



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Tesis Doctoral

**“Estrategias para mejorar la funcionalidad y
aplicabilidad de películas en base a
proteínas de soja”**

Lic. Cristian Matias Ortiz

Director: Dra. Adriana Noemí Mauri

Co-Director: Dr. Ariel Roberto Vicente

AÑO 2015

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-CONICET, La Plata, Argentina).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a aquellas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis:

- mis directores la Dra. Adriana N. Mauri y el Dr. Ariel R. Vicente, por haber confiado en mí, por las pautas de trabajo, el apoyo que me supieron brindar y, fundamentalmente, por el camino que recorrimos en los últimos cinco años.
- la Dra. Noemí Zaritsky, directora del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), por permitirme realizar mi Tesis Doctoral en sus instalaciones.
- el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas en el período 2010-2015.
- la Facultad de Ciencias Exactas y la Universidad Nacional de la Plata por su admisión al Doctorado, así como la posibilidad de brindarme variados cursos de postgrado.
- todos mis compañeros de los Laboratorios de Proteínas y Vegetales del CIDCA, pilares fundamentales en el día a día dentro y fuera del lugar de trabajo.
- todos mis compañeros durante mi actividad docente en la UNLP, y en particular a los docentes de la cátedra de Agroindustrias de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP.
- la Dra. Jaqueline Oliveira de Moraes y el Profesor Dr. João Borges Laurindo, por recibirme y ayudarme con los trabajos realizados en el Laboratorio de Propiedades Físicas de los Alimentos (PROFI) de la Universidad Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil).
- Pablo R. Salgado, Ignacio Echeverría, Francisco Speroni por la ayuda brindada.
- Javier Lecot y Daniel Russo por el apoyo técnico brindado.
- Diana Velasco por su atención y disposición en las búsquedas bibliográficas.
- todos los compañeros del CIDCA en general, por todos los momentos de trabajo y amistad.
- mis amigos, los que están siempre.

...y a lo más preciado de mi vida, mi hija Amparo, a Marisol por su aguante, a Mamá por el apoyo incondicional a la distancia, a mis hermanos Emiliano, Leonel y Nicolás, y a todo el resto de mi

Familia, gracias!...

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1. Materiales plásticos sintéticos	5
1.2. Bioplásticos	6
1.3. Proteínas como biopolímeros	8
1.3.1. Proteínas de soja	10
1.4. Películas proteicas	11
1.5. Propiedades de las películas proteicas	12
1.6. Estrategias actuales en investigación para ampliar la funcionalidad y aplicabilidad de las películas proteicas	15
1.6.1. Procesamiento de los materiales proteicos	16
1.6.2. Materiales compuestos de matriz proteica	18
1.6.3. Materiales nanocompuestos	19
1.6.4. Películas activas	26
1.6.5. Materiales proteicos en <i>packaging</i> o envasado de alimentos	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo general	31
2.2. Objetivos específicos	32
3. Películas proteicas de soja nanoreforzadas con montmorillonita y adicionadas con colorantes	33
3.1. Introducción	33
3.2. Objetivos	36
3.3. Materiales y métodos	36
3.3.1. Materiales	36
3.3.2. Caracterización del aislado proteico de soja (SPI)	37
3.3.2.1. Contenido de proteínas	37
3.3.2.2. Temperatura y grado de desnaturalización de las proteínas	37
3.3.2.3. Composición polipeptídica de los aislados proteicos	38
3.3.3. Obtención de las películas proteicas y nanocompuestas coloreadas por <i>casting</i>	39
3.3.4. Caracterización de las películas proteicas y nanocompuestas	39
3.3.4.1. Espesor	40
3.3.4.2. Determinación de color	40
3.3.4.3. Espectros de absorción en el visible y opacidad	41
3.3.4.4. Contenido de humedad	41
3.3.4.5. Solubilidad en agua	41
3.3.4.6. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	42
3.3.4.7. Absorción de agua	43
3.3.4.8. Temperatura de transición vítrea (Tg)	43
3.3.4.9. Propiedades mecánicas	44
3.3.4.10. Difracción de rayos X (XRD)	44
3.3.4.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	45

3.3.4.12. Liberación del colorante	45
3.3.4.13. Pérdida de peso en suelo	46
3.3.5. Análisis estadístico	47
3.4. Resultados y discusión	47
3.4.1. Caracterización del aislado proteico de soja	47
3.4.2. Apariencia y propiedades ópticas de las películas	49
3.4.3. Susceptibilidad al agua	54
3.4.4. Propiedades mecánicas	58
3.4.5. Temperatura de transición vítrea	61
3.4.6. Morfología de las películas proteicas y nanocompuestas	62
3.4.7. Liberación del colorante en solución acuosa	66
3.4.8. Pérdida de peso en suelo	68
3.5. Conclusiones	72
4. Películas proteicas de soja reforzadas con nanofibras de celulosa y activadas con aceite esencial de clavo de olor (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	73
4.1. Introducción	73
4.2. Objetivos	81
4.3. Materiales y métodos	82
4.3.1. Materiales	82
4.3.2. Obtención y caracterización de los nanorefuerzos de celulosa	82
4.3.2.1. Pre-tratamiento de las fibras	82
4.3.2.2. Obtención de la celulosa microfibrilada (MFC)	82
4.3.2.3. Caracterización de la celulosa microfibrilada (MFC)	83
4.3.3. Obtención de las películas nanocompuestas	83
4.3.4. Caracterización de las dispersiones filmogénicas mediante ensayos reológicos	84
4.3.5. Caracterización de las películas	84
4.3.5.1. Ángulo de contacto	85
4.3.5.2. Permeabilidad al O ₂	85
4.3.5.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	86
4.3.5.4. Actividad antioxidante	86
4.3.5.5. Actividad antimicrobiana	87
4.3.6. Análisis estadístico	87
4.4. Resultados y discusión	88
4.4.1. Obtención y caracterización de la celulosa microfibrilada obtenida a partir de fibras de formio	88
4.4.2. Caracterización reológica de las dispersiones filmogénicas	90
4.4.3. Caracterización de las películas proteicas y nanoreforzadas control y adicionadas con AEC	92
4.4.3.1. Apariencia	92
4.4.3.2. Susceptibilidad al agua	96
4.4.3.3. Propiedades barrera	98
4.4.3.4. Propiedades mecánicas	101
4.4.3.5. Temperatura de transición vítrea	103
4.4.3.6. Morfología	104
4.4.3.7. Propiedades antioxidantes	108
4.4.3.8. Propiedades antimicrobianas	109
4.5. Conclusiones	112

5. Películas en base a proteínas de soja procesadas por <i>tape casting</i>	114
5.1. Introducción	114
5.2. Objetivos	117
5.3. Materiales y métodos	118
5.3.1. Materiales	118
5.3.2. Tratamiento y caracterización de fibras de celulosa	118
5.3.2.1. Tratamiento	118
5.3.2.2. Morfología de las fibras	119
5.3.2.3. Contenido de lignina	119
5.3.2.4. Contenido de celulosa	120
5.3.3. Formación de películas por <i>tape casting</i>	120
5.3.3.1. Selección de la concentración óptima de proteínas	121
5.3.3.2. Evaluación del efecto del tipo y temperatura de secado	121
5.3.3.3. Evaluación del agregado de fibras a la formulación	122
5.3.3.4. Evaluación del agregado de ceras a la formulación	123
5.3.4. Caracterización de las dispersiones filmogénicas mediante ensayos reológicos	124
5.3.5. Estudio de la cinética de secado durante el procesamiento	125
5.3.6. Caracterización de las películas	126
5.3.6.1. Densidad	127
5.3.6.2. Propiedades mecánicas en punción	127
5.3.6.3. Capacidad y calidad de termosellado	128
5.3.7. Análisis estadístico	129
5.4. Resultados y discusión	129
5.4.1. Selección de la concentración proteica adecuada para el procesamiento por <i>tape casting</i>	129
5.4.2. Influencia de las condiciones de secado (temperatura y método de secado) sobre las propiedades de películas proteicas de soja obtenidas por <i>tape casting</i>	132
5.4.2.1. Cinética de secado	133
5.4.2.2. Caracterización de las películas secadas a diferentes temperaturas por conducción y a 60 °C por radiación	136
5.4.2.2.1. Apariencia	136
5.4.2.2.2. Susceptibilidad al agua	137
5.4.2.2.3. Propiedades mecánicas	139
5.4.2.2.4. Resistencia del termosellado	140
5.4.3. Películas compuestas en base a proteínas de soja y fibras celulósicas procesadas por <i>tape casting</i>	142
5.4.3.1. Caracterización de las fibras empleadas	143
5.4.3.2. Caracterización de las películas compuestas proteína-fibra	144
5.4.3.2.1. Apariencia	144
5.4.3.2.2. Susceptibilidad al agua	146
5.4.3.2.3. Propiedades mecánicas	147
5.4.3.2.4. Morfología	148
5.4.3.2.5. Resistencia del termosellado	150
5.4.4. Películas compuestas en base a proteínas de soja y ceras de abeja y carnauba obtenidas por <i>tape casting</i>	151
5.4.4.1. Apariencia	151

5.4.4.2.	Susceptibilidad al agua	156
5.4.4.3.	Propiedades mecánicas	159
5.4.4.4.	Morfología de las películas emulsionadas proteína-ceras	160
5.5.	Conclusiones	162
6.	Películas proteicas de soja liberadoras de principios activos durante el almacenamiento envasado de alimentos vegetales	164
6.1.	Introducción	164
6.2.	Objetivos	168
6.3.	Materiales y métodos	168
6.3.1.	Generación de contenedores-liberadores (<i>pads</i>) de 1-metilciclopropeno (1-MCP) para extender la vida útil de frutos de tomate	168
6.3.1.1.	Materiales	168
6.3.1.2.	Selección de la formulación para el liberador de 1-MCP	168
6.3.1.3.	Calidad de frutos envasados con el <i>pad</i> o contenedor-liberador de 1-MCP seleccionado durante el almacenamiento poscosecha	171
6.3.2.	Generación de matrices liberadoras (<i>generators</i>) de dióxido de azufre (SO ₂) para retrasar la aparición del pardeamiento enzimático de manzanas mínimamente procesadas	173
6.3.2.1.	Materiales	173
6.3.2.2.	Obtención y caracterización de películas	174
6.3.2.3.	Evaluación de las películas <i>generators</i> en sistema de envase	174
6.3.3.	Análisis estadístico	175
6.4.	Resultados y discusión	175
6.4.1.	Generación de contenedores-liberadores (<i>pads</i>) de 1-metilciclopropeno (1-MCP) para extender la vida útil de frutos de tomate	175
6.4.1.1.	Selección de la formulación filmogénica	175
6.4.1.2.	Calidad de frutos de tomate envasados con los <i>pads</i> contenedores-liberadores de 1-MCP durante el almacenamiento poscosecha	180
6.4.2.	Generación de matrices liberadoras (<i>generators</i>) de dióxido de azufre (SO ₂) para retrasar la aparición del pardeamiento enzimático de manzanas mínimamente procesadas	187
6.4.2.1.	Caracterización de las películas proteicas de soja <i>generators</i>	187
6.4.2.2.	Efecto de la aplicación de las películas como <i>generators</i> liberadores de SO ₂ en sistemas de envase	193
6.5.	Conclusiones	195
7.	Conclusiones generales	197
8.	Referencias bibliográficas	199
ANEXO I.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. Uso combinado de tratamientos físicos y recubrimientos comestibles en los productos frescos	220

RESUMEN

Entre los biopolímeros, las proteínas de soja tienen la capacidad de formar películas comestibles y biodegradables con gran potencial para reemplazar en al menos algunas aplicaciones a los sintéticos derivados del petróleo. Respecto de los polímeros sintéticos, las películas proteicas presentan excelentes propiedades barrera a gases, lípidos y aromas; pero existen aspectos que aún deben ser resueltos para aumentar su difusión y que son foco de investigaciones en la actualidad: *i)* obtener materiales con mejoras en sus propiedades (ej. compuestos, nanocompuestos, activos), *ii)* avanzar en el procesamiento de estos materiales a mayor escala, *iii)* explorar nuevas aplicaciones específicas para este tipo de materiales adecuadas. El objetivo general de la presente tesis fue estudiar distintas alternativas para mejorar la funcionalidad y aplicabilidad de películas en base a proteínas de soja, combinando estrategias de formulación y procesamiento y analizando algunas aplicaciones específicas, en las que las desventajas de los materiales para otros usos se transforman en aspectos deseables. En particular en este trabajo se estudió:

- el agregado conjunto de nanorefuerzos y aditivos que otorgan alguna otra propiedad adicional a la formulación, específicamente nanoarcillas (MMT) y colorantes comestibles, y nanofibras de celulosa y aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.).
- el desarrollo de materiales por *tape casting*, como técnica de escalado de proceso húmedo, analizando las condiciones óptimas del proceso, y el agregado de fibra y cera a la formulación.
- el uso de estos materiales para la formación de liberadores de principios activos, útiles para realizar tratamientos poscosecha de vegetales en el envase durante el almacenamiento: *pads* contenedores-liberadores de 1-metilciclopropeno, un inhibidor de la acción de etileno, para extender la vida útil de frutos de tomate, y matrices liberadoras (*generators*) de dióxido de azufre por activación de las películas con sulfito de sodio para retrasar el pardeamiento de manzanas mínimamente procesadas.

ABSTRACT

Soy proteins have the ability to form edible and biodegradable films with high potential to replace in some applications synthetic polymers. Protein films exhibit excellent barrier properties to gases, flavors and lipids. However, there are a number of issues that still need to be solved and which are the current focus of research activities in this area: i) to improve the materials (eg. composites, nanocomposites, active materials), ii) to develop higher scale processing strategies, iii) to explore new potential applications. The objective of this work was to evaluate different alternatives to improve the functionality of soy protein films. We evaluated different material formulation and processing techniques and we tested some applications to take advantage of properties that have been considered drawbacks of these materials. We particular investigated:

- the influence of adding nano-reinforcements and other additives to improve the material properties specifically nanoclays (MMT) and edible dyes, and cellulose nanofibers and clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil .
- the properties of soy protein films processed by tape casting as a scaling up technique, determining the optimal processing conditions, and the effects of adding fibers and waxes to the formulation.
- the use of these materials to generate releasers of active principles that may be useful for postharvest treatments: in package 1-methylcyclopropene (an ethylene inhibitor) releasing pads to prevent tomato ripening and protein and sulfite of sulfur dioxide generators to delay browning of apples minimally processed.

ABREVIATURAS

-	τ	esfuerzo de corte
-	®	marca registrada
-	α	nivel de significación
-	τ_0	umbral de fluencia
-	1-MCP	1-metilciclopropeno
-	A	área
-	a*	parámetro de color CIE-Lab
-	AB	cera de abeja
-	Abs	absorbancia
-	ABTS ⁺	radical del ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)
-	AEC	aceite esencial de clavo de olor
-	ANOVA	análisis de varianza
-	ASTM	American Society for Testing Materials
-	b*	parámetro de color CIE-Lab
-	Ca	cera de carnauba
-	AOX	actividad antioxidante
-	D	velocidad de deformación
-	D _m	deformación en punción
-	d	diámetro
-	DO	densidad óptica
-	DSC	calorimetría diferencial de barrido
-	E	módulo de Young
-	EC ₅₀	concentración equivalente 50%
-	eq	equivalente
-	ETA's	enfermedades transmitidas por alimentos
-	F	fibras
-	F _m	Fuerza máxima en punción
-	HR	humedad relativa
-	IR	infrarrojo
-	IR60	película secada por luz infrarrojo a 60 °C en <i>tape casting</i>
-	K	índice de consistencia
-	kV	kilovoltios
-	L*	parámetro de color CIE-Lab, luminosidad
-	m	masa
-	mA	miliamperes
-	MFC	celulosa microfibrilada
-	n	índice de flujo
-	N	Newton
-	p.a.	pro análisis
-	pH	potencial de hidrógeno
-	P _v ^{H₂O}	presión de vapor de agua (1753,35 Pa) a 20 °C
-	rpm	revoluciones por minuto
-	SEM	microscopía electrónica de barrido
-	SPI	aislado proteico de soja

-	TEM	microscopía electrónica de transmisión
-	T_f	temperatura de fusión
-	T_g	temperatura de transición vítrea
-	UA	unidad arbitraria (empleada en la medida de opacidad)
-	UFC	unidades formadoras de colonias
-	W	peso usado en el cálculo de pérdida de peso
-	WL	pérdida de peso
-	WSP	pectinas solubles en agua
-	WVP	permeabilidad al vapor de agua
-	δ	espesor
-	ΔE	variación de color
-	$\Delta m/\Delta t$	velocidad de permeación del vapor de agua
-	ϵ	coeficiente de extinción molar
-	ϵ_r	elongación a la ruptura medida en tracción
-	η_{app}	viscosidad aparente
-	θ	ángulo de difracción
-	λ	longitud de onda
-	ρ	densidad
-	σ_r	tensión a la ruptura medida en tracción

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Materiales plásticos sintéticos

Comúnmente reconocemos a los plásticos sintéticos como aquellos materiales obtenidos mediante polimerización de compuestos orgánicos derivados del petróleo. Estos materiales se caracterizan comúnmente por ser económicos, fáciles de trabajar y moldear empleando calor y presión, flexibles, fuertes pero ligeros. Asimismo pueden ser resistentes a la radiación, a la corrosión, al agua y al ataque de numerosos productos químicos y microorganismos y presentar buenas propiedades aislantes. Debido a su amplia gama de propiedades y a su bajo costo de producción, la utilización de los plásticos sintéticos ha adquirido gran popularidad llegando a sustituir a otros materiales en los ámbitos doméstico, agrícola, industrial y comercial (Goddard, 1990; Avella y col., 2001). Más allá de sus beneficios el empleo masivo de estos plásticos sintéticos trae algunos inconvenientes:

- i) el impacto ambiental producido a lo largo de su ciclo de vida en el que debe considerarse el consumo total de materias primas no renovables, la energía proveniente de recursos fósiles consumida en la producción y transporte, las emisiones de gases que contribuyen al efecto invernadero (CO_2 , CH_4 y N_2O) (Zhang y Mittal, 2010);
- ii) su incierta disponibilidad y precio futuro. Al ser el petróleo un recurso no renovable, la evolución y producción sostenida de estos materiales está condicionada y por ende se estima que su precio continuará incrementándose;
- iii) en general, los materiales plásticos sintéticos son altamente resistentes a la degradación, lo que conlleva a que se acumulen sobre la superficie terrestre, constituyendo un serio problema ambiental mundial relacionado con la contaminación del aire y fuentes de agua, entre otros (Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009). Algunas posibles soluciones a este problema podrían ser acumularlos en lugares específicos, incinerarlos o reciclarlos (Weber, 2002). La acumulación en lugares específicos no es una solución real, además de que con el crecimiento de las sociedades es difícil encontrar lugares para acumularlos. 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). Si bien el reciclado sería la opción más amigable con el medio ambiente, requiere mucho trabajo y energía ya que implica

remover los plásticos, clasificarlos, lavarlos, secarlos, triturarlos y recién después reprocesarlos, y en consecuencia el proceso en muchos casos no es rentable (SinhaRay y Bousmina 2005; Marsh y Bugusu, 2007).

Estas problemáticas muestran claramente que resulta prioritario desarrollar materiales poliméricos alternativos que no impliquen el uso de componentes tóxicos o nocivos en su fabricación, y que puedan reemplazar a los sintéticos al menos en algunas aplicaciones. Por estas razones, desde las últimas décadas el desarrollo de materiales biodegradables ha sido un gran desafío (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).

1.2. Bioplásticos

Actualmente los esfuerzos en investigación se focalizan en desarrollar nuevos materiales biodegradables a partir de fuentes renovables para reemplazar a los polímeros sintéticos ampliamente utilizados. Los bioplásticos tienen al menos alguna de estas características requeridas: son biodegradables y/o se obtienen a partir de fuentes renovables. La Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM) define a un material biodegradable a aquel que puede descomponerse en dióxido de carbono, metano, componentes inorgánicos o biomasa y puede medirse mediante ensayos estándar durante un determinado período de tiempo (ASTM D6400-99, 2002).

Basándose en su origen, los bioplásticos pueden clasificarse en tres grupos (Figura 1.1) (Reddy y col., 2013):

i) Bioplásticos basados en recursos renovables: aquellos que se sintetizan en forma natural por las plantas y los animales, o que son totalmente sintetizados a partir de recursos renovables por métodos químicos (como los ácidos poliláctico y poliglicólico, PLA y PGA respectivamente) o biológicos (como los polihidroxicanoatos o PHAs, y la celulosa bacteriana) (Sudesh y Iwata, 2008).

ii) *Bioplásticos basados en el petróleo*: estos polímeros se sintetizan a partir de recursos del petróleo, pero son biodegradables. La policaprolactona (PCL), el poli-(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT), los poli-(ésteres de amida) (PEAs) y los poli-(succinato-co-adipato de butileno) (PBSA) se incluyen en esta categoría.

iii) *Bioplásticos basados en recursos mixtos*: preparados a partir de combinaciones de monómeros de base biológica o derivada del petróleo; incluyen polímeros tales como poli-(tereftalato de trimetileno) (PTT), biomateriales termoestables y mezclas de base biológica.

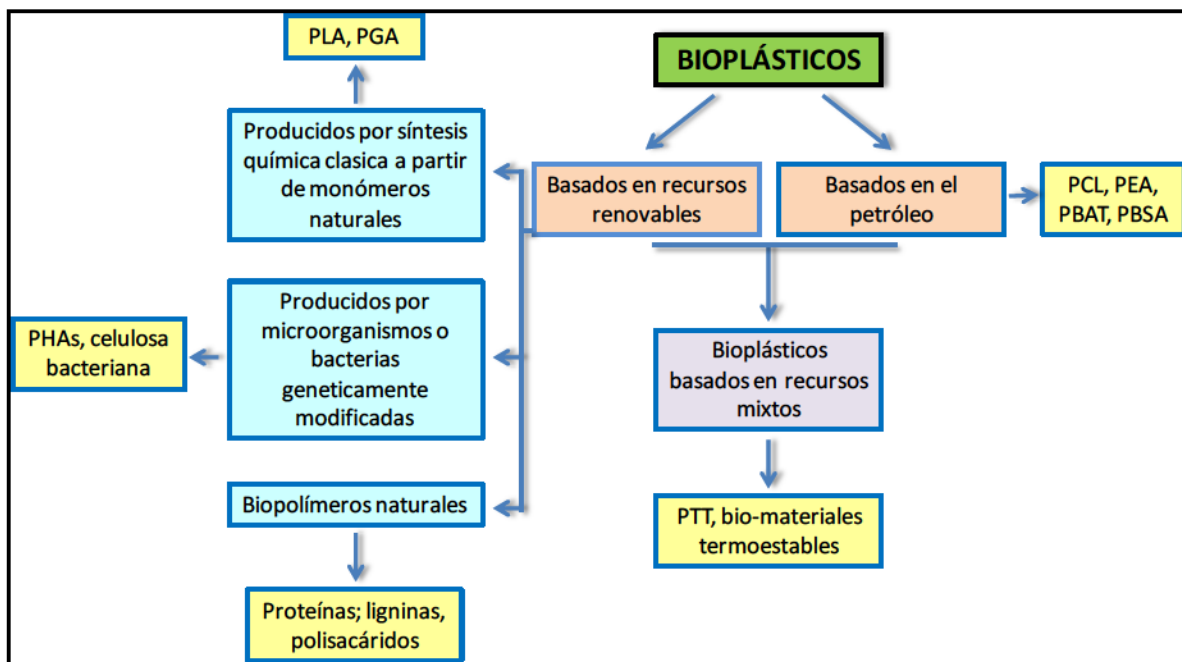


Figura 1.1. Clasificación de los bioplásticos en función de su origen o su método de producción (Reddy y col., 2013).

El hecho de que un material se obtenga a partir de recursos renovables no implica necesariamente que sea biodegradable, y viceversa. La combinación de ambas características es lo que hace al gran interés en esta área. Los *bioplásticos basados en recursos renovables* antes mencionados son a la vez biodegradables y renovables. Se pueden clasificar en tres categorías de acuerdo con el método de producción (Figura 1.1):

- *Polímeros producidos por síntesis química clásica a partir de monómeros naturales*: entre estos polímeros, los más estudiados son: el ácido poliláctico (PLA), preparado a partir de la

polimerización de ácido láctico que se produce por la fermentación de hidratos de carbono; y el ácido poliglicólico (PGA) sintetizado a partir de ácido glicólico. Desde un punto de vista comercial, el PLA es un material interesante ya que tiene buenas propiedades mecánicas, es transparente y biodegradable; sin embargo, el nivel de producción industrial es costoso en comparación con los materiales termoplásticos más utilizados (van Tuil y col., 2000; Bohlmann, 2005).

