una posible inhibición por parte de las películas.

La adición de AEC a las películas otorgó buenas propiedades antimicrobianas in vitro para los diferentes microorganismos ensayados, comparables con otros trabajos publicados (Estaca y col., 2010, Salgado y col., 2012). Los mayores porcentajes de inhibición correspondieron a los hongos *A. niger* y *P. expansum* y a las bacterias Gram-negativa *P. phosphoreum* y *V. parahaemolyticus* (**Tabla 6.5**). Ouattara y col. (1997) reportó que la pared celular de naturaleza lipopolisacárida de las bacterias Gram-negativas las protege frente a que compuestos activos alcancen la membrana citoplasmática, siendo por tanto más sensibles a la acción de los aceites esenciales las Gram-positivas. En este trabajo, *S. choleraesuis* y *S. sonnei* fueron resistentes al efecto del AEC, mientras que gran parte de las bacterias Gram-negativas presentaron inhibiciones variables. De las bacterias Gram-positivas sólo *B. coagulans* y *L. innocua* no fueron inhibidas, cuya resistencia fue comparable con aquellas Gram-negativas. Gómez-Estaca y col. (2010) observaron este mismo efecto; la diferencia en la resistencia de las Gram-positivas a los aceites esenciales puede atribuirse a la variabilidad entre cepas de la misma especie (Ouattara et al., 1997). Los resultados mostraron que las películas de proteína de soja activadas con AEC inhibieron a *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*, microorganismos implicados en el deterioro del pescado (López-Caballero y col., 2005). La sensibilidad de estos microorganismos al clavo ha sido referida en la bibliografía, tanto como aceite esencial como incorporado en películas de gelatina/quitosano (Gómez-Estaca y col., 2010) y de concentrado de proteína de girasol (Salgado y col., 2012).

Si comparamos las películas activadas entre sí observamos que la inhibición fue positiva para *B. cereus* cuando está presente la MMT, si bien la zona de inhibición de *S. aureus* disminuye

en presencia de la arcilla (**Tabla 6.5**). En general, para los microorganismos sensibles al aceite esencial de clavo, la inhibición fue independiente de la presencia o no de MMT. En otros casos sin embargo, el aumento en la concentración de MMT parecen reducir la liberación del compuesto activo (AEC) y así disminuir la zona de inhibición (por ejemplo, *C. perfringens*, *P. phosphoreum*, *S. putrefaciens*). Papadokostaki y col. (1997) reportaron que la estructura del polímero puede afectar la liberación de los componentes activos. Sin duda, la difusión del aceite va a variar en la matriz proteica con el contenido de arcilla. Incluso como se mencionó anteriormente las moléculas de activo podrían llegar a quedar intercaladas en la estructura de la arcilla.

En literatura existen pocos trabajos que estudian las propiedades antimicrobianas de películas nanocompuestas formadas por proteína-MMT con agregado de algún agente activo. Mascheroni y col. (2010) estudiaron la activación de películas de gluten-MMT con carvacrol y reportaron una mayor retención del antimicrobiano en las películas debido a las interacciones entre las proteínas, la MMT y el carvacrol. En este sentido, las películas nanocompuestas de gelatina-clara de huevo-sepiolita activadas con aceite esencial de clavo favorecieron la difusión del compuesto activo si bien no se produjeron cambios en la difusión del mismo con el tiempo (Giménez et al., 2012).

Sothornvit y col. (2009) estudiaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de el sistema proteína de suero/MMT modificada (sin activar), y observaron un efecto bacteriostático contra una bacteria Gram-positiva (*L. monocytogenes*), atribuido a la acción del grupo amonio cuaternario presente en la arcillas, que rompe las membranas de la pared celular causando la lisis de la bacteria. En el mismo trabajo se analizó esta actividad antimicrobiana utilizando una MMT natural, pero resultó ser nula. Incluso Hong y Rhim (2008) obtuvieron el mismo resultado probando la MMT natural sin encontrarse en contacto con una matriz.

Tabla 6.5: Actividad antimicrobiana de las películas nanocompuestas con y sin AEC sobre diferentes microorganismos.

Microorganismos	Actividad Antimicrobiana (%)					
	MMT (g/100 g SPI) - Sin AEC			MMT (g/100 g SPI) - Con AEC		
	0	5	10	0	5	10
<i>Aeromonas hydrophila</i> CECT 839T	19,7±0,8	19,1±0,8	18,9±0,6	25,7±0,6	29,8±0,2	31,2±1,5
<i>Aspergillus niger</i> CECT 2088	19,7±0,8	20,4±1,0	19,8±0,6	41,5±0,9	41,6±1,1	40,7±0,2
<i>Bacillus cereus</i> CECT 148	23,0±1,7	18,6±0,6	19,5±0,7	21,9±0,7	29,4±1,1	26,1±0,2
<i>Bacillus coagulans</i> CECT 561	20,1±0,1	20,1±0,2	18,7±0,0	20,7±0,1	19,8±0,3	17,8±0,5
<i>Bifidobacterium animalis spp. lactis</i> DSMZ 10140	19,0±0,4	19,7±0,0	19,1±0,0	31,5±0,2	32,9±0,5	25,6±0,1
<i>Brochothrix thermosphacta</i> CECT 847	18,9±0,2	18,6±0,4	18,2±0,2	27,8±0,1	31,7±1,3	25,0±1,6
<i>Citrobacter freundii</i> CECT 401	21,4±0,6	19,1±0,1	18,5±0,0	29,3±0,3	29,3±0,2	30,5±0,3
<i>Clostridium perfringens</i> CECT 486	19,5±0,6	18,8±0,3	18,3±0,1	32,3±1,4	33,4±0,8	19,2±0,8
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 20477	19,2±1,1	18,7±0,5	19,3±2,0	20,6±0,8	23,8±0,9	21,9±0,3
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	19,1±0,8	18,6±0,0	18,0±0,0	22,2±0,7	23,1±0,8	21,0±0,2
<i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 20075	22,0±9,0	18,8±0,1	17,7±0,4	23,9±0,3	23,8±0,3	20,8±0,3
<i>Listeria innocua</i> CECT 910	19,1±0,2	19,1±1,1	17,2±1,0	17,2±0,0	19,6±0,2	18,8±0,1
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032	18,6±0,2	18,3±0,0	17,7±0,0	29,0±0,1	32,7±0,2	33,2±3,1
<i>Penicillium expansum</i> DSMZ 62841	19,5±1,1	22,5±0,3	20,2±0,2	40,8±1,7	50,0±0,1	43,0±0,5
<i>Photobacterium phosphoreum</i> CECT 4192	19,9±0,6	20,1±1,3	19,1±0,8	43,6±1,9	47,9±1,5	30,0±0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 110	19,1±0,1	20,6±0,9	18,7±0,1	26,7±0,5	28,1±0,3	21,2±0,3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 4898	17,2±0,2	21,4±1,3	19,5±0,4	28,8±0,3	37,9±0,4	24,0±9,6
<i>Salmonella choleraesuis</i> CECT 4300	21,5±0,9	17,9±0,5	18,6±0,5	20,2±0,5	20,5±0,8	17,9±0,6
<i>Shewanella putrefaciens</i> CECT 5346T	17,5±0,3	19,6±0,1	18,9±0,5	29,9±0,9	24,6±0,8	20,2±0,1
<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887	20,7±0,1	19,4±0,3	18,6±0,1	19,0±0,4	18,9±0,7	18,7±0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 240	18,4±0,2	19,4±0,9	17,7±0,1	24,0±0,2	22,8±0,1	19,5±0,3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 511T	17,9±0,4	18,7±0,2	16,8±0,8	39,3±0,4	45,8±0,4	34,0±0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i> CECT 4315	18,6±0,2	17,5±0,3	17,6±0,1	26,2±0,2	20,3±0,5	26,2±1,2

6.3.1.7. Liberación de minerales

El contenido de minerales se determinó a partir de la fracción acuosa de solubilidad en agua de las películas. En la **Tabla 6.6** se representa el contenido de los minerales mayoritarios de la MMT con objeto de evaluar si difunden y por tanto para valorar si puede considerarse estas películas como envases de uso alimentario. No hay ninguna diferencia significativa en cuanto a la liberación de Na en ninguna de las películas, lo cual indica que no proviene de la MMT, mientras que para el Mg, igualmente no proveniente de la arcilla, solo se aprecia una disminución muy ligera pero significativa en películas con presencia de concentraciones del 10 g de MMT/100 g SPI, indicando por tanto que la arcilla a esta concentración estaría uniéndose más fuertemente con el Mg. Por el contrario se puede observar que aunque Al y Si están presentes en todas las muestras, en las películas que contienen MMT su liberación es mayor ($p \leq 0,05$), aunque solo para el silicio es dependiente de la concentración de arcilla. Ésto hace considerar la necesidad de evaluar en películas nanocompuestas con arcillas la liberación de minerales que en determinadas concentraciones puedan suponer un riesgo para la salud, ya que podrían pasar al alimento. Según la EFSA (European Food Safety Authority, 2011) para que el envase sea seguro el silicato aluminico liberado en alimentos no debe exceder de la estimación de la ingestión de 1mg por kg de peso corporal por semana.

Tabla 6.6: Contenido de minerales (Na, Mg, Al y Si) de películas proteicas y nanocompuestas con y sin el agregado de clavo, obtenidos a partir de la solubilidad en agua de las películas.

Tipo de película	% MMT	Na (mg/L)	Mg (mg/L)	Al (mg/L)	Si (mg/L)
SPI	0	112,0 ± 3,3 ^a	2,5 ± 0,1 ^d	0,018 ± 0,003 ^{ab}	0,16 ± 0,02 ^a
	5	113,0 ± 3,9 ^a	2,2 ± 0,3 ^d	0,035 ± 0,006 ^c	0,29 ± 0,04 ^b
	10	102,3 ± 6,5 ^a	2,1 ± 0,1 ^{cb}	0,039 ± 0,008 ^c	0,44 ± 0,02 ^d
SPI + AEC	0	109,9 ± 9,4 ^a	2,3 ± 0,2 ^c	0,010 ± 0,001 ^a	0,14 ± 0,01 ^a
	5	106,1 ± 2,9 ^a	1,9 ± 0,1 ^{ab}	0,032 ± 0,001 ^{cb}	0,29 ± 0,01 ^b
	10	117,1 ± 3,2 ^a	1,7 ± 0,3 ^a	0,029 ± 0,008 ^{cb}	0,37 ± 0,04 ^c

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con superíndices iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$.

El agregado de aceite esencial de clavo plastificó las matrices proteicas y nanocompuestas, les confirió a estas películas importantes propiedades antioxidantes y antimicrobianas y favoreció la exfoliación de la arcilla. La presencia de montmorillonita pareciera facilitar la liberación de algunos principios activos y modificar la actividad antimicrobiana. Se observó una transferencia de iones Al y Si provenientes de la arcilla, cuando las películas se ponen en contacto con el agua.

6.3.2. Aplicación de películas nanocompuestas activadas con aceite esencial de clavo en la conservación de filetes de atún rojo (*Thunnus thynnus*)

Teniendo en cuenta las interesantes propiedades fisicoquímicas, antimicrobianas y antioxidantes *in vitro* de las películas de matriz proteica reforzadas con MMT y activadas con aceite esencial de clavo –estudiadas en la sección anterior- se decidió evaluar su aplicación como material de envase para la conservación en refrigeración de filetes de atún rojo (*Thunnus thynnus*).

Para ello, los filetes se recubrieron con diferentes películas: polietileno (Control), películas proteicas con agregado de aceite esencial de clavo (SPI+AEC), películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI y aceite de clavo (SPI+MMT+AEC). Durante el almacenamiento refrigerado (a 2°C durante 17 días) se tomaron muestras de los filetes y se evaluaron: i) el efecto antimicrobiano -pH, Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) y recuentos microbianos-; ii) el control de la oxidación lipídica -índice del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), índice de peróxidos (IP), FTIR y color-; iii) y el pasaje de minerales (Na, Mg, Al y Si) desde las películas nanocompuestas hacia el pescado.

6.3.2.1. Caracterizaciones bioquímicas y microbiológicas para la evaluación de la eficacia de las películas desarrolladas en la preservación de pescado

La medida de Nitrógeno Básico Volátil Total NBVT está directamente relacionada con el crecimiento de microorganismos y la formación de compuestos básicos que resultan de su metabolismo y que conducen a un aumento en el pH. Los valores de NBVT para las muestras

en estudio se muestran en la **Figura 6.7**. Los valores de NBVT iniciales del atún fueron de 13,3 mg NBVT/100 g muestra, indicando que el pescado era de buena calidad. El nivel de NBVT de la muestra control aumentó progresivamente hasta llegar al final del período de almacenamiento (15 días) a un valor de 40,3 mg NBVT/100 g muestra. En las muestras cubiertas con las películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con 10 g MMT/100 g SPI activadas con clavo (SPI+MMT+AEC), los valores de NBVT se mantuvieron siempre por debajo de los valores del control, no observándose diferencias significativas entre las distintas películas analizadas, y recién aumentaron a partir del octavo día de almacenamiento, llegando a valores entre 30 y 33 mg NBVT/100 g muestra al final del período de conservación estudiado. Cabe resaltar que, excepto la muestra control, ninguno superó el límite crítico de 35 mg NBVT/100 g muestra (EEC, 1995) hasta al menos los 15 días de conservación analizados.

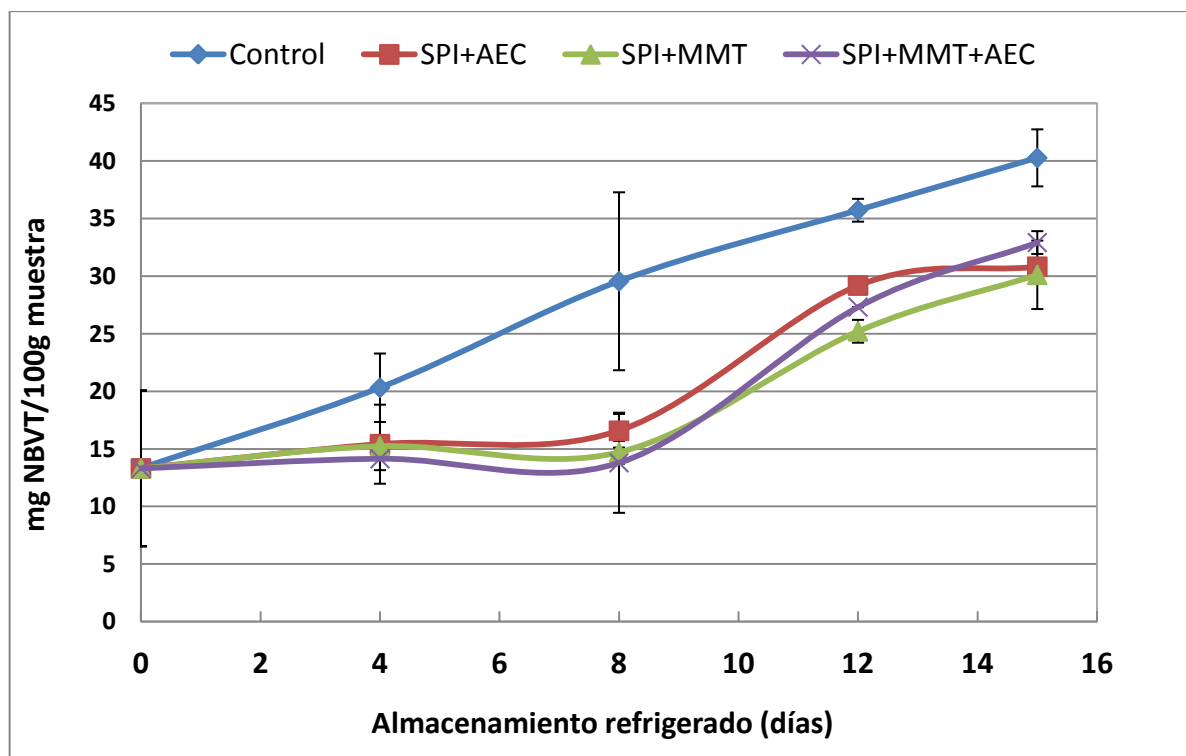


Figura 6.7: Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT) de filetes de atún rojo conservados a 2 ± 1 °C recubiertos con polietileno (Control), y filetes recubiertos con: películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con 10 g MMT/100 g SPI activadas con clavo (SPI+MMT+AEC).

Es bien sabido que los cambios de pH durante el almacenamiento refrigerado varían según la especie del pez y de otros factores como el grado de contaminación por microorganismos y las condiciones de almacenamiento (Ben-Gigirey y col., 1999). En la **Figura 6.8** se muestra el pH del músculo de atún en función de los días de almacenamiento refrigerado. Del gráfico se puede observar que el pH inicial para el atún fue de 5,88. Este pH es levemente mayor al informado por otros autores (Ruiz-Capillas y Moral, 2005) para muestras de atún (*Thunnus obesus*) refrigerado. Para la muestra control el aumento del pH es significativo recién a los 12 días, alcanzando un pH de 6,15 al final del almacenamiento (15 días). En las demás muestras el pH es mayor que el control durante todo el período de almacenamiento, y el valor se hace significativo con respecto al inicial recién al octavo día, alcanzando valores de 6,29 para la muestra SPI+MMT y 6,21 para SPI+MMT+AEC. Selmi y Sadok, (2008) obtienen un pH de 6,27 para muestras de atún (*Thunnus thynnus*) con y sin agregado de tomillo envasadas en bolsas de polietileno, y permanece constante durante 18 días de almacenamiento a 0 °C. Nuestros resultados mostraron que a pesar de los diferentes valores para el control y SPI+AEC, ambos lotes obtienen el mismo pH al final de la conservación. Este aumento en el pH para todas las muestras podría estar relacionado al crecimiento de microorganismos y/o la descomposición de proteínas, aunque este hecho no concuerda con los valores de NBVT determinados, donde los valores del control son significativamente mayores que los de las demás muestras. El hecho de que las muestras recubiertas con películas tengan el pH levemente por encima del control durante todo el período de almacenamiento podría explicarse parcialmente por el hecho que quede algún remanente de NaOH adicionado a las soluciones filmogénicas para obtener las películas. Aún así, ninguno de los valores del pH al final del almacenamiento supera el valor 7,5, máximo estipulado para la venta de pescado fresco en el artículo 272 del Código Alimentario Argentino.

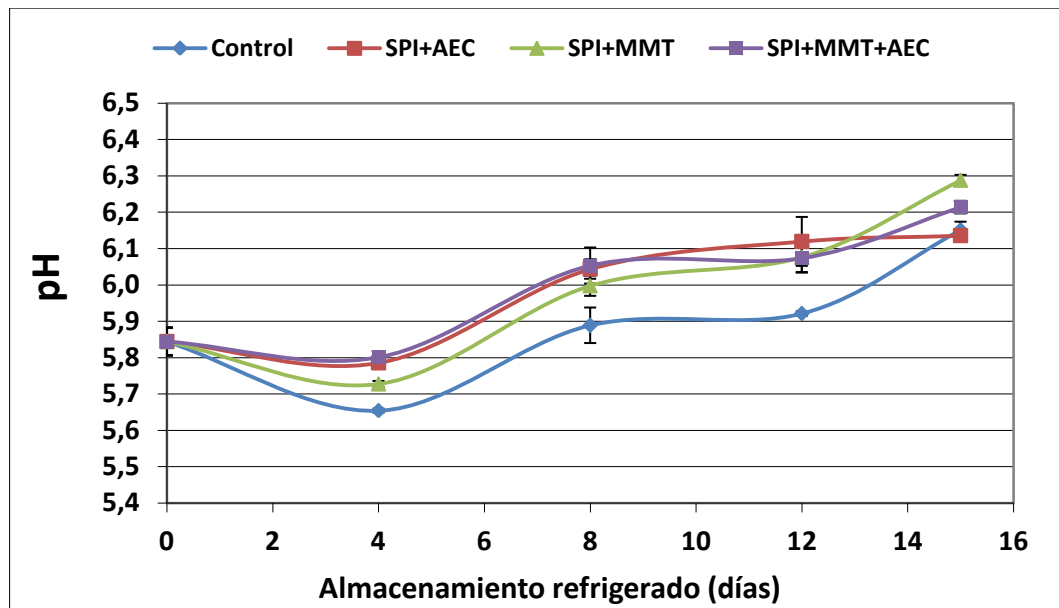


Figura 6.8: pH de filetes de atún rojo conservados a 2 ± 1 °C recubiertos con polietileno (Control), y filetes recubiertos con: películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con 10 g MMT/100 g SPI activadas con clavo (SPI+MMT+AEC).

Generalmente, la susceptibilidad de las bacterias ante el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales también parece aumentar con situaciones desfavorables en el entorno, como pueden ser con una disminución en el pH en el alimento, descenso de la temperatura de almacenamiento y reducción de la cantidad de oxígeno dentro del envase.

Los productos pesqueros frescos son altamente perecederos, y el desarrollo del deterioro del pescado almacenado en condiciones aeróbicas consiste típicamente de bacilos psicrófilos Gram-negativos no fermentadores. Por lo tanto, en condiciones aeróbicas de baja temperatura, la flora se compone casi exclusivamente de *Pseudomonas* spp. y *Shewanella putrefaciens* (Chouliara y col., 2004). El recuento de enterobacterias (Zambuchini y col., 2008) y mesófilas también se considera como otro índice de la calidad del pescado (del Valle Márquez Figueroa y col., 2006). Un seguimiento de estos microorganismos ha sido sugerido como una medida de la calidad del pescado (Topic Popovic y col., 2010).

En la **Tabla 6.7** se muestran los recuentos de microorganismos en filetes de atún recubiertos con las películas Control, SPI+AEC, SPI+MMT y SPI+MMT+AEC, almacenados en refrigeración. Inicialmente el recuento de bacterias totales en el atún fue de 3,6 log ufc/g, cifra prácticamente igual a la obtenida por las bacterias mesófilas (3,65 log ufc/g). Estos valores

son similares a los informados para atún fresco por del Valle Márquez Figueroa y col., (2006), quienes encontraron valores de 3,3 log ufc/g para mesófilos totales. El número de colonias productoras de H₂S (presuntamente *S. putrefaciens*) y de colonias luminiscentes (presuntamente *P. phosphoreum*) (López-Caballero y col., 2005) estuvieron por debajo de los límites de detección de la técnica (<2 log ufc/g). Los recuentos de *Pseudomonas* spp. fueron cercanos a los de bacterias totales (3,49 log ufc/g), mientras que tanto para los recuentos de bacterias lácticas como enterobacterias se obtuvieron valores cercanos a 1,5 log ufc/g (**Tabla 6.7**).

Los recuentos se mantienen prácticamente constantes durante los primeros días de conservación en el lote control. Recién a los 8 días de almacenamiento refrigerado, se observa un incremento en los recuentos de bacterias totales, mesófilas y *Pseudomonas* spp., que se sostiene hasta alcanzar valores superiores a 9 log ufc/g al final del período estudiado, mientras que los recuentos de los demás grupos de microorganismos se mantienen sin cambios.

En general se observa que los recuentos de bacterias totales (incubadas a 15 °C) y flora mesófila son muy similares durante la conservación. Asimismo, los recuentos de *Pseudomonas* spp. alcanzan también cifras semejantes a las obtenidas para recuento de flora total en medios generales de cultivo. Este hecho unido a los bajos recuentos (comparados con los de *Pseudomonas* spp.) observados para los H₂S-productores y colonias luminiscentes (presuntos *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*, respectivamente (López-Caballero et al., 2005) señalarían al género *Pseudomonas* como responsables del deterioro de atún refrigerado, ya que constituye la flora mayoritaria.

Las bacterias lácticas se encuentran por debajo del límite de detección durante gran parte de la conservación probablemente debido a su carácter mesófilo y a la temperatura de conservación utilizada (2 ± 1 °C), si bien en el lote control registran 2,5-3 log ufc/g a los 17 días de conservación. Las enterobacterias permanecen cercanas al límite de detección prácticamente hasta los 15 días, momento en el que registran 2,5 log ufc/g. Al final del período de conservación estudiado (día 17 de almacenamiento), los recuentos de bacterias totales en la muestra control superan el valor máximo permitido (7 log ufc/g) para la comercialización de pescado refrigerado, por encima de dicho valor la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) considera que el pescado representa un riesgo para la salud desde el punto de vista microbiológico.

Si comparamos el lote control con el de los filetes de atún recubiertos con películas (**Tabla 6.7**) podemos observar diferentes comportamientos. Para los filetes recubiertos con películas de SPI+MMT no se observaron diferencias con el lote control durante todo el período de almacenamiento para todos los recuentos, excepto para el final del almacenamiento donde los recuentos de bacterias totales son levemente menores para el lote SPI+MMT. Con *Pseudomonas* spp. y bacterias lácticas sucede lo mismo. Es decir, las películas nanocompuestas no contribuyen a la estabilidad del atún durante su conservación en refrigeración. Cuando recubrimos el pescado con películas activadas con AEC los recuentos de microorganismos se mantienen 1 ó 2 log por debajo respecto al control, siendo más evidentes las diferencias en etapas intermedias de la conservación (8-15 días, ya que al final del período de conservación estudiado todos los lotes presentan recuentos altos). Esta diferencia se debe a que el atún está en contacto con el aceite de clavo, el cual, como se discutió previamente en este capítulo tiene probadas propiedades antimicrobianas contra microorganismos patógenos y causantes del deterioro de alimentos. Esta acción antimicrobiana del aceite de clavo puede atribuirse a la naturaleza hidrofóbica que permite a los aceites esenciales y sus compuestos partir los lípidos de la membrana celular y mitocondria de las bacterias y alterar las estructuras haciéndolas más permeables (Outtara et al., 1997). Gómez-Estaca y col. (2010)_observan un aumento en la vida útil de bacalao refrigerado cuando se recubre con películas de gelatina/quitosano y clavo.

En el atún recubierto de películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI y activadas con AEC, los recuentos de bacterias totales a 15 °C, mesófilas totales, bacterias productoras de H₂S, luminiscentes y *Pseudomonas* spp. comienzan a aumentar a partir del día 10 de almacenamiento respecto al inicio de la conservación en refrigeración, siendo inferiores a los otros tres lotes (control, SPI+AEC y SPI+MMT). Esta diferencia se hace más evidente al final del almacenamiento. Con respecto a las bacterias lácticas y enterobacterias, esta diferencia en los recuentos que vemos para las demás bacterias se hace evidente recién al final del período de almacenamiento.

Es importante señalar que si bien el AEC fue adicionado a las películas proteicas (SPI+AEC) y a las películas nanocompuestas (SPI+MMT+AEC), en general los recuentos al final del almacenamiento siempre fueron 1 log menor para estas últimas. Esto podría ser un indicio de que el AEC se estaría liberando más lentamente de las películas nanocompuestas, y por lo tanto se presume que al final del almacenamiento el contenido de compuestos fenólicos del

aceite de clavo, es mayor que en las películas proteicas activadas. En relación a este hecho, la incorporación de aceite esencial de clavo a películas proteicas (gelatina-clara de huevo) nanocompuestas con sepiolita favorecieron la difusión del aceite esencial y por tanto aumentaron actividad antimicrobiana de las películas (Giménez y col., 2012).

Tabla 6.7: Recuentos de microorganismos en filetes de atún conservados a 2 ± 1 °C cubiertos con polietileno (Control), con película de proteína de soja activada con clavo (SPI+AEC), con película proteica con 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y con película con 10 g MMT/100 g SPI activada con clavo (SPI+MMT+AEC). Los resultados de la tabla están expresados en log de unidades formadoras de colonias por gramo de músculo (log ufc/g).

Microorganismos	Lotes	Días de conservación					
		0	4	8	12	15	17
Bacterias totales a 15 °C	Control	3,60 ± 0,02	2,98 ± 0,28	4,27 ± 0,01	6,26 ± 0,00	8,60 ± 0,34	11,44 ± 0,06
	SPI/AEC	3,60 ± 0,02	2,30 ± 0,42	2,92 ± 0,31	5,38 ± 0,14	6,92 ± 0,17	9,48 ± 0,31
	SPI/MMT	3,60 ± 0,02	2,95 ± 0,07	4,90 ± 0,00	6,87 ± 0,04	8,29 ± 0,04	9,37 ± 0,46
	SPI/MMT/AEC	3,60 ± 0,02	<2	2,75 ± 0,21	4,51 ± 0,02	6,54 ± 0,34	8,36 ± 0,06
Mesófilas totales	Control	3,65 ± 0,02	3,26 ± 0,04	4,35 ± 0,01	6,33 ± 0,14	8,44 ± 0,08	9,62 ± 0,03
	SPI/AEC	3,65 ± 0,02	2,27 ± 0,01	3,21 ± 0,01	5,30 ± 0,00	6,95 ± 0,06	9,98 ± 2,12
	SPI/MMT	3,65 ± 0,02	2,54 ± 0,40	4,67 ± 0,15	6,78 ± 0,03	8,28 ± 0,03	9,22 ± 0,06
	SPI/MMT/AEC	3,65 ± 0,02	2,05 ± 0,21	2,88 ± 0,03	4,51 ± 0,00	6,42 ± 0,13	8,29 ± 0,05
Productoras de H ₂ S	Control	<2,30	<2,15	<2	<3	<5	<7
	SPI/AEC	<2,30	<2	<2	<2	<4	6,80 ± 1,13
	SPI/MMT	<2,30	<2	<2	<3	<5	<7
	SPI/MMT/AEC	<2,30	<2	<2	<2	<4	<5
Colonias luminiscentes	Control	<2	<2	<2	<3	<5	<7
	SPI/AEC	<2	<2	<2	<2	<4	<6
	SPI/MMT	<2	<2	<2	<3	<5	<7
	SPI/MMT/AEC	<2	<2	<2	<2	<4	<5
<i>Pseudomonas</i> spp.	Control	3,49 ± 0,00	3,01 ± 0,15	4,36 ± 0,14	6,18 ± 0,00	8,71 ± 0,26	10,28 ± 1,70
	SPI/AEC	3,49 ± 0,00	<2	3,07 ± 0,16	5,28 ± 0,00	6,92 ± 0,01	9,43 ± 0,09
	SPI/MMT	3,49 ± 0,00	2,7 ± 0,00	4,80 ± 0,01	6,44 ± 0,01	7,76 ± 0,25	9,67 ± 0,05
	SPI/MMT/AEC	3,49 ± 0,00	<2	2,89 ± 0,16	4,30 ± 0,00	6,36 ± 0,08	8,16 ± 0,28
Bacterias lácticas	Control	1,39 ± 0,13	1,95 ± 0,00	1,82 ± 0,05	<1	<1	2,40 ± 0,56
	SPI/AEC	1,39 ± 0,13	<1,6	<1,6	<1	<1	<1
	SPI/MMT	1,39 ± 0,13	<1,6	<1	<1	<1	3,02 ± 0,09
	SPI/MMT/AEC	1,39 ± 0,13	<1	<1,6	<1	<1,6	<1
<i>Enterobacterias</i>	Control	1,87 ± 0,12	1,30 ± 0,42	<1,6	<1	2,43 ± 0,13	3,26 ± 0,00
	SPI/AEC	1,87 ± 0,12	1,30 ± 0,42	<1	<1	<1	<1
	SPI/MMT	1,87 ± 0,12	1,35 ± 0,49	<1,30	<1,30	2,56 ± 0,02	<1
	SPI/MMT/AEC	1,87 ± 0,12	<1	<1	<1	<1	<1

El principal mecanismo de oxidación de los lípidos es la autooxidación. Este es un proceso autocatalítico iniciado por formación de radicales en lípidos insaturados seguido de un ataque por parte del oxígeno (Frankel, 2005). Los hidroperóxidos son los productos de la oxidación primaria, y las reacciones posteriores de oxidación, de descomposición y polimerización, conducen a la formación de una mezcla compleja de productos de oxidación intermedios y finales que incluyen una amplia variedad de compuestos. Pueden formarse compuestos volátiles y no volátiles, de diferente peso molecular y polaridad, y que tengan diferentes funciones oxigenadas, tales como funciones hidroperoxi, hidroxil, aldehído, epoxi y cetónicos. Tal es así que se encuentran normalmente ciertas dificultades para evaluar el grado de oxidación (Dobarganes y Márquez-Ruiz, 2003). La evaluación de la oxidación lipídica se basa normalmente en índices analíticos como el índice de peróxido (IP) y del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), destacándose como indicadores de los productos de oxidación primaria y secundaria respectivamente (Aranda y col., 2005; Chaijan y col., 2006; Pourashouri y col., 2009; Quitral y col., 2009; Saeed y Howell, 2002; Yerlikaya y Gokoglu, 2010).

El músculo del pescado contiene ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con una variedad de beneficios para la salud (Rosales y col., 2002; Chagan y col., 2002; Herrera, 2002). Pero estos ácidos grasos poliinsaturados son muy susceptibles a las reacciones de oxidación (Aidos y col., 2002; Kamal y col., 2002). La oxidación de los lípidos en los alimentos conducen a una reducción en la vida útil debido a los cambios en el sabor y/o el olor, el deterioro de la textura y la funcionalidad del músculo, y una reducción en la calidad nutricional (Pereira de Abreu y col., 2010). El oxígeno puede tener un efecto muy negativo sobre el color del músculo de atún, debido a la oxidación de la mioglobina para formar metamioglobina, que le imparte un color marrón (Bekhit y Faustman, 2005). La autooxidación de lípidos es importante en pescados (por su alto contenido de ácidos grasos insaturados). Esta es una reacción en cadena, en donde en una primera etapa se producen peróxidos (que se evaluarán mediante la determinación del IP), y que luego se descomponen dando productos de bajo peso molecular tales como aldehídos y cetonas (que se determinarán con TBA).

En la **Figura 6.9** se muestran los índices de peróxido en función del tiempo de almacenamiento para la muestra control, y las muestras recubiertas con películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con

10% MMT activadas con clavo (SPI+MMT+AEC). Las muestras al inicio del almacenamiento tuvieron un valor inicial de 64,4 meq/Kg. En el lote control, el IP fluctúa entre valores cercanos, llegando al final del almacenamiento con 117,8 meq/Kg. La disminución en los valores de IP se interpreta como una formación de productos secundarios que se evaluarán posteriormente con el índice del TBA. Con respecto al resto de las muestras, no se observó un comportamiento definido en el valor de IP durante el tiempo que duró el almacenamiento, si bien todas las muestras llegaron a valores de IP más altos que el inicial, el único lote que finalizó con un valor de IP significativamente menor que el control fue la muestra de atún recubierta con SPI/AEC (IP= 87,9 meq/Kg). Este valor final más bajo para las películas SPI/AEC puede deberse a que los antioxidantes presentes en las películas con clavo, principalmente eugenol, actúan como aceptores de radicales libres, poniendo así fin a la oxidación en la etapa inicial ó también previniendo la posible formación de nuevos radicales en el proceso de oxidación (O'Sullivan y col., 2005). Como vimos anteriormente en este capítulo, las películas con aceite de clavo tienen muy buenas propiedades antioxidantes probadas mediante el ensayo de secuestro de radicales libres ABTS⁺. Aunque el IP es ampliamente considerado como un buen indicador de la autooxidación lipídica durante los primeros estadios, no se refleja claramente en este estudio debido a la gran fluctuación de estos compuestos en estos pescados. Giménez y col. (2011), observaron este mismo hecho en estudios de conservación de hamburguesas de caballa en estado congelado.

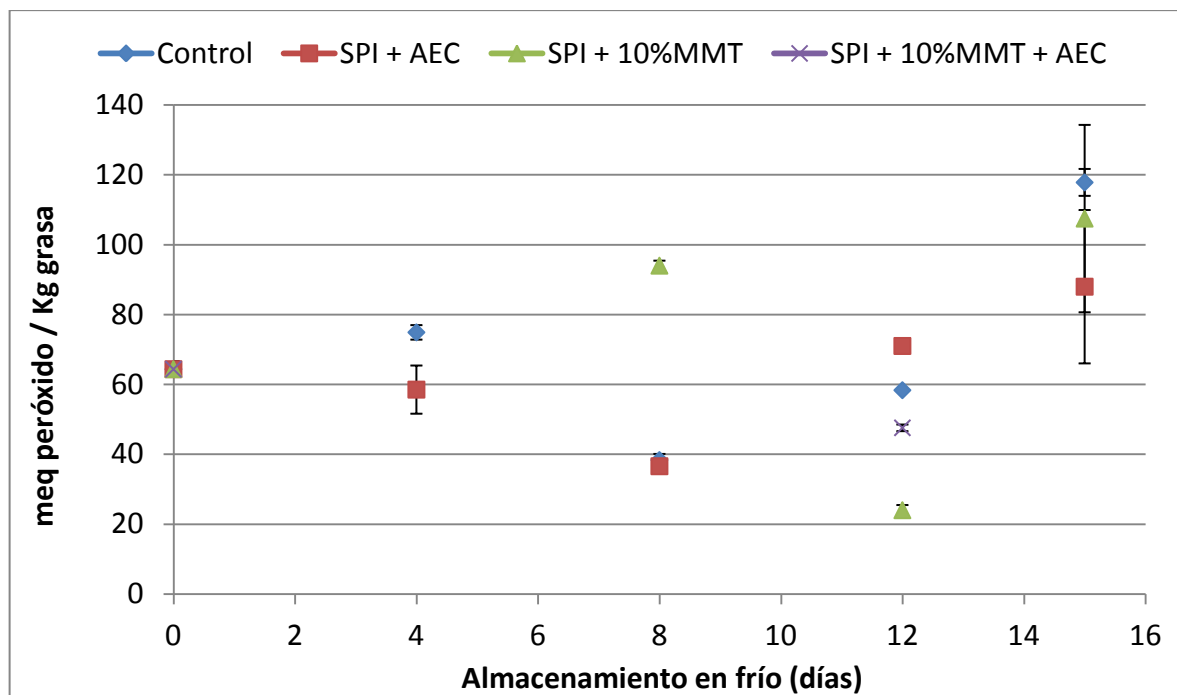


Figura 6.9: Índice de peróxidos de la grasa extraída de filetes de atún rojo conservados a 2 ± 1 °C cubiertos con polietileno (Control), y filetes recubiertos con: películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con 10gMMT/100 g SPI activadas con clavo (SPI+MMT+AEC).

En la **Figura 6.10** se muestra el índice del ácido tiobarbitúrico (TBA) del músculo de atún en función de los días de almacenamiento refrigerado. El nivel inicial de malonaldehído en la muestra control fue de 0,18 mg MAL/Kg músculo, manteniéndose constante hasta los 4 días de almacenamiento. La estabilidad a la oxidación lipídica del pescado observada puede deberse al frío y a la propiedad barrera al O₂ de las bolsas de polietileno usadas para cubrir el lote control. Pasados los 4 días el contenido de MAL comenzó a aumentar de forma exponencial hasta alcanzar un valor de 1,8 mg MAL/Kg músculo al final del estudio. Esto estaría indicando la formación de productos secundarios de la oxidación lipídica tales como aldehídos y otros compuestos volátiles (Kolakowska 2002). En un estudio previo con atún almacenado a 0°C en bolsas de polietileno selladas al vacío (Selmi y Sadok, 2008), los niveles de TBA fueron de 0,34 mg MAL/Kg de aceite. Este valor comenzó a incrementarse a partir del noveno día, pudiéndose atribuir el retardo en la oxidación al efecto combinado de temperatura, envase y vacío. Los valores de TBA para las películas con SPI+AEC, SPI+MMT y SPI+MMT+AEC mantuvieron su valor inicial durante todo el período de almacenamiento,

excepto para la película con 10 g MMT/100 g SPI sin agregado de AEC, donde el valor comenzó a aumentar a partir de los tres últimos días de almacenamiento, llegando a 0,72 mg MAL/Kg músculo. Con estos resultados se pone de manifiesto que la aplicación de películas proteicas y nanocompuestas, aditivadas o no con aceite esencial de clavo, protegen a los filetes de atún de la autooxidación lipídica -medida por índice de TBA-, siendo más efectivas las que contienen AEC en la formulación.

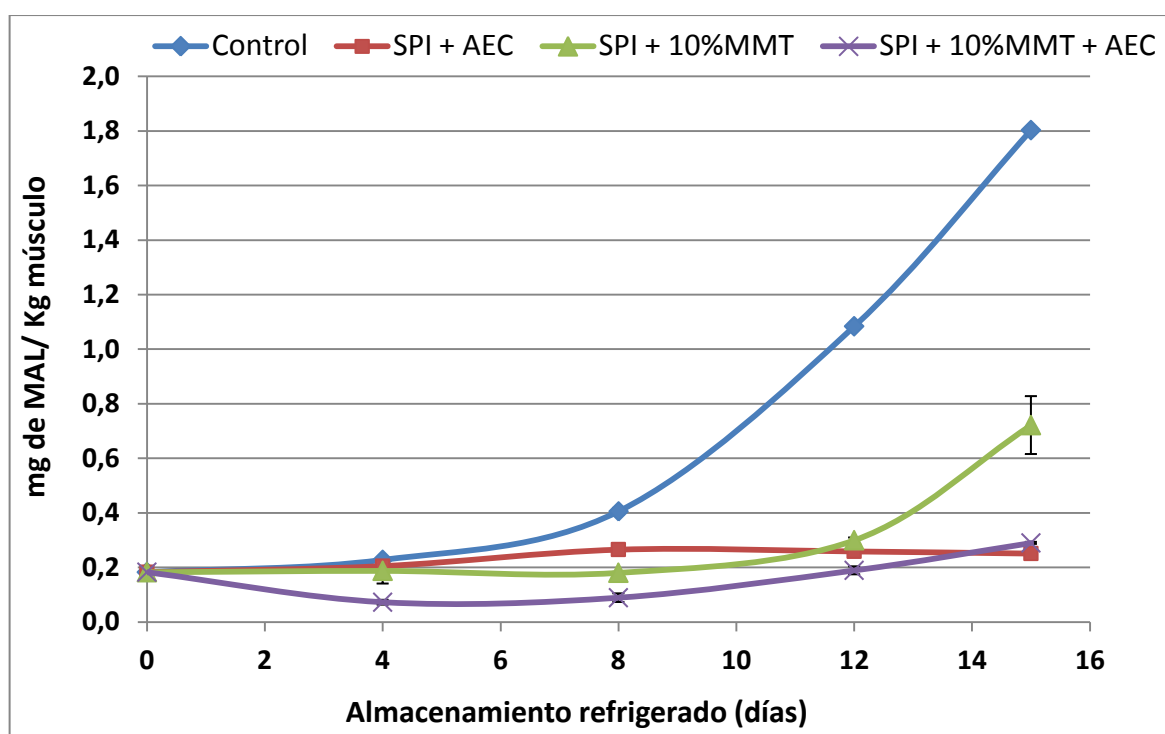


Figura 6.10: Índice de TBA de filetes de atún rojo conservados a 2 ± 1 °C recubiertos con: polietileno (Control), y filetes recubiertos con: películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con 10 g MMT/100 g SPI activadas con clavo (SPI+MMT+AEC).

En la **Figura 6.11** se muestra el espectro de FTIR entre 3600 y 3050 cm^{-1} (A) y entre 1780 y 1600 cm^{-1} (B) de grasa extraída de atún fresco recubierto con polietileno (control, C) y recubierto con películas nanocompuestas activadas con AEC (SPI+MMT+AEC).

En la **Figura 6.11-A** se puede observar la evolución típica de los hidroperóxidos durante el almacenamiento del atún refrigerado (lote control), donde al principio se acumulan (aumento progresivo en la intensidad durante los primeros 12 días de conservación) y luego se van consumiendo para formar compuestos más estables como aldehídos y cetonas (Giménez y col., 2011). Una tendencia similar sigue la evolución de los hidroperóxidos en el pescado recubierto con la película más compleja (SPI+MMT+AEC), si bien en este caso la desaparición de estos compuestos empieza a ser evidente a partir del día 12 de conservación.