- *Polímeros producidos por microorganismos tal como se encuentran en la naturaleza o bacterias modificadas genéticamente*: este grupo está constituido por los poliésteres producidos por una amplia variedad de microorganismos como fuente de almacenamiento de carbono y energía (Suriyamongkol y col., 2007). Entre ellos, los polímeros más conocidos son los polihidroxicanoatos, entre los cuales los más estudiados son los polihidroxibutiratos (PHB). Hay otros polímeros producidos por microorganismos que están siendo estudiados en la actualidad, tales como la celulosa bacteriana, entre otros. Es de destacar que los costos de producción de estos polímeros son todavía altos.

- *Biopolímeros naturales*: esta categoría comprende los polisacáridos (derivados de celulosa, alginato, pectina, almidón, quitosano, carragenina, agar y gomas), ligninas y proteínas (proteína de soja, trigo, gluten de trigo zeína de maíz, gelatina, suero de leche, caseína y queratina, entre otros) que son de origen vegetal o animal. Todos estos compuestos contienen enlaces hidrolizables, una propiedad que los hace muy susceptibles a la biodegradación por las enzimas hidrolíticas que producen los microorganismos. Esta característica tiene un gran impacto en el rendimiento y la durabilidad de estos materiales cuando se almacenan en condiciones de alta humedad (Song y Zheng, 2014).

1.3. Proteínas como biopolímeros

Entre los biopolímeros biodegradables y renovables se encuentran las proteínas. La función de estos polímeros naturales es aportar estructura y actividad biológica a plantas y animales. Están constituidas por aproximadamente 20 aminoácidos, que además de tener los grupos α -amino y α -carboxilo involucrados en las uniones peptídicas, presentan una cadena lateral con diferentes grupos funcionales que le dan un carácter distintivo (Mauri y Añón, 2012). La

mayoría de las proteínas están constituidas por 100-500 aminoácidos. Dependiendo del orden que se unan los aminoácidos para formar la cadena polipeptídica (estructura primaria), 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 electrostáticas 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). 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, recubrimientos, etc. (Damodaran y Paraf, 1997; Denavi y col. 2009; Mauri y Añón, 2012; Song y col., 2011). Se sabe que la conformación nativa de las proteínas deriva de su estructura secundaria y terciaria y de las interacciones que establecen con el medio. Esta conformación es por lo tanto frágil y modificable por variables tales como temperatura, pH, fuerza iónica, constante dieléctrica del medio, presión, tratamientos mecánicos, radiación, etc. La modificación de la conformación de la proteína tiene un impacto positivo o negativo directo sobre sus propiedades funcionales y puede constituir una vía para producir materiales con distintas propiedades (Gennadios, 2002).

La diversidad de proteínas susceptibles de ser evaluadas en la producción de biopolímeros es muy alta y al elevado número de factores antes mencionados se suma la diversidad biológica que permite contar con polipéptidos con características muy diferentes. En las últimas décadas han sido estudiadas numerosas proteínas de origen animal (caseínas, proteínas del suero de leche, albúminas, colágeno, gelatina, queratina y proteínas miofibrilares) y vegetal (soja, gluten de trigo, zeínas, de girasol, algodón, amaranto, maní, arroz, arveja, sorgo, pistacho y lupino, etc.) por su capacidad de formar bioplásticos (Dangaran y col., 2009; Denavi y col., 2009; Zhang y Mittal, 2010; Pérez-Gago, 2012; Salgado y col., 2013; Echeverría y col., 2014). De todas ellas, las que se extraen 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 y se encuentran altamente disponibles en nuestro país.

1.3.1. Proteínas de soja

La soja (*Glycine max*) pertenece a la familia de las Leguminosas y sus semillas contienen aproximadamente un 40% de proteína. Entre las proteínas de soja se han identificado dos fracciones principales: albúminas (solubles en agua) y globulinas (solubles en soluciones salinas). La fracción globulinas representa el 80% de la proteína total y son proteínas de almacenamiento, solubles a pH > 8 que precipitan a pH 4,5 (pI), y presentan un bajo contenido de metionina y cisteína. Estas proteínas de almacenamiento con estructura globular se encuentran en cuerpos proteicos y se hidrolizan durante la germinación (Nielsen, 1985 a; Zhang y Mittal, 2010).

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 soluble a pH 4,5 y presenta bajo peso molecular (8-20 kDa); se compone principalmente de inhibidores de tripsina (proteasas Bowman-Birk, de 7,8 kDa, y Kunitz de 21,5 kDa), y además de citocromo c, α -conglucina y proteasas (Wolf, 1970). La globulina 7S (35% de las proteínas) está compuesta por lectinas (o hemaglutininas), lipoxigenasa, amilasa y β y γ -conglucinas (Nielsen, 1985). La globulina 11S (35% del total de proteínas) está compuesta por glicinina. La fracción 15S (10% del total de proteínas) contiene agregados de 11S (Wolf, 1970). Los aislados proteicos de soja contienen principalmente globulinas 7S y 11S. La β -conglucina (7S) es una glicoproteína compleja que exhibe polimorfismo en las subunidades que la componen. Se trata de un trímero con una masa molecular de 180-200 kDa, formada por tres polipéptidos diferentes, designados α , α' y β (68, 72 y 52 kDa respectivamente), manteniéndose unidos por enlaces no-covalentes (Thanh y Shibasaki, 1976 y 1978). Por el otro lado, la glicinina (11S) posee una estructura cuaternaria compleja, organizada en hexámeros $([AB])_6$ de 320-380 kDa compuestos por dos trímeros asociados por interacciones hidrofóbicas. Se han identificado cinco subunidades mayoritarias AB (de 58-69 kDa) que conforman la estructura hexamérica, manteniéndose unidas mediante interacciones no-covalentes. Están formadas por un polipéptido ácido (polipéptido A, de 30 kDa), y un polipéptido básico (polipéptido B, de 30 kDa) enlazados por un enlace disulfuro (Nielsen, 1985; Staswick y col., 1984; Utsumi y Matsumura, 1997).

Las proteínas de soja se encuentran disponibles comercialmente en tres formas que difieren en el contenido proteico, la harina de soja (\approx 50-59% de proteína), los concentrados (65-72% de proteína) y los aislados proteicos (SPI, \geq 90%) (Pérez-Gago, 2012). Es posible obtener estos productos proteicos a partir de la torta residual de la industria aceitera (empleada

mayoritariamente para alimentación animal), lo que implicaría un mejor aprovechamiento de este subproducto (Remondetto y col., 2002). Esto convierte a las proteínas de soja en una materia prima interesante para la formulación de materiales biodegradables de gran disponibilidad y menor costo en comparación a otras fuentes de proteínas (Rouilly y Rigal, 2002; Zhang y Mittal, 2010; Song y col., 2011).

Los concentrados de proteína son generalmente obtenidos por técnicas que procuran eliminar los componentes no proteicos, principalmente los hidratos de carbono. Para aumentar los contenidos de proteína se emplean soluciones alcohólicas 60-80% v/v, o agua a un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas (pI 4,5 para las de soja) con el fin de minimizar la pérdida de proteína por solubilización (Vioque y col., 2001).

Por su parte, los aislados proteicos se obtienen a través de la solubilización de las proteínas en soluciones salinas y/o a pH alejado de su punto isoeléctrico, realizándose su posterior concentración por ultrafiltración o por precipitación isoeléctrica. Posteriormente se realizan procesos de secado hasta obtener polvos ricos en proteína (Vioque y col., 2001). Estos tratamientos pueden afectar el valor nutricional del producto final, así como sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (Pérez-Gago, 2012). El mayor contenido proteico de los aislados hace que presenten una mejor capacidad para formar películas biodegradables (Netrevali y col., 2007).

1.4. Películas proteicas

La formación de películas de matriz proteica requiere de una serie de etapas que implican:

- i) la ruptura, por procesos físicos o químicos, 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;
- ii) la disposición y orientación de las cadenas proteicas móviles a la forma deseada;
- iii) la formación de una nueva red tridimensional estabilizada por interacciones inter e intramoleculares del tipo covalentes (como enlaces disulfuros u otras formas de entrecruzamiento) y/o no covalentes (hidrofóbicas, electroestáticas e iónicas, de van der Waals y puentes de hidrógeno) (Mauri y Añón, 2012).

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, y otro seco basado en las propiedades termoplásticas de las proteínas a bajas concentraciones de agua (Cuq y col., 1997; Guilbert y Cuq, 2005).

1.5. Propiedades de las películas proteicas

Las propiedades de las películas proteicas están determinadas por su microestructura, la cual varía dependiendo de la composición proteica inicial y de la metodología utilizada para su obtención (Denavi y col., 2009). La estructura de la proteína 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 físicoquímicas, mecánicas y de barrera (Mauri y col., 2006 y 2008; Salgado y col., 2010). Cuando se obtiene una película en base a proteína, a partir de un método húmedo o seco, la eliminación de agua durante el secado genera que las proteínas interactúen entre sí para formar una matriz generalmente quebradiza; en este sentido, es necesario considerar el uso de plastificantes que se añaden comúnmente para disminuir la fragilidad (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008; Song y col., 2011; Vieira y col., 2011; Oz y Ulukanli, 2012). Los plastificantes más comunes utilizados en películas en base a biopolímeros incluyen agua, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa, polietilenglicol, ácidos grasos y monoglicéridos (Sothornvit y Krochta, 2005). El agregado de estos compuestos provoca una disminución de la interacción entre las cadenas peptídicas, y como consecuencia de ello se produce una disminución de la Temperatura de transición vítrea (T_g) 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 (Gennadios, 2002; Orliac y col., 2003; Audic y Chaufer, 2005, Turhan y col., 2007; Cao y col., 2009; Andreuccetti y col., 2009). Los plastificantes hidrófobos, tales como ésteres de citrato también están siendo estudiados (Andreuccetti y col., 2009).

Por otro lado, existe la posibilidad de emplear agentes entrecruzantes en las formulaciones de los materiales proteicos. Los entrecruzantes químicos (por lo general aldehídos de bajo peso molecular como formaldehído, glioxal, y glutaraldehído) reaccionan con los grupos amino y sulfidrilo 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 la permeabilidad al vapor de agua (Galiotta y col., 1998; Vaz y col. 2003; Audic y Chaufer, 2005; Tang y col., 2005).

Es posible modificar la funcionalidad de las películas proteicas sometiendo a las proteínas a distintos tratamientos (químicos, físicos y/o enzimáticos) previamente, durante o luego que se formaron las películas, los que inducen cambios estructurales de la matriz, y en consecuencia en sus principales propiedades:

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). Se sabe que el tratamiento térmico induce reacciones de desnaturalización de las proteínas de soja, siendo más sensible a la acción de la temperatura la fracción β -conglucina que la glicina. También han sido detectadas reacciones de disociación y, dependiendo de la concentración de proteínas presentes durante el tratamiento térmico, reacciones de agregación (Hermansson, 1978; Yamauchi y col., 1991; Sorgentini y col., 1995). Por su parte el tratamiento de estas proteínas en medio ácido conduce a la desnaturalización y disociación selectiva de glicina, sufriendo un menor efecto la β -conglucina (Koshiyama, 1972; Wagner y col. 1996; Puppo y Añón, 1999). El tratamiento combinado temperatura-medio ácido induce modificaciones adicionales tales como hidrólisis y desamidación (Matsudomi y col., 1985; Wagner y Guéguen, 1995). Todos estos cambios afectan de manera pronunciada las propiedades funcionales que pueden exhibir las proteínas. Ha sido demostrado que los cambios estructurales sufridos por las proteínas de soja, indicados anteriormente, afectan su solubilidad, capacidad de absorción de agua, viscosidad, capacidad de emulsificación y de formación de espumas (Wagner y col., 1996, Kato y Nakai, 1980). 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 solubilidad que sobre la permeabilidad al vapor de agua.

ii) *Modificación de las condiciones de procesamiento:* cambios en las condiciones de proceso pueden conducir a la obtención de materiales con distintas propiedades. Por ejemplo, durante el secado de las películas, la humedad relativa (HR) del ambiente afecta el flujo de vapor de agua desde la dispersión filmogénica pudiendo influenciar el tipo y la proporción de interacciones entre cadenas de proteínas (Denavi y col., 2009). Foulk y Bunn (2001) observaron que el aumento en la temperatura de termocompresión empleada incrementó la resistencia a la tracción y redujo la permeabilidad al vapor de agua de películas de soja acetiladas.

iii) *Aplicación de tratamientos físicos y químicos posteriores a la formación de las películas:* el curado (tratamiento térmico) afecta sensiblemente las propiedades de las películas proteicas, 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. Tratamientos combinados de alta temperatura y alta presión aumentan la resistencia mecánica de películas de soja (Kim y col., 2002).

Comparados con los materiales plásticos sintéticos, los materiales proteicos presentan excelentes propiedades barrera a gases (en particular al O₂), a los lípidos y a los aromas; pero comúnmente no muestran propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua satisfactorias para aplicaciones prácticas debido a su inherente hidrofiliidad, empobreciéndose estas propiedades en condiciones de alta humedad (Krochta 1997; Cuq y col., 1998; Weber, 2000; Gennadios, 2002; Bourtoom, 2008 y 2009; Dangaran y col. 2009; Zhang y Mittal, 2010). En particular, las propiedades mecánicas de los materiales proteicos son generalmente objeto de estudio ya que la importancia de esta propiedad radica en que una película biodegradable debe soportar la tensión normal encontrada durante su aplicación (en envasado de alimentos o usos agrícolas, por ejemplo) y posterior manipulación para mantener su integridad y propiedades barrera (Bourtoom, 2008). En lo que respecta a la susceptibilidad al agua que presentan las

películas proteicas, debido 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 mayormente utilizados. El aumento de la resistencia al agua de estos materiales constituye uno de los objetivos más buscados en esta área de investigación.

Respecto a las potenciales aplicaciones en *packaging* de alimentos, la característica más beneficiosa de los materiales proteicos reside en su comestibilidad y su biodegradabilidad. Para poder mantener la primera de dichas características, todos los componentes (proteínas, plastificantes y otros aditivos) empleados en la formulación de las películas deben ser ingredientes de grado alimentario. Asimismo los procesos de fabricación deben ser apropiados para la elaboración de alimentos (Krochta, 2002). Para que un material sea biodegradable, sus componentes deben ser biodegradables. Es importante además que los productos de degradación sean ambientalmente seguros (de Vlieger, 2003). La cinética de biodegradación del material dependerá del tipo de proteína (peso molecular, estructura) y de los aditivos usados (por ejemplo, plastificantes, refuerzos, etc). De todas maneras, las proteínas se sitúan entre los polímeros de más rápida degradación, no habiéndose observado efectos tóxicos de las mismas, ni de sus metabolitos al emplear ensayos de inhibición microbiana.

1.6. Estrategias actuales en investigación para ampliar la funcionalidad y aplicabilidad de las películas proteicas

La aplicación gradual de leyes que propendan al uso de materiales biodegradables y el incremento en el interés de los consumidores de emplear productos que sean amigables con el ambiente pueden traccionar en sentido de incrementar la difusión de películas proteicas (Petersen y col., 1999). Si bien los materiales de base proteica presentan potencial, existen diversos aspectos que aún deben ser resueltos para aumentar su difusión y que son foco de investigaciones en la actualidad:

- avanzar en el procesamiento de estos materiales a mayor escala;
- obtener materiales con mejoras en sus propiedades (ej. compuestos, nanocompuestos, activos);
- explorar nuevas aplicaciones específicas para este tipo de materiales.

1.6.1. Procesamiento de los materiales proteicos

Como se mencionó anteriormente, los materiales proteicos pueden obtenerse a partir de procesos húmedos y secos.

- *Procesos húmedos*: estos procesos son utilizados principalmente a escala laboratorio e involucran comúnmente la disposición de una solución o dispersión proteica sobre un molde o soporte seguida de la evaporación del solvente (Guilbert y Cuq, 2005; Hettiarachchy y Eswaranandam, 2005). Estos procesos tienen varias limitaciones que incluyen el pequeño tamaño y la baja capacidad de producción, los tiempos largos de proceso, 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, 2012). 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 semicontínuo, como el caso del *tape casting* o *spread coating* (Kozempel y Tomazula, 2004; Larotonda, 2007; de Moraes y col., 2013). Además esta técnica es empleada generalmente para recubrir otras superficies, como 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. En estos procesos se combinan altas temperaturas, presiones, y 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, 2012). La temperatura y el esfuerzo de corte provocan una gran reestructuración del material proteico. 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).

Resulta importante conocer el comportamiento reológico de las proteínas en las condiciones requeridas por los procesos secos. Las propiedades viscoelásticas y de flujo de algunas proteínas han sido extensamente estudiadas, pero existen pocos trabajos determinando la viscosidad de las proteínas fundidas. En general la dependencia de la viscosidad de la proteína con la temperatura, el esfuerzo de corte y el contenido de plastificante parece ser similar a la del almidón termoplástico (Redl y col., 1999b; Morgan y col., 1983; Della Valle y col., 1998). La principal diferencia surge de la potencialidad de la proteína de entrecruzarse o reticularse de manera termoestable por lo que se observa una dependencia compleja de la viscosidad de la proteína con la historia tiempo-temperatura y el esfuerzo de corte. La historia térmica estaría relacionada con la polimerización de proteínas, mientras que la historia del esfuerzo de corte sería relevante para el proceso de depolimerización (Mauri y Añón, 2006). Así por ejemplo, cuando se plastifica gluten de trigo con glicerol se forma una fase maleable que se asemeja a una estructura de sólido viscoelástico con un comportamiento pseudoplástico (Pommet y col., 2005). Las propiedades reológicas de gluten plastificado muestran que los principios de superposición tiempo-temperatura se pueden aplicar a este tipo de sistemas (Redl y col., 1999a). Sin embargo, el rango de temperatura en el que es válido este principio es restringido, debido a que el polímero se vuelve reactivo a temperaturas superiores a 60 °C induciéndose reacciones de entrecruzamiento (Lefebvre y col., 2000; Domenek y col., 2002).

Si bien el moldeo por compresión es valioso por su simplicidad y capacidad de producir productos de gran tamaño, los procesos de extrusión e inyección son los métodos preferidos para la producción envases. Estas tecnologías permiten obtener, por ejemplo, materiales compuestos, películas para usos agrícolas, u objetos moldeados tales como contenedores desechables de alimentos, aislantes térmicos, bolsas de residuos, macetas y bandejas, entre otros. Si bien el uso de estas tecnologías para la formación de materiales a partir de proteínas de girasol, soja, gluten, del suero de leche y miofibrilares ha sido estudiado (Orliac y col., 2002 y 2003; Micard y col., 2001; Cuq y col., 1998; Foulk y Bunn 2001; Mungara y col., 2002), su aplicación todavía no ha sido explotada comercialmente.

Las condiciones y técnicas de procesamiento determinan las propiedades de las matrices proteicas resultantes y con ello de su comportamiento (Debeaufort y col., 1998; Denavi y col., 2009). En este sentido, resulta fundamental seguir avanzando en investigación en el análisis de estas técnicas de procesamiento. En este trabajo de Tesis se intentará avanzar en las técnicas de procesamiento mediante técnicas húmedas.

1.6.2. Materiales compuestos de matriz proteica

La formación de materiales compuestos propende a 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. Se han estudiado distintos tipos de materiales compuestos a partir de:

-*mezcla de proteínas de distinto origen* (Cao y col., 2007; Denavi y col., 2009; Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2009; Monedero y col. 2010);

-*mezclas de proteínas con otros polímeros (blends)*: varios autores han estudiado la formación de películas mediante mezclas de proteínas con otros polímeros, ya sea naturales o sintéticos con el interés de mejorar las propiedades mecánicas y/o de barrera, así como facilitar el procesamiento de las películas proteicas. Así se ha estudiado la formación de materiales a partir 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; Arvanitoyannis y col., 1998), metilcelulosa (Zuo y col., 2009);

-*mezclas de proteínas con polímeros biodegradables sintéticos*: como ácido poliláctico (Rhim y col., 2007), policaprolactona (Choi y col., 2006; Hong y col., 2009), polivinilalcohol (Maria y col., 2008; Limpan y col., 2010; Su y col., 2010) e incluso a partir de proteínas y polímeros sintéticos como polietileno y polipropileno (Hong y Krochta, 2006);

-*mezclas de proteínas con lípidos*: que intenta reducir la susceptibilidad al vapor de agua. Esto da origen a dos tipos de materiales compuestos. El primer grupo son los materiales *laminados*, en los cuales el lípido constituye una capa separada de la proteica. Estos materiales en general se forman depositándolos sobre la película proteica a partir del fundido o a partir de una solución que lo contenga (también llamados bicapa). El tipo restante de materiales compuestos de proteínas y lípidos son los denominados *emulsionados*, en los que la fase lipídica se encuentra dispersa en la matriz proteica. Las ceras han sido las que han contribuido en mejor manera a mejorar las propiedades de los materiales proteicos (Debeaufort y col., 2000; Quezada Gallo, 2000). Denavi y

col. (2005) estudiaron la formación de películas compuestas en base a proteínas de soja y cera de abeja, bicapa y emulsionadas. Los autores observaron que si bien las películas emulsionadas se formaban en una sola etapa, las bicapa presentaron mejores propiedades mecánicas y de 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 y sus mezclas (Atares y col., 2010; Monedero y col., 2009; Zahedi y col., 2010; Salgado y col., 2013);

–adición de refuerzos: las fibras celulósicas naturales, como las de lino, yute, ramio, cáñamo, sisal, y ananá, han atraído la atención como refuerzos para materiales compuestos, debido a que poseen un módulo específico relativamente alto, son renovables, livianas, biodegradables y tienen bajo costo (Bledzki y Gassan, 1999; Mohanty y col, 2000; Wambua y col., 2003). Se lograron mejorar las propiedades mecánicas y de barrera al combinar proteínas con fibras celulósicas largas, cortas y microcristalinas, orientadas o no (Liu y col., 2004 y 2005; Salgado y col. 2008; Pateau y col., 1994; Kumar y Zhang, 2009), con lignosulfonatos y lignina (Huang y col., 2003), e incluso con fibra de vidrio (Beg y col., 2005).

El área de materiales proteicos compuestos en investigación, si bien ha sido explorada tal como los antecedentes anteriormente mencionados lo indican, requiere aún de avances en investigación, priorizando a aquellos de naturaleza biodegradable obtenidos de recursos renovables, y aplicables en tecnologías de envasado de alimentos. Bajo estas premisas, algunos de ellos serán estudiados en este trabajo de Tesis.

1.6.3. Materiales nanocompuestos

Los materiales nanocompuestos son una nueva generación de materiales compuestos en los que el material de refuerzo tiene al menos una de las dimensiones en escala nanométrica (1–100 nm), por lo que se los denomina nanorefuerzos. Es de esperar que los materiales nanocompuestos resultantes exhiban mejores propiedades mecánicas y de barrera, estabilidad térmica, resistencia química y apariencia superficial (Giannelis, 1996), aún con niveles de carga bajos (\approx 5-10%), inferiores a los usados en la formación de materiales compuestos tradicionales. Este comportamiento es posible debido al gran área superficial que presentan las nanopartículas (Rhim y Ng, 2007; Zhao y col., 2008), que le permiten interaccionar fuertemente con la matriz

polimérica. 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 en mejoras en el comportamiento barrera para iguales dimensiones.

Una de las clasificaciones más empleadas de los nanorefuerzos es la que tiene en cuenta el número de dimensiones en el rango nanométrico de los materiales de relleno dispersados (Condés y col., 2015). Bajo este criterio, se pueden clasificar en:

i) *nanopartículas isodimensionales*: cuando tres dimensiones son del orden de los nanómetros, como las nanopartículas esféricas de sílice, *nanoclusters* semiconductores y las nanopartículas metálicas (Vladimirov y col., 2006; Herron y Thorn, 1998). Estas nanopartículas muestran generalmente un efecto refuerzo moderado debido a su baja relación de aspecto, pero son usadas para mejorar la resistencia a la inflamabilidad y para disminuir la permeabilidad y/o los costos del material nanocompuesto resultante;

ii) *partículas alargadas*: cuando están presentes dos dimensiones en la escala nanométrica y una tercera dimensión es más grande, como los nanotubos de carbono o las nanofibras de celulosa, que se han estudiado ampliamente como rellenos de materiales nanocompuestos otorgando propiedades excepcionales (Calvert, 1997; Siqueira y col., 2010);

iii) *partículas en capas*: cuando sólo poseen una dimensión en el intervalo nanométrico. En este caso, la carga está presente en forma de láminas de uno a unos pocos nanómetros de espesor y cientos de miles de nanómetros de largo, como los cristales o arcillas en capas (Ojijo y Sinha Ray, 2013).