En la **Figura 6.11-B** se muestra la evolución de los aldehídos y cetonas que se van acumulando a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, lo cual puede verse por un incremento de la intensidad en torno a 1728 cm^{-1} para aldehídos y a 1712 cm^{-1} para cetonas, además de una disminución relativa en la intensidad y frecuencia del pico de triglicéridos, localizado en torno a 1743 cm^{-1} . En este sentido, las diferencias entre el lote control (C) y el recubierto con la película SPI+MMT+AEC comienzan a evidenciarse a partir del día 12 de conservación. La acumulación de cetonas y degradación de triglicéridos se manifiesta claramente en el día 15 de almacenamiento, tanto en la muestra control (C4) como en la muestra con la película nanocompuesta activa (SPI+MMT+AEC-4), aunque en este último caso lo hace con menor intensidad. Esto indica claramente que la película protege en cierta manera de la oxidación lipídica en los estadios más avanzados de la conservación.

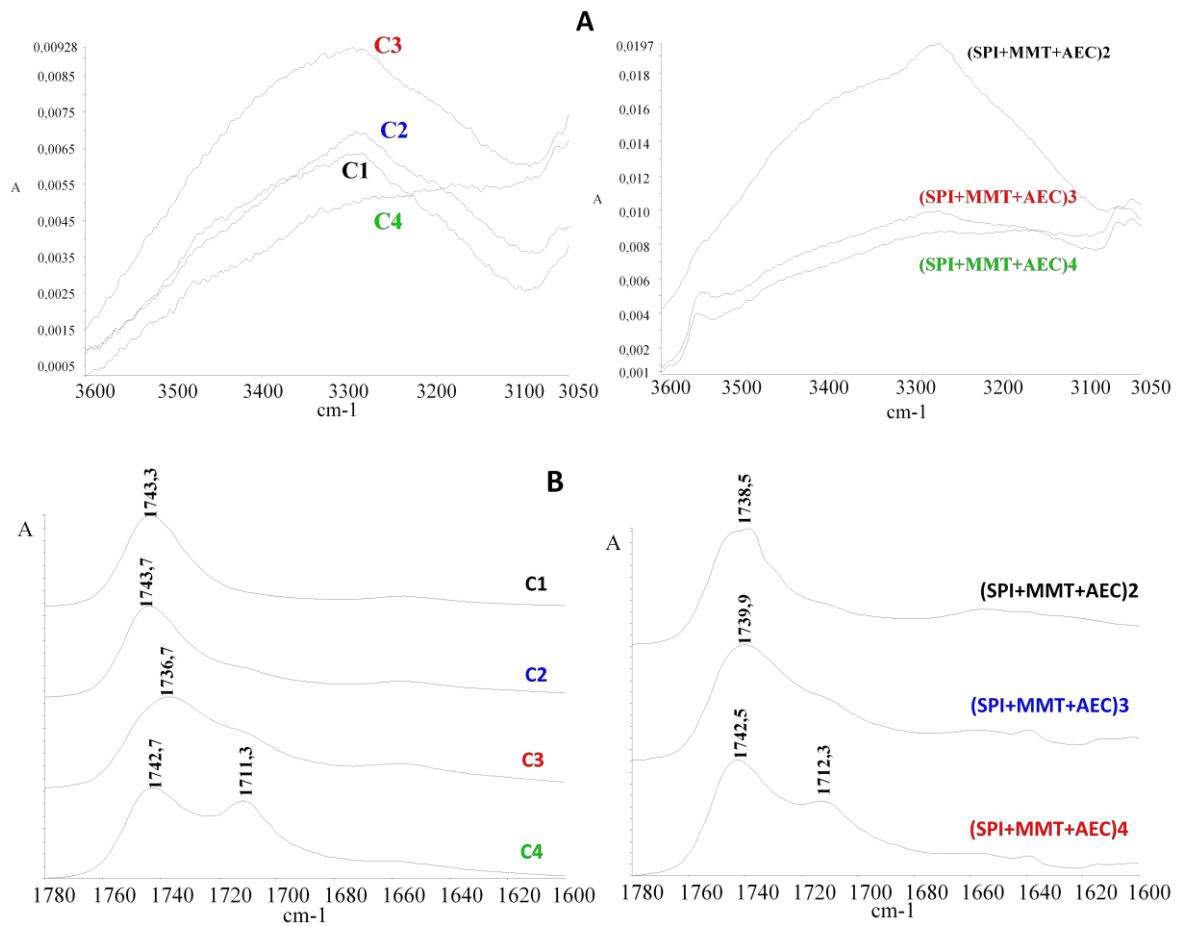


Figura 6.11: Curvas de FTIR para **A)** hidroperóxidos y **B)** aldehídos y cetonas de filetes de atún control (C) y recubiertos con películas de SPI+MMT+AEC. Los números (1, 2, 3, 4) al lado de las siglas (C y SPI+MMT+AEC) se refieren a los días 4, 8, 12 y 15 del período de conservación del atún en frío, respectivamente.

Los valores de luminosidad (L) para todos los lotes a lo largo de la conservación se mantuvieron muy similares, tan solo al final de la conservación variaron entre menos de un 10 %, entre el lote control (con menores valores) y los lotes con películas aditivadas con clavo (con y sin arcilla) con los mayores valores. La tendencia al rojo (a) disminuyó para todos los músculos recubiertos con películas en los primeros días de la conservación y a partir del día 12, el lote control también manifiesta una disminución igualando los valores al resto de muestras. Mientras tanto, la tendencia al amarillo (b) incrementó progresivamente desde los primeros días en las muestras que tienen películas con clavo –con y sin MMT–, esto se puede explicar por el depósito superficial de fenoles en el músculo, que aunque protegen

de la oxidación modifiquen ligeramente esta tonalidad. EL ΔE sigue una evolución en la que influye mucho más la luminosidad que el resto de parámetros involucrados.

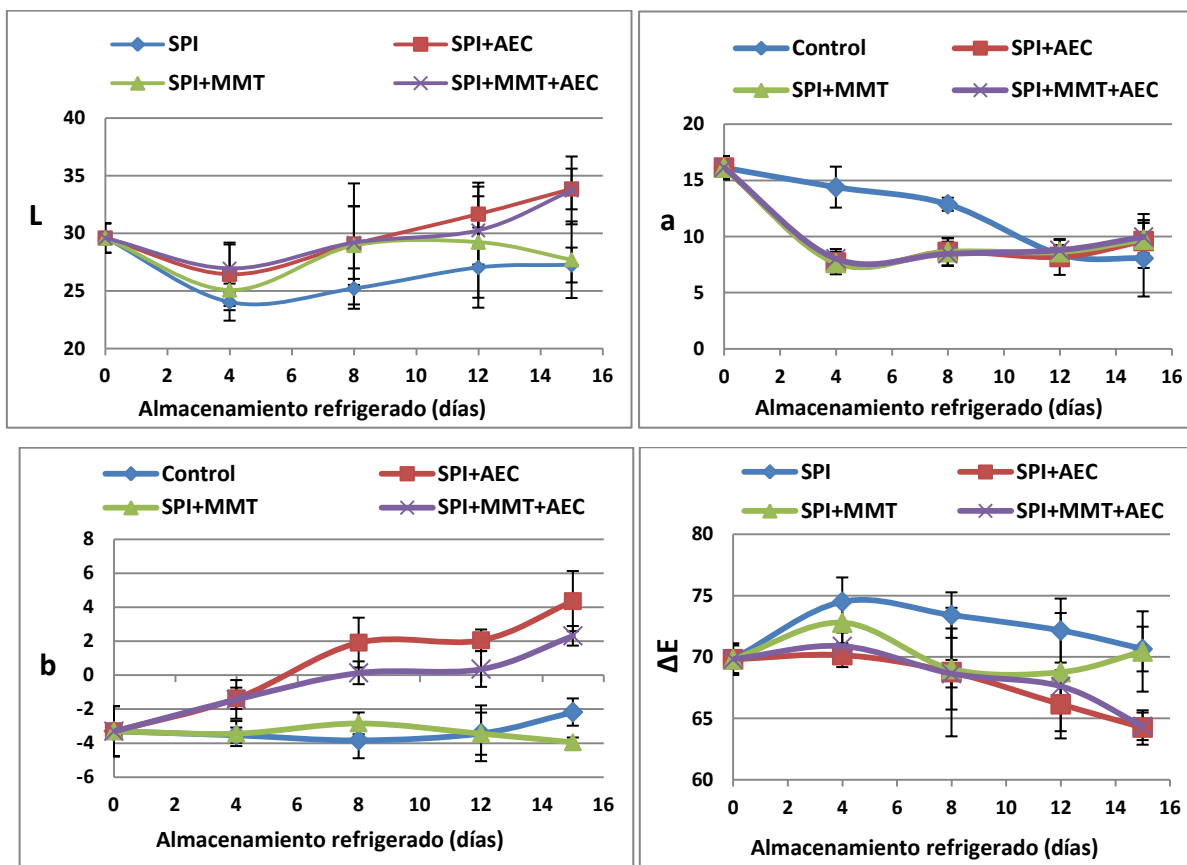


Figura 6.12: Valores de luminosidad (L), cromaticidad (a y b) y diferencia de color (ΔE) de filetes de atún rojo conservados a 2 ± 1 °C recubiertos con polietileno (Control), y filetes recubiertos con: películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con 10 g MMT/100 g SPI activadas con clavo (SPI+MMT+AEC).

6.3.2.2. Migración de minerales al pescado

Para evaluar si la MMT utilizada en las películas difunde al pescado se determinó la concentración de minerales mayoritarios de la arcilla (Na, Mg, Al y Si) en el músculo. Los resultados preliminares encontrados en este sentido se muestran en la **Tabla 6.8**. La presencia en músculo de atún crudo de Na y Mg no se vió modificada al cabo de 17 días de

conservación en el lote control. Sin embargo, en el lote de SPI aditivado de aceite esencial de clavo se observó un aumento considerable en la concentración de Na, manteniéndose constantes los valores de Mg. El AEC podría llegar a estar interactuando con SPI de manera que liberar ciertos iones presente en el aislado, en este caso Na, pudiendo pasar así al músculo. Este efecto también se muestra en las películas nanocompuestas con o sin AEC, aunque en menor medida.

Tabla 6.8: Concentración de sodio (Na), magnesio (Mg), aluminio (Al) y silicio (Si) en filetes de atún conservados a 2 ± 1 °C cubiertos con polietileno (Control), y filetes recubiertos con: películas de soja y clavo (SPI+AEC), películas de soja y 10 g MMT/100 g SPI (SPI+MMT) y películas de soja con 10 g MMT/100 g SPI activadas con clavo (SPI+MMT+AEC).

Lote	Minerales			
	Na (mg/100 g muestra)		Mg (mg/100g muestra)	
	Día 0	Día 17	Día 0	Día 17
	Control	50,25 ± 5,73 ^A	51,80 ± 3,22 ^{aA}	36,10 ± 2,72 ^A
SPI/AEC	--	103,64 ± 6,65 ^c	--	37,65 ± 0,31 ^a
SPI/MMT	--	87,70 ± 3,03 ^b	--	39,83 ± 2,92 ^a
SPI/MMT/AEC	--	79,24 ± 5,33 ^b	--	37,03 ± 0,57 ^a

Lote	Minerales					
	Al (mg/100 g muestra)			Si (mg/100 g muestra)		
	Día 0	Día 7	Día 17	Día 0	Día 7	Día 17
	Control	0,46±0,24	0,16 ± 0,01 ^{aA}	0,13±0,09 ^{aA}	0,34±0,05	0,30±0,14 ^{aA}
SPI/AEC	--	0,37 ± 0,01 ^{bB}	0,20±0,05 ^{bA}	--	0,24±0,05 ^{aA}	0,34±0,06 ^{bA}
SPI/10MMT	--	0,18 ± 0,02 ^{aA}	0,13±0,05 ^{aA}	--	0,28±0,02 ^{aA}	0,15±0,02 ^{aA}
SPI/10MMT/AEC	--	0,11 ± 0,09 ^{aA}	0,11±0,02 ^{aA}	--	0,17±0,08 ^{aA}	0,13±0,01 ^{aA}

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los superíndices en minúscula iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$. En filas, los superíndices en mayúscula iguales corresponden a medias iguales con un $p \leq 0,05$ para cada determinación.

En la **Tabla 6.8** también se observa que independientemente de los valores absolutos encontrados en los controles, las concentraciones de Si y Al en el pescado, no se incrementaron al utilizar como materiales de envasado las películas proteicas de soja reforzadas con MMT (activadas o no con aceite esencial de clavo). Estos resultados preliminares, se muestran prometedores para la utilización de estos materiales en el envasado de alimentos.

*La aplicación de las películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI activadas con aceite esencial de clavo sobre filetes de músculo de atún rojo (*Thunnus thynnus*) logró disminuir los valores de NBVT, el recuento final de microorganismos y la autooxidación lipídica durante todo el período de almacenamiento refrigerado estudiado. Y en los estudios preliminares realizados, los minerales presentes en la arcilla no difundieron al pescado*

6.4. Conclusiones

a. Se logró activar las películas nanocompuestas en base a proteínas de soja – MMT natural con agregado de aceite esencial de clavo obteniendo un material con importantes propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

b. El agregado de aceite esencial de clavo a las formulaciones proteicas y nanocompuestas, ejerció cierto efecto plastificante, verificado en la disminución de la resistencia a la rotura y el módulo elástico y en el aumento del contenido de agua, no modificando significativamente la elongación, la WVP y la solubilidad en agua de las respectivas películas. También favoreció el grado de exfoliación de arcilla en la matriz, aunque en estos sistemas coexisten las nanoestructuras exfoliadas e intercaladas.

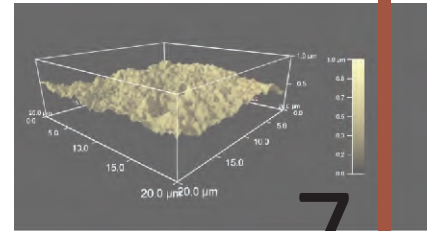
c. Los estudios realizados sugieren la interacción entre los tres componentes de la película (proteínas-aceite esencial-MMT). La presencia de arcilla pareciera facilitar la liberación de

algunos principios activos y modificar algunas actividades microbiológicas. El poder de la MMT de modular la liberación de principios activos desde matrices proteicas será motivo de futuros estudios.

d. La aplicación de las películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI activadas con aceite esencial de clavo sobre filetes de músculo de atún rojo (*Thunnus thynnus*) logró disminuir los valores de NBVT, el recuento final de microorganismos y la autooxidación lipídica durante todo el período de almacenamiento refrigerado estudiado.

e. Las propiedades antioxidantes in vitro y el menor recuento de microorganismos al finalizar el almacenamiento refrigerado para el pescado recubierto con las películas nanocompuestas con 10 g MMT/100 g SPI activadas con aceite de clavo respecto del pescado cubierto con las mismas películas sin activar confirmaría que la presencia de la arcilla favorece la liberación de los principios activos del aceite de clavo prolongando su actividad antimicrobiana y antioxidante en el tiempo.

f. Si bien se observó difusión de algunos minerales presentes en la arcilla a dispersiones acuosas, no se observó indicio de tal difusión al músculo de pescado en el período de almacenamiento evaluado. Estos resultados se muestran prometedores para la utilización de las películas nanocompuestas en el envasado de algunos alimentos.



Propiedades adhesivas de formulaciones en base a proteínas de soja y montmorillonita



7. Propiedades adhesivas de formulaciones en base a proteínas de soja y montmorillonita

7.1. Introducción

Los adhesivos pueden definirse, según Martín (2000), como aquellas sustancias que aplicadas a las superficies de dos materiales permiten una unión resistente a la separación, actuando como puentes entre la superficie de los sustratos. Estos sustratos o adherentes pueden ser de materiales iguales o distintos.

En el mecanismo de unión de sustratos, surgen dos conceptos fundamentales: cohesión y adhesión, que se representan en la **Figura 7.1**. La cohesión se define como la fuerza interna que posee el adhesivo, mientras la adhesión se define como el conjunto de interacciones físicas y químicas que tienen lugar en la interfase adhesivo/sustrato.

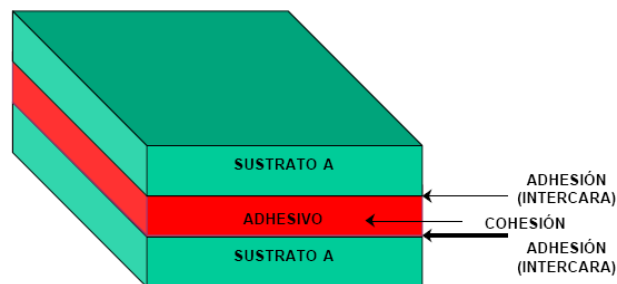


Figura 7.1: Representación esquemática para diferenciar los conceptos de adhesión y cohesión. Adaptado de Martin (2000)

Según Klimets y col. (2004) los adhesivos de alta calidad deberían tener un alto rendimiento de la unión adhesiva en la etapa inicial del secado, un tiempo corto de curado y un comportamiento de flujo pseudoplástico.

Los adhesivos se clasifican, según su composición química, en adhesivos en fase líquida y en fase sólida (Orgilés y col., 1992). En general, los primeros forman uniones resistentes luego de perder el solvente (Shanmugharaj y col., 2005). Los adhesivos líquidos en base acuosa presentan ciertas ventajas en comparación con los adhesivos en base disolvente, ya que si bien estos últimos permiten una unión mucho más rápida de los materiales, utilizan como

soporte un disolvente orgánico que puede ser tóxico e inflamable durante su producción industrial, almacenamiento, transporte y aplicación. Sumado a esto, hoy en día hay una preferencia por parte de los consumidores por los adhesivos formulados con agua, en base a materiales poliméricos que no incluyen componentes tóxicos en la fabricación y pueden degradarse naturalmente en el medio ambiente. Algunas proteínas que son solubles en agua, como las proteínas de soja, reúnen estas condiciones y también presentan propiedades adhesivas (Kumar y col., 2002; Nordqvist y col., 2010; Yuan y Kaichang, 2007; Choi y col., 2006).

Las proteínas de soja han sido utilizadas como adhesivos para madera desde hace mucho tiempo ya que además de ser amigables con el medio ambiente y tener bajo costo, curan rápidamente. Sin embargo, su uso no ha sido extendido industrialmente debido a que sus adhesivos presentan baja fuerza de pegamento y pobre resistencia al agua (Liu y Li, 2007; Zhang y Hua, 2007; Liu y col., 2010). Dado que en los capítulos anteriores observamos que el agregado de MMT a matrices proteicas de soja aumentaba significativamente la resistencia al agua y mecánica de las películas nanocompuestas resultantes, se consideró interesante evaluar las propiedades adhesivas de las formulaciones en base a estas proteínas con distintas concentraciones de montmorillonita. Para esto se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar las propiedades adhesivas de las formulaciones en base a proteína de soja y montmorillonita natural.
- Estudiar las propiedades de superficie (hidrofobicidad superficial, Microscopía de Fuerza Atómica) y reológicas de las dispersiones resultantes.
- Evaluar la posible aplicación en función de los resultados obtenidos.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1. Materiales

Se utilizaron los mismos materiales (aislado proteico y montmorillonita natural) descritos en la sección 2.2.1. Como sustrato para el adhesivo se utilizó un cartón de superficie lisa de 4 mm de espesor comprado en el mercado local. Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

7.3.2. Obtención de los adhesivos nanocompuestos

Por un lado se dispersaron diferentes cantidades de MMT natural (0, 0,125, 0,25, 0,375, y 0,5 g) en 20 ml de agua destilada, inicialmente con agitación magnética por 1 hora aproximadamente y luego aplicando un tratamiento con ultrasonido a 80 % de amplitud durante 1 minuto en un equipo de ultrasonido (Misonix, modelo S-4000, USA). Por otro lado, se mezclaron 5 g de SPI en 80ml de agua destilada con las dispersiones antes preparadas de MMT y agua (para el caso de las muestras sin MMT), con un agitador mecánico de paletas (Cole Palmer modelo 50801-00, Canadá) a 500 rpm, 50 °C durante 20 minutos, ajustando su pH a 10,5 con NaOH 2N (Microprocessor pH Meter, modelo HI-221, Hanna Instruments). De esta forma se obtuvieron adhesivos con 0, 2,5, 5, 7,5 y 10 g de MMT cada 100 g de SPI.

7.3.3. Caracterización de los adhesivos proteicos y nanocompuestos

Los adhesivos nanocompuestos fueron caracterizados mediante análisis termogravimétrico, difracción de rayos X y ángulo de contacto (según los procedimientos descritos en la sección 2.2.4) realizados sobre películas formadas esparciendo el adhesivo sobre una placa de vidrio y dejándola secar a temperatura ambiente durante 24 h. Además se realizaron las siguientes determinaciones.

7.3.3.1. Ensayos reológicos

El comportamiento del flujo de los adhesivos SPI/MMT se evaluaron en un reómetro ReoStress 600 (Termo Haake, Karlsruhe, Alemania) con un sensor serrado de platos paralelos con una diferencia de 1 mm entre platos. Las dispersiones de SPI/MMT se mantuvieron a 25 °C por un baño de agua circulante (Circulator DC50 Thermo Haake) conectado a la cubierta que rodea al sistema del sensor durante el testeo. El gradiente de velocidad aumentó de 0 a 500 s⁻¹ en 2 minutos, se mantuvo durante 1 minuto y luego disminuyó desde 500 hasta 0 s⁻¹ en 2 min. El valor de umbral de fluencia (τ_0) y los índices de flujo (n) y consistencia (K) fueron determinados ajustando los resultados experimentales con el modelo reológico de Herschel-Bulkley en la zona de velocidad ascendente según la **Ecuación 7.1**.

$$\tau = \tau_0 + K \cdot D^n$$

Ecuación 7.1

Donde: τ : Esfuerzo de corte (Pa); τ_0 : Valor de umbral de fluencia (Pa); K: índice de consistencia (Pa sⁿ); D: Gradiente de velocidad (s⁻¹); n: Índice de comportamiento de flujo, un número adimensional que indica la cercanía a un flujo Newtoniano. n tiene un valor de 1 para Newtonianos, superior a 1 para dilatante y entre 0 y 1 para fluidos pseudoplásticos.

7.3.3.2. Mediciones de Pelado en T

Para llevar a cabo esta técnica se elaboraron probetas de cartón, con dimensiones de 5 cm de ancho por 18 cm de largo, realizando una cuadrícula de 15 cm de largo y dejando un espacio de 3 cm de largo para poder sujetar la probeta con las mordazas como se representa en la **Figura 7.2**. A cada probeta de cartón se le adicionó 0,5 g de adhesivo desparramados de manera uniforme por toda la superficie cuadrículada, y se unieron en pares. Posteriormente se colocaron bajo una presión de 443,85 Pa, durante 30 min (0,5 h). Finalizados los 30 min se inició la medición de la fuerza adhesiva.



Figura 7.2: Probeta de cartón utilizada para los ensayos de Pelado en T

El ensayo se basó en la norma UNE EN 1392, cuyo procedimiento consiste en tomar ambos extremos de las probetas y sujetarlas firmemente en las mordazas del aparato de ensayo (Analizador Mecánico Universal Tensilón RTH-250 Orientec Corporation), como se observa en la **Figura 7.3**. El análisis se efectuó separando las mordazas entre sí con una velocidad de ensayo de 20 mm/min con un rango de 2%, hasta despegar 3 cm de cartón de la probeta. Y se repitió a distintos tiempos de análisis. Para cada tiempo de ensayo se utilizaron 10 probetas.



Figura 7.3: Ilustración del ensayo de Pelado en T.

7.3.3.3. Determinación del fallo de la unión adhesiva

Teniendo en cuenta que cuando un adhesivo falla, lo puede hacer de tres maneras (**Figura 7.4**): i) falla de adhesión: cuando la separación se produce en la interfase sustrato-adhesivo, ii) falla de cohesión: cuando la ruptura se produce en el adhesivo, quedando adhesivo sobre los dos sustratos, iii) por ruptura del sustrato: cuando el propio sustrato se rompe antes que la unión adhesiva o que la interfase sustrato-adhesivo; se analizó el tipo de fallo producido durante las pruebas de pelado en T para cada formulación observando y cuantificando las grillas dibujadas en las probetas. El tipo de fallo se expresó como porcentaje, y los valores presentados corresponden al promedio de al menos 10 probetas analizadas para cada formulación y cada tiempo.

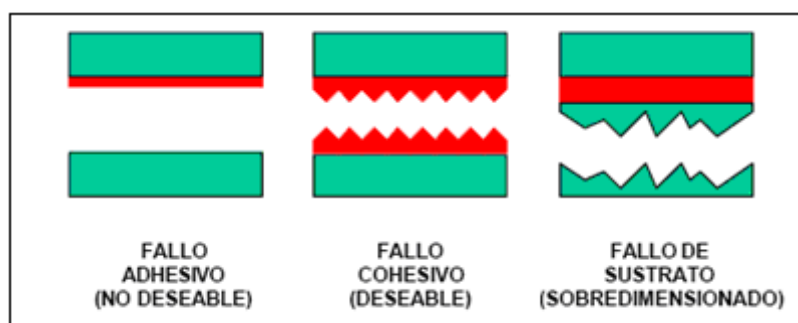


Figura 7.4: Tipos de fallo que ocurren en las uniones adhesivas, en color rojo se muestra el adhesivo y en color verde el sustrato.

7.3.3.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Las mediciones de AFM fueron llevadas a cabo con un microscopio de fuerza atómica MFP-3D™ Stand Alone (Asylum Research) con micro-cantilever fabricados de Si_3N_4 con una frecuencia de resonancia de 270 kHz y una fuerza constante de 29 N/m. Todas las imágenes AFM de las películas SPI/MMT (preparadas como se describió en la sección 7.3.3) fueron tomadas en modo de no-contacto a temperatura ambiente y analizadas mediante el software MFP-3D IGOR Pro del equipo. Las mediciones se realizaron por duplicado.

7.3.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medidas fueron evaluadas por el Test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

7.4. Resultados y discusión

7.4.1. Caracterización reológica de los adhesivos

Un buen adhesivo debe tener la habilidad de humedecer de manera apropiada el sustrato, fluir sobre él y atravesarlo sin volcarse. La viscosidad es una propiedad física importante que gobierna el comportamiento de flujo de los adhesivos, y puede proveer información acerca de las características mencionadas anteriormente. La **Figura 7.5** muestra las curvas de esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad para todas las formulaciones. Los adhesivos nanocompuestos de SPI-MMT presentaron un comportamiento pseudoplástico mientras que las formulaciones proteicas sin agregado de arcilla tuvieron un comportamiento de flujo casi newtoniano. Los resultados experimentales ajustaron muy bien ($r^2 = 0,999$) con el modelo Herschel-Bulkley (**Ecuación 7.1**), cuyos parámetros reológicos (valor umbral de esfuerzo de corte τ_0 , índice de consistencia K , e índice del comportamiento de flujo n) se resumen en la **Tabla 7.1**. Las formulaciones de SPI presentaron un valor n de 0,932 y un τ_0 de 0,0638, demostrando un comportamiento pseudoplástico. Sin embargo, la presencia de MMT llevó a un constante incremento de K y una disminución de n , lo que indicó que al aumentar la concentración de arcilla en las diferentes formulaciones, el comportamiento de flujo pseudoplástico se hizo más pronunciado (**Figura 7.5 a**).

Tabla 7.1: Características reológicas (umbral de esfuerzo de corte $-\tau_0$, índice de consistencia $-K$, índice del comportamiento de circulación $-n$) de las dispersiones de SPI y de SPI con diferentes concentraciones de MMT.

MMT (g/100 g SPI)	τ_0 (Pa)	n	K	r^2
0	$0,0638 \pm 0,0042^a$	$0,9320 \pm 0,0079^e$	$0,0163 \pm 0,0006^a$	0,9999
2,5	$0,2228 \pm 0,0068^b$	$0,8568 \pm 0,0107^d$	$0,0443 \pm 0,0031^b$	0,9999
5	$0,3348 \pm 0,0086^c$	$0,7970 \pm 0,0020^c$	$0,0752 \pm 0,0005^c$	0,9998
7,5	$0,4837 \pm 0,0078^d$	$0,7600 \pm 0,0021^b$	$0,1085 \pm 0,0037^d$	0,9998
10	$0,7104 \pm 0,0087^e$	$0,7169 \pm 0,0056^a$	$0,1535 \pm 0,0076^e$	0,9997

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

La **Figura 7.5 b** muestra un aumento significativo de la viscosidad aparente a bajos gradientes de velocidad (D) al aumentar el contenido de arcilla en la formulación. El incremento en la viscosidad en estas mismas condiciones debido al agregado de arcilla fue reportado por Giannelis (1996), Krishnamoorti y col. (2001), y Manias y col. (1996), para preparaciones de polímeros sintéticos y por Tunc y col. (2007) para dispersiones de gluten y MMT. Estos autores, atribuyeron este comportamiento a cambios en la conformación del polímero durante la aplicación del esfuerzo de corte, a la orientación preferencial de las capas de silicato paralelas a la dirección de flujo, y también a la interacción que puede establecerse entre la MMT y el polímero que forma la matriz (en este caso la proteína). Teniendo en cuenta que la MMT puede interactuar con agua y proteínas, la viscosidad creciente durante la adición de MMT podría ser atribuida al incremento en el radio hidrodinámico de la estructura proteína-MMT.

En todos los casos estudiados, la viscosidad aparente disminuyó con el aumento del gradiente de velocidad (**Figura 7.5 b**), siendo esta disminución más importante para las formulaciones con un mayor contenido de arcilla. Por ejemplo, la viscosidad aparente de la muestra con 10 g MMT/100 g SPI va desde 226 (a $1,9 \text{ s}^{-1}$) hasta 27,5 mPa.s (a 500 s^{-1}), mientras que para la muestra sin arcilla va desde 18,9 hasta 10,92 mPa.s en el mismo rango de gradiente de velocidad. El hecho de que los adhesivos nanocompuestos presenten más

estructura (a niveles muy bajos de gradiente de velocidad) y también puedan fluir fácilmente cuando se les aplica esfuerzo de corte (a altos valores de rpm), es de interés tecnológico, ya que es preferible que los adhesivos puedan extenderse fácilmente sobre las superficies sin chorrear.

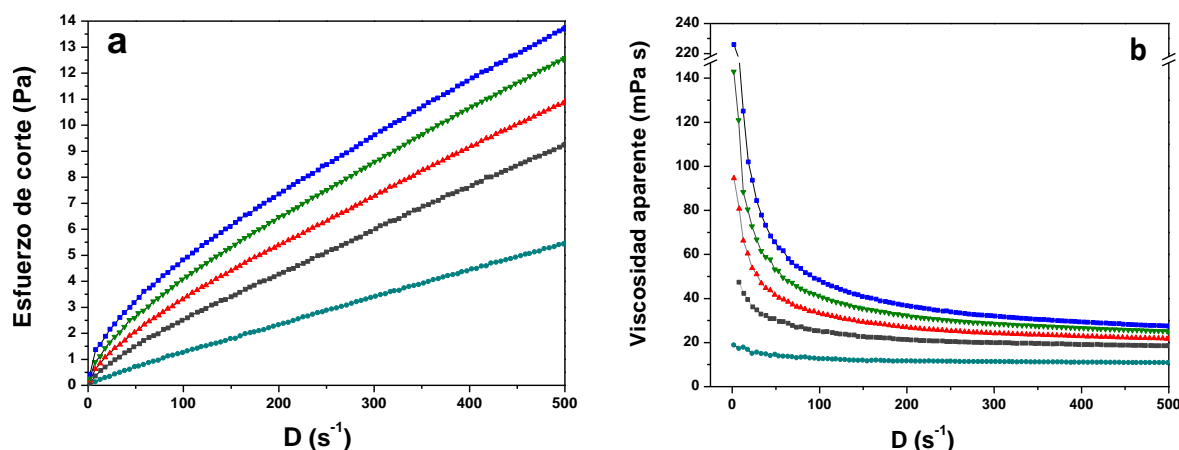


Figura 7.5: Curvas de esfuerzo de corte (a) y viscosidad aparente (b) en función del gradiente de velocidad (D) de dispersiones de SPI con concentraciones crecientes de MMT: 0 (●), 2,5 (■), 5 (▲), 7,5 (▼) y 10 (■) g MMT/100 g SPI.

7.4.2. Hidrofobicidad superficial de los adhesivos

La baja resistencia al agua de los adhesivos de SPI (Liu y Li, 2007; Zhang y Hua, 2007) puede atribuirse principalmente a la naturaleza hidrofílica de sus proteínas. De manera de analizar susceptibilidad al agua de los materiales se midió el ángulo de contacto de películas formadas a partir del secado del adhesivo a temperatura ambiente sobre una superficie de vidrio. La **Figura 7.6 a** muestra cómo los ángulos de contacto crecieron de manera escalonada con el aumento en el contenido de MMT y la **Figura 7.6 b** muestra las gotas de agua formadas sobre las películas de adhesivos. Estos resultados indican un incremento de la hidrofobicidad en la superficie de los adhesivos con el aumento de arcilla, y consecuentemente, un aumento significativo de la resistencia al agua de estas formulaciones.

Si bien en los capítulos anteriores se observó que la hidrofobicidad de las películas disminuía al aumentar el contenido de MMT en la formulación (también estudiado a partir de

mediciones en el ángulo de contacto), cabe señalar que las formulaciones de los adhesivos no contenían plastificante, y que las películas se formaron sobre vidrio, se secaron a temperatura ambiente, y fueron mucho más delgadas que las analizadas anteriormente. Todas estas cuestiones implican la formación de una matriz de SPI-MMT diferente, posiblemente formada por interacciones más intensas entre la arcilla y la proteína (debido a la ausencia del glicerol) y a que la superficie del vidrio tiene una hidrofiliidad mucho mayor que la de los moldes empleados para realizar las películas en los otros capítulos. La intensidad de las interacciones proteína-MMT también serían las causantes del incremento de viscosidad con proporciones crecientes de arcilla.

Teniendo en cuenta que la humectabilidad de los adhesivos en la superficie del sustrato es una precondición para una mejor adherencia (Zhang y Hua, 2007), intentamos estudiar el ángulo de contacto formado al colocar una gota de las formulaciones SPI-MMT sobre un sustrato de cartón. Pero no fue posible obtener medidas repetitivas porque el formato de las gotas varió con el tiempo de residencia de dispersión en la jeringa. Esto podría atribuirse a la naturaleza de la dispersión nanocompuesta. Serán necesarios estudios futuros para encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo estas determinaciones.

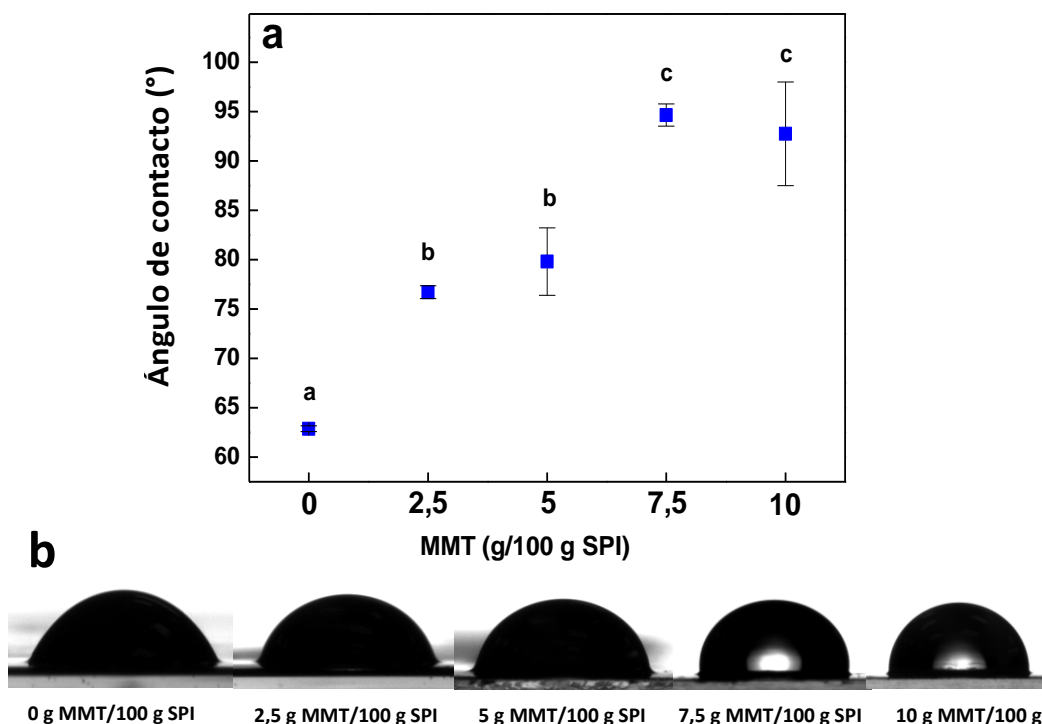


Figura 7.6: Ángulos de contacto (a) al colocar una gota de agua destilada sobre un film hecho de SPI y MMT a 0, 2,5, 5, 7,5 y 10 g MMT/100 g SPI, y sus fotos (b). En el gráfico se informan valores promedio \pm desviación estándar. Letras distintas son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

7.4.3. Fuerza adhesiva de las uniones adhesivo-sustrato y tipo de fallo de sustrato

La **Figura 7.7** muestra la fuerza adhesiva en función del tiempo de curado para todas las formulaciones. Se observó que a intervalos cortos de tiempo (0,5 h) hubo un aumento significativo en la fuerza adhesiva al aumentar el contenido de MMT en la formulación. Mientras que los adhesivos en base a proteína no mostraron diferencias significativas en la fuerza adhesiva en el tiempo luego de la formación de la unión, los nanocompuestos mostraron una disminución significativa entre 0,5 y 4 h, con valores constantes de allí en adelante. Luego en el período más largo de tiempo testeado (72 h), solo las muestras con 5 g MMT/100 g SPI tenían una fuerza de unión significativamente mayor que aquel en el adhesivo proteico.

Muy probablemente, luego de 0,5 h de la formación de la unión, la formulación contenga un mayor contenido de agua que los últimos tiempos analizados, y la presencia de agua parece

aumentar la adhesión de las formulaciones al cartón. Teniendo en cuenta que la adición de la arcilla incrementó la hidrofobicidad superficial del adhesivo seco, esto podría explicar por qué se observa este efecto en presencia de la arcilla y no en su ausencia. Este efecto puede estar relacionado con el aumento de la hidrofobicidad de la superficie de las formulaciones secas con un creciente contenido de arcilla, como se discutió más arriba. En el capítulo 2, observamos que los aislados de proteínas de soja reforzados con 10 g MMT/100 g mostraban una tensión máxima a la rotura y un módulo de Young (medidos en tracción) mucho más altos (137 y 328 %) que aquellos de las proteínas de soja. Se han informado resultados similares por otros autores al agregar arcilla a otras matrices proteicas (Bae y col., 2009; Chen y Zhang, 2006; Hedenqvist y col. 2006; Kumar y col., 2010; Rao, 2007; Tunc y col., 2007). Esto sugiere que el efecto de refuerzo que ejerce la arcilla en la matriz de las proteínas no se refleja en igual magnitud en la fuerza de adhesiva.

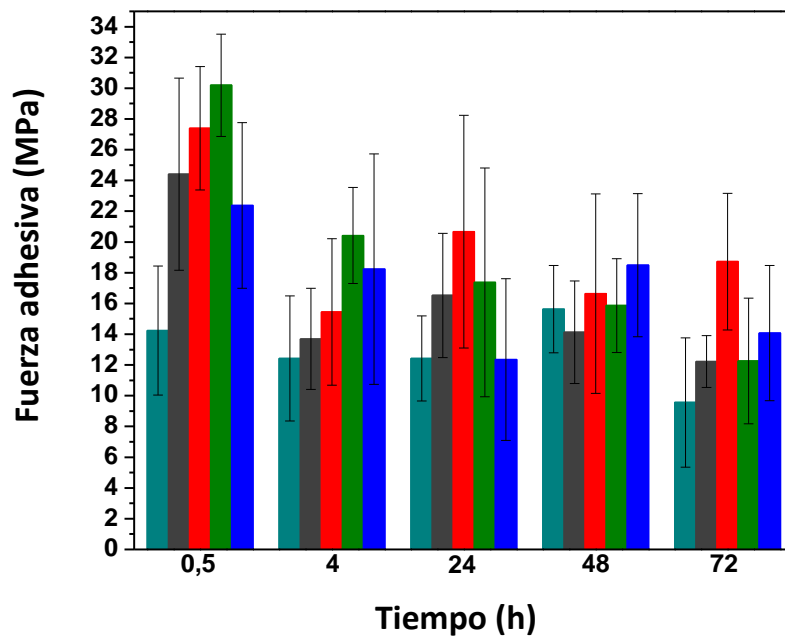


Figura 7.7: Valores de la fuerza de adhesión de las uniones entre la plantilla de cartón y el adhesivo medida por el ensayo de pelado en T para SPI-MMT obtenido con 0 (■), 2,5 (■), 5 (■), 7,5 (■) y 10 (■) g MMT/100g SPI.

Una inspección visual de los sustratos (cartón) luego de el ensayo de Pelado en T permitió distinguir solo dos tipos de fallos: i) fallo cohesiva, generada por la ruptura dentro del adhesivo, que es generalmente deseada y ii) fallo de sustrato, que ocurre cuando el sustrato se rompe antes que la unión adhesiva o la interfase adhesivo-sustrato, lo que significa que la fuerza adhesiva es demasiado fuerte y se dice que el adhesivo está sobredimensionado (**Figura 7.4**). La **Figura 7.8** muestra un ejemplo del sustrato adherido con la formulación con 5 g de MMT/100 g de SPI después de ser ensayado por Pelado en T luego de 0,5 h de la formación de la unión. Ninguna de las fórmulas testeadas presentó falla de adhesión, la cual ocurre cuando la separación se produce en la interfase sustrato-adhesivo (no deseada). Pero el porcentaje de cada tipo de fallo observado varió con la formulación, mostrando una disminución marcada en el porcentaje de fallo cohesivo (**Figura 7.8 b**) y por consecuencia un aumento en el porcentaje de fallo se sustrato (**Figura 7.8 c**) al agregar MMT a la formulación, especialmente a partir de un contenido de 5 g MMT/100 g SPI. Al menos un 80 % de fallo de sustrato se observó para estas formulaciones, lo cual indica la gran cohesión de estos adhesivos nanocompuestos además de la buena adhesión entre estos y el cartón.