Como las dimensiones alcanzan el nivel nanométrico, las interacciones entre las interfaces son en gran medida más íntimas lo que puede provocar una importante mejora en las propiedades de los materiales. En este contexto, la relación área de superficie-volumen de los refuerzos empleados en la preparación de materiales nanocompuestos es crucial para entender sus relaciones estructura-propiedad (McCrum y col., 1996). En general, la relación área de superficie-volumen es mayor para los nanorefuerzos laminados y las nanofibras, lo que explica que pueden producir un efecto refuerzo superior al de las nanopartículas isodimensionales. A su vez, entre estos dos nanorefuerzos, los laminados poseen mayor área, lo que sugiere que las nanofibras son

más fácilmente incorporadas en un material nanocompuesto al tener menos superficie de contacto que los laminados (Gusev, 2001).

La diversidad de nanorefuerzos existentes es muy elevada. Se han incluido en matrices biopoliméricas el uso de nanopartículas metálicas, nanoarcillas, nanotubos de carbono, nanopartículas derivadas de polisacáridos (como las nanopartículas de almidón y las nanofibras de celulosa), nanocristales de distinto origen, el grafeno, y nanorellenos orgánicos, entre otros (Ojijo y Sinha Ray, 2013; Famá y col., 2011; Pan y col., 2011; Hong y col., 2005; Mihindukulasuriya y col., 2014). Al igual que en los materiales compuestos, el área de materiales nanocompuestos está en intensa investigación y los trabajos se focalizan principalmente en formular materiales eco-compatibles. Algunos de los refuerzos de interés siguiendo esa línea son las nanoarcillas y los derivados de polisacáridos. A continuación se describen con mayor detalle las nanoarcillas (particularmente la montmorillonita, MMT), y los nanorefuerzos derivados de la celulosa.

i) *Montmorillonita*: la montmorillonita (MMT) es una nanoarcilla abundante, económica y amigable con el medio ambiente. Ha sido empleada en varios estudios en los que su agregado ha logrado mejorar la *performance* de materiales de matriz proteica de soja (Kumar y col., 2010; Echeverria y col., 2014), gluten (Tunc y col., 2007; Cho y col., 2010; Guilherme y col., 2010), proteínas de suero de leche (Hedenqvist y col., 2006) y gelatina (Rao, 2007). La principal razón por la cual estas nanoarcillas mejoran las propiedades de los polímeros son las interacciones superficiales fuertes entre la matriz polimérica y la carga (Chen y col., 2002). Están compuestas por capas de silicatos que generalmente tienen grosores del orden de 1 nm y grandes superficies (10-1000 nm), por lo que aún usando bajas proporciones de cargas al dispersarlos bien en la matriz se generan mayores superficies de contacto que otros compuestos convencionales.

ii) *Nanorefuerzos derivados de la celulosa*: los nanorefuerzos derivados de polisacáridos, y en particular de la celulosa, generan una buena alternativa para la formulación de materiales nanocompuestos (Lavoine y col., 2012). Dentro de estos nanorefuerzos, las nanofibras de celulosa (MFC), también conocidas como celulosa microfibrilada, han logrado mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de distintas matrices biopoliméricas (Pereda y col., 2010; Siqueira y col., 2010; Siró y col., 2010; Klemm y col., 2011; Lavoine y col., 2012; Abdul Khalil y col., 2014; Kumar y col., 2014; Mihindukulasuriya y col., 2014).

Varios autores han reportado para casi todo tipo de biopolímeros con la adición de diferentes nanopartículas, mejoras en las propiedades mecánicas, incrementando el módulo elástico y la resistencia a la rotura y disminuyendo la elongación a la rotura en ensayos de tracción. Por ejemplo, nanocompuestos de MMT y almidón o proteínas de soja, nanocilindros celulosa y PLA, nanotubos de carbono y PCL, o nanopartículas de almidón y caucho natural (Huang y Yu, 2006; Echeverría y col., 2014; Petersson y col., 2007; Chrissafis y col., 2007; Angellier y col., 2005a, 2005b y 2006). En cuanto a las propiedades de barrera de los nanocompuestos se ha encontrado reducir, en algunos casos en gran medida, las permeabilidades a los gases y al vapor de agua. La incorporación de nanorellenos, especialmente nanoarcillas y nanoalmidones en la matriz polimérica puede conducir a una mejora en esas propiedades de barrera (Sinha Ray y Okamoto, 2003 a y b; LeCorre y col., 2010). La misma se explica por un incremento en la trayectoria que deben recorrer las moléculas de gas para difundir a través de la matriz nanorellena. El esquema que se muestra en la **Figura 1.2** ilustra este efecto. A partir de esto se comprende que las propiedades de barrera de los materiales biopoliméricos nanocompuestos dependerán tanto de la relación de aspecto de los nanorellenos como de su orientación y dispersión en la matriz polimérica (Bharadwaj, 2001).

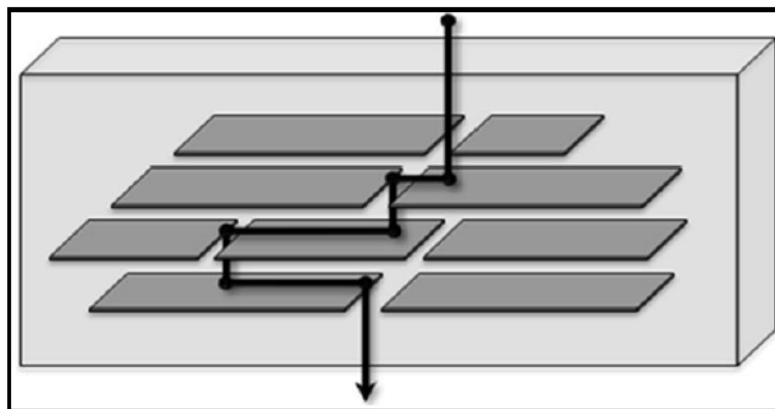


Figura 1.2. Representación del efecto barrera como un camino tortuoso que una molécula debe atravesar en un material nanocompuesto (Mihindukulasuriya y col., 2014).

Las cargas también tienen un efecto sobre la movilidad-cristalinidad de la cadena de la matriz de polímero que conduce a la reducción de la permeación. Por lo tanto, tanto los cambios de cristalinidad y la presencia de un camino tortuoso tienen que ser tomadas en cuenta al analizar el efecto de nanocargas en la permeabilidad de los nanocompuestos (Reddy y col., 2013). La mejora de la permeabilidad a los gases de nanocompuestos con arcillas depende en gran medida

del tipo de arcilla, de las dimensiones de las sus láminas y de la estructura de los nanocompuestos (Reddy y col., 2013). Las mejoras más significativas se asocian a arcillas exfoliadas en nanocompuestos. Estas mejoras en las propiedades de barrera al agua han sido reportados por ejemplo para nanocompuestos preparados a partir de almidón termoplástico y arcilla, acetato de celulosa y arcilla, o almidón y las nanofibras de celulosa (Park y col., 2003 y 2004; Dufresne y col., 2000). Mejoras para las propiedades de barrera al oxígeno debido la adición de nanocargas se han reportado para los diferentes sistemas nanocompuestos de bioplásticos, por ejemplo para PLA o PHB se han añadido nanoarcillas (Rhim y Ng, 2007; Thellen y col., 2005; Sánchez-García y Lagaron, 2010).

Las propiedades ópticas son también una característica importante de los polímeros. En general, los polímeros amorfos son transparentes en el rango visible (Trotignon y col., 1989). La incorporación de refuerzos en nano-niveles puede tener efecto significativo en las características de transparencia y opacidad de las películas. La adición de pequeñas cantidades de nanocargas podría mantener la transparencia del polímero a pesar de ser suficiente para generar una mejora significativa en otras propiedades (Bharadwaj y col., 2002).

Respecto a la biodegradabilidad de los materiales biopoliméricos nanocompuestos, el aumento o la conservación de la biodegradabilidad por la adición de nanocargas podría deberse a diferentes causas dependiendo de la naturaleza del material y de la nanocarga. Por ejemplo, Tetto y col. (1999) probaron la biodegradabilidad de los nanocompuestos de PCL y arcilla y observaron una biodegradabilidad mejorada que podría atribuirse a la función catalizadora de la arcilla orgánica durante el proceso de biodegradación. Sin embargo, Sinha Ray y col. (2003a y b) concluyeron que la biodegradabilidad de nanocompuestos de PLA y arcillas mejoró significativamente en comparación con el PLA puro, debido a la presencia de grupos terminales hidroxilados de borde en las capas de arcilla. En otros casos se ha descrito una disminución de la biodegradabilidad como consecuencia de la adición de nanocargas. Nanocompuestos preparados con poli-(succinato de butileno) o PBS y arcilla orgánica mostraron una disminución de la biodegradabilidad que se asoció con la mayor dificultad de los microorganismos de atacar estos materiales (Lee y col., 2002). Rhim y col. (2007) concluyeron que la disminución de la biodegradabilidad de los materiales nanocompuestos de arcilla orgánica-PBS se asoció a la actividad antimicrobiana del grupo amonio cuaternario presente en la arcilla modificada. Las nanopartículas pueden además tener efectos opuestos (degradación o la estabilización) dependiendo de las condiciones ambientales y de procesamiento.

La incorporación de nanopartículas en matrices de polímeros debe estar dirigida a lograr una buena distribución de las nanopartículas en la matriz polimérica superando así la tendencia de la aglomeración de estas partículas con gran área superficial. La dispersión de las nanopartículas dentro de la matriz polimérica durante el procesamiento depende de: (i) la afinidad química del polímero y las nanopartículas; y (ii) las condiciones de procesamiento. Para el caso de nanorefuerzos laminares, en particular montmorillonita las posibilidades de interacción del polímero con el nanorefuerzo pueden dar lugar a la formación de tres posibles tipos de nanocompuestos que se esquematizan para la misma en la **Figura 1.3**.

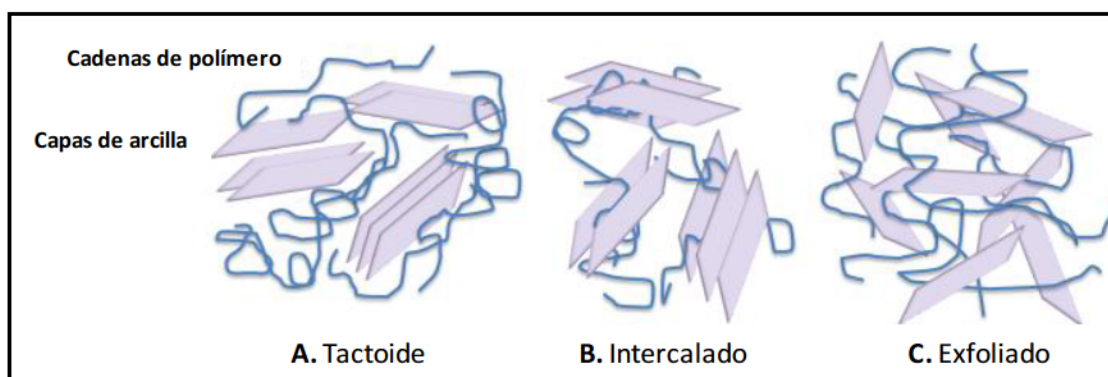


Figura 1.3. Diagrama de los tres posibles tipos de nanocompuestos formados por polímero-montmorillonita: tactoide, microcompuesto de fases separadas **(A)**; nanocompuesto intercalado **(B)**; nanocompuesto exfoliado **(C)** (Condés y col., 2015).

En general las mejoras en las propiedades se encuentran asociadas con un alto grado de intercalación-exfoliación del nanorefuerzo en la matriz biopolimérica. Aunque otras técnicas de preparación, como *electrospinning* y procesamiento en condiciones supercríticas han ganado recientemente su interés, hay tres técnicas principales para la preparación de nanocompuestos que permitirían obtener nanoestructuras intercaladas y/o exfoliadas (Ojijo y Sinha Ray, 2013):

i) *Intercalación en solución*: basado en un sistema disolvente en el que se dispersan el polímero y las nanopartículas. Típicamente, ambos componentes son hidratados por separado y se dispersan en el mismo o diferente disolvente antes de ser mezclados. A veces se incorporan técnicas de dispersión tales como el sonicado para favorecer la dispersión de nanopartículas. Finalmente, cuando se evapora el disolvente, las interacciones entre el nanorelleno y el polímero resultan en un nanocompuesto. 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, este método es difícil de aplicar en la industria debido los problemas asociados al uso de grandes volúmenes de solventes (Alexandre y Dubois, 2000; Beyer, 2002);

ii) *Intercalación in-situ*: en el que las nanopartículas se incorporan dentro de la solución conteniendo al monómero, seguido por la etapa de polimerización que se inicia ya sea mediante calor, radiación u otro iniciador;

iii) *Intercalación en fundido*: las nanopartículas se mezclan con la matriz de polímero en el estado fundido. El proceso consiste en calentar la mezcla por encima del punto de ablandamiento del polímero, de forma estática o bajo cizallamiento. Este método es seguro para el medio ambiente, ya que no requiere el uso de disolventes y es compatible con los procesos industriales actuales, tales como moldeo por extrusión e inyección. También permite el uso de biopolímeros inadecuados para la polimerización *in situ*, o que no pueden disolverse en las condiciones requeridas para dispersar las nanopartículas. Sin embargo, en el caso de los bionanocompuestos, la fuerza de cizallamiento mecánico o la temperatura aplicada durante el procesamiento pueden degradar ciertos biopolímeros y nanocargas orgánicos. Por ejemplo, se ha informado que si las condiciones no están bien controladas, el ácido poliláctico (PLA) puede sufrir degradación térmica, oxidativa e hidrolítica durante el procesamiento, lo que disminuye su peso molecular (Ojijo y Sinha Ray, 2013).

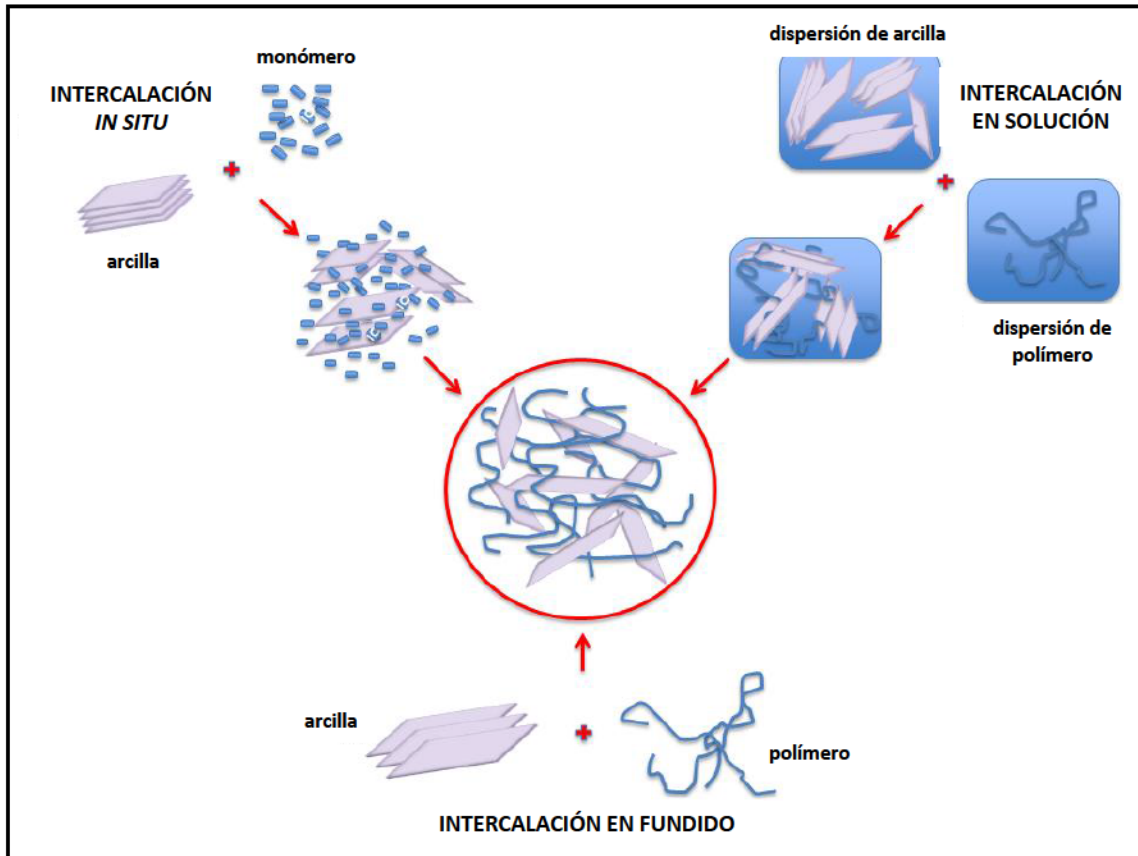


Figura 1.4. Técnicas principales para la preparación de nanocompuestos, en particular montmorillonita (Condés y col., 2015): polimerización *in situ*; intercalación en solución; intercalación en fundido.

La selección de cualquiera de las técnicas depende del tipo de biopolímero involucrado y en gran medida, de la nanopartícula en cuestión. Es esencial la optimización de las condiciones de procesamiento para tener nanopartículas bien dispersadas garantizando al mismo tiempo la integridad estructural y efectos adversos mínimos sobre de las mismas.

1.6.4. Películas activas

Las películas proteicas pueden actuar como vehículos de distintos aditivos que pueden otorgar una propiedad adicional. En *packaging* de alimentos, una película activa es aquella que además de poder contener a un alimento envasado, aporta a mejorar o mantener la calidad, estabilidad y seguridad del mismo mediante la interacción deliberada entre la película usada de envase o componentes de la misma con el alimento o su entorno. Para ello, se debe tener en cuenta además de las características físicas del alimento (si son sólidos, líquidos, secos, húmedos, grasos, magros, etc.), cuáles son los principales mecanismos involucrados en su deterioro (Brody y

col., 2001). Variables como la actividad acuosa (a_w), pH, temperatura, composición de la atmósfera del entorno, y vida útil podrían permitir diseñar películas activas para cada tipo de alimento.

Dependiendo de la naturaleza del aditivo incorporado, las películas activas resultantes pueden tener diferentes funciones. La acción de la película puede darse por contacto directo con el alimento, o bien por la liberación de compuestos en forma gaseosa. Dentro de los aditivos empleados, existen los que otorgan a las películas propiedades antimicrobianas (benzoatos, sorbatos, nisina, natamicina, timol, entre otros), o propiedades antioxidantes (como el butilhidroxitolueno (BHT) y butilhidroxianisol (BHA)) (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., 2009 a; Pintado y col., 2009; Rossi-Márquez y col., 2009; Zhang y col., 2010; Leerahawong y col., 2011, González y col., 2013). Se ha reportado también la incorporación de vitaminas, microorganismos probióticos, *flavors* y colorantes (Han y col., 2007; Gómez-Estaca y col., 2009 a; Giménez y col., 2012). Resulta interesante en este contexto, la potencial formulación de películas activas en las que estén presentes captoreadores de etileno y oxígeno, absorbedores y emisores de dióxido de carbono, removedores de humedad y de olores, emisores de olores, entre otros, aunque ésta es un área más reciente. En la actualidad se observa un renovado interés en la utilización de aditivos provenientes de fuentes naturales, como por ejemplo algunos compuestos fenólicos 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 (Oussalah y col., 2004; Güçbilmez y col., 2007; Gómez-Estaca y col., 2009 a y 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).

Los principales avances en el campo de las películas activas han logrado sugerir aplicaciones como materiales de envasado y/o recubrimientos en alimentos, en donde los aditivos incorporados podrían al ser retenidos en la superficie de los alimentos mejorando la estabilidad y la seguridad de los mismos (Freitas y col., 2013; Mehvar y col., 2014). En vegetales se ha estudiado por ejemplo la incorporación de sorbato de potasio en formulaciones de almidón aplicadas sobre frutillas para reducir el crecimiento microbiano (García y col., 1998). Otras investigaciones han

evaluado el uso de: recubrimientos de hidroxipropilmetilcelulosa con etanol, para inactivar *Salmonella montevideo* en tomates (Zhuang y col., 1996); enzimas antimicrobianas tales como la lisozima incorporadas en recubrimientos de quitosano para controlar *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* (Park y Zhao, 2004); aceites esenciales como antimicrobianos naturales (Novaes Azevedo y col., 2014). Swenson y col. (1953) mostraron que recubrimientos con pectato o zeína conteniendo butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) y ácido cítrico redujeron la rancidez de nueces; antioxidantes como el ácido ascórbico se han incorporado en recubrimientos comestibles para reducir el pardeamiento enzimático en champiñones trozados (Nisperos-Carriedo y col, 1992); recubrimientos de goma xántica conteniendo α -tocoferol mejoraron la calidad nutricional y redujeron los cambios en el color superficial de zanahorias *baby* peladas (Mei y col., 2002). También se han incorporado potenciadores de textura. Hernández-Muñoz y col. (2008) observaron que la adición de gluconato de calcio (1%) para la formulación de recubrimientos de quitosano aumentó la firmeza de frutillas refrigeradas. Si bien también pueden añadirse saborizantes, colorantes, nutrientes y compuestos bioactivos para mejorar la calidad sensorial de los productos, las publicaciones sobre estas aplicaciones son menos frecuentes (Park y Zao, 2004; Han y col., 2005).

Por otro lado, se ha observado que la presencia de los nanorefuerzos modifica las propiedades de transferencia a través de las matrices proteicas (Tunc y col., 2007). Teniendo en cuenta esta observación se podría pensar que los sistemas nanocompuestos podrían modular la liberación de moléculas activas (incorporadas a la formulación) debido a diferencias en la estructuración de la red de proteínas provocada por la presencia de esos refuerzos y al incremento de la tortuosidad del camino a recorrer, reduciendo la velocidad de difusión. Así, resulta interesante el estudio de sistemas de liberación controlada, ya que dependiendo del activo se podría realizar tratamientos prolongados o liberaciones iniciales, como sea necesario en cada caso. Por ejemplo, empleando materiales proteicos nanoreforzados y aditivados con diferentes principios activos, varios autores evidenciaron efectos moduladores en la liberación de los mismos a partir del agregado de nanoarcillas o fibras en las formulaciones (Mascheroni y col., 2010; Quilaqueo Gutiérrez y col., 2012; Giménez y col., 2012; Echeverría 2012). Otros estudios más recientes han resultado novedosos, como el de González y col. (2015) en donde se evaluó la liberación de timolol maleato (una droga de uso oftalmológico) a partir de materiales formados por proteínas de soja y distintas cantidades de un agente entrecruzante natural y no citotóxico (genipina), recubiertos y sin recubrir por ácido poliláctico. Estos autores realizaron evaluaciones *in*

vitro e *in vivo* (empleando conejos) de la liberación de la droga, y pudieron demostrar efectos de liberación en tiempos prolongados de 24 h en algunos tratamientos. Este tipo de estudios aplicados en sistemas de envase activo requieren que se sigan investigando para seguir avanzando en esta área, involucrando diferentes estrategias para lograr diseñar películas proteicas activas exitosas. Es importante destacar que la presencia de un activo determinado en una película empleada en un envase o como un recubrimiento, no necesariamente conducirá al éxito de la aplicación. Por lo tanto resulta necesario evaluar a los materiales en sistemas reales de producción y almacenamiento.

1.6.5. Materiales proteicos en *packaging* o envasado de alimentos

Las proteínas, especialmente aquellas de menor costo por ser extraídas de recursos agropecuarios renovables o de subproductos industriales, se muestran como una alternativa con potencial para suplantar a los materiales sintéticos no degradables especialmente en aplicaciones de vida corta en la que la tasa de utilización es elevada, como es el caso de los envases y/o recubrimientos de alimentos (Gennadios, 2002), o en aplicaciones no comestibles en donde la biodegradabilidad es un valorpreciado, como son los plásticos para la agricultura.