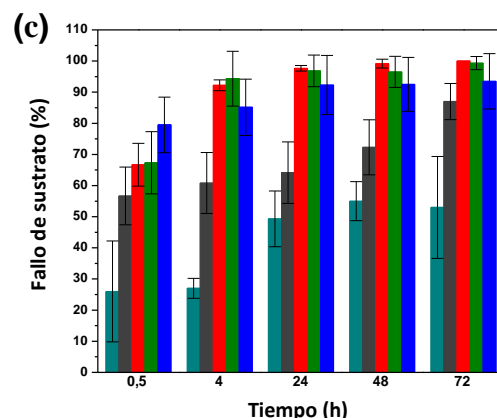
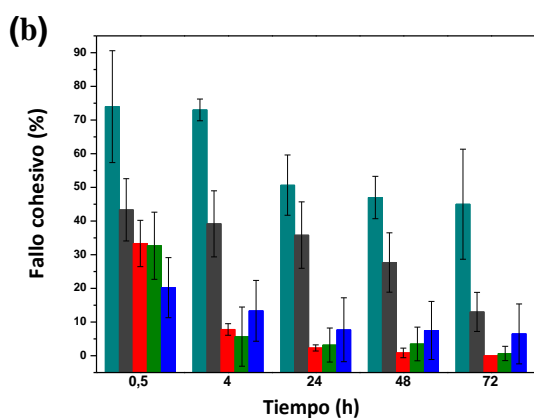
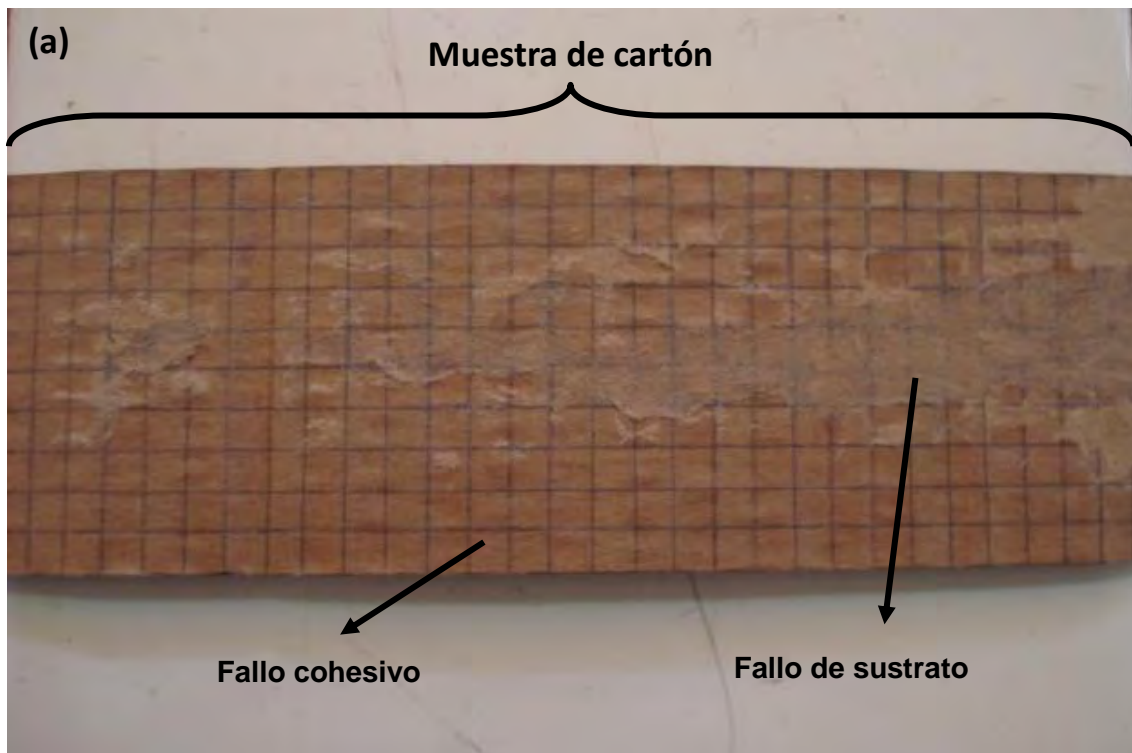


Figura 7.8: (a) Ejemplo ilustrativo de un sustrato de cartón usado para medir la fuerza de Pelado en T y el tipo de fallo de la unión adhesiva. El porcentaje de falla cohesiva (b) y de falla de sustrato (c) de las uniones entre la plantilla de cartón y el adhesivo de SPI-MMT obtenido con 0 (■), 2,5 (■), 5 (■), 7,5 (■) y 10 (■) g MMT/100g SPI.

7.4.4. Morfología de los adhesivos

En general, se cree que el parámetro crítico para lograr el mejor rendimiento de compuestos polímero/arcilla, es la buena dispersión de la misma en la matriz polimérica (si la arcilla no produce defectos) (Ludueña y col., 2007). En este sentido se estudio por AFM la morfología

de los adhesivos obtenidos. Como se muestra en la **Figura 7.9**, las superficies de las películas formadas por los adhesivos al secarse fueron homogéneas, lo que implica una buena dispersión de la arcilla. Se observó además que al aumentar la concentración de MMT aumentó significativamente la rugosidad de la superficie, lo que podría promover la adhesión al sustrato al permitir la formación de un mayor número de interacciones (Martinez, 2000), y por ende mejorar las propiedades adhesivas.

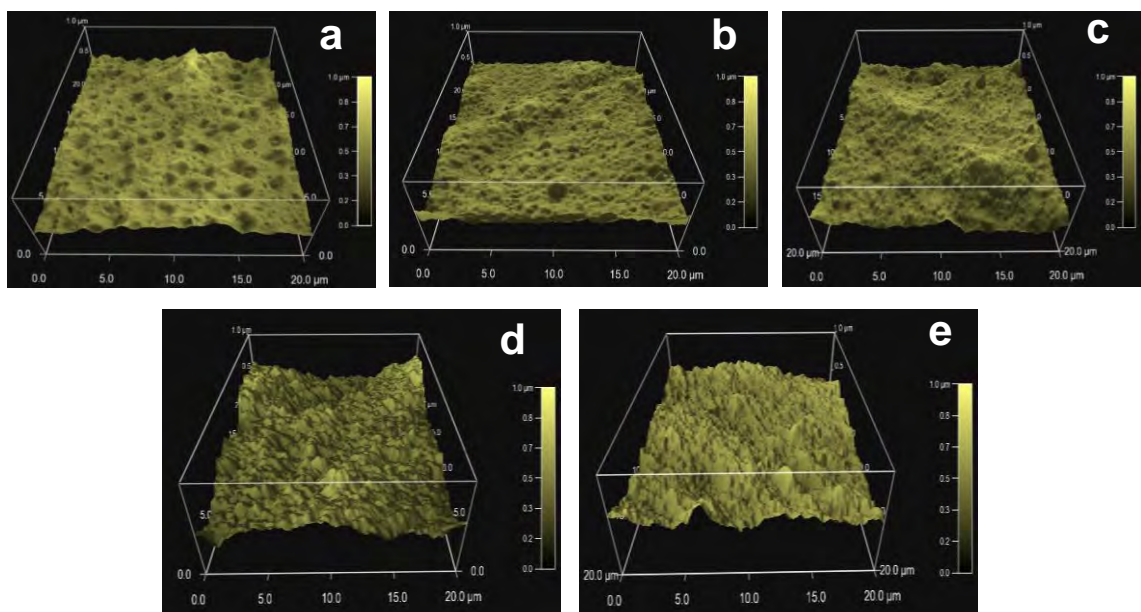


Figura 7.9: Microscopía de fuerza atómica de películas hechas con **a)** SPI, y SPI con **b)** 2,5, **c)** 5, **d)** 7,5 y **e)** 10 g MMT/100g SPI.

También se realizaron análisis de difracción de rayos X de los adhesivos a fin de determinar el tipo de estructura nanocompuesta de las arcillas en la matriz del adhesivo. La **Figura 7.10** muestra los patrones de difracción de rayos X obtenidos para la MMT, para los adhesivos en base a SPI y los nanocompuestos con 5 y 10 g MMT/100 g SPI. Los adhesivos con proteínas de soja no mostraron pico en el rango estudiado mientras que la MMT exhibió un único pico de difracción en $2\theta = 7,21^\circ$, que corresponde a una distancia interlamina de 1,22 nm. En el espectro correspondiente al adhesivo nanocompuesto con 5 g MMT/100 g SPI, el pico

característico de la MMT pura ya no se distingue, mientras que se puede observar un hombro a bajos ángulos cuyo máximo no puede ser observado. Esto puede indicar la presencia de los estados exfoliado e intercalado en este sistema. Algo similar se observó para el adhesivo nanocompuesto con 10 g MMT/100 g SPI, pero en este caso, se observó un pico a $2\theta = 4^\circ$ que corresponde a una distancia interlamina $d_{001} = 2,17$ nm. El mayor grado de exfoliación de la arcilla en la matriz proteica del adhesivo conteniendo 5 g MMT/100 g SPI explica porque esta formulación fue la que presentó la mayor fuerza adhesiva. Aun así, el grado de intercalación/exfoliación alcanzado, distribuido homogéneamente en las matrices proteicas son los responsables de las interesantes propiedades alcanzadas.

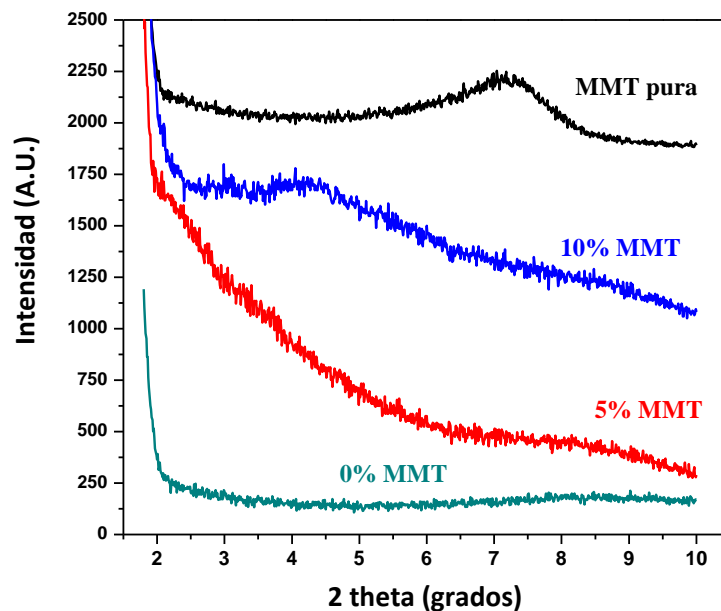


Figura 7.10: Espectros de difracción de rayos X de la MMT pura y de los adhesivos con 0, 5 y 10 g MMT/100g SPI.

7.4.5. Estabilidad térmica

Se analizó el efecto de la adición de MMT sobre la estabilidad térmica de los adhesivos. La **Figura 7.11** muestra los termogramas obtenidos por TGA, en la cual se observan tres pasos de la degradación térmica en el intervalo de temperatura de 50 a 700 °C para todas las muestras analizadas. El rango de temperatura para el primer paso de la degradación térmica es de 80 a 150 °C, que corresponde a la pérdida de agua de las películas. El rango de temperatura para el segundo paso de la degradación térmica es de 250 a 450 °C, y

corresponde a la descomposición de la proteína de soja de las películas, y el intervalo de temperatura para el tercer paso de la degradación térmica es 450 a 575 °C, que puede corresponder a la deshidroxilación de la MMT (Tunc y col., 2007). Resultados similares para las películas nanocompuestas de SPI/MMT han sido informados por Kumar y col. (2009).

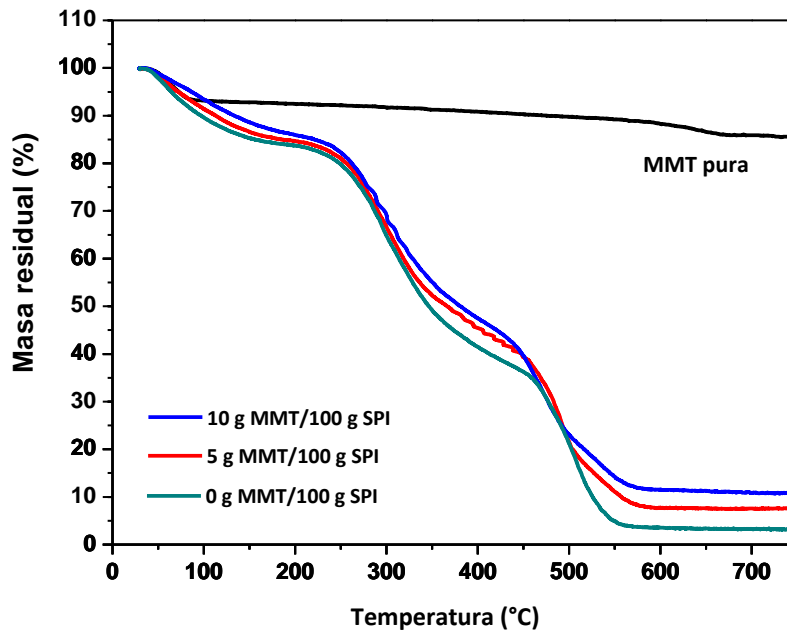


Figura 7.11: Curvas de análisis termogravimétrico de de la MMT pura y de los adhesivos con 0, 5 y 10 g MMT/100g SPI.

El refuerzo de las formulaciones proteicas con MMT no modificó en gran medida el comportamiento térmico analizado. Solo se observa el efecto residual de la arcilla en los termogramas y el efecto de su concentración en las transiciones. Después de la descomposición a 700 °C, las películas dieron un residuo carbonizado proporcional a su contenido de arcilla, mientras que la MMT pura dio una masa residual del 85 %, lo cual coincide con lo informado por Kim y White (2005) para el mismo tipo de arcilla.

7.5. Conclusiones

El agregado de cantidades crecientes de MMT a las formulaciones de adhesivos a base de SPI aumento la viscosidad, y la rugosidad e hidrofobicidad superficial de los adhesivos. Aquellos reforzados con 5 g MMT/100 g SPI mostraron una mayor fuerza adhesiva, que se correlaciona con el mayor grado de exfoliación/intercalación de la MMT en la matriz proteica. La mejor cohesión del adhesivo con el agregado de MMT, evidenciada en el análisis del tipo de fallo de las uniones sustrato/adhesivo, sugiere que estos adhesivos nanocompuestos podrían ser usados para otros tipos de sustratos. Cabe señalar que las mejoras obtenidas en el comportamiento reológico, en la resistencia al agua y en la fuerza adhesiva son importantes para la posible utilización de estas formulaciones como adhesivos amigables con el medio ambiente.



8

Conclusiones Generales



8. Conclusiones Generales

- Se prepararon películas flexibles de matriz proteica de soja reforzadas con concentraciones variables de MMT por *casting*, *spread coating* y termocompresión (técnicas de procesamiento con grado de escalado diferente).
- El efecto refuerzo de la arcilla se manifestó en una mejora de la resistencia al agua (solubilidad y WVP) y de las propiedades mecánicas – las dos propiedades más desfavorables que presentan las películas proteicas-, sin modificar significativamente la apariencia visual de las películas. Este efecto puede atribuirse a la gran afinidad de la MMT natural con la proteína de soja, que facilitó la intercalación/exfoliación de la arcilla de manera homogénea en la matriz proteica y la formación de importantes interacciones entre las láminas de arcilla y la matriz.
- El efecto refuerzo de la MMT fue más significativo para las películas preparadas a través de procesos húmedos (*casting* y *spread coating*) a pH neutros y alcalinos que para las películas obtenidas por un proceso seco (termocompresión). Estas diferencias pudieron atribuirse al mayor grado de intercalación/exfoliación de la arcilla en la matriz proteica, alcanzadas en los procesos que parten de dispersiones.
- Las películas nanocompuestas obtenidas por *spread coating* fueron las que mejores propiedades mecánicas presentaron, como consecuencia de una orientación preferencial de las macromoléculas y/o la arcilla en la dirección de máquina y también por el alto grado de exfoliación de la arcilla en la matriz proteica.
- En estos procesos, el aumento de la concentración de plastificantes favoreció la exfoliación/intercalación de la arcilla, pareciendo ser más efectivo el efecto refuerzo de la arcilla en sistemas plastificados con sorbitol que con glicerol.

- Se prepararon materias primas nanocompuestas en base a proteínas de soja y MMT, donde la arcilla se encontraba dispersa con un buen grado de exfoliación, para facilitar el procesamiento de materiales nanocompuestos.
- Las películas formadas a partir de estas materias primas – por *casting* o termocompresión- presentaron propiedades mecánicas inferiores (menores elongaciones y resistencia a la ruptura) que las obtenidas por mezcla directa de los componentes, debida a una menor homogeneidad de los materiales resultantes.
- Se prepararon películas flexibles de matriz proteica de soja con distinto contenido de arcillas orgánicamente modificadas por mezclado en fundido y posterior termocompresión. No fue posible alcanzar un nivel de exfoliación/intercalación de la arcilla suficiente como para que estas ejercieran un efecto refuerzo de las películas proteicas, posiblemente debido a la menor afinidad de las proteínas de soja con estas arcillas mas hidrofóbicas, ya que coexisten estructuras intercaladas junto con agregados de la arcilla distribuidos en la matriz proteica
- Se logró activar las películas nanocompuestas en base a proteínas de soja – MMT natural con agregado de aceite esencial de clavo obteniendo un material con importantes propiedades antioxidantes y antimicrobianas.
- El agregado de aceite esencial de clavo a las formulaciones proteicas y nanocompuestas, ejerció cierto efecto plastificante y favoreció la exfoliación de la arcilla en las matrices proteicas. Mientras que las arcillas favorecieron la liberación de los principios activos del aceite esencial.
- Las películas proteicas y nanocompuestas activadas con aceite esencial de clavo fueron evaluadas como material de envase para preservar la calidad de filetes de músculo de

atún rojo (*Thunnus thynnus*) durante su almacenamiento refrigerado. Con las mismas fue posible disminuir los valores de NBVT, el recuento final de microorganismos así como la autooxidación lipídica durante todo el período de almacenamiento estudiado.

- Si bien se observó difusión de algunos minerales presentes en la arcilla a dispersiones acuosas, no se observó indicio de tal difusión al músculo de pescado en el período de almacenamiento evaluado. Estos resultados se muestran prometedores para la utilización de las películas nanocompuestas en el envasado de algunos alimentos.
- Es evidente que la presencia de MMT modula la liberación de los principios activos. Esta característica será motivo de estudios futuros.
- En cuanto a los adhesivos en base a SPI-MMT, el agregado de arcilla a las formulaciones logro mejorar el comportamiento reológico, la resistencia al agua y la fuerza adhesiva de los respectivos adhesivos proteicos.

Teniendo en cuenta que todos los materiales desarrollados son amigables con el medio ambiente, este trabajo contribuye a buscar alternativas de sustitución de los materiales sintéticos, en algunas aplicaciones, especialmente en aquellas de vida de corta, como es el envasado de alimentos



9

Referencias Bibliográficas



9. Referencias Bibliográficas

- Alexandre, M.; Dubois, P. (2000). Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Material Science Engineering*, 28, 1-63.
- Al-Hassan, A.A.; Norziah, M.H. (2012). Starch-Gelatin edible films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*. 26, 108-117.
- Almasi, H.; Ghanbarzadeh, B.; Entezami, A.A. (2010). Physicochemical properties of starch–CMC–nanoclay biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 46, 1–5.
- Altshul, H. (1985). Wilcke (Eds.), *New proteins foods 5: Seed storage proteins*, Academic Press, Orlando. P. 27–60.
- Alvarez Hayes, J.; Díaz Ramírez, L.E.; Mauri, A.N.; Añón, M.C. (2005). Obtención de películas biodegradables a partir de proteínas de amaranto. *Proteínas y Coloides de Interés Industrial*. Ed. Univ. de Sevilla, Secretariado de Publicaciones. p. 215-22.
- Andrea Sorrentino, A., Gorrasi, G., y Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*. 18, 84-95.
- Andreuccetti, C.; Carvalho, R.A.; Grosso, C.R.F. (2009). Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International* 42(8), 1113-1121.
- Anker, M. (1996) *Edible and biodegradable films and coatings for food packaging. a literature review.*, Chalmers University of Technology: Göteborg.
- Añón, M.C., Sorgentini, D.A. & Wagner, J.R. (2001). Relationships between Different Hydration Properties of Commercial and Laboratory Soybean Isolates *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49, 10, 4852-4858.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1984). *Official methods of analysis* (12th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC, 1989 (ver en <http://www.cabi.org/GARA/FullTextPDF/2000/20003020540.pdf>)
- AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed. (1995). AOAC International: Gaithersburg, MD.
- Aranda, P. y Ruis-Hitzky, E. (1992). Poly(ethylene oxide)-silicate intercalation materials. *Chemistry of Materials*, 4, 1395-1403.
- Arora, A.; Padua, G.W. (2010). Review: Nanocomposites in Food Packaging. *Journal of Food Science*, 75, R43–R49.
- Arvanitoyannis, I.S. (1999). Totally-And-Partially Biodegradable Polymer Blends Based on Natural and Synthetic Macromolecules: Preparation and Physical Properties and Potential as Food Packaging materials. *J. Macromol. Sci. - Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C39, 205-271.

- Arvanitoyannis, I.S.; Nakayama, A.; Aiba, S.I. (1998). Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate Polymers* 36(2-3): 105-119.
- Ashby, N. P.; Binks, B.P. (2000). Pickering emulsions stabilised by laponite clay particles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2, 5640-5646.
- ASTM D644-94. (1994). Standard Test Methods for Moisture Content of Paper and Paperboard by Oven Drying. In Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, USA. pp. 1–2.
- ASTM E 96-80. (1989). Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual book of ASTM Standards. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, 15: 745-54.
- ASTM. (1991). Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Designation: D882-91. In Annual Book of ASTM Standards; ASTM: Philadelphia, PA, 182-190.
- Atares, L.; De Jesus, C.; Talens, P.; Chiralt, A. (2010). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*. 99, 384–391.
- Aubourg, S. P.; Piñeiro, C.; González, M. J. (2004). Quality loss related to rancidity development during frozen storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of American Oil Chemists' Society*. 81(7), 671–678.
- Audic, J.L.; Chaufer, B. (2005). Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal* 41(8), 1934-1942.
- Avella, M.; Bonadies E.; Martuscelli E.; Rimedio R. (2001). European current standardization for plastic packaging recoverable through composting and biodegradation. *Polymer Testing*. 20, 517–521.
- Avella, M.; De Vlieger, J.J.; Errico, M. E.; Fischer, S.; Vacca, P.; Volpe, M.G. (2005). Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*. 93 (3) 467-474.
- Ayd, T.P.; Weller, C.L.; Testin, R.F. (1991). Mechanical and barrier properties of edible corn and wheat protein films. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*. 34 (1) 207-211.
- Azeredo, H.M.C.; Mattoso, L.H.C.; Avena, R. J.; Filho, G.C.; Munford, M.L.; Wood, D.; McHugh, T.H. (2010). Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*. 75 (1) N1-N7.

- Bae, H.J.; Park, H.J.; Hong, S.I.; Byun, Y.J.; Darby, D.O.; Kimmel, R.M.; Whiteside, W.S. (2009). Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. *LWT - Food Science and Technology*. 42, 1179–1186.
- Bai, H. Y.; Kumar, R.; Yang, C.; Liu, X. Y.; Zhang, L. (2010). Effect of salicylic acid on the mechanical properties and water resistance of soy protein isolate films. *Polymers & Polymer Composites*. 18(4), 197–203.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99(1), 191-203.
- Banker, G. S. (1966). Film coating theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Science*. 55, 81–89.
- Barick, A.K. & Tripathy, D.K. (2011). Effect of organically modified layered silicate nanoclay on the dynamic viscoelastic properties of thermoplastic polyurethane nanocomposites. *Applied Clay Science*. 52, 312–321.
- Beg, M. D. H., Pickering, K. L. & Weal, S. J. (2005). Corn gluten meal as a biodegradable matrix material in wood fibre reinforced composites. *Materials Science and Engineering*. 412, 7-11.
- Bekhit, A.E.D.; Faustman, C. (2005). Metmyoglobin reducing activity. *Meat Science*. 71, 407-439.
- Ben-Gigirey, B.; Baptista De Sousa, J. M. V.; Villa, T.G.; Barros-Velazquez, J. (1999). Chemical Changes and Visual Appearance of Albacore Tuna as Related to Frozen Storage. *Journal of Food Science*. 64, 20-24.
- Bertan, L.C.; Tanada-Palmu, P.S.; Siani, A.C.; Grosso, C.R.F. (2005). Effect of fatty acids and ‘Brazilian elemi’ on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*. 19, 73–82.
- Bifani V., Ramírez C., Ihl M., Rubilar M., García A., & Zaritzky N. (2007). Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose based edible films. *Lebensmittel wissenschaft und technologie*. 40, 1473-1481.
- Bledzki, A. K.; Gassan, J. (1999). Composites Reinforced with Cellulose Based Fibres. *Progress in Polymer Science*. 24, 221-274.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Bourtoom, T. (2008b). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*. 15(3), 237-248.

- Bourtoom, T. (2008a). Factor Affecting the Properties of Edible Film Prepared from Mung Bean Proteins, *International Food Research Journal*. 15(2), 167-180.
- Bourtoom, T. (2008b). Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch-chitosan. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 30, 149-165.
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein film: properties enhancement. *International Food Research Journal*. 16, 1-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Burgentzlé, D.; Duchet, J.; Gerard, J.F.; Jupin, A.; Fillon, B. (2004). Solvent-based nanocomposite coatings: I Dispersion of organophilic montmorillonite in organic solvents. *Journal of Colloid and Interface Science*. 278 (1) 26-39.
- Burt (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int Journal of Food Microbiology*. 94(3), 223-53.
- Cámara Argentina de la Industria Plástica (2010). <http://www.caip.org.ar/>
- Cao N; Yang X; Fu Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*. 23(3), 729–735.
- Cao, N.; Fu, Y. H.; He, J. H. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*. 21, 1153–1162.
- Cardamone, M. & Puri, N. K. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.*, 282, 589–593.
- Carvalho, S., Rebouta, L., Cavaleiro, A., Rocha, L.A., Gomes, J. & Alves, E. (2001). Microstructure and mechanical properties of nanocomposite (Ti, Si, Al) N coatings. *Thin Solid Films*. 398, 391–396.
- Casariego, A., Souza, B.W.S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J.A., Cruz, L., Diaz, R. & Vicente, A.A. (2009). Chitosan/clay films properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles concentrations. *Food Hydrocolloids*. 23 (7) 1895-1902.
- Chaijan M.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Faustman C. (2006). Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*. 99 (1), 83-91.
- Chambi, H.; Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*. 39(4), 458-466.
- Chang, P.R.; Ai, F.; Dufresne, A.; Huang, J. (2009). Effects of starch nanocrystal-graft-polycaprolactone on mechanical properties of waterborne polyurethane-based nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*. 111, 619-627.

- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 10, 621–632.
- Cheftel, J.L., Cuq, J.L, y Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides and proteins (Chapter 5). En Fennema O.R. (ed). Food Chemistry. Marcel Dekker Inc, New York, Estados Unidos.
- Chen, J.S., Poliks MD, Ober CK, Zhang Y, Wiesner U, & Giannelis EP.(2002). Study of the interlayer expansion mechanism and thermal-mechanical properties of surface-initiated epoxy nanocomposites. *Polymer*. 43, 4895–904.
- Chen, P.; Zhang, L. (2006). Interaction and Properties of Highly Exfoliated Soy Protein/Montmorillonite Nanocomposites. *Biomacromolecules*. 7, 1700-1706.
- Chen, P.; Zhang, L.; Peng, S.; Liao, B. (2006). Effects of nanoscale hydroxypropyl lignin on properties of soy protein plastics. *Journal of Applied Polymer Science*. 101, 334.
- Chen, Y.; Zhang, L. N.; Du, L. B. (2003). Structure and properties of composites compression-molded from polyurethane prepolymer and various soy products. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 42(26), 6786–6794.
- Cheng, E.; Sun, X. (2006). Effects of wood-surface roughness, adhesive viscosity and processing pressure on adhesion strength of protein adhesive. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 20, 997-1017.
- Cherian G.; Chinachoti P. (1996). ^2H and ^{17}O NMR study of water mobility in gluten in the glassy and rubbery states. *Cereal Chemistry*. 73(5), 618-624.
- Cherian, G.; Gennadios, A.; Weller, C.; Chinachoti, P. (1995). Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin and sorbitol. *Cereal Chemistry*. 72(1), 1-6.
- Chini, V.; Giovanni Bernardini, A.F.; Terova, G.; Saroglia, M.; Gornati, R. (2008). Genes expressed in Blue Fin Tuna (*Thunnus thynnus*) liver and gonads. *Gene*. 410 (1), 207–213.
- Chiou, B.; Wood, D.; Yee, E.; Imam, S. H.; Glenn, G. M.; Orts, W. J. (2007). Extruded starch–nanoclay nanocomposites: Effects of glycerol and nanoclay concentration. *Polymer Engineering and Science*. 47, 1898–1904.
- Chivrac, F.; Pollet, E.; Dole, P.; Avérous, L. (2010). Starch-based nano-biocomposites: Plasticizer impact on the montmorillonite exfoliation process. *Carbohydrate Polymers*. 79, 941–947.
- Cho J.W.; Paul D.R. (2001). Nylon 6 nanocomposites by melt compounding. *Polymer*. 42(3), 1083-1904.
- Cho, S.Y.; Rhee, C. (2002). Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their Relation to Mechanical Properties. *LWT - Food Science and Technology*. 35, 151-157.

- Cho, S.Y.; Rhee, C. (2002). Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their commercial development. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*. 5, 1574–92.
- Choi, J.; Tamaki, R.; Kim, S.G.; Laine, R.M. (2003). Organic/Inorganic Imide Nanocomposites from Aminophenylsilsequioxanes. *Chemistry of Materials*. 15, 3365–3375.
- Choi, W.Y.; Lee, C.M.; Park, H.J. (2006). Development of biodegradable hot-melt adhesive based on poly- ϵ -caprolactone and soy protein isolate for food packaging system. *LWT- Food Science and Technology*. 39, 591–597.
- Choudalakis, G.; Gotsis, A. D. (2009). Permeability of polymer/clay nanocomposites: A review. *European Polymer Journal*. 45(4), 967-984.
- Chouliara, E.; Karatapanis, I.N.; Savvaidis, M.G.; Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology*. 24,607–617
- Chouliara, I.; Savvaidis, I.N.; Panagiotakis, N.; Kontominas, M.G. (2004). Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Zootecnia Tropical*. 21, 351–359.
- Código Alimentario Argentino (C.A.A.). Capítulo VI, artículo 272. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_VI.pdf
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*. 78(1-2), 90-103.
- Coughlan, J.N.; Shaw, N.B.; Monahan, F.J.; O’Riordan, E.D.; O’Sullivan, M. (2000). Modelling the effect of glicerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*. 43, 1, 25-30.
- Cruz-Romero, M.; Kerry, J.P. (2008). Crop-based biodegradable packaging and its environmental implications. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 3(74), 1-25.
- Cunningham, P.; Ogale, A.A.; Dawson, P.L.; Acton, J.C. (2000). Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *Journal of Food Science*. 65 (4), 668–671.
- Cuq, B.; Gontard, N.; Cuq, J.L.; Guilbert, S. (1996). Functional properties of myofibrillar protein based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*. 61 (3), 580–584.
- Cuq, B.; Gontard, N.; Guilbert, N. (1997). Packaging material based on natural polymers. *Ind. Aliment. Agric*. 114:110-6.

- Cuq, B.; Gontard, N.; Cuq, J.L.; Guilbert, S. (1997). Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 622-626.
- Cuq, B.; Gontard, N.; Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*. 75, 1–9.
- Cyras, V.P., Manfredi, L.B., Ton-That, M.T., & Vazquez, A. (2008). Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrates Polymer*, 73, 55–63.
- Cyras, V.P.; Soledad, C.M.; Analía, V. (2009). Biocomposites based on renewable resource: Acetylated and non acetylated cellulose cardboard coated with polyhydroxybutyrate. *Polymer*. 50 (26) 6274-6280.
- Liu, D.; Chen, H.; Chang, P. R.; Wu, Q.; Li, K.; Guan, L. (2010). Biomimetic soy protein nanocomposites with calcium carbonate crystalline arrays for use as wood adhesive. *Bioresource Technology*. 101, 6235–6241
- Damodaran, S. (2010). Aminoácidos, péptidos y proteínas (Capítulo 5). En Damodaran S., Parkin K.L., y Fennema O.R. (eds). *Química de los Alimentos*. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Damodaran, S.; Paraf, A. (1997). *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker Inc, New York, Estados Unidos.
- Danganan, K.; Tomasula, P.M.; Qi, P. (2009). Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings (Chapter 2). En: *Edible films and coatings for food applications*. Embuscado, M.E, y Huber, K.C. (Eds). Springer Science+Business Media, New York, Estados Unidos.
- Darder, M.; Colilla, M.; Ruiz-Hitzky, E. (2003). Biopolymer–clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chemistry of Materials*, 15 (20), 3774-3780.
- Dawson, P.L.; Hirt, D.E.; Rieck, J.R.; Acton, J.C.; Sotthibandhu, A. (2003). Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method. *Food Research International*. 36(9-10), 959-968.
- Dean, K.; Yu, L. (2005). Biodegradable protein–nanoparticle composite. In: Smith R, editor. *Biodegradable polymers*. Cambridge, UK: Woodhead.
- Dean, K.M.; Yu, L.; Wu, D.Y. (2004). Structure and properties of novel protein based biodegradable nanocomposites. IUPAC world polymer congress, France.
- de Azeredo, H. M. C. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*. 42, 1240–1253.

- Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J. A.; Delporte, B.; Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*. 180, 47–55.
- Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J.A.; Volley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38(4), 299-313.
- Del Valle Márquez Figueroa Y.; Cabello, A.M.; Villalobos, L.B.; Zambuchini, B.; Fiorini, D.; Verdenelli, M.C.; Orpianesi, C.; Ballini, R. (2008). Inhibition of microbiological activity during sole (*Solea solea* L.) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *Food Science and Technology*. 41, 1733–1738.
- Demicheli, M. (1996). *Biodegradable plastics from renewable sources*, in *IPTS Report, Vol 10.*, <http://www.jrc.es>, Editor.
- Denavi, G. A.; Perez-Mateos, M.; Añón, M. C.; Montero, P.; Mauri, A. N.; Gomez-Guillen, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*. 23, 2094–2101.
- Denavi, G. A.; Tapia Blácido, D.R.; Añón, M.C.; Sobral, P.J.A.; Mauri, A.N.; Menegalli, F.C. (2008). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*. 90(3), 341-349.
- Dias, A.B. Müller; C.M.O. Larotonda, F.D.S.; Laurindo, J.B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*. 51(2), 213-219.
- Dias, A.B.; Müller, C.M.O.; Larotonda, F.D.S.; Laurindo, J.B. (2011). Mechanical and barrier properties of composite films based on rice flour and cellulose fibers. *Food Science and Technology*. 44, 535-542.
- Doi, Y.; Fukuda, K. (1994). *Biodegradable plastics and polymers*. Elsevier Ed. Amsterdam, pp. 479-497.
- Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using dpph, abts, frap, sod, and orac assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 1768–1774.
- EFSA Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF). Scientific Opinion on the safety evaluation of the substance, silver zeolite A (silver zinc sodium ammonium alumino silicate), silver content 2 – 5 %, for use in food contact materials. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal* 2011;9(2):1999
- Ensminger, L.E.; Gieseking, J.E. (1939). The absorption of proteins by montmorillonitic clays. *Soil Science*. 48, 467.

- Ensminger, L.E.; Gieseking, J. E. (1941). The absorption of proteins by montmorillonitic clays and its effect on base-exchange capacity. *Soil Science*. 51, 125.
- Escobar, D.; Márquez, R.; Repiso, L.; Sala, A.; Silvera, C. (2009). Elaboración, caracterización y comparación de películas comestibles en base a aislado de proteínas de suero lácteo (WPI). <http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1004942>
- Escobar, D.; Sala, A.; Silvera, C.; Harispe, R.; Márquez, R. (2009). Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. 4, 33-36.
- European Economic Commission. 1995. Determinación de la concentración de bases nitrogenadas volátiles (NBVT) en pescados y productos de la pesca procedimiento de referencia. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, N°L 97, Directive 149: 84-7.
- Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. (2008). Tensile and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*. 85, 393–400.
- Fennema, O.R. (1996). Water and Ice. En: Food Chemistry (Principles of Food Science Series). Edited by Owen R. Fennema. Marcel Dekker, Inc., New York, 1976. Pág 18-95.
- Ferreira, C.O., Nunes, C.A., Delgadillo, I., y Lopes-da-Silva, J.A. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International* 42(7): 807-813.
- Ferry, J.D. (1980). Viscoelastic properties of polymers. 3th edición., John Wiley and Sons, New York, USA, 1980.
- Fishman, M.L., Coffin, D.R., Onwulata, C.I., Konstance, R.P. (2004). Extrusion of pectin and glycerol with various combinations of orange albedo and starch. *Carbohydrate Polymers*. 57, 401–413.
- Flieger, M., et al. (2003). Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica* (Prague, Czech Republic). 48(1), 27-44.
- Flint, F.O. & Johnson, R.F.P. (1981). A study of film formation by soy protein isolates. *Journal of Food Science*. 46, 1351–1353.
- Fornes, T.D.; Yoon, P.J., Keskkula, H. & Paul, D. R. (2001). Nylon 6 nanocomposites: the effect of matrix molecular weight. *Polymer*. 42(25), 9929-40.
- Foulk, J.A.; Bunn, J.M. (2001). Properties of compression-molded, acetylated soy protein films. *Industrial Crops and Products*. 14, 11-22.
- Frankel, E.N. (2005). Lipid oxidation. Edición 2. Editor Oily Press. 470 pags

- Franssen, L.R., Rumsey, T.R., y Krochta, J.M. (2004). Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. *Journal of Food Science*. 69(5): 347-350.
- Galietta, G.; Di Gioia, L.; Guilbert, S.; Cuq, B. (1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*. 81(12), 3123-3130.
- García, M. A.; Martino, M. N.; Zaritzky, N. E. (1999). Edible starch films and coatings characterization: Scanning electron microscopy, water vapor transmission and gas permeabilities. *Scanning*. 21, 348–353.
- García, M. A.; Martino, M. N.; Zaritzky, N.E. (2000). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coating. *Journal of Food Science*. 65, 941–946.
- Garcia, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzki, N.E. (2000). Barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*. 65(6), 941–947.
- García, S. (2009). Referencias históricas y evolución de los plásticos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 10, 71-80.
- Gemili, S.; Yemeniciolu, A.; Altinkaya, S.A. (2010). Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering*. 96(3), 325-332.
- Gennadios, A.; Brandenburg, A.H.; Weller, C.L.; Testin, R.F. (1993). Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41, 1835–1839.
- Gennadios, A. (2002). Protein-based films and coatings. CRC Press. USA.
- Gennadios, A.; Ghorpade, V.M.; Weller, C.L.; Hanna, M.A. (1996). Heat curing of soy protein films. *Transactions of the ASABE*. 39(2), 575-579.
- Gennadios, A.; McHugh, T. H.; Weller, C. L.; Krochta, J. M. (1994). Edible coating and films based on protein. In Krochta, J. M., Balwin, E. A. and Niperos- Carriedo, M. O. (Eds.). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, p. 201-277. Lancaster. Basel: Technomic Publishing.
- Gennadios, A.; Rhim, J.W.; Handa, A.; Weller, C. L.; Hanna, M. A. (1998). Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. *Journal of Food Science*. 63, 225–228.
- Ghanbarzadeh, B.; Oromiehi, A.R. (2009). Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *Journal of Food Engineering*. 90(4), 517-524.
- Ghorpade, V.M.; Li, H.; Gennadios, A.; Hanna, M.A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Trans. ASAE* 38(6), 1805–1808.

- Ghorpade, V. M.; Gennadios, A.; Hanna, M. A.; Weller, C. L. (1995). Soy protein isolate/poly(ethylene oxide) films. *Cereal Chem*, 72, 559–563.
- Giannelis, E.P. (1996). Polymer layered silicate nanocomposites. *Journal of Advanced Materials*. 8, 29–35.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C., Pérez-Mateos, M., Montero, P., Márquez-Ruiz, G. (2011). Evaluation of lipid oxidation in horse mackerel patties covered with borage-containing film during frozen storage. *Food Chemistry*, 124, 1393-1403.
- Giménez, B.; Gomez-Guillen, M.E.; Lopez-Caballero, J.; Gomez-Estaca, J; Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. *Food Hydrocolloids*. 27 (2), 475-486.
- Giménez, B.; Gómez-Estaca, J.; Alemán, A.; Gómez-Guillén, M.C.; Montero, M.P. (2009). Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food Hydrocolloids*. 23(5), 1322-1327.
- Goddard, R. (1990). *Packaging Materials*. Pira, Leatherhead, Surrey.
- Gokoglu, N.; Topuz, O.K.; Yerlikaya, P. (2009). Effects of pomegranate sauce on quality of marinated anchovy during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*. 42 (1), 113-118.
- Gómez Estaca, J.; Giménez, B.; Gómez-Guillén, C.; Montero, P. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin or a comercial fish skin gelatin. *Journal of Food Engineering*. 92, 78-85.
- Gómez-Estaca, J.; Bravo, L.; Gómez-Guillén, M.C.; Alemán, A.; Montero, P. (2009a). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry* 112(1), 18-25.
- Gomez-Estaca, J.; Gimenez, B.; Gómez-Guillén, M.C.; Montero, P. (2010). Influence of frozen storage on aptitude of sardine and dolphinfish for cold-smoking process. *LWT - Food Science and Technology*. 43 (8), 1246-1252.
- Gomez-Estaca, J.; López de Lacey, A.; López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*. 27 (7), 889-896.
- Gomez-Guillén M.C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*. 21, 1133–1143.

- Gontard N.; Guilbert, S.; Cuq, J.L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*. 58: 206–211.
- Gontard, N. ; Ring, S. (1996). Edible wheat gluten film: Influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 3474-3478.
- Gontard, N.; Guilbert, S. ; Cuq, J. L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*. 57, 190-195.
- González-Gutiérrez, J., Partal, P., García-Morales, M. & Gallegos, C. (2010). Development of highly-transparent protein/starch-based bioplastics. *Bioresource Technology*. 101 (6), 2007-2013.
- Güçbilmez, C.M., Yemenicioğlu, A., y Arslanoğlu, A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*. 40(1), 80-91.
- Gueguen, J.; Viroben, G.; Noireaux, P.; Subirade, M. (1998). Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products*. 7(2-3), 149-157.
- Guerrero, P.; de la Caba, K. (2010). Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. *Journal of Food Engineering*. 100 (2), 261–269.
- Guerrero, P.; Stefani, P.M.; Ruseckaite, R.A; De la Caba, K. (2011). Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering*. 105, 65–72
- Guevara, G.; Figuera García, B.E.; Vallenilla González, O.M. (2006). Cambios físicos-químicos y microbiológicos observados durante el proceso tecnológico de la conserva de atún. *Zootecnia Tropical*. 24(1), 17-29.
- Guilbert, S. (1986). Ed. *Technology and Application of Edible Protective Films*; Elsevier Applied Science Publishers Ltd.: New York.
- Guilbert, S.; Cuq, B.; Gontard, N. (1997). Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*. 14(6), 741-751.
- Guilbert, S.; Cuq, B. (2005). Material formed from proteins. En: *Handbook of biodegradable polymers*. Ed. Bastioli, C. Rapra Technology Limited, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, Inglaterra: Smithers, pp. 339-384.
- Guilherme, M.R.; Mattoso, L.H.Z.; Gontard, N.; Guilbert, S.; Gastaldi, E. (2010). Synthesis of nanocomposite films from wheat gluten matrix and MMT intercalated with different quaternary ammonium salts by way of hydroalcoholic solvent casting. *Composites: Part A*. 41, 375-382.

- Gutierrez J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*. 26 (2), 142-150.
- Gutierrez, J.; Bourke, P.; Lonchamp, J.; Barry-Ryan, C. (2009). Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10 (2), 195-202.
- Han, J. H., & Krochta, J. M. (2007). Physical properties of whey protein coating solutions and films containing antioxidants. *Journal of Food Science*, 72, 308-314.
- Han, J. H.; Gennadios, A. (2005). Edible films and coatings: a review. En: J.H. Han, Editor, *Innovations in Food Packaging*, Elsevier Academic Press, San Diego, CA (2005), pp. 239–262.
- Hedenqvist, M.S., Backman, A., Gallstedt, M., Boyd, R.H. & Gedde, U.W. (2006). Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. *Composites Science Technology*. 66, 2350–2359.
- Henriette M.C. de Azeredo (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*. 42, 1240–1253.
- Hernández Silva, M. L.; Boris Guzmán Martínez. (2009). Biopolymers used in the manufacture of food packaging. *Revista Publicaciones e Investigación, Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*. 3, 103-122.
- Hernandez-Izquierdo, V. M. & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation – a review. *Journal of Food Science*. 73(2), 30-39.
- Herrera, E. (2002). Implications of Dietary Fatty Acids During Pregnancy on Placental, Fetal and Postnatal Development. - A Review. *Placenta*. 23 (A), S9-S19.
- Hettiarachchy, N. S.; Eswaranandam, S. (2005). Edible Films and Coatings from Soybean and Other Protein Sources. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set*. Edited by Fereidoon Shahidi. John Wiley & Sons, Inc.
- Holley, R.A.; Patel, D. (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22,273–292.
- Hong, S.I.; Choi, W.Y.; Cho, S.Y.; Jung, S.H.; Shin, B.Y.; Park, H.J. (2009). Mechanical properties and biodegradability of poly-ε-caprolactone/soy protein isolate blends compatibilized by coconut oil. *Polymer Degradation and Stability*. 94(10), 1876-1881.
- Hong, S-I; Rhim, J-W. (2008). Antimicrobial Activity of Organically Modified Nano-Clays. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 8 (11), 5818-5824.