Las propiedades diferenciales que presentan los materiales formulados a partir de proteínas, aún sus aparentes desventajas, pueden ser utilizadas con diferentes fines. Así por ejemplo, la solubilidad en agua o la sensibilidad al agua de este tipo de materiales es una ventaja en la formulación de *sachets* solubles (menos perceptibles en la boca) o en la formulación de materiales activos donde la capacidad de embeber agua es usada para inducir un cambio drástico en las propiedades del material, o para liberar un compuesto activo (Ortiz y col., 2013). La alta selectividad a gases de las películas proteicas es particularmente interesante para el desarrollo de envases con atmósfera modificada destinados a empaques para quesos (para controlar la proliferación de la microflora) y para frutas y vegetales frescos (para controlar la velocidad de respiración) (Guilbert y col., 1996; Barron y col., 2002). Se ha mostrado que la aplicación de recubrimientos proteicos sobre algunos alimentos antes del frito, permite aumentar la retención de jugos y *flavors* naturales, mejorar la textura y apariencia, y principalmente reducir la migración de agua y la absorción de aceite, dándole una respuesta a los consumidores que demandan por productos fritos con bajo contenido de aceite y buenas características organolépticas (Rayner y col., 2000; Albert y Mittal, 2002).

Por otro lado, existen también numerosas aplicaciones potenciales en el campo no alimentario. En agricultura por ejemplo, las películas pueden ser empleadas como *mulching* (para evitar crecimiento de malezas en algunos cultivos) o para túneles bajos (por ejemplo para cultivos de frutillas), pero también como recubrimientos de semillas, o para la liberación de productos agroquímicos (Guilbert y Gontard, 1995). La aplicación de materiales biodegradables en agricultura intensiva, es de suma importancia debido a la dificultad que implica la gestión de residuos plásticos en las zonas rurales o donde se encuentran los invernaderos. Las formulaciones en base a proteínas, también podrían ser usadas en la industria del papel o del plástico, a través de la modificación de las propiedades de estos materiales por formación de recubrimientos proteicos sobre su superficie (Han y Krochta, 1999 y 2001).

2. OBJETIVOS

En este trabajo de Tesis se realizó:

- el estudio del uso de nanorefuerzos en conjunto con aditivos que otorgan alguna otra propiedad adicional:
 - i) nanoarcillas (MMT) y colorantes.
 - ii) nanofibras de celulosa y aceite esencial de clavo de olor con capacidad de activar a las películas con actividad antioxidante y antimicrobiana.

- el desarrollo de materiales proteicos y compuestos por *tape casting*, como técnica de escalado de procesos húmedos.

- la evaluación de algunas aplicaciones que surgen de aprovechar las desventajas que presentan estos sistemas para otros usos, por ejemplo la absorción de agua de las películas en base a proteína para facilitar la liberación de principios activos en tratamientos de alimentos en el envase.

En este marco se plantearon siguientes objetivos generales y particulares:

2.1. Objetivo general

Estudiar distintas alternativas para mejorar la funcionalidad y aplicabilidad de películas en base a proteínas de soja como envases de alimentos, combinando estrategias de formulación y procesamiento y analizando algunas aplicaciones específicas, donde las desventajas de los materiales para otros usos se aprovechan como aspectos de utilidad.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la influencia del agregado de montmorillonita (MMT) y colorantes a formulaciones en base a proteínas de soja sobre las propiedades físicas y químicas y el comportamiento en algunas condiciones particulares de uso (contacto directo con agua y bajo suelo) de las películas proteicas y nanocompuestas resultantes, obtenidas por *casting*.

- Evaluar la obtención de nanofibras de celulosa a partir de fibras de formio por tratamientos mecánicos (celulosa microfibrilada), determinar el efecto que causa su adición a matrices proteicas de soja y analizar la activación de los sistemas nanocompuestos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a través del agregado de aceite esencial de clavo de olor a las formulaciones.

- Analizar el procesamiento de películas proteicas y compuestas en base a proteínas de soja por *tape casting* como estrategia de escalado en la producción de estos materiales, evaluando la influencia de las condiciones de secado (temperatura y método de secado), del agregado de fibras celulósicas y de ceras emulsionadas sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes.

- Determinar la potencial aplicación de películas proteicas de soja como sistemas contenedores-liberadores de principios activos para llevar a cabo tratamientos de poscosecha en vegetales enteros o mínimamente procesados durante su transporte o distribución:

i) pads contenedores-liberadores de 1 metilciclopropeno (1-MCP, inhibidor de la acción de etileno) para extender la vida útil de frutos de tomate, y

ii) matrices liberadoras (generators) de dióxido de azufre (SO₂) por activación de las películas con sulfito de sodio para retrasar el pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas.

3. Películas proteicas de soja nanoreforzadas con montmorillonita y adicionadas con colorantes

3.1. Introducción

La montmorillonita (MMT) es un mineral arcilloso en capas que pertenece a la familia de los silicatos con capas 2:1 o filosilicatos (Grim y col., 1960). La estructura cristalina general de los filosilicatos consiste en dos capas donde una lámina octaédrica con un átomo 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 3.1). La sustitución isomórfica dentro de las capas (por ejemplo Mg^{+2} o Fe^{+2} en lugar de Al^{+3} en la lámina octaédrica, o Al^{+3} en lugar de Si^{+4} en la lámina tetraédrica) genera cargas negativas que se compensan con cationes alcalinos y alcalino térreos hidratados (por ejemplo Na^+ , K^+ o Ca^{+2}) situados en el interior del espacio interlaminar.

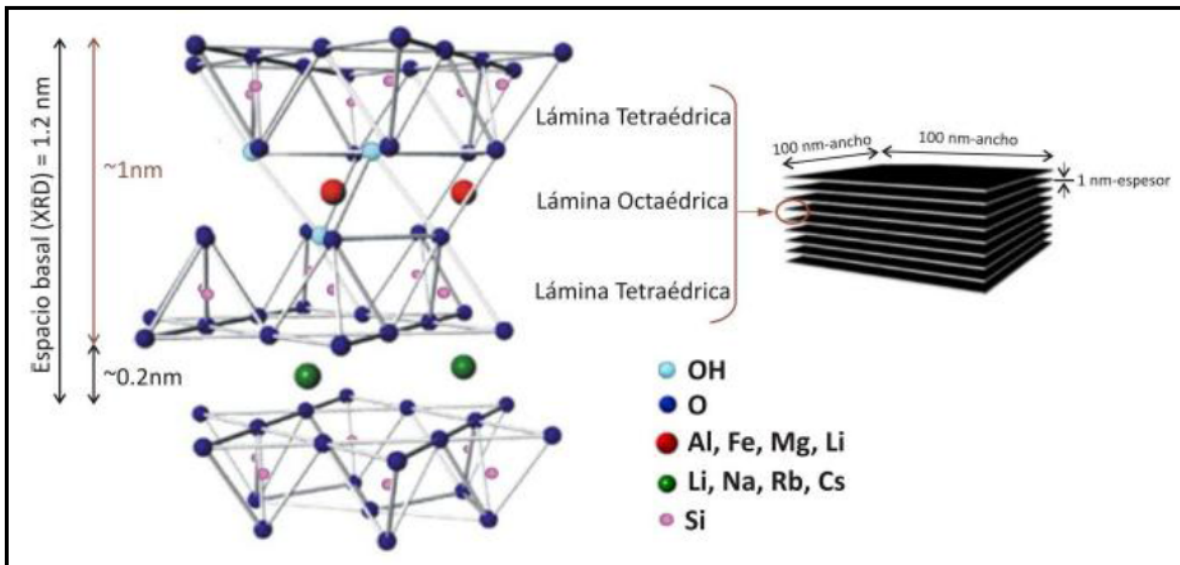


Figura 3.1. Estructura general de los 2:1 filosilicatos (Echeverría, 2012).

Superficialmente los filosilicatos poseen una moderada carga negativa conocida como capacidad de intercambio catiónico (CIC), que se expresa generalmente en meq/100 g. En los filosilicatos naturales, los cationes del espacio interlaminar son generalmente Na^+ o K^+ hidratados, mostrando propiedades hidrofílicas de superficie. En este estado natural, estos silicatos son más compatibles con polímeros de naturaleza hidrofílica, como las proteínas. En los casos en que se requiere la compatibilidad de este tipo de silicatos hidrofílicos con polímeros hidrofóbicos, existe la posibilidad de modificarlos a través de reacciones de intercambio iónico con cationes de alquilamonio, cationes surfactantes, etc. Estos cationes orgánicos disminuyen la energía superficial del silicato, logrando así un espaciado mayor entre las capas. Asimismo pueden contener grupos funcionales que reaccionan con el polímero mejorando la interacción polímero-silicato (Ray y Okamoto, 2003).

Como se describió en la introducción general, es posible obtener tres tipos de compuestos cuando el polímero y la arcilla se asocian: *tactoides o aglomerados* cuando el polímero es incapaz de intercalarse entre las capas de arcilla, obteniéndose un compuesto de dos fases con propiedades similares a las de un microcompuesto; *intercalados*, cuando 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 *exfoliados* cuando las capas de los silicatos son separadas en la matriz polimérica y la distancia promedio entre ellos depende del nivel de carga. Para el desarrollo exitoso de los nanocompuestos en base a polímero-arcilla hay que lograr un alto grado de intercalación-exfoliación del silicato en capas en la matriz polimérica (Alexandre y Dubois, 2000). La posibilidad de dispersar la MMT en la matriz proteica depende del proceso utilizado para la preparación del nanocompuesto, así como de la afinidad entre las proteínas y la arcilla. La principal razón por la cual las nanoarcillas mejoran las propiedades de los polímeros son sus interacciones superficiales fuertes con la matriz (Chen y col., 2002). Entre ellas pueden mencionarse una mayor resistencia a la ignición, estabilidad térmica, resistencia mecánica y módulo elástico, mayor claridad, mejores propiedades barrera, menor absorción de agua y densidad.

En una tesis doctoral realizada previamente en nuestro laboratorio (Echeverría, 2012) se estudió la formación de películas en base a aislado proteico de soja (SPI) y MMT 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, que implicaba mejores propiedades mecánicas y menor solubilidad y permeabilidad al vapor de agua. Las mejoras alcanzadas pudieron atribuirse al alto grado de exfoliación-intercalación que presentaron las arcillas en la matriz proteica dada por la gran afinidad de las proteínas de soja 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, especialmente para las películas que contenían el máximo contenido de MMT estudiado (10 g/ 100 g de SPI).

Varios estudios han empleado a las películas en base a proteínas como vehículos de distintos tipos de aditivos (como antioxidantes, antimicrobianos, *flavors*, colorantes, etc.), capaces de aumentar la funcionalidad de los materiales (Han y Gennadios, 2005; Han y Krochta, 2007; Gómez-Estaca y col., 2009 y 2010; Sultanbawa, 2011; Echeverría 2012). También se ha observado que la presencia adicional de nanorefuerzos en esos sistemas modifica las propiedades de transferencia a través de las matrices proteicas (Tunc y col., 2007). Teniendo en cuenta esta observación se podría pensar que los sistemas nanocompuestos podrían modular la liberación de moléculas activas o aditivos (incorporadas a la formulación) debido a diferencias en la estructuración de la red de proteínas. Esto está siendo actualmente investigado en relación a sus posibles aplicaciones en el envasado de alimentos (Mascheroni y col., 2010). Echeverría (2012) describió que la exfoliación de la arcilla (MMT) en películas proteicas favoreció la liberación de los principios activos de aceite esencial de clavo de olor presente en la formulación. Esas películas posteriormente 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 auto-oxidación lipídica durante el almacenamiento sin observar indicio de la difusión de los metales presentes en la arcilla al alimento.

El agregado de colorantes a las formulaciones formadoras de películas proteicas, responde al interés de obtener materiales que puedan resultar atractivos para diferentes aplicaciones (ej. *packaging*), que posean buenas propiedades de barrera a la luz (y prevenir reacciones de auto-oxidación) (Salgado y col., 2013). Salgado y col. (2010) estudiaron la formación de películas proteicas de girasol naturalmente activadas con propiedades antioxidantes, actividad otorgada por los compuestos fenólicos, especialmente ácido clorogénico no extraído con las proteínas durante la formación de aislados y concentrados. Los autores observaron que con el incremento de los

compuestos fenólicos, las películas presentaban una mayor opacidad, una coloración verdosa y especularon un potencial uso de las mismas en *mulching*, una cubierta protectora que se extiende sobre el suelo y que se emplea principalmente para reducir las pérdidas de agua, controlar malezas y proteger a los frutos del contacto directo con el suelo en algunas especies (Scarascia-Mugnozza y col., 2006). En la práctica actual, se emplean para *mulching* fundamentalmente plásticos negros aunque se han evaluado de diferentes colores debido a las diferencias de estos materiales para filtrar y reflejar la luz. En general colores más oscuros aumentan la temperatura del suelo, y los más claros reflejan más la radiación (Moreno y Moreno, 2008).

3.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo fue estudiar la influencia del agregado de montmorillonita (MMT) y colorantes a formulaciones en base a proteínas de soja sobre las propiedades fisicoquímicas y en algunas condiciones particulares de uso (contacto directo con agua y bajo suelo) de las películas resultantes obtenidas por *casting*.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Materiales

Se utilizó un aislado proteico de soja comercial (SPI, SUPRO 500-E) suministrado gentilmente por Dupont N & H (Brasil) como fuente de proteínas, y glicerol (Anedra, p.a) como plastificante, para la formación de las películas. La montmorillonita de sodio natural (MMT, Cloisite®Na⁺) fue gentilmente suministrada por Southern Clay Products (Estados Unidos). Esta MMT presentaba una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 92,6 meq/100 g, una distancia típica entre capas de 11,7 Å, una densidad aparente de 2,86 g/cm³ y un rango de tamaño de partícula entre 2 y 13 µm.

Las películas fueron adicionadas con colorantes comestibles en pasta de los colores blanco, negro, verde y naranja comerciales (Fleibor®, Argentina), cuyas composiciones se muestran en la **Tabla 3.1**.

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

Tabla 3.1. Componentes presentes en los colorantes comerciales utilizados.

Componentes	Colorantes alimentarios Fleibor®			
	Blanco	Negro	Verde	Naranja
Azúcar	x	x	x	x
Glicerina	x	x	x	x
Propilenglicol	x	x	x	x
Carbón activado		x		
Dióxido de titanio	x		x	x
Dióxido de silicio		x	x	
Tartrazina			x	x
Amaranto				x
Amarillo ocaso				x
Colorante caramelo		x		
Azul indigotina			x	x
Azul patente			x	

3.3.2. Caracterización del aislado proteico de soja (SPI)

El aislado proteico de soja fue caracterizado según su contenido de proteínas, grado de desnaturalización, y composición polipeptídica como se detalla a continuación.

3.3.2.1. Contenido de proteínas

El contenido de proteínas se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC 920.53) utilizando 5,71 como factor de conversión de nitrógeno en proteína.

3.3.2.2. Temperatura y grado de desnaturalización de las proteínas

Se determinó la temperatura y el grado de desnaturalización del SPI comercial y de un aislado proteico nativo como control preparado en el laboratorio según la técnica utilizada por

Mauri y Añón (2006), por calorimetría diferencial de barrido (DSC) empleando un calorímetro Q100 V9.8 Build 296 (TA Instrument, Estados Unidos) controlado por un módulo de TA 5000 con un accesorio de enfriamiento. El equipo fue calibrado según normas ASTM, usando indio, ácido láurico y ácido esteárico como patrones de calor y temperatura. Se prepararon dispersiones de los aislados al 20% p/p en agua, y alrededor de 15 mg de dispersión fueron colocados en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. Las muestras fueron sometidas al siguiente tratamiento térmico: 1 min a 20 °C (equilibrado) y un posterior calentamiento a 10 °C/min entre 20 y 120 °C. Los termogramas resultantes fueron analizados con el software Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, Estados Unidos). De los mismos se determinaron la temperatura de pico y el calor de la endoterma registrada, que corresponde a la temperatura y la entalpía de desnaturalización térmica de las proteínas, T_d en °C y ΔH_d en J/g de proteína, teniendo en cuenta el peso seco (determinado por la perforación de las cápsulas y calentando durante la noche a 105 °C) y el contenido de proteína de la muestra. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.3.2.3. Composición polipeptídica de los aislados proteicos

La composición polipeptídica del aislado proteico de soja comercial se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), siguiendo el método de Laemmli (1970), en condiciones reductoras y no reductoras. 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, Estados Unidos). Se emplearon los siguientes sistemas buffer: i) buffer de separación: tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1% p/v a pH 8,8; ii) buffer de corrida: tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% p/v a pH 8,3; y iii) buffer de muestra: tris-HCl 0,125 M, glicerol 20% v/v, SDS 1% p/v, azul de bromofenol 0,05% p/v a pH 6,8. Se preparó la muestra de SPI disolviéndolo al 1% p/v en el buffer de muestra. Para analizar el patrón de bandas en condiciones reductoras, se agregó 2-mercaptoetanol (2-ME) al 5% v/v al buffer de muestra, y las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 min y se centrifugaron 15 min a $9.200 \times g$ y temperatura ambiente antes de ser sembradas (centrífuga Labnet, Digital Spectrafuge 24D, Estados Unidos). En cada calle se sembró un volumen de sobrenadante correspondiente a 20-30 μg de proteína total. La electroforesis se realizó a voltaje constante (200 V).

Para estimar la masa molecular de las proteínas, se utilizó una mezcla de patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Inglaterra) que se separaron también en el gel, conteniendo

fosforilasa b (94,0 kDa), seroalbúmina bovina (67,0 kDa), ovoalbúmina (43,0 kDa), anhidrasa carbónica (30,0 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). Los geles obtenidos se fijaron y colorearon simultáneamente (12 h) con una solución de agua, metanol y ácido acético (5:5:2) conteniendo 0,2% p/v de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina). Los geles se decoloraron con una mezcla de agua, etanol y ácido acético (65:25:10) y se adquirieron imágenes con un scanner HP Scanjet G2710 (Hewlett-Packard, Estados Unidos).

3.3.3. Obtención de las películas proteicas y nanocompuestas coloreadas por *casting*

Las películas se prepararon por *casting* a partir de dispersiones acuosas formadas mezclando tres dispersiones preparadas previamente: i) 60 mL de una dispersión acuosa que contenía 5 g de SPI y 1,25 g de glicerol a pH 10,5 agitada magnéticamente a 20 °C por aproximadamente 30 min, ii) 20 mL de otra dispersión acuosa que contenía 0 o 0,5 g de colorantes blanco, negro, naranja y verde y iii) una dispersión acuosa que contenía 0 o 0,5 g de MMT sometida a agitación magnética durante 1 h y posterior tratamiento de ultrasonido durante 1 min en un equipo Sonics Vibra-cell modelo VCX 750 (Sonics & Materials, Estados Unidos). Estas dispersiones se mezclaron con agitación magnética durante 1 h a 20 °C, se corrigió su pH a pH 10,5 con NaOH 2 N y se sometió a vacío para eliminar las burbujas. Finalmente, 10 mL de las mismas se colocaron en cajas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron en estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60 °C durante 3 h. Las películas resultantes se acondicionaron a 20 °C y 58% HR (en desecador con solución saturada de NaBr) durante 48 h previo a su caracterización. De esta manera se obtuvieron películas proteicas y nanocompuestas conteniendo 10 g de MMT/100 g de SPI, coloreadas o no con 10 g de colorante blanco, negro, verde y naranja/100 g de SPI. La concentración de arcilla seleccionada se basó en estudios previos realizados en el laboratorio (Echeverría, 2012).

3.3.4. Caracterización de las películas proteicas y nanocompuestas

Las películas se caracterizaron según su espesor, color, opacidad y espectros de absorción en el visible, contenido de humedad, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua (WVP), absorción de agua, temperatura de transición vítrea (T_g), propiedades mecánicas en tracción,

difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de transmisión (TEM), liberación del colorante en agua y pérdida de peso en suelo según los procedimientos descritos a continuación.

3.3.4.1. Espesor

Para medir el espesor de las películas se utilizó un medidor digital (Check Line DCN-900, Estados Unidos) para materiales no conductores ni ferrosos. Las medidas se realizaron en cinco posiciones a lo largo de las probetas rectangulares utilizadas para medir las propiedades mecánicas en tracción, y en el centro y en ocho posiciones alrededor del perímetro de las muestras utilizadas para determinar la permeabilidad al vapor de agua (WVP). Posteriormente las propiedades mencionadas se calcularon utilizando el espesor promedio para cada réplica de película.

3.3.4.2. Determinación del color

El color de las películas fue determinado utilizando un colorímetro Minolta Chroma meter (CR 300, Minolta Chroma Co., Japón). Se empleó la escala CIE-L*a*b* para medir luminosidad (L*: 0=negro, 100=blanco) y cromaticidad (a*: +a=rojo, -a=verde; b*: +b=amarillo, -b=azul). El equipo fue calibrado usando tres placas provistas por el fabricante. Las mediciones se realizaron colocando las películas sobre la superficie de la placa blanca del equipo con coordenadas $L_{placa}=97,3$; $a_{placa}=0,14$; $b_{placa}=1,71$. La variación de color (ΔE) fue calculada mediante la Ecuación 3.1.

$$\Delta E = \sqrt{(L_{film} - L_{standard})^2 + (a_{film} - a_{standard})^2 + (b_{film} - b_{standard})^2} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde: ΔE es la variación total de color entre la muestra y la placa blanca del equipo, L es la luminosidad, y a y b son los parámetros de cromaticidad. Se realizaron diez determinaciones para cada muestra.

3.3.4.3. Espectros de absorción en el visible y opacidad

Cada película se cortó en una pieza rectangular y se colocó dentro de una cubeta de un espectrofotómetro Beckman DU650 (Beckman, Alemania). Se registró el espectro de absorción de cada película en función de la longitud de onda, entre 400 y 800 nm, utilizando una cubeta vacía como referencia. La opacidad de la película (UA/mm) se calculó dividiendo la absorbancia a 500 nm por el espesor de la película (mm) (Cao y col., 2007). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.4.4. Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó luego de secar la película en una estufa a 105 °C durante 24 h. Las películas fueron cortadas en pequeños trozos y se colocaron en recipientes pequeños de papel de 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.

3.3.4.5. Solubilidad en agua

La solubilidad en agua de las películas se determinó de acuerdo con el método propuesto por Gontard y col. (1992). Tres probetas circulares de película (2 cm de diámetro) se sumergieron en 50 mL de agua destilada, el sistema se agitó a 90 rpm y 20 °C durante 24 h. Luego, las muestras se filtraron (Whatman N°1). La fracción insoluble se secó en una estufa de aire forzado (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 105 °C durante 24 h. La solubilidad se calculó según la Ecuación 3.2.

$$S (\%) = \frac{(m_0 - m_f) \times 100}{m_0}$$

Ecuación 3.2

Donde: S es la solubilidad de la película (en %), m_0 y m_f son los pesos de la muestra de película antes y después de la solubilización y secado en estufa 24 h a 105 °C, respectivamente. Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

3.3.4.6. 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 $0,00185 \text{ m}^2$. La determinación se efectuó a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, colocando las celdas en un desecador (Figura 3.2). La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de $1753,35 \text{ Pa}$. Para mantener dicha fuerza impulsora se utilizó sílica anhidra ($\text{HR}_c=0$) en la celda de permeación, y solución saturada de NaCl ($\text{HR}_d=0,75$) 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.

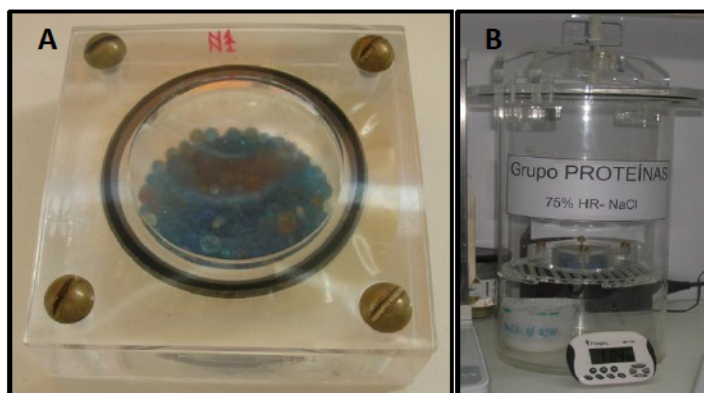


Figura 3.2. Dispositivo de medida, en donde se puede observar la película proteica colocada en la celda de permeación (con sílica en su interior, $\text{HR}_c=0$) (A); y la celda de permeación colocada dentro de la cámara con humedad relativa controlada (con solución saturada de NaCl, $\text{HR}_d=0,75$) (B).