- Hong, S.-I., y Krochta, J.M. (2006). Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*. 77(3), 739-745.
- Hsieh, T.H.; Ho, K.S. (1999). Effects of thermal stability on the crystallization behavior of poly(vinylidene chloride). *Journal of Polymer Science*. 37, 3269-3276.
- Huang, J. (1995). Polymer Waste Management - biodegradation, incineration and recycling, in Selected Papers Presented at the International Workshop on Controlled Life Cycle of Polymeric Materials, Stockholm, 1994. *Journal Macromolecular Science - Pure Applied Chemistry*. 32(4), 593-597.
- Huang, J.; Zhang, L.; Chen, P. (2003). Effects of lignin as a filler on properties of soy protein plastics. I. Lignosulfonate. *Journal of Applied Polymer Science*. 88, 3291–3297.
- Huang, M.F.; Yu, J.G.; Ma, X.F. (2004). Studies on the properties of montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites. *Polymer*. 45, 7017–7023.
- Huang, S.J., Polymer Waste Management - biodegradation, incineration and recycling, in Selected Papers Presented at the International Workshop on Controlled Life Cycle of Polymeric Materials, Stockholm, 1994. *Journal Macromolecular Science - Pure Applied Chemistry*, 1995. 32(4): p. 593-597.
- ICMSF (1986). *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 1986. 2nd Ed. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
- Irissin-Mangata, J.; Bauduin, G.; Boutevin, B.; Gontard, N. (2001). New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal* 37(8), 1533-1541.
- Jangchud A. & Chinnan M.S. (1999). Peanut protein film as affected by drying temperature and pH of film forming solution. *Journal of Food Science*. 64: 153–157.
- Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research Technology*. 222, 229–235.
- Kamal, D.; Preeti, B.; Tapasya, S.; Subrata, S.; Parthaprasad, C. (20029). p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34 (2), 148-157.
- Karbowski, T., Debeaufort, F., Champion, D., & Voilley, A. (2006). Wetting properties at the surface of iota-carrageenan-based edible films. *Journal of Colloid and Interface Science*. 294, 400-410.

- Karlsson, S.; Albertsson, A.C. (1998). Biodegradable Polymers and Environmental Interaction. *Polymer Engineering and Science*. 38 (8), 1251-1253.
- Ke, Y. C. & Stroeve, P. (2005). *Polymer-layered silicate and silica nanocomposites*, 1st Edition. Elsevier Science, Amsterdam, Holanda.
- Keshavarz, T.; Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13, 321–326.
- Kim, K. M.; Hwang, K. T.; Weller, C. L.; Hanna, M. A. (2002). Preparation and Characterization of Soy Protein Isolate Films Modified with Sorghum Wax. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 79, 615–619.
- Kim, Y.; White, J.L. (2005). Formation of polymer nanocomposites with various organoclays. *Journal of Applied Polymer Science*. 96, 1888–1896.
- Kinsella, J.E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 56, 242–258.
- Klimets, T. G.; Grinyuk, E. V.; Nareiko, E. I.; Skakovskii, E. D.; Yu Tychinskaya, L.; Krul, L. P. (2004). Aqueous Adhesives Based on Dextrin-Containing Polyacrylate Composites. *Russian journal of Applied Chemistry*. 77 (5), 817-819.
- Koehler, P.; Kieffer, R.; Wieser, H. (2010). Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten III. Studies on gluten films. *Journal of Cereal Science*. 51 (1), 140-145.
- Kojima, Y., Usuki, A., Kawasumi, M., Okada, A., Karauchi, T. & Kamigaito, O. (1993a). Synthesis of nylon 6-clay hybrid by montmorillonite intercalated with ϵ -caprolactam. *Journal of Polymer Science Part A*. 31, 983-986.
- Kojima, Y.; Usuki, A.; Kawasumi, M.; Okada, A.; Karauchi, T.; Kamigaito, O. (1993). One pot synthesis of nylon 6-clay hybrid. *Journal of Polymer Science Part A*. 31, 1755-1758.
- Kolakowska, A. (2002). Lipid oxidation in food systems. In Z. Sikorski & A. Kolakowska (Eds.), *Chemical and functional properties of food lipids* (pp. 133-165). London, UK: CRC Press.
- Koller, M.; Salerno, A.; Dias, M.; Reiterer, A.; Braunegg, G. (2010). Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Biotechnology*. 48, 255–269.
- Kong, F., Tang, J.; Rasco, B.; Crapo, C. (2007). Kinetics of salmon quality changes during thermal processing. *Journal of Food Engineering*. 83 (4), 510-520.
- Kosior, E.; Braganca, R.M.; Fowler, P. (2006). Lightweight compostable packaging: literature review. Wrap, Banbury, Inglaterra (www.wrap.org.uk).
- Kowalczyk, D. & Baraniak, B. (2011). Effects of plasticizer, pH, and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*. 105, 295-305.

- Kozempel, M.; Tomasula, P.M. (2004). Development of a continuous process to make casein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1190-1195.
- Krishnamachari, P.; Zhang, J.; Lou, A.; Yan, J.; Uitenham, L. (2009). Biodegradable poly(lactic acid)/clay nanocomposites by melt intercalation: a study of morphological, thermal, and mechanical properties. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 14 (4), 336-350.
- Krishnamoorti, R., Ren, J. & Silva, A.S. (2001). Shear response of layered silicate nanocomposites. *Journal of Chemical Physics*. 114, 4968–4973.
- Krishnamoorti, R., Silvia, A.S. & Mitchell, C.A. (2001). Effect of silicate layer anisotropy on cylindrical and spherical microdomain ordering in block copolymer nanocomposites. *Journal of Chemical Physics*. 115, 7175-7181.
- Krochta, J. M. (1997). Edible protein films and coatings. En: Damodaran, S. and Paraf, A. (ed), *Food proteins and their applications*. New York, Marcel Dekker, Inc, pp. 529-549.
- Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*. 85, 633-640.
- Kumar, L.; Popat, D.; Bansal, A. K. (2011). Investigation of the atypical glass transition and recrystallization behavior of amorphous prazosin salts. *Pharmaceutics*. 3, 525-537.
- Kumar, P.; Sandeep, K. P.; Alavi, S.; Truong, V. D.; Gorga, R. E. (2010). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusión. *Journal of Food Engineering*. 100, 480–489.
- Kumar, P.; Sandeep, K. P.; Alavi, S.; Truong, V. D.; Gorga, R. E. (2010). Effect of Type and Content of Modified Montmorillonite on the Structure and Properties of Bio-Nanocomposite Films Based on Soy Protein Isolate and Montmorillonite. *Journal of Food Science*. 35, 46–56.
- Kumar, R.; Choudhary, V.; Mishra, S.; Varma, I.K.; Mattiason, Bo. (2002). Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*. 16, 155–172.
- Kumar, R.; Zhang, L. (2009). Aligned ramie fiber reinforced arylated soy protein composites with improved properties. *Composites Science and Technology*. 69, 555–560.
- Kuorwel, K.; Cran, M.J.; Sonneveld, K.; Miltz, J.; Bigger, S.W. (2011). Antimicrobial Activity of Biodegradable Polysaccharide and Protein-Based Films Containing Active Agents. *Journal of Food Science*. 76 (3), R90–R102.
- Kurokawa, Y.; Yasuda, H.; Oya, A. (1996). Preparation of a nanocomposite of polypropylene and smectite. *Journal of Materials Science Letters*. 15 (17), 1481-1483.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 681-685.

- Lagaly, G. (1986). Interaction of alkylamines with different types of layered compounds. *Solid State Ionics*. 22, 43–51.
- Larotonda, F. D. S. (2007). Biodegradable films and coatings obtained from carrageenan from *Mastocarpus stellatus* and starch from *Quercus suber*. Tesis. Faculty of Engineering of the University of Porto, Portugal.
- Larotonda, F.D.S.; Matsui, K.N.; Sobral, P.J.A.; Laurindo, J.B. (2005). Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. *Journal of Food Engineering*. 71, 394-402.
- Lavorgna, M.; Piscitelli, F.; Mangiacapra, P.; Buonocore, G. G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*. 82 (2), 291–298.
- LeBaron, P. C.; Wang, Z.; Pinnavaia, T. J. (1999). Polymer-layered silicate nanocomposites: an overview. *Applied Clay Science*. 15, 11-29.
- Lee, J.E.; Kim, K. M. (2010). Characteristics of soy protein isolate-montmorillonite composite films. *Journal of Applied Polymer Science*. 118 (4), 2257–2263.
- Leerahawong, A.; Arii, R.; Tanaka, M.; Osako, K. (2011). Edible film from squid (*Todarodes pacificus*) mantle muscle. *Food Chemistry*. 124 (1), 177-182.
- Leszczynska, A., Pielichowski, K., 2008. Application of thermal analysis methods for characterization of polymer/montmorillonite nanocomposites. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 93 (3), 677–687.
- Li, Y. D.; Zeng, J. B.; Wang, X. L.; Yang, K. K.; Wang, Y. Z. (2008). Structure and properties of soy protein/poly(butylene succinate) blends with improved compatibility. *Biomacromolecules*. 9, 3157–3164.
- Limpan, N.; Prodpran, T.; Benjakul, S.; Prasarpran, S. (2010). Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. *Journal of Food Engineering*. 100 (1), 85-92.
- Lin, Y.; Zhang, K.; Dong, Z. M.; Dong, L. S.; Li, Y. S. (2007). Study of hydrogen-bonded blend of polylactide with biodegradable hyperbranched poly(ester amide). *Macromolecules*. 40, 6257–6267.
- Liu, W.; Misra, M.; Askeland, P.; Drzal, L. T.; Mohanty, A. K. (2005). Green composites from soy based plastic and pineapple leaf fiber: fabrication and properties evaluation. *Polymer*. 46, 2710-2721.

- Liu, D.; Chen, H.; Chang, P.R.; Wu, Q.; Li, K.; Guan, L. (2010). Biomimetic soy protein nanocomposites with calcium carbonate crystalline arrays for use as wood adhesive. *Bioresource Technology*. 101, 6235–6241.
- Liu, W.; Mohanty, A. K.; Askeland, P.; Drzal, L. T.; Misra, M. (2004). Influence of fiber surface treatment on properties of Indian grass fiber reinforced soy protein based biocomposites. *Polymer*. 45, 7589-7596
- Liu, Y.; Li, K. (2007). Development and characterization of adhesives from soy protein for bonding wood. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 27, 59–67.
- López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Pérez-Mateos, M.; Montero, P. (2005). A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*. 19 (2), 303-311.
- Lu, Y. S.; Weng, L. H.; Zhang, L. N. (2004). Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules*. 5, 1046–1051.
- Lu, Z. X.; Laroche, A.; Huang, H. C. (2005). Isolation and characterization of chitinases from *V. lecanii*. *Canadian Journal of Microbiol.* 51, 1045-1055.
- Ludueña, L.N.; Alvarez, V.A.; Vazquez, A. (2007). Processing and microstructure of PCL/clay nanocomposites. *Materials Science and Engineering*. 460–461, 121–129.
- Luecha, J.; Sozer, N.; Kokini, J. L. (2010). Synthesis and properties of corn zein/montmorillonite nanocomposite films. *Journal of Materials Science*. 45, 3529–3537.
- Majdzadeh-ardakani, K.; Navarchian, A. H.; Sadeghi, F. (2010). Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 79, 547–554.
- Mali, S.; Grossmann, M.V.E.; García, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. (2005). Mechanical and thermal properties of yam starch films. *Food Hydrocolloids*. 19, 157-164.
- Mallapragada, S.K.; Narasimhan, B. (2006). Handbook of biodegradable polymeric materials and applications, vol 1. *American Scientific Publishers*. 1–6, 154–197.
- Mangiacapra, P.; Gorrasi, G.; Sorrentino, A.; Vittoria, V. (2006). Biodegradable nanocomposites obtained by ball milling of pectin and montmorillonites. *Carbohydrate Polymers*. 64 (4), 516-523.
- Manias, E.; Hadziioannou, G.; Brinke, G. T. (1996). Inhomogeneities in sheared ultrathin lubricating films. *Langmuir*. 12, 4587–4593.
- Manias, E.; Touny, A.; Wu, L.; Strawhecker, K.; Lu, B.; Chunget, T. C. (2001). Polypropylene/Montmorillonite Nanocomposites. Review of the Synthetic Routes and Materials Properties. *Chemistry of Materials*. 13, 3516-3523.

- Manzano, M.A.M.; Pacheco-Aguilar, R.; Díaz-Rojas, E.I.; Lugo-Sánchez, M.E. (2000). Postmortem Changes in Black Skipjack Muscle During Storage in Ice. *Journal of Food Science*. 65, 774-779.
- Maria, T.M.C.; de Carvalho, R.A.; Sobral, P.J.A.; Habitante, A.M.B.Q.; Solorza-Feria, J. (2008). The effect of the degree of hydrolysis of the PVA and the plasticizer concentration on the color, opacity, and thermal and mechanical properties of films based on PVA and gelatin blends. *Journal of Food Engineering*. 87(2), 191-199.
- Marsh, K.; Bugusu, B. (2007). Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*. 72, R39-R55.
- Martelli, S. M.; Moore, G.; Silva Paes, S.; Gandolfo, C.; Laurindo, J. B. (2006). Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. *Food Science and Technology*. 39 (3), 292-301.
- Martínez, J. M. M. (2000). Conceptos Básicos de Adhesión y de Uniones Adhesivas, Publicaciones de la Universidad de Alicante, Alicante.
- Mascheroni, E.; Chalier, P.; Gontard, N.; Gastaldi, E. (2010). Designing of a wheat gluten/montmorillonite based system as carvacrol carrier: Rheological and structural properties. *Food Hydrocolloids*. 24, 406–413.
- Matayabas, J.C.; Turner, S.R. Polymer-Clay Nanocomposites, Eds. T.J. Pinnavaia and G.W. Beall, John Wiley & Sons: New York, 2001, pp. 207–226].
- Mauri, A. N.; Añón, M. C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86, 1064-1072.
- Mauri, A. N.; Añón, M. C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH modified microstructures. *Food Science and Technology International*. 14(2), 119-125.
- Mauri, A.N.; Añón, M.C. (2011). “Proteínas como envases alimentarios”. En “Películas y Recubrimientos Comestibles: Propiedades y aplicaciones en alimentos”, editado por Olivas, G.I., Soliva-Fortuní, R., Martín-Belloso, O. y González-Aguilar, G.. Editorial Trillas, Mexico. En Prensa.
- McHugh, H.T.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, J.M. (1993). Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58, 899–903.
- Melissa Gurgel Adeodato Vieira; Mariana Altenhofen da Silva; Lucielen Oliveira dos Santos; Marisa Masumi Beppu (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*. 47, 254–263.

- Micard, V.; Morel, M.H.; Bonicel, J.; Guilbert, S. (2001). Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation. *Polymer*. 42, 477-485.
- Micard, V.; Belamri, R.; Morel, M. H.; Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (7), 2948-2953.
- Miller, K.S.; Chiang, M.T.; Krochta, J.M. (1997). Heat curing of whey protein films. *Journal of Food Science*. 62(6), 1189-1193.
- Mohanty, A. K.; Misra, M.; Hinrichsen, G. (2000). Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromolecular Materials and Engineering*. 276/277, 1–24.
- Monedero, F.M.; Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. (2009). Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*. 91, 509–515.
- Monedero, F.M.; Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. (2010). Effect of calcium and sodium caseinates on physical characteristics of soy protein isolate–lipid films. *Journal of Food Engineering*. 97, 228–234.
- Montenegro, G. (2002). *Ugni molinae* Turcz. In G. Montenegro, & B. N.Timmermann (Eds.), *Chile nuestra flora útil. Guía de uso apícola, medicinal folclórica, artesanal y ornamental* (2nd ed., pp. 241–242). Santiago: Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Monterrey-Quintero, E. S.; Sobral, P. J. A. (1999). Caracterizacao de propriedades mecanicas e oticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilapia do nilo usando uma metodologia de superficie resposta. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 19(2), 294 –301.
- Moore, G.R.P.; Martelli, S.M.; Gandolfo, C.; do Amaral Sobral, P.J.; Laurindo, J.B. (2006). Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. *Food Hydrocolloids*. 20, 975-982.
- Moreno, R. (1992). The role of slip additives in tape casting technology, part II - binders and plasticizers. *Journal of the American Ceramic Society*. 71, 1647–57.
- Müller, C.M.O.; Yamashita, F.; Laurindo, J.B. (2008). Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*. 72 (1), 82-87.
- Mytle, N.; Anderson, G.L.; Doyle, M.P.; Smith, M.A. (2006). Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control*. 17 (2), 102-107.
- Nampoothiri, K.M.; Nair, N.R.; John, R.P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 101, 8493–8501.

- Nayak, P.; Sahoo, S. K.; Behera, A.; Nanda, P. K.; Nayak, P. L.; Guru, B. C. (2011). Synthesis and characterization of soy protein isolate/MMT nanocomposite film for the control release of the drug ofloxacin. *World Journal of Nano Science and Engineering*. 1, 27-36.
- Netravali, A. N.; Huang, X.; Mizuta, K. (2007). Advanced Green Composites. *Advanced Composite Materials*. 16, 269–282.
- Nielsen, N. (1985a). Structure of soy proteins. En A. Altshul, H. Wilcke (Eds.), *New proteins foods 5: Seed storage proteins*. Academic Press, Orlando, 27–60.
- Nielsen, N.C. (1985b). The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 62 (12), 1680-1686.
- Norajit, K.; Kim, K.M.; Ryu, G.H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*. 98 (3), 377-384.
- Nordqvist, P.; Khabbaz, F.; Malmström, E. (2010). Comparing bond strength and water resistance of alkali-modified soy protein isolate and wheat gluten adhesives. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 30, 72–79.
- Ogawa, M.; Kuroda, K. (1997). Preparation of inorganic-organic nanocomposites through intercalation of organoammonium ions into layered silicates. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 70, 2593-618.
- Ojagh, S.M.; Núñez-Flores, R.; López-Caballero, M.E; Montero, M.P.; GómezGuillén, M.C. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. *Food Chemistry*. 125, 595-606.
- Olabarrieta, I. (2005). Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films. Tesis Doctoral. KTH Fibre and Polymer Technology. Estocolmo, Suecia.
- Orliac, O.; Silvestre, F. (2003). New thermo-molded biodegradable films based on sunflower protein isolate: aging and physical properties. *Macromolecular Symposia*. 197 (1), 193-206.
- Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L. (2002). Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*. 43, 5417-5425.
- Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L. (2003). Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*. 18, 91-100.
- Ormancey, X.; Sisalli, S.; Coutiere, P. (2001). Formulation of essential oils in functional perfumery. *Parfums, Cosmétiques, Actualités*, 157, 30-40.

- O'Sullivan, D.W.; Neale, P.J.; Coffin, R.B.; Boyd, T.J.; Osburn, C.L. (2005). Photochemical production of hydrogen peroxide and methylhydroperoxide in coastal waters. *Marine Chemistry*. 97(1–2), 14-33.
- Ou, S.; Wang, Y.; Tang, S.; Huang, C.; Jackson, M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*. 70, 2, 205-210.
- Oussalah, M.; Caillet, S.; Salmiéri, S.; Saucier, L.; Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (18), 5598-5605.
- Uttara, B.; Simard, R.E.; Holley, R.A.; Piette, G.J.P.; Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 37, 155-162.
- Ozdemir, M.; Floros, J.D. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *Journal of Food Engineering*. 86 (2), 215-224.
- Paetau, I.; Chen, C. Z.; Jane, J. (1994). Biodegradable plastic made from soybean products. II. Effects of cross-linking and cellulose incorporation on mechanical properties and water absorption. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 2(3), 211–217.
- Pandey, J.K., Reddy, K.R., Kumar, A.P. & Singh, R.P. (2005) An overview on the degradability of polymer nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*. 88(2):234-250
- Papadokostaki, K.G.; Petropoulos, J.H. (1998). Kinetics of release of a model disperse dye from supersaturated cellulose acetate matrices. *Journal of Controlled Release*. 54 (3), 251-264.
- Park, H. J.; Bunn Curtis, J. M.; Weller, L.; Vergano, P. J.; Testin, R. F. (1994). Water vapor permeability and mechanical properties of grain protein-based films as effected by mixtures of polyethylene glycol and glycerin plasticizers. *Transactions of the ASAE*. 37 (4), 1281-1285.
- Park, H.; Lee, W.; Park, C.; Cho, W.; Ha, C. (2003). Environmentally friendly polymer hybrids. Part I. Mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Journal of Materials Science*. 38 (5), 909-915.
- Park, H.; Li, X.; Jin, C.; Park, C.; Cho, W.; Ha, C. (2002). Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids. *Macromolecular Materials and Engineering*. 287, 553–558.
- Park, J. K.; Choy, Y. B.; Oh, J.M.; Kim, J.Y.; Hwang, S.J.; Choy, J.H. (2008). Controlled release of donepezil intercalated in smectite clays. *International Journal of Pharmaceutics*. 359(1–2), 198–204.

- Park, J. W.; Scott Whiteside, W.; Cho, S. Y. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatine films. *LWT - Food Science and Technology*. 41 (4), 692–700.
- Pereda, M.; Aranguren, M.I.; Marcovich, N.E. (2010). Caseinate films modified with tung oil. *Food Hydrocolloids*. 24 (8), 800-808.
- Pereira de Abreu, D.A.; Paseiro Losada, P.; Maroto, J.; Cruz, J.M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*. 43 (5), 1277-1282.
- Peterson, K.; Nielsen, P.V.; Bertelsen, G.; Lawther, M.; Olsen, M.B.; Nilsson, N.H.; Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 10, 52–68.
- Pintado, C.M.B.S.; Ferreira, M.A.S.S.; Sousa, I. (2009). Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*. 72 (9), 1891-1896.
- Plasticizers Krauskopf LG. In: Zweifel H, Maier RD, Schiller M, editors. Munich: Hanser Publications; 2009. p. 485–511.
- Pourashouri, P.; Shabanpour, B.; Auburg, P.; Daghigh Rohi, J.; Shabani, A. (2009). An investigation of rancidity inhibition during frozen storage of Wels catfish (*Silurus glanis*) fillets by previous ascorbic and citric acid treatment. *International Journal of Food Science and Technology*. 44 (8), 1503-1509.
- Quezada Gallo, J.A.; Frédéric Debeaufort, Francesca Callegarin, Andrée Voilley. (2000). Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science*. 180(1), 37-46.
- Quilaqueo Gutiérrez, M.; Echeverría, I.; Ihl, M.; Bifani, V.; Mauri, A.N. (2011). Carboxymethylcellulose–montmorillonite nanocomposite films activated with murta (*Ugni molinae* Turcz) leaves extract. *Carbohydrate Polymers*. 87, 1495-1502.
- Quitral, V.; Donoso, M.L.; Ortiz, J.; Herrera, M.V.; Araya, H.; Aubourg S.P. (2009). Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): Effect of a plant-extract icing system. *LWT - Food Science and Technology*. 42 (8), 1450-1454.
- Rahman, M.; Brazel, C.S. (2004). The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in Polymer Science*. 29, 1223–48.