Luego de alcanzar el estado estacionario (aproximadamente 1 h), se realizaron 8 determinaciones de peso de la celda de permeación durante 8 h. Los cambios en el peso de la celda en función del tiempo fueron registrados y graficados. Se determinó la pendiente del gráfico obtenido por medio de regresión lineal. La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la Ecuación 3.3.

$$\text{WVP} = (\Delta m / \Delta t) \cdot (\delta / P_v^{\text{H}_2\text{O}} \cdot (\text{HR}_d - \text{HR}_c) \cdot A) \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Donde: WVP es la permeabilidad al vapor de agua ($\text{g H}_2\text{O}/\text{m Pa s}$); $\Delta m/\Delta t$ es la velocidad de permeación del vapor de agua ($\text{g de H}_2\text{O}/\text{s}$); δ es el espesor de la película; $P_v^{\text{H}_2\text{O}}$ es la presión de

vapor de agua (1753,35 Pa) a la temperatura del ensayo (20 °C); HR_c es la humedad relativa en la celda de permeación; HR_d es la humedad relativa en el desecador; y A es el área de permeación (m^2). Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

3.3.4.7. Absorción de agua

La absorción de agua (AA) se determinó utilizando trozos de película de 1 cm^2 , que se pesaron inicialmente (m_0) y luego se acondicionaron en un desecador conteniendo una solución acuosa saturada de CuSO_4 (98 % HR) a temperatura ambiente. A distintos intervalos de tiempo, las muestras fueron pesadas, hasta alcanzar el valor de equilibrio (m_∞). El valor de AA (en %) fue calculado según la Ecuación 3.4.

$$AA (\%) = (m_\infty - m_0) \times 100 / m_0 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Donde: AA es la absorción de agua (en %); m_0 y m_∞ son la masa inicial y de equilibrio de la película estudiada en cada caso. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.4.8. Temperatura de transición vítrea (T_g)

La temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) empleando el mismo calorímetro y la calibración que se describió en la sección 3.3.2.2. Se colocaron pequeños trozos de las películas ($\approx 10\text{ mg}$) 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 a -100 °C durante un minuto y por último calentamiento entre -100 y 220 °C a una velocidad de 10 °C/min. La temperatura de transición vítrea (T_g , 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 col., 1996). Para su determinación se empleó el software Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, Estados Unidos). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.4.9. Propiedades mecánicas

Se determinaron las propiedades mecánicas en ensayos de tracción, de acuerdo a la norma ASTM D882-91 (1991), empleando un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG y acoplado a un software específico (Textur Expert V.1.22, Stable Micro Systems, Inglaterra). 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 (σ = fuerza/área transversal de la película) vs deformación (ϵ = porcentaje de elongación respecto de la separación de mordazas inicial). En la Figura 3.3 se muestra una curva a modo de ejemplo. De las mismas se obtuvo la resistencia a la tracción al momento de ruptura (σ_r), la elongación a la ruptura (ϵ_r) 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.

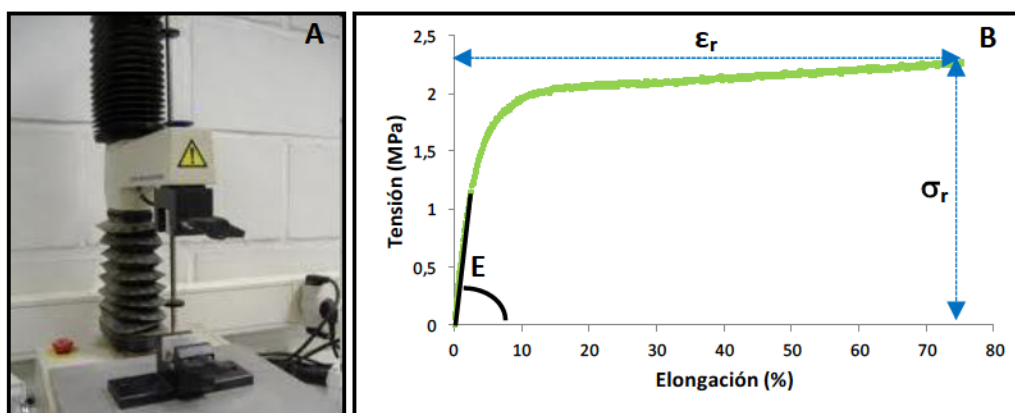


Figura 3.3. Equipo empleado en el ensayo de tracción (A). Curva tensión vs deformación para una película proteica de soja, en donde se pueden observar los parámetros evaluados: módulo elástico (E), resistencia máxima a la tracción al momento de ruptura (σ_r), y el porcentaje de elongación a la ruptura (ϵ_r) (B).

3.3.4.10. Difracción de rayos X (XRD)

Se llevó a cabo en un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, Estados Unidos) 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 datos de difracción se obtuvieron de $2\theta = 1,5 \sim 10^\circ$ en un modo de

tiempo fijo con un intervalo de paso de 0,01 °. Los valores del espacio interlamilar de la arcilla (d_{001}) fueron calculados a partir del pico de difracción de la MMT según la ley de Bragg (Ecuación 3.5).

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

Ecuación 3.5

Donde: λ es la longitud de onda de los rayos en el experimento; d es la separación entre las láminas de arcilla; y 2θ es la posición del pico de difracción.

3.3.4.11. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Muestras de película cortadas en piezas menores a 0,5 mm² se sumergieron en una solución de glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato de Sorensen (pH 7,2) durante 12 h para realizar una primera fijación. Posteriormente se lavó en el mismo buffer durante 30 min por tres veces y se llevó a cabo una segunda fijación con tetróxido de osmio al 2% durante 1 h. A continuación se lavó con agua destilada por tres veces (30 min cada lavado), y se procedió a la deshidratación en serie en 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. 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 una tinción con acetato de uranilo (1 min) y citrato de plomo (40 seg). La observación se realizó en un microscopio de transmisión (JEOL 100 CXII, Japón) a 80 kV.

3.3.4.12. Liberación del colorante

Se analizó la capacidad de retención del colorante en la matriz proteica o nanocompuesta. Inicialmente se prepararon soluciones acuosas con 10 g de los colorantes blanco, negro, verde y naranja/100 mL de agua destilada, y se caracterizaron según sus espectros de absorción UV-visible (entre 280 y 800 nm) en un espectrofotómetro (Beckman DU650, Alemania). A partir de los espectros de absorción, se seleccionó la longitud de onda (λ) que permitiera caracterizar a cada colorante, escogida como la λ con el máximo valor de absorbancia en el espectro. Posteriormente, discos de películas de 2,5 cm de diámetro fueron cortados, pesados, y colocados en un Erlenmeyer

con 20 mL de agua destilada, que se mantuvieron con agitación constante a 90 rpm durante 24 h. Se midió la absorbancia del soluble a 1 minuto (t_i) y a 24 h (t_f) a la λ característica del colorante incluido en la formulación de la película. El cálculo de liberación de colorante se realizó empleando una curva de calibración para cada colorante realizada a partir de una solución acuosa de 10 g de los mismos/100 mL, observando la variación entre t_i y t_f del colorante liberado.

3.3.4.13. Pérdida de peso en suelo

La pérdida de peso en suelo se determinó como una medida indirecta de la capacidad de biodesintegración de las películas y se analizó según un ensayo de pérdida de peso en suelo descrito por Dalev y col. (2000). Se colocó tierra (Terraferil, Argentina) compuesta de *compost* orgánico y tierra negra (humedad: 35-40%, cenizas: 40-45%, materia orgánica: 15-20%, relación C/N: 7,7, pH: 6,2, conductividad eléctrica: 1,1 mmhos/seg) en recipientes plásticos, aproximadamente 400 g por bandeja. Muestras de películas de 1 cm² fueron secadas previamente a 50 °C durante 24 h, pesadas y colocadas sobre mallas de plástico (también previamente secadas y pesadas) para permitir el acceso de los microorganismos y humedad, y la fácil remoción de las muestras durante el ensayo. Las mallas de plástico con las muestras de película se taparon con 1 cm de la tierra. Las muestras se incubaron durante 4 semanas en cámaras a temperatura controlada de 23 °C, y ciclos de 8 h de oscuridad y 16 h de luz, de modo de simular condiciones ambientales, regando la tierra en toda su superficie con agua por aspersión una vez por día. Una vez por semana se tomaron muestras de película de la tierra, las cuales fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada, secadas a 50 °C durante 24 h y pesadas nuevamente. La pérdida de peso relativa fue calculada como la diferencia de peso entre la muestra inicial y final, respecto del peso inicial. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. En la Figura 3.4 se ilustra la realización del ensayo.

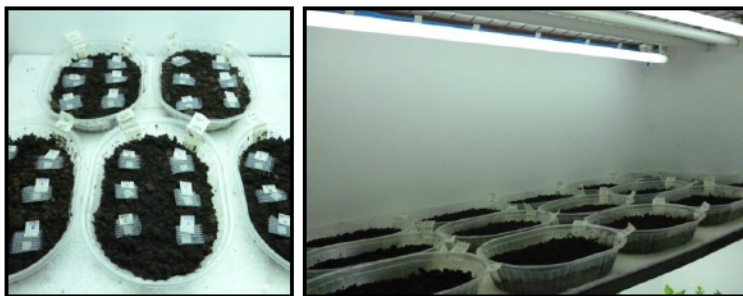


Figura 3.4. Disposición de las películas en bandejas con tierra para ensayo de pérdida de peso en suelo.

3.3.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y expresados como la media \pm desviación estándar. Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey con un nivel de significación $\alpha = 0,05$, utilizando el programa SYSTAT (versión 12, Systat Software, Inc., Chicago, Estados Unidos).

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Caracterización del aislado proteico de soja

El aislado proteico de soja utilizado en esta Tesis presentó un $85 \pm 2\%$ p/p de proteínas (en base seca). La Figura 3.5 muestra los termogramas obtenidos por DSC del SPI comercial y de un SPI nativo obtenido a partir de harina de soja comercial desgrasada procesada sin calentamiento. En el termograma del SPI comercial se observa la ausencia de las dos endotermas típicas, presentes en el aislado nativo, a $78,95 \pm 1,72$ °C y $93,68 \pm 1,21$ °C correspondientes a la desnaturalización de β -conglucina (7S) y glicinina (11S) respectivamente (Mauri y Añón, 2006), que estarían indicando que el proceso industrial de la obtención del SPI afectó la conformación de las globulinas de soja, encontrándose totalmente desnaturalizadas. Los aislados proteicos preparados a escala industrial generalmente sufren diferentes procesos con el fin de obtener propiedades funcionales distintivas en el producto. El tratamiento térmico es el proceso más habitual utilizado en la industria para modificar el comportamiento de las proteínas provocando el despliegue de las macromoléculas y la posible agregación de las subunidades AB de la fracción glicinina (Añón y col., 2001). Por el contrario, el proceso seguido en el laboratorio para la obtención del aislado, que consta de una

solubilización de la harina a pH 8, y posterior precipitación isoelectrica de las proteínas a pH 4,5, redisolución y liofilización, permite obtener las proteínas prácticamente en su estado nativo, caracterizado por una entalpía de desnaturalización de $15,46 \pm 1,34$ J/g (Mauri y Añón, 2006).

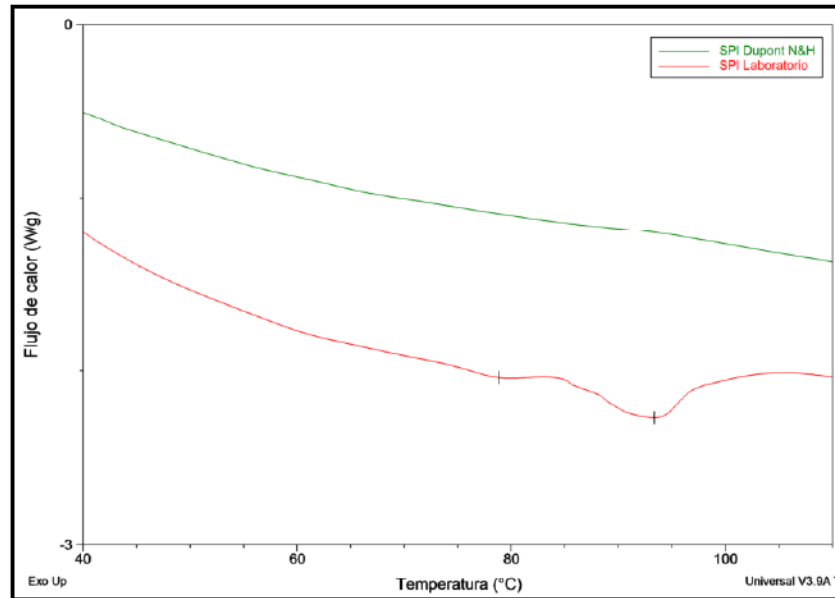


Figure 3.5. Termogramas obtenidos por DSC del aislado proteico comercial de soja empleado en este trabajo de Tesis (●); y de un aislado proteico de soja obtenido en el laboratorio sin tratamiento térmico (●).

La composición polipeptídica del SPI utilizado fue analizada por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras (con β -mercaptoetanol) (Figura 3.6).

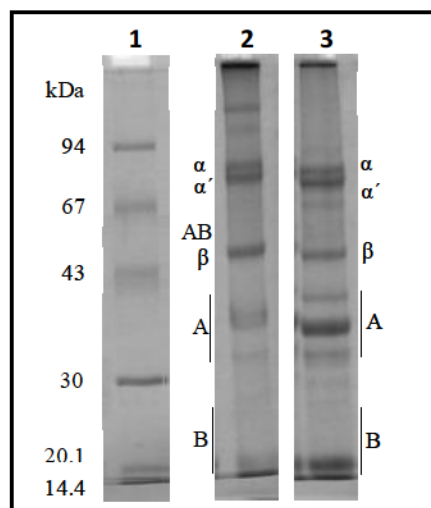


Figura 3.6. Patrones electroforéticos del aislado proteico de soja utilizado en este trabajo de Tesis: calle (1) patrones de bajo peso molecular; calle (2) SDS-PAGE en condiciones no reductoras; calle (3) SDS-PAGE en condiciones reductoras (con adición de 2- β -mercaptoetanol).

El perfil obtenido bajo condiciones no reductoras (calle 2) mostró las bandas correspondientes a agregados solubles de alto peso molecular (superior a 94 kDa), algunos de los cuales no pudieron entrar en el gel, junto a los polipéptidos característicos de β -conglucina ($\alpha \approx 68$ kDa, $\alpha' \approx 72$ kDa y $\beta \approx 52$ kDa), y una baja proporción de los polipéptidos ácidos y básicos de glicina (A ≈ 35 kDa, y B ≈ 20 kDa (Nielsen, 1985a,b). No se aprecia la banda correspondiente a las subunidades AB (≈ 58 -69 kDa) de glicina, lo que sugiere que estos polipéptidos estarían algo disociados y principalmente formando parte de los agregados de alto peso molecular, en concordancia a lo reportado por Añón y col., (2001). En condiciones reductoras (calle 3), también se observan las bandas de las subunidades α , α' , β (de β -conglucina), y A y B (de glicina) incrementadas a expensas de la desaparición de una proporción importante de los agregados de alto peso molecular, estabilizados por puentes disulfuro, y una cantidad menor de agregados remanentes que no pudieron entrar en el gel estabilizados por interacciones no covalentes que no pudieron ser desestabilizadas por las condiciones experimentales utilizadas.

3.4.2. Apariencia y propiedades ópticas de las películas

En general las películas proteicas de soja son traslúcidas y con una coloración amarillenta tenue. Dicha coloración puede atribuirse a otros compuestos que se co-extraen junto a las proteínas. En este trabajo, fue posible obtener películas proteicas y nanocompuestas homogéneas coloreadas en blanco, negro, verde y naranja, y sin colorear por *casting*. En la Figura 3.7 se muestran a modo de ejemplo las películas nanocompuestas conteniendo 10 g de MMT/100 g de SPI con el agregado de los distintos colorantes analizados.

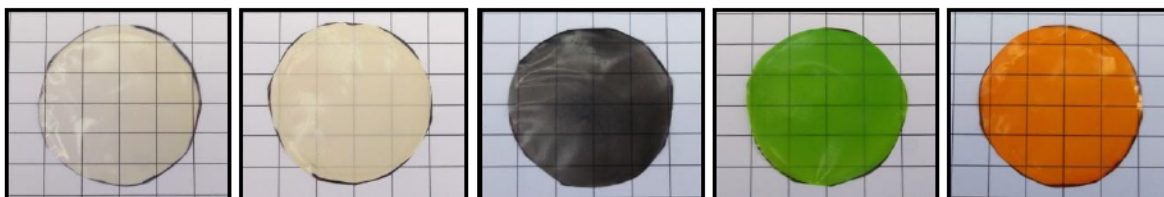


Figura 3.7. Películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y MMT control o adicionadas con diferentes colorantes.

En la Tabla 3.2 se presentan los espesores de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas. El agregado de MMT aumentó en todos los casos el espesor de las películas

proteicas. Por su parte la incorporación de los colorantes a las formulaciones no afectó de manera significativa el espesor de las películas proteicas y nanocompuestas resultantes.

Tabla 3.2. Espesor de las películas proteicas y nanocompuestas control o coloreadas (blanco, negro, verde y naranja).

Muestra	Espesor (μm)	
	SIN MMT	CON MMT
Control	58,46 \pm 8,98 b,A	65,95 \pm 9,90 a,A
Blanco	55,50 \pm 7,98 b,A	73,60 \pm 6,56 a,A
Negro	58,91 \pm 6,23 b,A	73,80 \pm 5,26 a,A
Verde	58,63 \pm 6,12 b,A	74,32 \pm 9,45 a,A
Naranja	61,02 \pm 5,30 b,A	75,05 \pm 8,40 a,A

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas debidas al agregado de MMT para igual coloración ($\alpha = 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas debidas al agregado de los diferentes colorantes ($\alpha = 0,05$).

En la **Figura 3.8** se presentan los parámetros de color L^* , a^* y b^* de las películas estudiadas. Al incorporar MMT a la formulación, sólo se observaron diferencias en la luminosidad (L^*) de las películas negras (**Figura 3.8 A**). Por otra parte, el agregado de los colorantes a las películas proteicas y nanocompuestas disminuyó los valores de luminosidad respecto a las películas control, siendo estas disminuciones más importantes para las películas negras y verdes.

El parámetro a^* , que describe la cromaticidad verde a rojo, de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas se presenta en la **Figura 3.8 B**. El agregado de MMT solo modificó el parámetro a^* de las películas coloreadas. En particular generó un aumento significativo del parámetro a^* en las películas naranjas, y una disminución en las películas de color blanco y verde. Las películas naranjas fueron las que mayor valor a^* presentaron, debido a su componente amaranto que otorga característico color rojo oscuro; en contraposición las películas verdes fueron las de menores valores de a^* , característica del color verde que forman la mezcla de componentes azules (azul indigotina y azul patente) y amarillo-anaranjado (tartrazina).

El parámetro b^* , que describe la cromaticidad azul a amarillo, de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas se esquematiza en la **Figura 3.8 C**. La incorporación de MMT a las películas (sin colorantes) generó un pequeño aumento de b^* , intensificando la coloración

amarillenta a las películas nanocompuestas resultantes; mientras que en el caso de las películas verdes, el agregado de MMT disminuyó el valor b^* , y no se vio efecto en las películas coloreadas de blanco, negro y naranja.

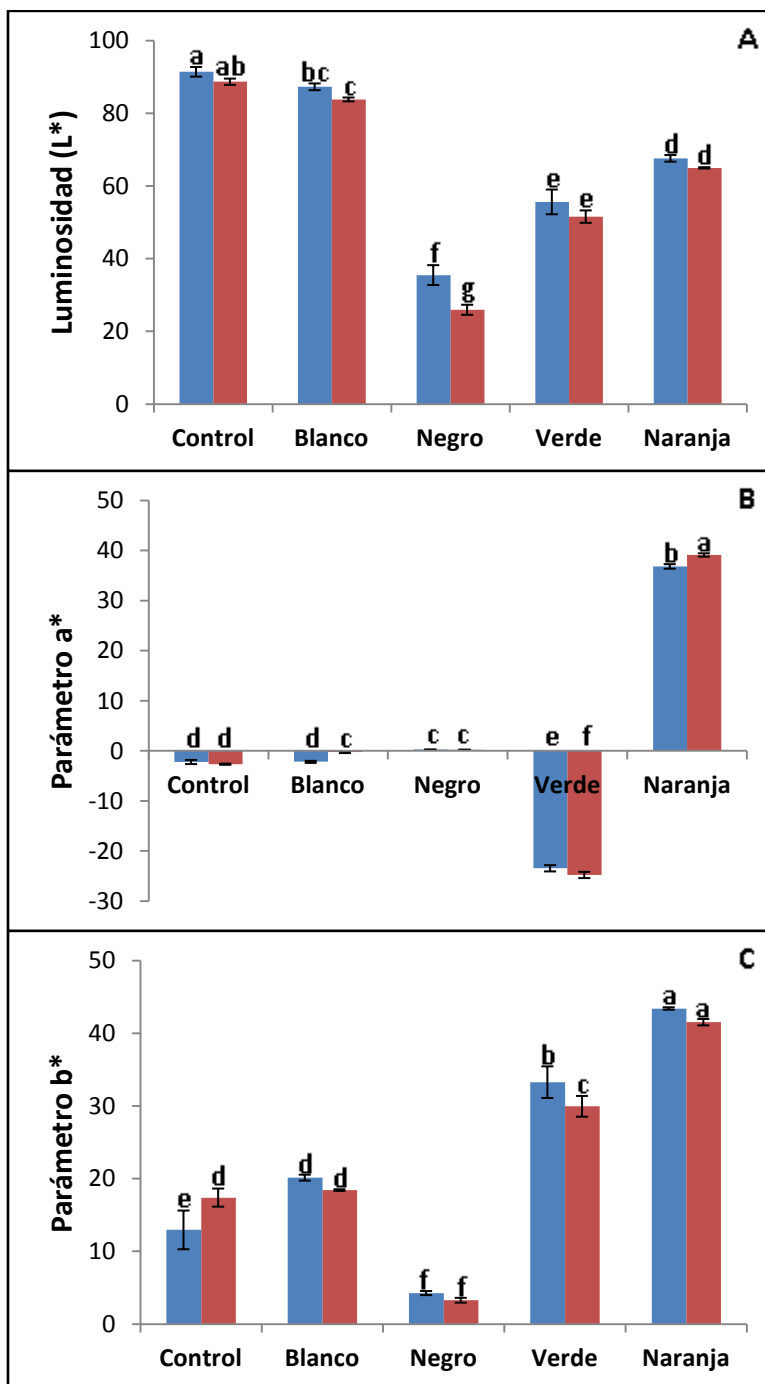


Figura 3.8. Luminosidad (A), parámetros de cromaticidad a^* (B) y b^* (C) de las películas proteicas (■) y nanocompuestas (■) control o con colorantes blanco, negro, verde y naranja. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancias de $\alpha = 0,05$.

Todas estas observaciones pueden resumirse analizando la variación de color (ΔE) (**Tabla 3.3**). El agregado de MMT a las formulaciones generó un aumento significativo en la variación de color de todas las películas, excepto para las blancas. Los cambios más marcados se presentaron en las películas sin colorear y negras. De todos modos es importante destacar que las diferencias estadísticas para la detección instrumental de color debidas al agregado de la MMT fueron prácticamente imperceptibles a simple vista.

Tabla 3.3. Variación de color (ΔE) y opacidad de las películas proteicas y nanocompuestas control o coloreadas (blanco, negro, verde, naranja).

Muestra	ΔE		Opacidad (UA/mm)	
	SIN MMT	CON MMT	SIN MMT	CON MMT
Control	12,91 \pm 2,98 b,D	18,12 \pm 1,50 a,E	1,86 \pm 0,31 a,D	2,02 \pm 0,14 a,D
Blanco	21,11 \pm 0,77 a,C	21,49 \pm 0,37 a,D	41,28 \pm 1,12 a,A	35,45 \pm 0,14 b,A
Negro	61,87 \pm 2,71 b,A	71,39 \pm 1,37 a,A	14,58 \pm 0,56 a,C	13,19 \pm 0,92 a,C
Verde	57,45 \pm 1,03 b,B	59,27 \pm 0,37 a,C	26,04 \pm 5,35 a,B	23,62 \pm 2,53 a,B
Naranja	62,98 \pm 0,73 b,A	64,42 \pm 0,14 a,B	39,35 \pm 1,63 a,A	36,49 \pm 0,74 a,A

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas debidas al agregado de MMT para igual coloración ($\alpha = 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas debidas al agregado de los diferentes colorantes ($\alpha = 0,05$).

La opacidad de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas también se presenta en la **Tabla 3.3**. Petersson y Oksman (2006) sugieren que el grado de exfoliación y la fracción volumétrica de nanorefuerzo tienen una gran influencia en la transmitancia de luz UV y visible, y que el hecho que no haya reducción en la cantidad de luz que se transmite a través de las películas nanocompuestas es una indicación de que los nano-refuerzos están totalmente exfoliados, dado que una matriz transparente que contiene un bajo porcentaje de nanorefuerzo totalmente exfoliado presenta buena claridad óptica. Finalmente concluyen como resultado de esto que no debería haber una gran diferencia en la cantidad de luz que se transmite a través de las películas nanocompuestas respecto de las formadas por la matriz pura. El agregado de MMT redujo la opacidad en las películas blancas. Echeverría y col. (2014) también observaron una disminución en la opacidad de películas nanocompuestas basadas en proteínas de soja y MMT respecto de las respectivas películas control. Los autores propusieron que esos cambios podrían

deberse a diferentes arreglos moleculares de agregación por presencia de la arcilla en la matriz proteica que otorgaría mayor transparencia a las películas nanocompuestas y finalmente al buen grado de intercalación-exfoliación de la MMT alcanzado. De todos modos esto requiere ser determinado en forma directa. El hecho de que el efecto de disminución en la opacidad logrado por la MMT se observe solo en las películas blancas, sugiere que la presencia de la nanoarcilla podría estar modificando la distribución del colorante en la matriz proteica.

En todos los casos la presencia de los colorantes en las películas proteicas y nanocompuestas provocó un aumento en la opacidad de los respectivos materiales, siendo las de color blanco y naranja las más opacas. Pero cabe repetir que en el caso de las blancas, el efecto antes descrito del agregado de la arcilla fue el más significativo. La mayor opacidad de las películas blancas probablemente se encuentre asociada con la presencia de una mayor proporción en la formulación de este colorante de dióxido de titanio (TiO₂) insoluble, que se encontrará disperso en la matriz.

Con el fin de evaluar la capacidad barrera a la luz de las películas proteicas y nanocompuestas coloreadas o no, se analizaron los espectros de absorción en la zona del visible (400 a 800 nm) (**Figura 3.9**).

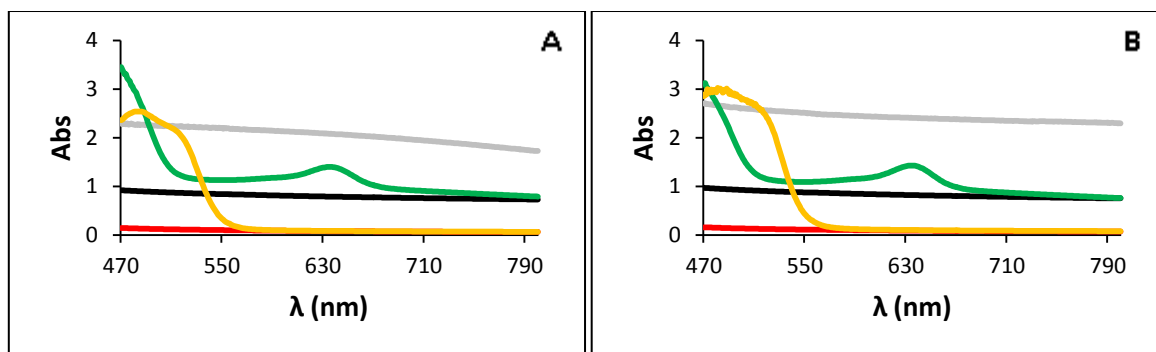


Figura 3.9. Espectros de absorción en la zona del visible para películas proteicas de soja (sin MMT) (A) y películas nanocompuestas (con MMT) (B): (●) control, (●) blancas, (●) negras, (●) verdes y (●) naranjas.

Las películas sin colorear (con y sin MMT), que eran traslúcidas prácticamente no mostraron absorción en el rango analizado. El agregado de los distintos colorantes permitió obtener propiedades barrera a la luz diferenciales. La presencia de MMT (**Figura 3.9 B**) no modificó los espectros, sólo generó un aumento en los valores de absorción para los colorantes blanco y naranja y una leve disminución en el verde al menos para algunas longitudes de onda. Esto podría deberse a interacciones distintas de los compuestos presentes en los colorantes con

las proteínas en presencia de la arcilla. Las películas proteicas y nanocompuestas blancas y negras presentaron una absorción pareja en todo el rango del espectro analizado, sin picos de absorción, y con una leve disminución de absorción a mayores valores de longitud de onda, siendo esta barrera máxima para las películas nanocompuestas blancas. Los niveles de absorbancia similares en el caso de las películas blancas y negras podrían deberse a que en este caso predomina la dispersión de la luz en todo el espectro por la presencia de componentes insolubles en los colorantes como el dióxido de titanio (TiO₂) y el carbón activado. Por su parte, las películas verdes que también presentaron una absorbancia base, algo mayor que la de las negras, también presentaron dos picos con máximos a 440 nm y 640 nm respectivamente. Por último las películas coloreadas de naranja mostraron un efecto barrera a la luz importante a $\lambda < 580$ nm (con un máximo en 480 nm), y una absorción muy baja en el resto del espectro (Figura 3.9 B).

La selección de los colorantes apropiados permitiría generar películas con espectros de absorción más apropiados para cada uso en particular. Las películas con menor transmisión de radiación podrían ser por ejemplo de utilidad para envasar alimentos que sean sensibles a la foto-oxidación o para emplear en cultivos en los que se desee utilizar *mulching*, en los que la baja transmisión de radiación fotosintéticamente activa (PAR) al suelo es de interés para el control de las malezas. La manipulación de los colores de las películas empleadas en *mulching* puede afectar la reflexión de la radiación y tener implicancias productivas. Así por ejemplo el empleo de coberturas claras aumentó la radiación PAR recibida por plantas de frutilla incrementando el rendimiento y la calidad de frutos (Shiukhy y col., 2014). El uso de recubrimientos que modifican la proporción de radiación roja y roja lejana modificó las respuestas fotomorfogénicas en cultivos (Casierra-Posada y col., 2011). Además, los distintos espectros demostrados permitirían usar estas películas proteicas y nanocompuestas coloreadas en agricultura permitiendo que cierta radiación pase hacia el suelo en cultivos en que se necesitan mantener la temperatura del mismo, o evitar el crecimiento de malezas.

3.4.3. Susceptibilidad al agua

La susceptibilidad al agua de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas se estudió a través de las determinaciones de contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y absorción de agua (AA).

El contenido de agua y la solubilidad de las películas estudiadas se presentan en la **Tabla**

3.4.

Tabla 3.4. Contenido de agua y solubilidad de películas proteicas y nanocompuestas control o coloreadas (blanco, negro, verde y naranja).

Muestra	Contenido de agua (%)		Solubilidad (%)	
	SIN MMT	CON MMT	SIN MMT	CON MMT
Control	19,5 ± 0,4 a,B	15,3 ± 0,8 b,AB	39,6 ± 2,5 a,B	36,8 ± 2,5 a,B
Blanco	21,8 ± 1,5 a,AB	15,1 ± 0,3 b,B	40,4 ± 0,3 a,B	38,9 ± 2,4 a,AB
Negro	21,2 ± 0,8 a,AB	15,2 ± 0,2 b,AB	40,9 ± 2,8 a,B	39,6 ± 2,7 a,AB
Verde	20,6 ± 0,4 a,B	15,5 ± 0,7 b,AB	40,7 ± 1,6 a,B	39,1 ± 2,5 a,AB
Naranja	23,4 ± 0,3 a,A	16,5 ± 0,2 b,A	46,7 ± 0,2 a,A	44,2 ± 1,5 a,A

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas debidas al agregado de MMT para igual coloración ($\alpha = 0,05$). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas debidas al agregado de los diferentes colorantes ($\alpha = 0,05$).

Al incorporar MMT a las formulaciones, las películas nanocompuestas resultantes presentaron un contenido de agua menor que las películas proteicas control con o sin colorantes. Teniendo en cuenta que la MMT tiene cierto carácter hidrofílico y capacidad de interactuar con el agua a través de puentes de hidrógeno (Sharif y col., 2005; Rhim y Perry, 2007; Huang y col., 2004), la disminución en el contenido de agua observada sugeriría que las interacciones entre la proteína y la arcilla estarían favorecidas, dejando menos sitios disponibles para retener agua. Por su parte los colorantes incorporados a las formulaciones no modificaron el contenido de agua de las películas proteicas y nanocompuestas resultantes, con excepción del naranja que sólo provocó un aumento en el contenido de agua respecto de la película proteica control.

Respecto a la solubilidad en agua, todas las películas estudiadas, proteicas y nanocompuestas control y coloreadas mantuvieron su integridad luego de permanecer en contacto con agua durante 24 h en agitación, tal como se observa en la **Figura 3.10** para las películas nanocompuestas a modo de ejemplo. En la imagen también se observa la liberación de los colorantes de las películas naranjas y verdes, lo que no ocurrió con las películas blancas y negras. Los valores de solubilidad (**Tabla 3.4**) de las películas proteicas de soja son relativamente bajos comparados con los de otras fuentes proteicas, y en el rango de los reportados previamente

para películas obtenidas con aislados de soja similares (Denavi y col, 2009). El agregado de MMT no modificó la solubilidad de las películas proteicas independientemente de la presencia o no de colorantes, evidenciando que el tipo de interacciones establecidas entre la MMT y la soja (posiblemente responsables de las disminuciones en el contenido de agua), serían desestabilizadas con las condiciones del ensayo de solubilidad (contacto prolongado con agua en agitación). Por su parte, la presencia de colorantes tampoco modificó el valor de solubilidad de las películas proteicas y nanocompuestas resultantes, a excepción de las películas naranjas, que sí presentaron una mayor solubilidad.

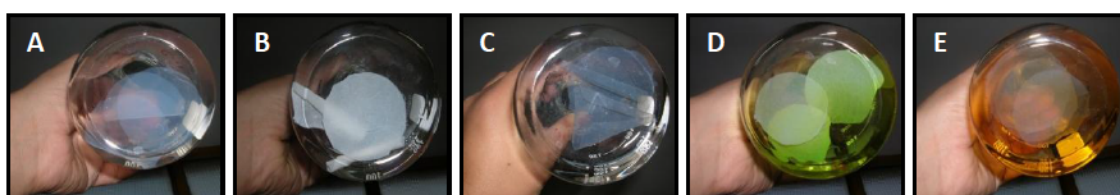


Figura 3.10. Fotos del ensayo de solubilidad de las películas nanocompuestas sin colorante (A), y con colorantes blanco (B), negro (C), verde (D) y naranja (E), luego de estar en contacto con agua y agitación durante 24 h.

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) y la absorción de agua (AA) de las películas se presentan en la **Tabla 3.5**. El agregado de MMT a las formulaciones no modificó la permeabilidad de las películas proteicas control, ni adicionadas con colorantes blanco, negro y verde. Solo disminuyó significativamente la WVP de las películas proteicas naranjas (\cong 50%). Por su lado, ningún colorante modificó la permeabilidad de las películas proteicas y nanocompuestas. Solo el efecto diferencial del colorante naranja en presencia de MMT provocó una disminución de la WVP de esta película respecto de la película nanocompuesta control (soja + MMT sin colorante).

Por último, la arcilla sólo disminuyó la absorción de agua en las películas proteicas control y naranja, no produciendo modificaciones en el resto de las formulaciones. En cuanto a los colorantes, las películas blancas, negras y verdes bajaron la absorción de agua de las películas proteicas, pero no la de las respectivas películas nanocompuestas. Por su parte, la presencia del colorante naranja no modificó la AA de las películas proteicas pero sí logro disminuirla en su respectivo nanocompuesto. Para esta propiedad, pareciera que el efecto de los colorantes negro, naranja y verde podría estar enmascarando el de la MMT. Cyras y col. (2008) reportaron una disminución de la absorción de agua en películas en base a almidón nanoreforzadas con MMT, que atribuyeron a la formación de una matriz estabilizada principalmente por puentes de hidrógeno

entre el almidón y los grupos hidroxilo de la MMT que dificulte la difusión de agua hacia el interior de la matriz. Los resultados encontrados en este trabajo de Tesis sugieren que los componentes de los colorantes (en especial los del blanco, negro y verde) estarían más expuestos en la superficie de la matriz limitando la cantidad de agua absorbida.

En bibliografía existen numerosos ejemplos en los que el agregado de arcilla disminuye la susceptibilidad al agua de películas en base a biopolímeros, pero no en todos los casos el efecto se observa en todas las propiedades que se utilizan para caracterizar este comportamiento y los resultados son muy dependientes de las condiciones experimentales utilizadas así como de las características propias de cada sistema. A diferencia de los resultados aquí reportados, Echeverría y col. (2014), observaron que al incrementar el contenido de MMT en películas proteicas de soja disminuía progresivamente el contenido de agua, junto con la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua de las películas nanocompuestas resultantes. Incluso llegaron a demostrar que la disminución en la permeabilidad al vapor de agua se debía principalmente a la disminución de la velocidad de difusión de estas moléculas, posiblemente por el aumento en la tortuosidad del camino a recorrer ocasionado por la exfoliación de la arcilla en la película. La diferencia en los resultados en este trabajo posiblemente se asocie a un menor grado de intercalación-exfoliación de la arcilla dentro de la matriz proteica. Más allá de esto es importante señalar que el agregado de los colorantes no afectó demasiado la susceptibilidad al agua de las películas, teniendo en cuenta que en muchas ocasiones el agregado de compuestos activos a matrices proteicas además de otorgarle una propiedad adicional, genera un efecto plastificante influyendo en las propiedades de barrera, solubilidad y también en las propiedades mecánicas (Salgado y col., 2011; Quilaqueo Gutiérrez y col., 2012; Salgado y col., 2013). De los colorantes evaluados en este trabajo, el naranja presentó un comportamiento distinto al resto, característico a compuestos más hidrofílicos, pero posiblemente con mayor capacidad de interactuar con la arcilla, dado que este sistema fue el más modificado por la presencia del nanorefuerzo.

Tabla 3.5. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y absorción de agua (AA) de películas proteicas y nanocompuestas control o coloreadas (blanco, negro, verde y naranja).

Muestra	WVP x 10 ⁻¹¹ (g H ₂ O/m Pa s)		AA (%)	
	SIN MMT	CON MMT	SIN MMT	CON MMT
Control	8,2 ± 0,8 a,AB	5,5 ± 1,5 a,A	118,5 ± 2,0 a,A	91,9 ± 3,1 b,AB
Blanco	6,7 ± 0,1 a,AB	5,6 ± 1,5 a,A	93,9 ± 1,4 a,B	89,7 ± 3,4 a,B
Negro	6,8 ± 0,6 a,AB	5,1 ± 0,6 a,A	93,3 ± 3,3 a,B	91,3 ± 1,7 a,AB
Verde	6,1 ± 0,1 a,B	5,0 ± 1,1 a,A	95,2 ± 3,0 a,B	95,5 ± 2,8 a,AB
Naranja	8,9 ± 1,1 a,A	4,1 ± 0,9 b,A	119,7 ± 3,1 a,A	98,1 ± 2,5 b,A

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas debidas al agregado de MMT para igual coloración ($\alpha = 0,05$). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas debidas al agregado de los diferentes colorantes ($\alpha = 0,05$).

3.4.4. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas fueron estudiadas a partir de ensayos en tracción y se presentan los valores de tensión a la ruptura, elongación a la ruptura y módulo de Young (Figura 3.11).

El agregado de MMT a las formulaciones produjo un efecto refuerzo importante en las películas proteicas control y coloreadas, evidenciado en un aumento significativo en la resistencia a la ruptura y el módulo de Young, en detrimento de la elongación en todos los casos. Por ejemplo, para las películas control, el agregado de MMT generó un aumento del 150% y 283% en la tensión a la ruptura y el módulo de Young respectivamente. En las películas coloreadas de verde y naranja, las mejoras fueron aún más importantes, llegando a aumentar en un 163% la tensión a la ruptura y en un 353% el módulo de Young para las de color naranja; y en las blancas y negras estas mejoras fueron inferiores a las alcanzadas para las películas control. El mayor efecto refuerzo en presencia del colorante naranja, también fue verificado al analizar la susceptibilidad al agua de estas películas nanocompuestas.

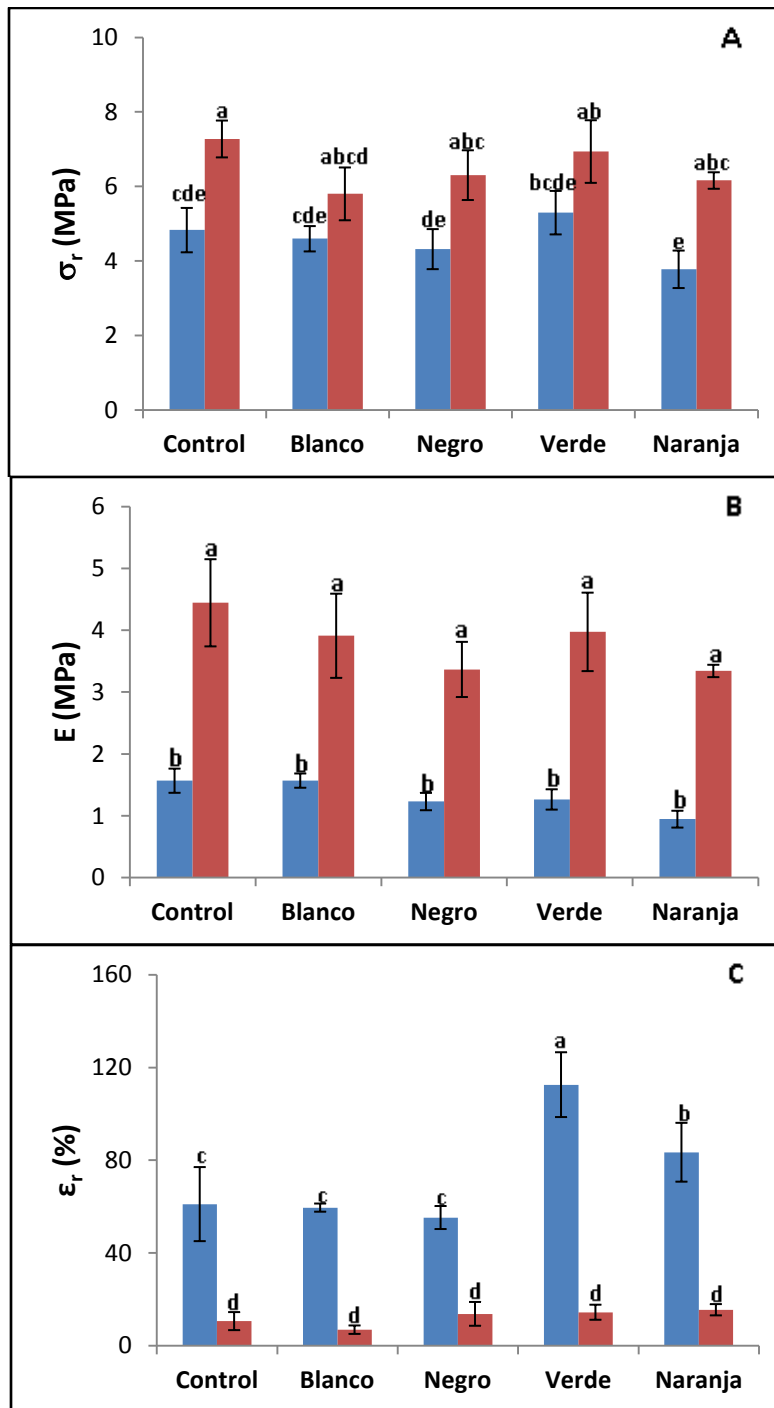


Figura 3.11. Propiedades mecánicas medidas en tracción de las películas proteicas (sin MMT, ●) y nanocompuestas (con MMT, ●) control o coloreadas de blanco, negro, verde y naranja: tensión a la ruptura (σ_r) (A); módulo de Young (E) (B); elongación a la ruptura (ϵ_r) (C). Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La adición de los colorantes a las películas proteicas no afectó la tensión a la ruptura y el módulo de Young de las mismas evidenciando que los mismos no tienen efecto plastificante, tal como se mencionó anteriormente. Pero en el caso de los colorantes verde y naranja aumentaron

significativamente la elongación a la ruptura de estas películas proteicas, efecto que no se visualizó en las películas nanocompuestas

Es evidente que existe una importante afinidad entre la matriz proteica y la MMT que provoca interacciones fuertes que logran mejorar las propiedades mecánicas, aunque no se observan mejoras estadísticamente significativas en la permeabilidad al vapor de agua y la solubilidad. Además el grado de interacción resultante es diferente dependiendo del tipo de colorante empleado. Ensminger y Giesecking (1939 y 1941) reportaron que la formación de complejos entre la proteína y la MMT 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 MMT. Por su parte, Zhang y col. (2001), y Chen y Zhang (2006) atribuyeron el efecto refuerzo a las fuertes interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno entre las proteínas de soja y las capas de MMT desordenadas en la matriz proteica, que restringen el movimiento de las cadenas peptídicas y provocan el aumento de la resistencia a la tracción y módulo de las películas nanocompuestas, y la disminución de su elongación. Echeverría y col. (2014) analizaron el tipo y la proporción de interacciones que estabilizaban las películas proteicas de soja reforzadas con cantidades variables de MMT. Ellos realizaron ensayos de solubilidad diferencial de las películas proteicas y nanocompuestas en diferentes sistemas *buffers* capaces de interferir con tipos específicos de interacciones: agua, para disolver polipéptidos libres en la matriz proteica; *buffer* fosfato, para interferir en interacciones electrostáticas; *buffer* fosfato con SDS, para interrumpir interacciones hidrofóbicas; *buffer* fosfato con urea, para interrumpir los puentes hidrógeno así como interacciones hidrofóbicas; *buffer* fosfato con SDS y urea para interrumpir todas las interacciones antes mencionadas; y *buffer* fosfato con SDS, urea y ME (β -mercaptoetanol) para interrumpir puentes disulfuro. De este estudio, Echeverría y col. (2014) pudieron evidenciar que cuando se incorpora MMT a las películas proteicas, la solubilidad decrece marcadamente (independientemente de la cantidad de MMT incorporada) en todos los *buffers* estudiados, y que son los puentes disulfuro las interacciones que juegan un papel fundamental en la matriz estructural tanto en películas proteicas como nanocompuestas. La MMT estaría interfiriendo en las uniones estabilizadas por puentes de hidrógeno, quizás porque las fracciones involucradas en ese tipo de uniones estén interaccionando con la MMT. El hecho que en este trabajo no se haya modificado la solubilidad de las películas nanocompuestas, hace suponer que posiblemente en este caso el agregado de la arcilla no haya influenciado en demasía en la formación de puentes disulfuro.

3.4.5. Temperatura de transición vítrea

Las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas fueron analizadas según su temperatura de transición vítrea, calculadas a partir del análisis de los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC), y los resultados se presentan en la **Tabla 3.6**.

Tabla 3.6. Temperatura de transición vítrea (Tg) de las películas proteicas y nanocompuestas control o coloreadas (blanco, negro, verde y naranja).

Muestra	Tg (°C)	
	SIN MMT	CON MMT
Control	-39,2 ± 0,1 a,A	-39,5 ± 2,1 a,A
Blanco	-36,8 ± 4,1 a,A	-38,5 ± 3,8 a,A
Negro	-35,5 ± 2,4 a,A	-37,1 ± 3,7 a,A
Verde	-36,7 ± 3,9 a,A	-42,2 ± 3,9 a,A
Naranja	-36,9 ± 3,5 a,A	-37,8 ± 4,7 a,A

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas debidas al agregado de MMT para igual coloración ($\alpha = 0,05$). Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas debidas al agregado de los diferentes colorantes ($\alpha = 0,05$).

Inesperadamente no se observaron diferencias en los valores de Tg con el agregado de arcilla, incluso a pesar del menor contenido de agua que presentaron las películas nanocompuestas, en concordancia con los resultados de Echeverría y col. (2014) quienes también reportaron Tg cercanas a los -40 °C para películas proteicas y nanocompuestas de soja-MMT. Estos resultados sugerirían que los cambios en el entrecruzamiento de la matriz proteica en presencia de la MMT, responsables del refuerzo, posiblemente estarían dejando un volumen libre que compensaría a la movilidad de las moléculas, y que en parte podría relacionarse con el aumento en el espesor observado. A diferencia de estos resultados Hedenqvist y col. (2006) informaron que la Tg de películas proteicas en base a proteína de suero aumentó de 5 a 10 °C con la adición de MMT; y Rimdusit y col. (2008) vieron un aumento en la Tg de 176 a 182 °C para películas en base a carboximetilcelulosa-MMT que atribuyeron a la restricción en los movimientos térmicos del polímero debido a la presencia de la MMT. Por su parte, el agregado de los distintos colorantes tampoco modificó los valores de las Tg de las películas proteicas y nanocompuestas, lo que resultó esperado a partir de lo observado en otras propiedades fisicoquímicas.