- Ramírez, V.H.; Milania Rocha Palma; Ericka Rodríguez Vega (2002). Plantas medicinales. Vol II. Centro Nacional de Información de Medicamentos (CIMED). INIFAR. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica.CIMED.
- Rangavajhyala, N.; Ghorpade, V.; Hanna M. (1997). Solubility and molecular properties of heat-cured soy protein film. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45, 4204-4208.
- Rao, Y. Q. (2007). Gelatine clay nanocomposites of improved properties. *Polymer*. 48, 5369-5375.
- Ray, S. S.; Bousmina, M. (2005). Nano-Reinforcements of Renewable Plastics: To Create the Next Generation of Value added Novel Eco Friendly Nanocomposites. *HandBook of Biodegradable Materials and Their Applications*, Chapter 1, Volume 1.
- Ray, S. S.; Okamoto, M. (2003). Polymer/layered Silicate Nanocomposite: A Review from Preparation to Processing. *Progress in Polymer Science*. 28, 1539-1641.
- Ray, S.S. (2006). Rheology of polymer/layered silicate nanocomposites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 12, 811-842.
- Ray, S.S., Yamada, K., Okamoto, M. & Veada, K. (2002). Polylactide-layered silicate nanocomposite: A novel biodegradable material. *Nano Letters*. 2, 1093-1096.
- Remondetto, G.E.; R.J. González and M.C. Añón. (2002). Effects of Simultaneous Heat and Reducing Treatments on Some Structural Characteristics of Soy Isolates Obtained at Pilot Plant Scale. *Food Science and Technology International*. 8, 223-228.
- Rhim, J.W.; Gennadios, A.; Handa, A., Weller, C.L.; Hanna, M.A. (2000). Solubility, tensile and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 4937-4941.
- Rhim, J. W. (2011). Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*. 86, 691-699.
- Rhim, J.W. & Perry, K.W. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 47,1-24.
- Rhim, J.W.; Mohanty, K.A.; Singh, S.P.; Ng, P.K. (2006). Preparation and properties of biodegradable multilayer films based on soy protein. Isolate and poly(lactide). *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 45 (9), 3059–3066.
- Rimdusit, S. J.; Sorada, D.; Siriporn, T.; Sunan, T. T. (2008). Biodegradability and property characterizations of MethylCellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*. 72, 444–455.

- Robertson, M. (2008). State-of-the-art biobased food packaging materials. En: Environmentally compatible food packaging. Part I: Biobased food packaging materials: new directions. Ed.: E. Chiellini. Primera edición. Editorial Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cap. 1, pag. 3-24.,
- Rojas-Graü, M.A.; Avena-Bustillos, R.J.; Olsen, C.; Friedman, M.; Henika, P.R.; Martín-Belloso, O.; Pan, Z.; McHugh, T.H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*. 81 (3), 634-641.
- Rossi-Márquez, G.; Han, J.H.; García-Almendárez, B.; Castaño-Tostado, E.; Regalado-González, C. (2009). Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89 (14), 2492-2497.
- Rouilly, A.; Mériaux, A.; Geneau, C.; Silvestre, F.; Rigal, L. (2006a). Film extrusion of sunflower protein isolate. *Polymer Engineering & Science*. 46, 1635–1640.
- Rouilly, A.; Orliac, O.; Silvestre, F.; Rigal, L. (2006b). New natural injection-moldable composite material from sunflower oil cake. *Bioresource Technology*. 97, 553–561.
- Rubilar M.; Pinelo M.; Ihl, M.; Scheuermann, E.; Sineiro, J.; Nuñez, M. J. (2006). Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 59–64.
- Ryu, K.S.; Kim, K.M.; Park, N.G.; Park, Y.J.; Chang, S.H. (2002). Redox supercapacitor using polyaniline doped with Li salt as electrode. *Solid State Ionics*. 152, 861-866.
- Ryu, S.Y.; Rhim, J.W.; Roh, H.J.; Kim, S.S. (2002). Preparation and physical properties of zein coated high amylose corn starch film. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 35, 680–686.
- S.I., 2007. Wetting properties of biopolyester films prepared by thermo-compression method. *Food Sci Biotechnol*. 16, 234–237.
- Salgado, P. R.; Molina Ortiz, S. E.; Petruccielli, S.; Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*. 24,525–533.
- Salgado, P.R.; López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Mauri, A.N.; Montero, P. (2012). Sunflower protein films activated with antioxidant and antimicrobial properties have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*. Enviado.
- Salgado, P.R.; López-Caballero, M.E.; Gómez-Guillén, M.C.; Mauri, A.N.; Montero, P. (2012). Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*. DOI information: 10.1016/j.foodhyd.2012.03.006

- Sánchez-González, L.; Chiralt, A.; González-Martínez, C.; Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*. 105 (2), 246-253.
- Schmidt, D.; Shah, D.; Giannelis, E. P. (2002). New Advances in Polymer/Layered Silicate Nanocomposites. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. 6 (3), 205-212.
- Scott, G. (2000). 'Green' Polymers. *Polymer Degradation and Stability*. 68, 1-7.
- Seacheol, M.; Krochta, J.M. (2007). Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (8): 2964-2969.
- Seguel, I.; Peñalosa, E.; Gaete, N.; Montenegro, A.; Torres, A. (2000). Colecta y caracterización molecular de germoplasma de murta (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile. *Revista Agro Sur*, 28, 32–41.
- Sejidov, F.T.; Mansoori, Y.; Goodarzi, N. (2005). Esterification reaction using solid heterogeneous acid catalysts under solvent-less condition. *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical*. 240 (1–2), 186–90.
- Selmi S.; Sadok, S. (2008). The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* Linnaeus) on flesh quality of tuna (*Thunnus thynnus* (Linnaeus)) during chilled storage. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 3 (1): 36-45
- Seung In Hong; Won Young Choi; Seung Yong Cho; Se H. Jung; Boo Y. Shin; Hyun Jin Park (2009). Mechanical properties and biodegradability of poly-3-caprolactone/soy proteína isolate blends compatibilized by coconut oil. *Polymer Degradation and Stability*. 94, 1876–1881.
- Seung, Y.C.; Chul, R. (2002). Sorption characteristics of soy protein films and their relation to Mechanical Properties. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 35, 151–157.
- Seydim, A.C.; Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*. 39 (5), 639-644.
- Shanmugaraj, A. M.; Rhee, K. Y.; Ryu, S.H. (2006). Influence of dispersing medium on grafting of aminopropyltriethoxysilane in swelling clay materials. *Journal of Colloid and Interface Science*. 298 (2) 854-859.
- Shanmugaraj, A. M.; Chattopadhyay, R. N.; Singha, N. K.; Bhowmick, A. K. (2005). Studies on the adhesion behavior of water-based adhesives blended with asan gum. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 19 (8), 639-658.
- Sharif, J.; Wan Yunus, W.M.Z.; Mohd Dahlan, K.Z.H.; Ahmad, M.H. (2005). Preparation and properties of radiation crosslinked natural rubber/clay nanocomposites. *Polymer Testing*. 24, 211-217.

- Shaw, N.B.; Monahan, F.J.; O'Rioran, E.D.; O'Sullivan, M. (2002). Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composites WPI films. *Journal of Food Engineering*. 51, 299-304.
- Shaw, N.B.; Monahan, F.J. E.D. O'riordan, And M. O'sullivan Physical Properties of WPI Films Plasticized with Glycerol, Xylitol, or Sorbitol. *Journal of Food Science*. 67 (1) 164-167.
- Shen, Z.Q.; Simon, G.P.; Cheng, Y. B. (2002). Comparison of solution intercalation and melt intercalation of polymer-clay nanocomposites. *Journal of Polymer Science*. 43 (15), 4251-4260.
- Sian, N. K.; Ishak, S. (1990). Effect of pH on Formation, Proximate Composition and Rehydration Capacity of Winged Bean and Soybean Protein-Lipid Film. *Journal of Food Science*. 55, 261–262.
- Sian, N. K.; Ishak, S. (1990). Effect of pH on yield, chemical composition, and boiling resistance of soybean protein–lipid film. *Cereal Food World*. 35, 748–750.
- Sienkiewicz, M.; Denys, P.; Kowalczyk, E. (2011). Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils. *International Review of Allergology and Clinical Immunology*. 17, 1-2.
- Silvestre, C.; Duraccio, D.; Cimmino, S. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*. 36, 1766-1782.
- Sinha Ray, S.; Bousmina, M. (2005). Biodegradable Polymers and Their Layered Silicate Nanocomposites: In Greening the 21st Century Materials World. *Progress in Materials Science*. 50, 962-1080.
- Sinha Ray, S.; Okamoto, M. (2003). Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science*. 28, 1539–641.
- Siracusa, V.; Rocculi, P.; Romani, S.; Rosa, M.D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 19, 634–643.
- Siripatrawan, U.; Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 24 (8), 770-775.
- Sivarooban, T.; Hettiarachchy, N.S.; Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*. 41 (8), 781-785.
- Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C.; Hubinger, M. D.; Roques, M. A. (2001). Mechanical water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*. 15, 423–432.
- Sobral, P.J.A.; Alvarao, J.D.; Zaritzky, N.E.; Laurindo, J.B.; Gómez-Guillén, C.; Añón, M.C.; Montero, P.; Denavi, G.; Molina Ortiz, S.E.; Mauri, A.; Pinotti, A.; García, M.A.; Martino, M.N.; Carvalho, R.A. (2008). Films based on biopolymers from conventional and non conventional

sources “*Food Engineering: Integrated Approaches*”. Nueva York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. p. 193-225.

- Song, F.; Tang, D.; Wang, X.; Wang, Y. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules*. 12, 3369–3380.
- Sorrentino A; Gorrasi G; Vittoria V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*. 18, 84-95.
- Sothornvit, R.; Krotcha, J.M. (2000). Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. *Journal of Food Science*. 65, 700-703.
- Sothornvit, R.; Chollakup, R. (2009). Properties of sericin–glucomannan composite films. *International Journal of Food Science & Technology*. 44, 1395–1400.
- Sothornvit, R.; Hong, S.I.; Duck, J.A.; Rhim, J.W. (2010). Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties. *LWT - Food Science and Technology*. 43, 279–284.
- Sothornvit, R.; Olsen, C. W.; McHugh, T. H.; Krochta, J. M. (2003). Formation Conditions, Water-vapor Permeability, and Solubility of Compression-molded Whey Protein Films. *Journal of Food Science*. 68 (6), 1985–1999.
- Staswick, P.E.; Hermodson, M.A.; Nielsen, N.C. (1984). Identification of the cysteines which link acidic and basic components of the glycinin. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 13431-13435.
- Steffe, J.F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*, second ed. Freeman Press, Michigan.
- Stuchell, Y. M.; Krochta, J. M. (1994). Enzymatic treatment and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science*. 59, 1332–1337.
- Su, J.F.; Huang, Z.; Zhao, Y.H.; Yuan, X.Y.; Wang, X.Y.; Li, M. (2010). Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol)/glycerol blend films. *Industrial Crops and Products*. 31(2), 266-276.
- Subirade, M.; Kelly, I.; Gueguen, J.; Pezolet, M. (1998). Molecular basis of film formation from a soybean protein: Comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23, 241-249.
- Sultanbawa, Y. (2011). Plant antimicrobials in food applications: Minireview. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed). 1084-1093.
- Sun, L.; Boo, W. J.; Clearfield, A.; Sue, H. J.; Pham, H. Q. (2008). Barrier properties of model epoxy nanocomposites. *Journal of Membrane Science*. 318, 129–136.

- Swain, S.N.; Biswal, S.M.; Nanda, P.K.; Nayak, P.L. (2004). Biodegradable soy-based plastics: Opportunities and challenges. *Journal of Polymers and the Environment*. 12 (1), 35-42.
- Swift, G. (1995). Opportunities for Environmentally Degradable Polymers, in Selected Papers Presented in The International Workshop on Controlled Life-Cycle of Polymeric Materials, Stockholm, 1994. *Journal Macromolecular Science - Pure Applied Chemistry*. 32(4), 641 - 651.
- Tang, C. H.; Jiang, Y.; Wen, Q. B.; Yang, X. Q. (2005). Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology*. 120, 296–307.
- Tang, X.; Alavi, S.; Herald, T. J. (2008). Effects of plasticizers on the structure and properties of starch–clay nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*. 74, 552–558.
- Thanh, V.; Shibasaki, K. (1977). β -conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical of the monomeric forms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 490, 370–376.
- Tapia-Blácido, D.; Mauri, A. N.; Menegalli, F. C.; Sobral, P. J. A.; Añón, M. C. (2007). Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. *Journal of Food Sciences*. 72 (5), 293-300.
- Tapia-Blácido, D.R.; do Amaral Sobral, P.J.; Menegalli, F.C. (2011). Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. *LWT - Food Science and Technology*. 44, 1731-1738.
- Thanh, V. H.; Shibasaki, K. (1977). Beta-Conglycinin from Soybean Proteins Isolation and Immunological and Physicochemical Properties of the Monomeric Forms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 490, 370-384.
- Thomazine, M.; Carvalho, R.A.; Sobral, P.J.A. (2005). Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. *Journal of Food Science*. 70 (3), 172-176.
- Tian, H. F.; Wang, Y. X.; Zhang, L. N.; Quan, C. Y.; Zhang, X. Z. (2010). *Industrial Crops and Products*. 32, 13–20.
- Topic Popovic, N.; Benussi Skukan, A.; Dzidara, P.; Coz-Rakovac, R.; Strunjak-Perovic, I.; Kozacinski, L.; Jadan, M.; Brlek-Gorski, D. (2010). Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. *Veterinarni Medicin*. 55 (5), 233-241.
- Trznadel, M. (1995). Biodegradable polymer materials. *International Polymer Science and Technology*. 22(12), 58-65.
- Tummala, P.; Liu, W.; Drzal, W.T.; Mohanty, A.K.; Misra, M. (2006). Influence of plasticizers on thermal and mechanical properties and morphology of soy-based bioplastics. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 45 (22), 7491–7496.

- Tunc, S.; Angellier, H.; Cahyana, Y.; Chalier, P.; Gontard, N.; Gastaldi, E. (2007). Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science*. 289, 159–168.
- Turhan, K.N.; Özge Erdohan Sancak, Z.; Ayana, B.; Ergoğdu, F. (2007). Optimization of glycerol effect on the mechanical properties and water vapor permeability of whey protein-methylcellulose films. *Journal of Food Process Engineering*. 30, 485–500.
- Urbain, W. M., Ed. *Radiation Chemistry of Proteins*; Elsevier Scientific Publishing Co.: Amsterdam, 1977.
- Vaia, R. A.; Giannelis, E. P. (1997). Polymer Melt Intercalation in Organically-Modified Layered Silicates: Model Predictions and Experiment. *Macromolecules*. 30 (25), 8000-8009.
- Vaia, R.; Teukolsky, R.; Giannelis, E. (1994). Interlayer structure and molecular environment of alkylammonium layered silicates. *Chemistry of Materials*. 6, 1017.
- Vaia, R.A.; Vasudevan, S.; Krawiec, W.; Scanlon, L.G.; Giannelis, E.P. (1995). New polymer electrolyte nanocomposites: Melt intercalation of poly(ethylene oxide) in mica-type silicates. *Advanced Materials*. 7 (2), 154-156.
- Van Der Berg, C.; Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects, in water activity: Influence on food quality, Ed by Rockland LB and Stewart GF, Academic Press, New York, 1-61.
- van der Zee, M. (2005). Biodegradability of Polymers - Mechanisms and Evaluation Methods. En: Handbook of Biodegradable Polymers. Ed.: C. Bastioli, C. Edición N° 2 Editorial Rapra Technology Limited. Shabury, Shrewsbury, Shropshire, SY4 4NR, United Kingdom. Cap. 1, pág 1-22.
- Van Oss, C.J. (1994). Interfacial Forces in Aqueous Media, Marcel Dekker Inc., p. 179.
- van Tuil, R.; Fowler, P.; Lawther, M.; Weber C. J. (2000). Properties of biobased packaging materials. En: Biobased packaging materials for the food industry: status and perspectives. Ed. Weber, C. J. KVL: Frederiksberg, Dinamarca, pp. 13-44.
- Van Vliet, T.; Anneke H Martina, Martin A Bos. Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 7, 5–6, 462–468.
- Varelziz, K.; Zetou, F.; Tsiaras, I. (1988). Textural deterioration of chub mackerel (*Scomber japonicus collias*) and smooth hound (*Mustelus mustelus L.*) in frozen storage in relation to chemical parameter. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*. 21, 206-211.
- Vaz, C. M.; de Graaf, L. A.; Reis, R. L.; Cunha, A. M. (2003). In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. *Polymer Degradation and Stability*. 81 (1), 65-74.

- Viuda-Martos, M.; Ruiz Navajas, Y.; Sánchez Zapata, E.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*. 25, 13–19.
- Vyncke, M. (1970). Direct Determinación of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette Wiss Technology*. 72 (12), 1084-1087.
- Wambua, P.; Ivens, J.; Verpoest, I. (2003). Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics. *Composites Science and Technology*. 63, 1259-1264.
- Wan, V. C.H.; Kim, M. S.; Lee, S. Y. (2005). Water vapor permeability and mechanical properties of soy protein isolate edible films composed of different plasticizer combination. *Journal of Food Science*. 70, 387–391.
- Wang, N. G.; Zhang, L. N. (2005). Preparation and characterization of soy protein plastics plasticized with water-borne polyurethane. *Polymer International*. 54, 233–239.
- Weber, C.J. (2000). Bio-based Packaging Materials for the Food Industry Status and Prospectives. Frederiksberg C, Denmark. The Royal Veterinary and Agricultural University. Disponible: www.mli.kvl.dk/foodchem/special/biopack/
- Wei, M.; Fan, L.; Huang, J.; Chen, Y. (2006). Role of Star-Like Hydroxylpropyl Lignin in Soy-Protein Plastics. *Macromolecular Materials and Engineering*. 291 (5), 524-530.
- Weiss, J.; Takhistov, P.; Mc Clements, D. J. (2006). Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*. 71 (9), 107-116.
- Won Y. Choi; Chong M. Lee; Hyun J. Park. (2006). Development of biodegradable hot-melt adhesive based on poly-ε-caprolactone and soy protein isolate for food packaging system. *LWT*. 39, 591–597.
- www.argentinatradenet.gov.ar - Informe Sectorial – Sector del Plástico 2011. Subsecretaría de Comercio Internacional, Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto (último acceso marzo de 2012).
- <http://www.caip.org.ar> - Cámara Argentina de la Industria Plástica (último acceso marzo de 2012).
- Wypych, G. (2004). Handbook of plasticizers. Toronto: ChemTec Publishing. p. 687
- Xiang, L.X.; Tang C.Y; Cao, J; Wang, C.Y; Wang, K; Zhang, Q.; Fu, Q. (2009). Preparation and Characterization Of Soy Protein Isolate (SPI)/Montmorillonite (MMT) Bionanocomposites. *Chinese Journal of Polymer Science*. 27 (6), 843–849.
- Yang, L.; Paulson, A.T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*. 33(7), 571–578.

-
- Yu L.; Dean K.; Wu D.Y. (2004). Polymer blends and composites from renewable resources. International symposium on engineering plastics, EP'2, Lanzhou, China.
 - Yuan, L.; Kaichang, L. (2007). Development and characterization of adhesives from soy protein for bonding wood. *International Journal of Adhesion & Adhesives*. 27, 59-67.
 - Zahedi, Y.; B. Ghanbarzadeh, N. (2010). Sedaghat Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering*. 100 (1), 102-108.
 - Zambuchini, B.; Fiorini, D.; Verdenelli, M.C.; Orpianesi, C.; Ballini, R. (2008). Inhibition of microbiological activity during sole (*Solea solea* L.) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *LWT - Food Science and Technology*. 41 (9), 1733-1738.
 - Zeng, C.; Lee, L. J. (2001). Poly(methyl methacrylate) and polystyrene/clay nanocomposites prepared by in situ polymerization. *Macromolecules*. 34, 4098–4103.
 - Zeng, Q.H.; Yu, A.B.; Lu, G.Q.; Paul, D.R. (2005). Clay-based polymer nanocomposites: research and commercial development. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 5 (10), 1574-92.
 - Zhang, J.; Mungara, P.; Jane, J. (2001). Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer*. 42 (6), 2569-2578.
 - Zhang, C.; Guo, K.; Ma, Y.; Ma, D.; Li, X.; Zhao, X. (2010). Incorporations of blueberry extracts into soybean-protein-isolate film preserve qualities of packaged lard. *International Journal of Food Science and Technology*. 45 (9), 1801-1806.
 - Zhang, H.; Mittal, G. (2010). Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 23, 203-220.
 - Zhang, Z.; Hua, Y. (2007). Urea-modified soy globulin proteins (7S and 11S): Effect of wettability and secondary structure on adhesion. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 84, 853-857.
 - Zhao, R.; Torley, P.; Halley, P. J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science*. 43, 3058–3071.
 - Zuo, M.; Song, Y.; Zheng, Q. (2009). Preparation and properties of wheat gluten/methylcellulose binary blend film casting from aqueous ammonia: A comparison with compression molded composites. *Journal of Food Engineering*. 91 (3), 415–422.