3.4.6. Morfología de las películas proteicas y nanocompuestas

La morfología de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas fue analizada por difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Mediante estas técnicas, es posible determinar el grado de exfoliación y/o intercalación alcanzado, y la dispersión de la MMT en la matriz proteica, así como el efecto de la adición de los colorantes en las distintas matrices (proteicas y nanocompuestas).

En la Figura 3.12 se muestra el espectro de rayos X de la MMT-Na empleada con su pico característico en $2\theta = 7,21^\circ$. Este pico de difracción se corresponde según la Ley de Bragg a un espacio interlaminar $d_{001} = 1,2$ nm. Al separarse las capas que forman la estructura cristalina de la arcilla, los picos de difracción característicos de la arcilla pura tienden a moverse hacia ángulos menores e incluso pueden llegar a desaparecer si hay desordenamiento total de la estructura cristalina de la MMT. Cuando las cadenas del polímero se intercalan entre las capas de arcilla, el espacio interlaminar aumenta y es evidenciado por el desplazamiento del pico de difracción de la MMT pura a menores ángulos de difracción. Si las cadenas de polímero logran una estructura exfoliada con las capas de arcilla, no se observan picos de difracción debido a que el espacio interlaminar es mayor que el intercalado ($>$ a 8 nm en una estructura exfoliada) o porque los nanocompuestos no presentan una estructura ordenada (Quilaqueo Gutiérrez y col., 2012).

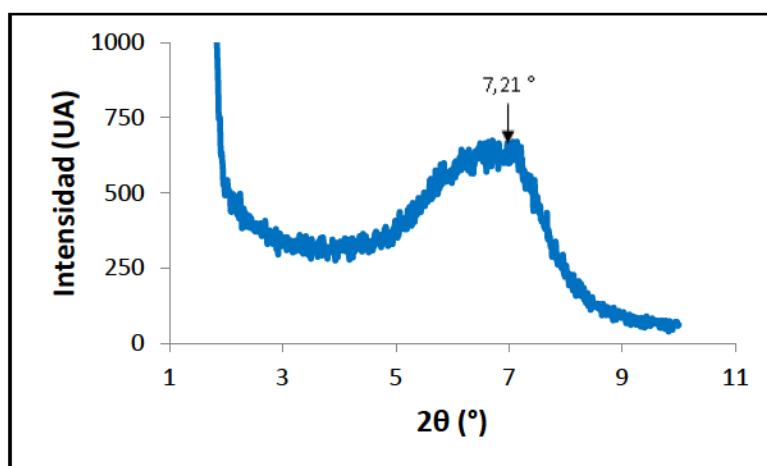


Figura 3.12. Patrón de difracción de rayos X (DRX) característico de la MMT-Na natural.

El difractograma obtenido de la MMT pura, con su pico característico a $2\theta = 7,21^\circ$, se repite en la Figura 3.13 junto a los de las películas proteicas control, y al de las películas nanocompuestas control y coloreadas de blanco, negro, verde y naranja.

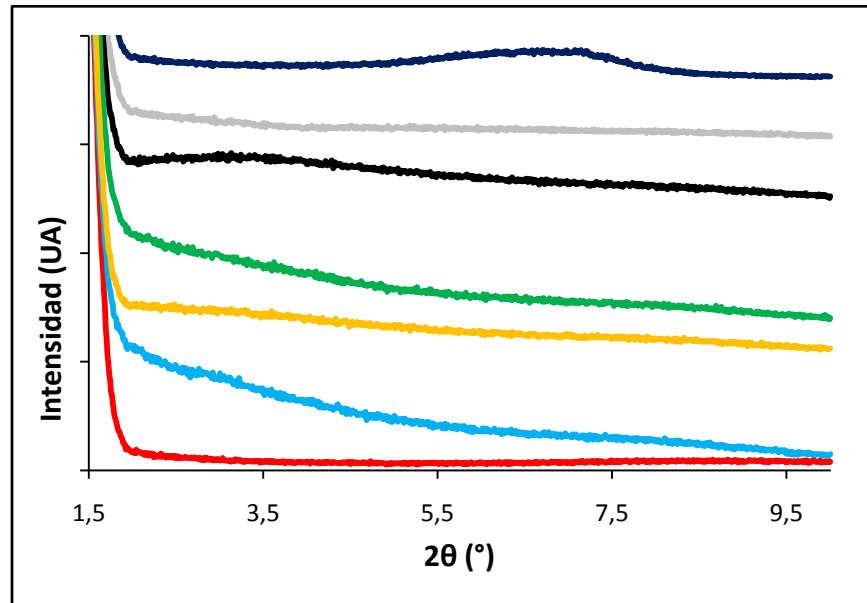


Figura 3.13. Difracción de rayos X (DRX) de la MMT pura (●) y de películas proteicas de soja sin colorear y sin MMT (●) control; y películas proteicas nanocompuestas sin colorear (●) y coloreadas de blanco (●), negro (●), verde (●) y naranja (●) con MMT.

Como era de esperar, el difractograma de la película proteica control (sin MMT) no presentó ninguna transición en el rango analizado (sin pico ni levantamiento de la línea de base) debido a su naturaleza amorfa. Por su parte, en el correspondiente a las películas proteicas de soja reforzadas con MMT (control sin colorante), no se observa ningún pico definido, ni el correspondiente a la MMT pura, ni otro que pudiera identificar un aumento definido en el espaciamiento de las capas de arcilla, pero sí un levantamiento de la línea de base en la medida que el ángulo tiende a cero. Ese levantamiento podría estar relacionado con un cierto grado de intercalación de las cadenas de proteínas en las galerías de las capas de arcilla, causando un ensanchamiento de la separación de las capas de la MMT en el nanocompuesto en relación con la MMT pura, en conjunto con capas de MMT exfoliadas, separadas del resto (Quillaqueo Gutierrez y col., 2012). En síntesis estas películas nanocompuestas presentarían un alto grado de intercalación-exfoliación de la MMT en la matriz proteica. Los difractogramas de las películas nanocompuestas coloreadas mostraron modificaciones respecto del de la película nanocompuesta control, lo que indicaría que los componentes presentes en los colorantes influenciarían en el grado de intercalación-exfoliación, pero en todos desaparece el pico característico de la MMT confirmando la formación de los nanocompuestos. En el caso de las películas blancas y naranjas no

se observaron picos desplazados a ángulos menores, ni prácticamente el levantamiento de la línea de base, lo que permite suponer que los compuestos que integran estos colorantes estarían favoreciendo la exfoliación de la arcilla en la matriz proteica. Esto puede correlacionarse con las mejores propiedades de las películas nanocompuestas naranjas, y con el efecto refuerzo y la importante disminución en la opacidad de las películas nanocompuestas blancas. En el difractograma de la película verde tampoco se aprecia un pico definido, pero sí un levantamiento de la línea de base que resulta ser menor que el de la película nanocompuesta control que hace suponer un alto grado de intercalación-exfoliación. Por último, el agregado del colorante negro afectó la organización del nanocompuesto formado, que sí evidenció un corrimiento de pico de difracción a $2\theta = 3,2^\circ$, correspondiente a un espacio interlaminar $d_{001} = 2,75$ nm (mayor que el de la MMT pura), denotando una mayor importancia al fenómeno de intercalación de la proteína en las galerías de la MMT, pero que podría estar coexistiendo con capas de arcilla exfoliadas. En este caso algún componente del colorante negro estaría disminuyendo en parte la capacidad de la proteína de intercalarse entre las capas de arcilla y seguir separándolas hasta lograr la exfoliación completa de la misma.

Las películas nanocompuestas control y coloreadas fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y las micrografías resultantes se muestran en la **Figura 3.14**.

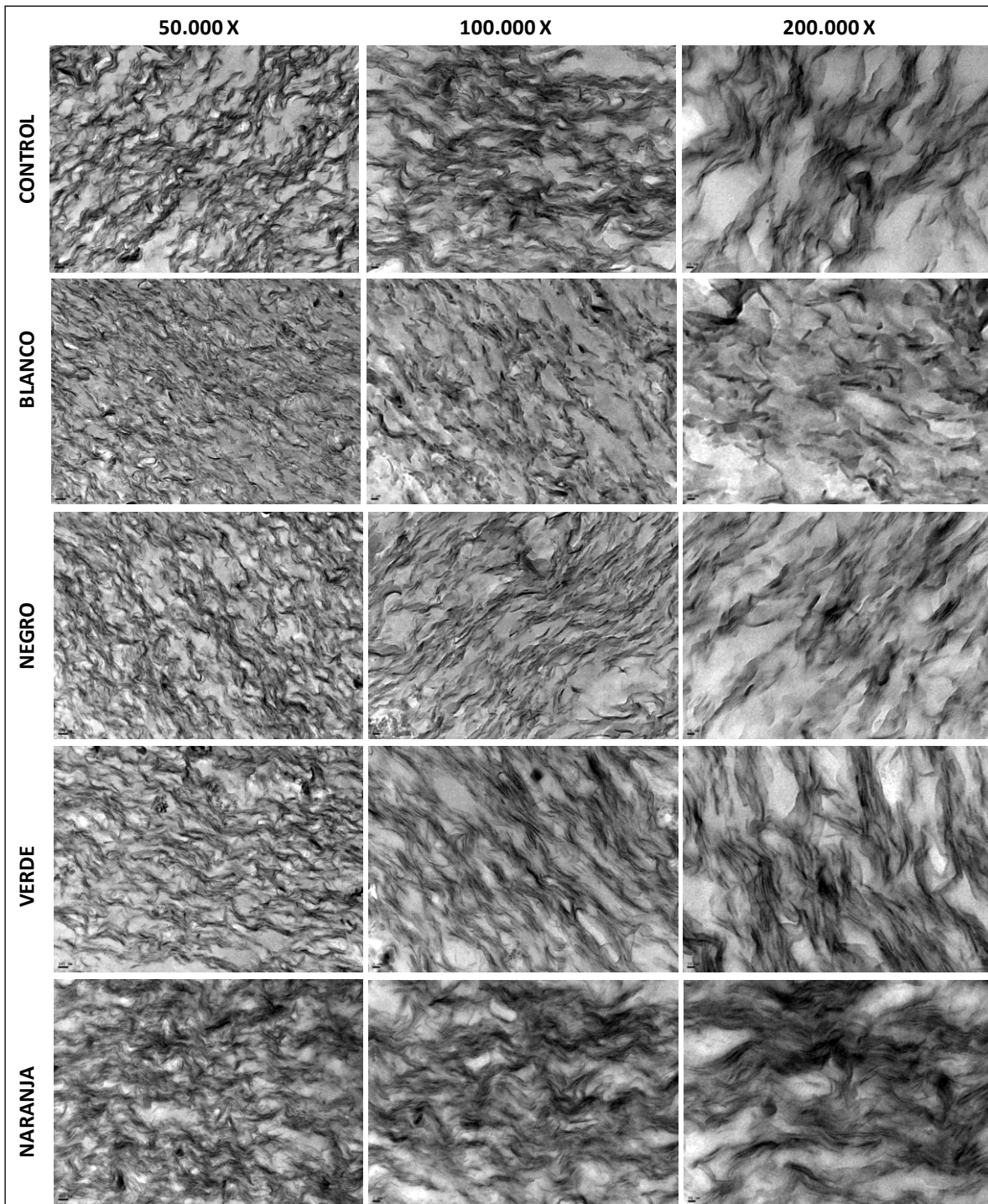


Figura 3.14. Microfotografías TEM de las películas nanocompuestas coloreadas.

Esta técnica complementa a la difracción de rayos X y permite visualizar como esa morfología vista por DRX se distribuye en la matriz proteica. En las mismas se puede observar la gran cantidad de MMT presente en la matriz (propia de la concentración seleccionada para

trabajar) y que la misma se encuentra homogéneamente dispersa en la matriz proteica. En todos los sistemas se observan láminas de arcilla totalmente exfoliadas, en conjunto con otras con distinto grado de separación de las capas pero alineadas, características de sistemas intercalados, evidenciando que el ordenamiento tactoide de las arcillas ha sido desplazado por las proteínas de soja lo que confirma el alto grado de exfoliación-intercalación alcanzado observado por rayos X. Así por ejemplo, las de las películas blancas reflejan una mejor distribución y mayor proporción de exfoliación tal como se observó en su correspondiente difractograma. También se observan regiones ricas en proteínas, sin presencia de arcilla, especialmente en las películas control. Esto evidenciaría que la presencia de los colorantes facilitó la distribución de la arcilla en la matriz proteica y tal vez podría ser responsable de no haber podido mejorar la permeabilidad al vapor de agua. Aun así esta organización de la estructura, definida por la afinidad de los componentes de cada formulación, y determinada por el uso de técnicas apropiadas para dispersar la MMT en agua y posteriormente en las dispersiones conteniendo a la proteína de soja y los colorantes, logró mejorar el comportamiento mecánico de las películas, así como sus propiedades ópticas y de barrera. Según Majdzadeh-Ardakani y col. (2010) la combinación de mezclado mecánico y ultrasonido favorece la dispersión eficiente de la arcilla, tal como se realizó en este trabajo.

3.4.7. Liberación del colorante en solución acuosa

Cuando se realizó la medida de solubilidad en agua de las películas proteicas y nanocompuestas coloreadas, se visualizó la liberación de al menos parte de los colorantes verde y naranja luego de 24 h, tal como se mostró en la **Figura 3.10**. A partir de esa observación se intentó cuantificar la liberación de los colorantes y evaluar si la presencia de MMT modificaba la retención de los mismos en las matrices nanocompuestas.

Esa liberación fue medida a partir de discos de película que se colocaron en contacto con agua, y de la misma se calculó espectrofotométricamente la cantidad de colorante liberado en el soluble a 1 min (t_i) y a las 24 h (t_f). Los resultados se resumen en la **Figura 3.15**.

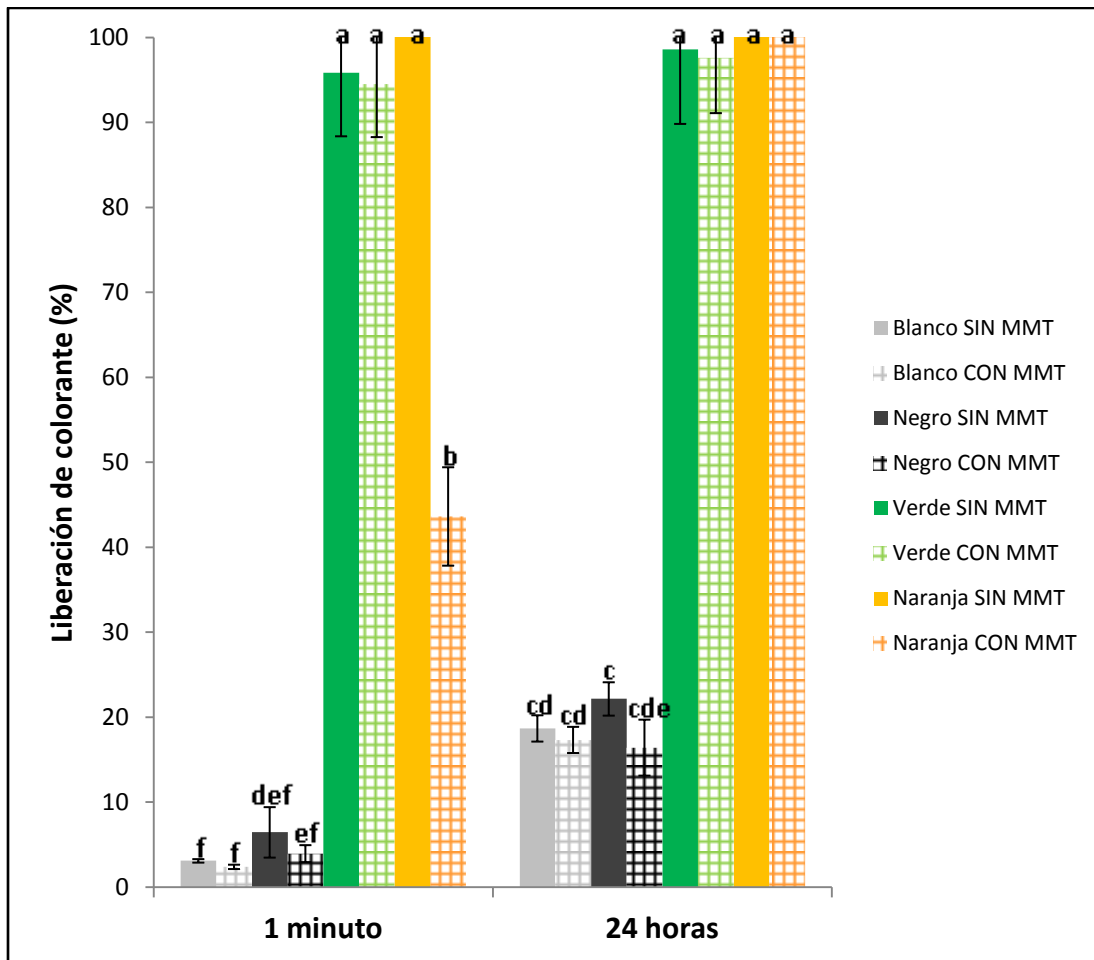


Figura 3.15. Liberación del colorante en contacto directo con agua medido a $t_i = 1$ minuto y $t_f = 24$ h. Barras con colores intensos corresponden a las películas proteicas coloreadas, y con textura a las correspondientes nanocompuestas. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El agregado de MMT a las películas proteicas coloreadas únicamente tuvo efecto en la retención del colorante a corto lapso de tiempo para la película coloreada de naranja. Luego de 1 min en contacto con agua se liberó el $43,6 \pm 5,7\%$ del colorante naranja contenido en la película nanocompuesta, y pasadas las 24 h de ensayo no se observó retención alguna, liberándose el 100% del colorante presente tanto en las películas proteicas como nanocompuestas de este color. Cuando se describió la absorción de agua de las películas, la MMT fue capaz de disminuir la cantidad de agua absorbida por las películas nanocompuestas naranjas, y quizás este comportamiento explicaría el retardo en la liberación del colorante naranja en las películas nanocompuestas. Los colorantes blanco y negro permanecieron más retenidos en las películas proteicas y nanocompuestas respecto a los colorantes verde y naranja. Luego de 1 min de tiempo de ensayo, las películas proteicas y nanocompuestas blancas y negras no mostraron diferencias en

el porcentaje de colorante liberado, alcanzado valores de liberación de colorante entre 2 y 6%; pasadas las 24 h, la liberación de colorante de estas películas alcanzo valores de 17 y 22%. El colorante verde de las películas proteicas y nanocompuestas fue liberado totalmente en los dos lapsos de tiempo evaluados en este ensayo. Estos resultados sugieren que los colorantes naranja y verde no se encuentran ligados fuertemente a las proteínas, y su naturaleza hidrofílica hace que se liberen fácilmente en contacto con el agua. La MMT solamente retardó inicialmente la liberación del colorante naranja, probablemente debido a la tortuosidad generada en la matriz para que difundan las moléculas que únicamente están presentes en la composición del colorante naranja (amaranto y amarillo ocaso) pero principalmente por las interacciones que este pueda estar manteniendo con la arcilla, que hace que el comportamiento de la película proteica y nanocompuesta de ese color presenten comportamientos bien distintos. En cambio, los colorantes blanco y negro parecerían estar más involucrados en la formación de la matriz, interaccionando más con la proteína de soja, sin influirle la presencia de la arcilla.

La importancia de conocer la retención de los colorantes en las películas, tanto proteicas como nanocompuestas, es fundamental para poder plantear potenciales aplicaciones.

3.4.8. Pérdida de peso en suelo

Se analizó la pérdida de peso en suelo de las películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas de blanco y negro, y los resultados se presentan en la **Figura 3.16**, en donde se muestra la pérdida de peso relativa de las películas evaluadas en función del tiempo del ensayo.

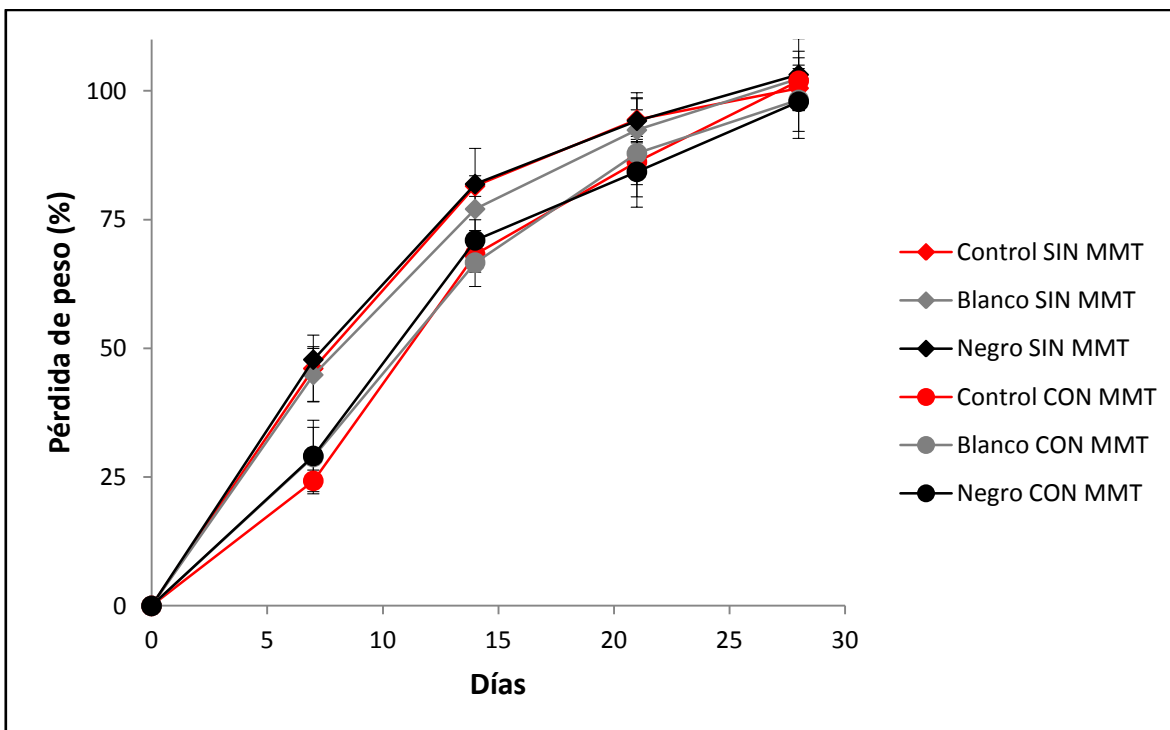


Figura 3.16. Pérdida de peso en suelo de películas proteicas y nanocompuestas control y coloreadas de blanco y negro durante cuatro semanas.

El agregado de MMT a las películas proteicas logró reducir significativamente la pérdida de peso de las películas control y blanco durante las dos primeras semanas de ensayo, y solo para la primera semana en el caso de las películas coloreadas de negro. El agregado de los colorantes no tuvo efecto en la pérdida de peso ni en las películas proteicas ni en las nanocompuestas.

Las películas proteicas fueron los materiales que perdieron peso más rápidamente en las condiciones de ensayo. Al cabo de una semana se observó una pérdida de peso del $46,1 \pm 6,4\%$ en las películas proteicas control, de $44,8 \pm 5,1\%$ para las películas proteicas blancas, y de $47,8 \pm 2,5$ para las películas proteicas negras. En cambio, en esa primer semana de ensayo, las películas nanocompuestas control perdieron peso en un $24,2 \pm 2,1\%$, las blancas $28,9 \pm 7,1\%$ y las negras $29,1 \pm 5,5\%$. En la segunda semana, las pérdidas de peso rondaron el 80% para las películas proteicas y el 69% para las películas nanocompuestas, siendo significativa la diferencia sólo para las películas control y blanca. A partir de la tercer semana, no se observaron diferencias entre la pérdida de peso de las películas proteicas y nanocompuestas y los valores de pérdida de peso rondaron entre el 90 y el 95%, siendo muy difícil la manipulación de todas las películas por el alto grado de desintegración; ya para la cuarta semana, tanto las películas proteicas como nanocompuestas control y coloreadas de blanco y negro se encontraron completamente

desintegradas. Mediante ensayos de pérdida de peso similares, Dalev y col. (2000) evidenciaron que películas proteicas en base a gelatina, control y con diferentes agregados de agentes entrecruzantes, no duraron más de 6 días en contacto con suelo, ya que fueron completamente degradadas. Condés (2012) estudió la pérdida de peso en suelo para películas en base a proteínas de amaranto, control y nanoreforzadas con nanocristales de almidón y pudo evidenciar una diferencia en la pérdida de peso de las películas al cabo de una semana, siendo del 80% para las películas proteicas y en el orden del 20% para las nanoreforzadas; para la segunda semana de ensayo, este autor informó que tanto las películas proteicas de amaranto como las nanoreforzadas fueron casi completamente degradadas. Las películas proteicas de soja evaluadas en el ensayo de pérdida de peso de este capítulo presentan mayor durabilidad si se las compara con las películas proteicas en base a gelatina y a amaranto. Sin embargo, el retraso inicial en la pérdida de peso de las películas nanocompuestas en base a proteínas de soja y MMT, se asemeja al retraso inicial que Condés (2012) informó para películas proteicas de amaranto nanoreforzadas con nanocristales de almidón, por lo que el empleo de nanorefuerzos en películas proteicas trae aparejado un aumento, aunque sea a intervalos de una a dos semanas, de la durabilidad de la película en contacto con suelo.

El retraso en la pérdida de peso inicial de las películas nanocompuestas, indicaría que la MMT estaría protegiendo a la matriz proteica. Chevillard y col. (2011) estudiaron la biodegradación de materiales (*pellets*) proteicos y nanocompuestos en base a gluten de trigo y 2 tipos diferentes de MMT, una natural y otra orgánicamente modificada, obtenidos por extrusión. El método que emplearon para medir la biodegradación se basó en la norma ASTM D5988-96, que utiliza la medición del CO₂ generado durante la biodegradación como producto proporcional del sustrato biodegradado. Pudieron evidenciar un retraso en la biodegradación de las muestras que contenían las arcillas respecto a las que solo se componían de proteína, y a partir de sus resultados, estos autores proponen tres hipótesis posibles para explicarlo:

- i) la menor capacidad de adsorción de agua de los materiales con MMT;
- ii) la presencia de tortuosidad en el camino a penetrar dada la nanodispersión de estos silicatos, resultando en una difusión lenta de agua, microorganismos y sus enzimas;
- iii) el establecimiento de interacciones específicas entre los silicatos en capas y la matriz que lleva a una menor disponibilidad a que esta se biodegrade.

El aspecto macroscópico de las películas durante el avance del ensayo en las 4 semanas evaluadas se muestra en la Figura 3.17. Más allá de la pérdida de masa que puede apreciarse con el transcurso de las semanas (y que se discutió anteriormente), puede observarse que las películas control sufren un cambio de color ya luego de permanecer la primera semana bajo tierra, su tonalidad amarillenta característica pasó a una tonalidad más opaca y amarronada, similar a lo obtenido por González y col. (2011) también para películas proteicas de soja.

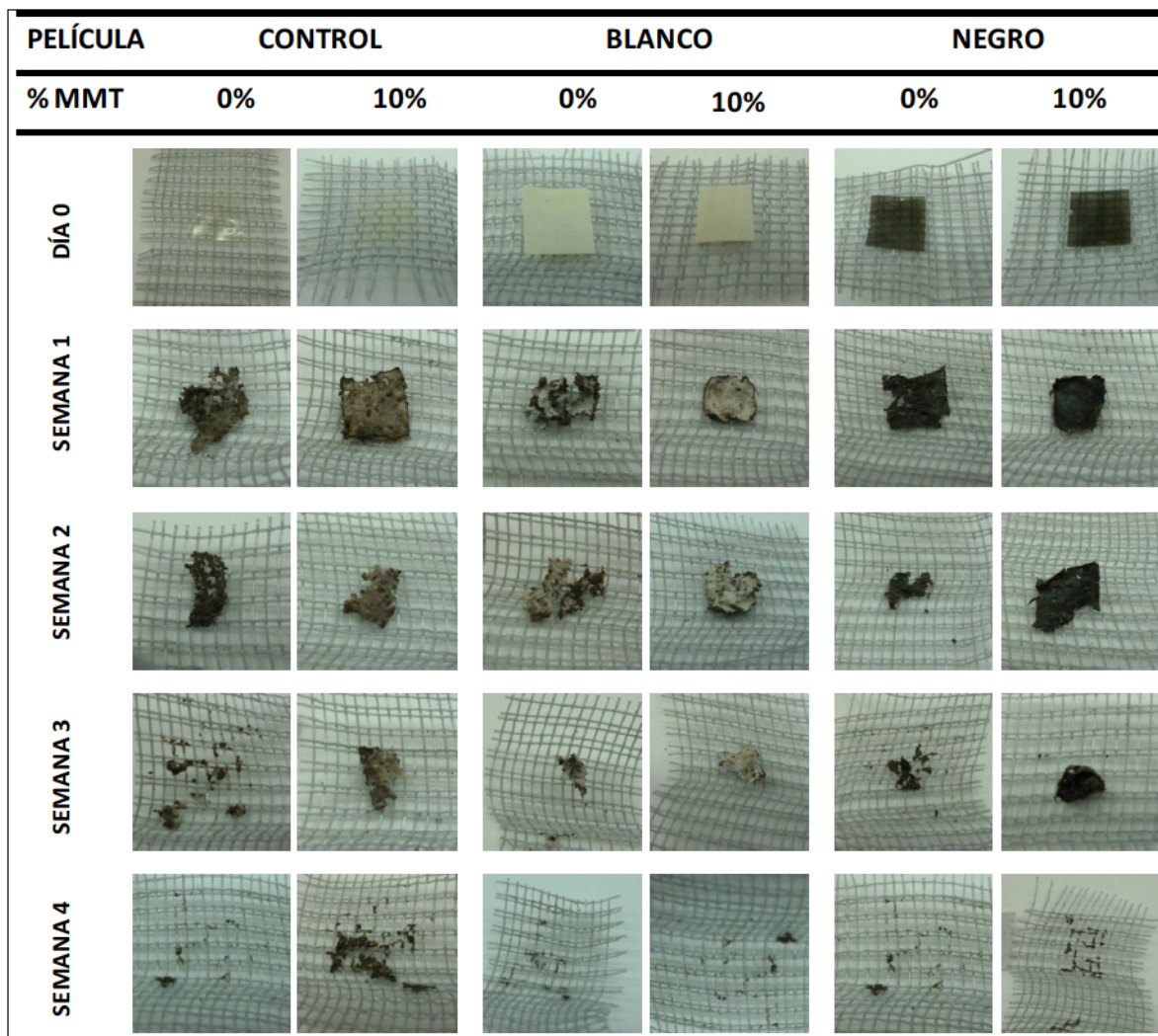


Figura 3.17. Apariencia de las películas durante el ensayo de pérdida de peso en suelo.

3.5. Conclusiones

Fue posible obtener materiales nanocompuestos a partir de proteínas de soja, MMT y colorantes comestibles, que podrían ser evaluados para distintas aplicaciones. El agregado de la MMT le otorgó a las películas una mayor transparencia (menor opacidad), mejores propiedades mecánicas (generando aumentos en la tensión a la ruptura y módulo de Young, y disminuyendo su elongación) y prolongó su período de biodegradación (medido a través de la pérdida de peso en suelo), pero no logró modificar la permeabilidad al vapor de agua a todas las películas estudiadas. El agregado de colorantes a las películas proteicas y nanocompuestas permitió obtener una variedad de materiales con distintas propiedades ópticas, con mayor capacidad barrera a la luz en todos los casos respecto a las películas control. La arcilla solo logró mejorar la retención del colorante naranja en la matriz proteica frente al contacto con agua a tiempos cortos. Por su parte los colorantes le dieron interesantes propiedades barrera a la luz, especialmente en el caso del blanco sin modificar en general las propiedades fisicoquímicas de las películas. Estos colorantes parecieran mejorar la distribución de la MMT en la formulación, y variar su grado de exfoliación-intercalación, responsable del efecto refuerzo otorgado. Los colorantes blanco y negro parecieran ser los más adecuados debido que interactuaron más fuertemente con las proteínas, y presentaron una menor liberación frente a agua.

La adición de MMT retardó la desintegración de las películas nanocompuestas control y coloreadas de blanco y negro en hasta 2 semanas. Esto resulta importante en el caso de aplicaciones en las que se requiera una mayor duración de los materiales como por ejemplo el empleo de *mulching* en agricultura. De todos modos, resulta necesario evaluar otras estrategias para que la duración de los materiales sea compatible con el ciclo fenológico de los cultivos.

4. Películas proteicas de soja reforzadas con nanofibras de celulosa y activadas con aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.)

4.1. Introducción

En los últimos años, ha crecido en forma marcada el interés en los micro y nanorefuerzos obtenidos a partir de polisacáridos, principalmente celulosa, almidón y quitosano. La celulosa es uno de los polímeros naturales más importantes y el más abundante sobre la tierra, encontrándose ampliamente distribuida bajo la forma de variadas fuentes vegetales, tales como fibras de plantas (algodón, cáñamo, lino), algas, hongos; así como de algunas especies de invertebrados y bacterias (Anglés y Dufresne, 2001). También se ha estudiado en forma detallada la celulosa bacteriana secretada extracelularmente por bacterias específicas, entre ellas las del género *Gluconoacetobacter* sp. (Klemm y col., 2009; Siró y Plackett, 2010). En lo que respecta a las fuentes de plantas, la celulosa puede encontrarse en forma abundante en algunas plantas fibrosas (como las fibras de sisal y formio), en semillas (algodón), y en los tallos primarios (lino) o secundarios (madera) (Lavoine y col., 2012). Anglés y Dufresne (2001) obtuvieron celulosa a partir de la tunicina, compuesto presente en la superficie de organismos marinos llamados urocordados o tunicados. Varios trabajos han caracterizado y evaluado potenciales aplicaciones de fuentes de celulosa provenientes de deshechos o subproductos agroindustriales de bajo valor, como el bagazo de caña de azúcar y mandioca (Bras y col., 2010; Pasquini y col., 2010); la pulpa de remolacha azucarera (Azizi y col., 2004); la cáscara de higo (Habibi y col., 2009); la fibra de formio (Fortunati y col., 2013); algunas fuentes derivadas de la industria del papel (Boluk y col., 2011), etc.

Desde el punto de vista fisicoquímico, la celulosa es un homopolisacárido lineal de unidades β -1,4-D-glucosa. La estructura química básica de la celulosa se presenta en la **Figura 4.1**, y consta de segmentos repetitivos de un dímero denominado celobiosa, en los que cada monómero de anhidro glucosa presenta tres grupos hidroxilo. Estos grupos y su capacidad de generar fuertes uniones mediante puentes de hidrógeno, le confieren a la celulosa naturaleza altamente cohesiva, y capacidad de organizarse en estructuras microfibriladas (Pasquini y col., 2010).

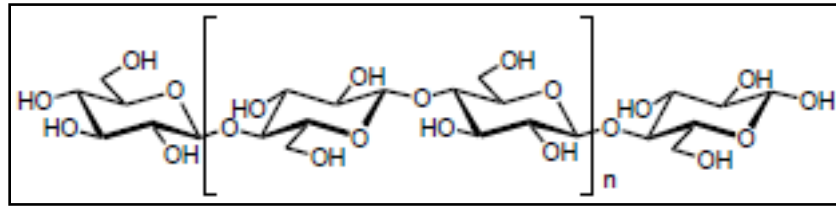


Figura 4.1. Estructura química de la celulosa mostrando las unidades repetitivas de celobiosas.

La celulosa es el componente mayoritario de las paredes celulares de vegetales (30% y en algunos casos 40% dependiendo la especie, del órgano y estado de desarrollo considerado), a las que les otorga resistencia. Se organiza en microfibrillas (de 2 a 20 nm de diámetro) que se forman durante la biosíntesis y son empaquetadas por las hemicelulosas, ligninas y sustancias pécticas (Siqueira y col., 2010; Habibi y col., 2010). Estas microfibrillas se van agregando y forman una fibrilla como se muestra en la **Figura 4.2**, estabilizadas por puentes de hidrógeno. Cada microfibrilla puede considerarse como una cadena lineal de cristales de celulosa interrumpidas por dominios amorfos desordenados a lo largo del eje (Azizi Samir y col., 2005).

La celulosa, al igual que la hemicelulosa y sustancias pécticas, es de naturaleza hidrofílica mientras que las ligninas son hidrofóbicas. Las hemicelulosas son heteropolisacáridos con estructura diversa. La más abundante en la pared de plantas Dicotiledóneas no comelinoides es el xiloglucano formado por una cadena principal de glucosa con uniones β -1,4 y cadenas laterales de xilosa, galactosa y fucosa. Otros grupos de hemicelulosas incluyen a los xilanos y mananos. Las hemicelulosas son moléculas más cortas que la celulosa comúnmente ramificadas lo que hace que sean más solubles (son solubles en álcali 1 o 4 M dependiendo del tipo). Las ligninas son polímeros amorfos de unidades de fenilpropano y se encuentra en niveles apreciables sólo en paredes secundarias. Por su parte, las pectinas son también un grupo diverso de polisacáridos de naturaleza ácida caracterizados por ser ricos en unidades de ácido galacturónico con variable grado de metil esterificación.

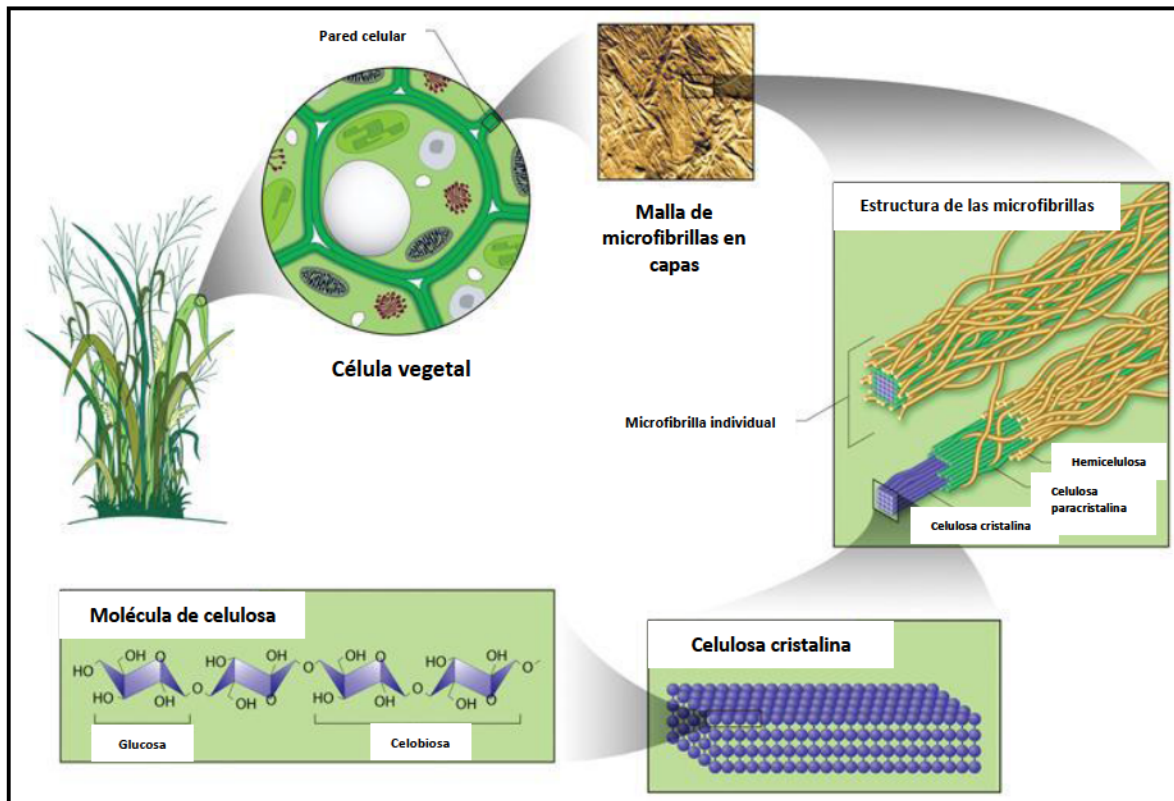


Figura 4.2. Esquema de la pared celular vegetal y de su organización microfibrilar (Siqueira y col., 2010).

Entendiendo esta organización de la celulosa en las paredes celulares de las plantas, es posible a partir de ella obtener distintos tipos de nanorefuerzos, capaces de mejorar las propiedades barrera y mecánicas de biopolímeros, debido a su alta resistencia específica, (Lavoine y col., 2012):

i) *Nanocristales de celulosa (NCC)*: también conocidos como celulosa nanocristalina, *whiskers* de celulosa, microcristales de celulosa, entre otros (Abdul Khalil y col., 2014). Se trata de estructuras obtenidas por el procesamiento de la celulosa bajo condiciones controladas, que conducen a la formación de cristales individuales de alta pureza. El proceso principal en la preparación de NCC se basa en una hidrólisis ácida fuerte bajo condiciones (temperatura, agitación y tiempo) estrictamente controladas. Las regiones amorfas de la celulosa, que se consideran defectos estructurales, son atacadas bajo estos procesos de hidrólisis ácida, dejando las zonas cristalinas (dominios más resistentes) intactas (Azizi y col., 2005; Habibi y col., 2010). En general, después del proceso de hidrólisis, se realiza una centrifugación, diálisis en agua, y/o lavados sucesivos con agua para eliminar remanentes de ácido. Los NCC en general rondan los 5-70 nm de diámetro y el largo

puede ser de 100 a 250 nm. Si el material de partida es de origen vegetal, antes de los pasos de hidrólisis, es necesario realizar tratamientos alcalinos y de blanqueo para eliminar hemicelulosas y ligninas que podrían afectar las propiedades de los nanocompuestos (Siqueira y col., 2010).

Diversos autores han trabajado en el impacto de las condiciones de hidrólisis sobre el tamaño y estabilidad de los NCC resultantes, ya que son varios los parámetros involucrados (Bondeson y col., 2006). Además de estos procesos, otros autores sugieren que se pueden emplear procesos de ultrasonido luego de la obtención de los NCC para favorecer su homogenización y evitar la agregación (Bras y col., 2010; Pasquini y col., 2010; Atef y col., 2014). Otra alternativa para obtener NCC es la que proponen Atef y col. (2014), quienes sumaron a la hidrólisis ácida un tratamiento mecánico. Estos autores emplearon suspensiones acuosas de celulosa microcristalina comercial al 50:50, y realizaron la hidrólisis con ácido sulfúrico al 64% p/p a 45 °C por 12 min, centrifugaron a 6000 rpm 15 min, y realizaron diálisis contra agua hasta pH alrededor de 5-7. Posteriormente, generaron un tratamiento mecánico en un homogenizador a una velocidad de 13000 por 20 min a temperatura de 20 °C, y posterior ultrasonido por 30 min.

Estos nanocristales de celulosa (NCC), presentan características mecánicas muy interesantes. Su módulo de Young se encuentra entre 130 GPa (Sakurada y col., 1962) y 250 GPa (Zimmermann y col., 2004), valor cercano al módulo de un cristal perfecto de celulosa nativa (\cong 167,5 GPa) (Tashiro y Kobayashi, 1991; Habibi y col., 2010). Además, los NCC poseen propiedades ópticas interesantes ya que dadas sus pequeñas dimensiones (menores que las de las nanofibras de celulosa) dispersan menos la luz, mejorando la transparencia de los materiales nanocompuestos (Abdul Khalil y col., 2014).

ii) *Nanofibras de celulosa o celulosa microfibrilada (MFC)*: a estas nanofibras también se las conoce como microfibrillas de celulosa, nanofibrillas de celulosa, celulosa nanofibrilada, o celulosa microfibrilar, entre otros sinónimos (Siqueira y col., 2010; Klemm y col., 2011; Dufresne, 2012; Brinchi y col., 2013; Abdul Khalil y col., 2014). La celulosa microfibrilada (MFC) es preparada por cizallamiento mecánico de fibras de celulosa con el fin de separar las microfibrillas en sus cadenas constitutivas (Lavoine y col., 2012; Siró y col., 2010), empleando equipamientos que generan alto grado de cizalladura como el que se describe en la Figura 4.3. De este modo se generan largos filamentos de celulosa flexibles en la escala nanométrica (20-60 nm de diámetro y varios micrómetros de longitud). El producto obtenido sólo contiene un pequeño número de defectos, por lo que su módulo de Young axial es muy alto (\approx 150 GPa), mayor que el del acero y similar al

del Kevlar (Dufresne, 2012). Al igual que en la obtención de los nanocristales, si se parte de materia prima de origen vegetal es importante realizar antes de los tratamientos mecánicos, tratamientos alcalinos y de blanqueo para eliminar hemicelulosas y ligninas que podrían afectar las propiedades de los nanocompuestos (Siqueira y col., 2010).

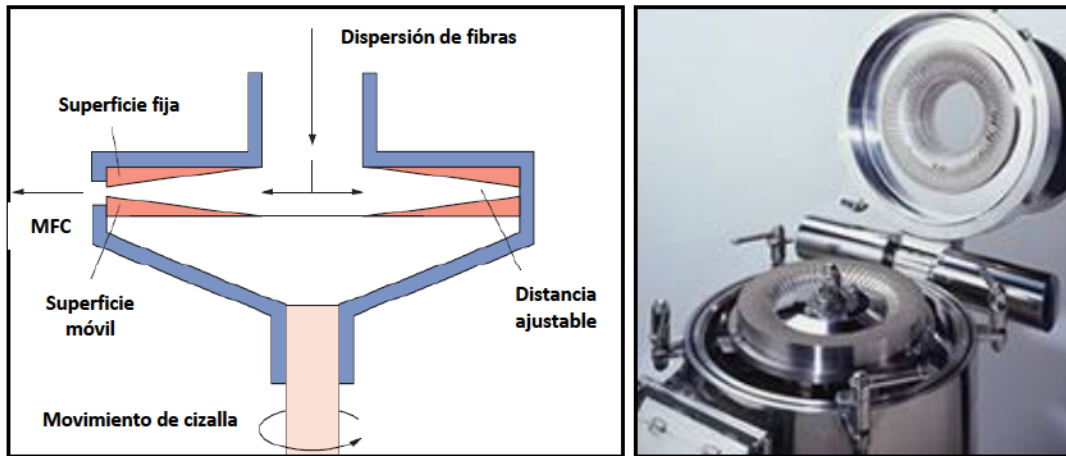


Figura 4.3. Esquema del funcionamiento de un molinillo homogeneizador tipo empleado en la producción de MFC (A); foto de un molinillo de fricción ultrafina (Super Masscolloider, Masuko Sangyo Co, Japón) (B).

Se ha informado en bibliografía la obtención de MFC por tratamiento mecánico a partir de diferentes fuentes, como pulpa de papel blanqueada (Wang y col., 2011), pulpa de papel Kraft (Matsuda y col., 2001), pulpa de madera de *Eucalyptus* (Bilbao-Sainz y col., 2011), fibras de sisal (Siqueira y col., 2010) y paja de trigo (Zimmermann y col., 2010).

A diferencia de los NCC, la MFC presenta zonas amorfas y cristalinas, formando una estructura más parecida a una red (Lu y col., 2008). La relación de aspecto (L/d) es muy alta en la MFC, lo que denota un umbral muy bajo de percolación, por lo que la capacidad de formar una red rígida es muy ventajosa (Lavoine y col., 2012).

La desventaja de los procesos para obtener MFC para el éxito comercial ha sido el alto consumo de energía de los homogeneizadores. Lavoine y col. (2012) han demostrado que es necesario repetir el procedimiento de homogeneización varias veces, con el fin de aumentar el proceso de desintegración, lo que requiere aún más cantidad de energía. Progresos en la producción MFC se han logrado mediante la combinación de procesos mecánicos con tratamientos enzimáticos (con celobiosa hidrolasas y endoglucanasas), tratamientos ácido-álcali, así como a través de un nuevo proceso basado en una reacción de oxidación con 2,2,6,6-

tetrametilpiperedina-1-oxil (TEMPO) que facilita la separación de las nanofibras (Pääkkö y col., 2007; Siqueira y col., 2010).

A modo de resumen, se pueden esquematizar los procesos mediante los cuales se pueden obtener NCC y MFC a partir de fibras vegetales de la siguiente manera:

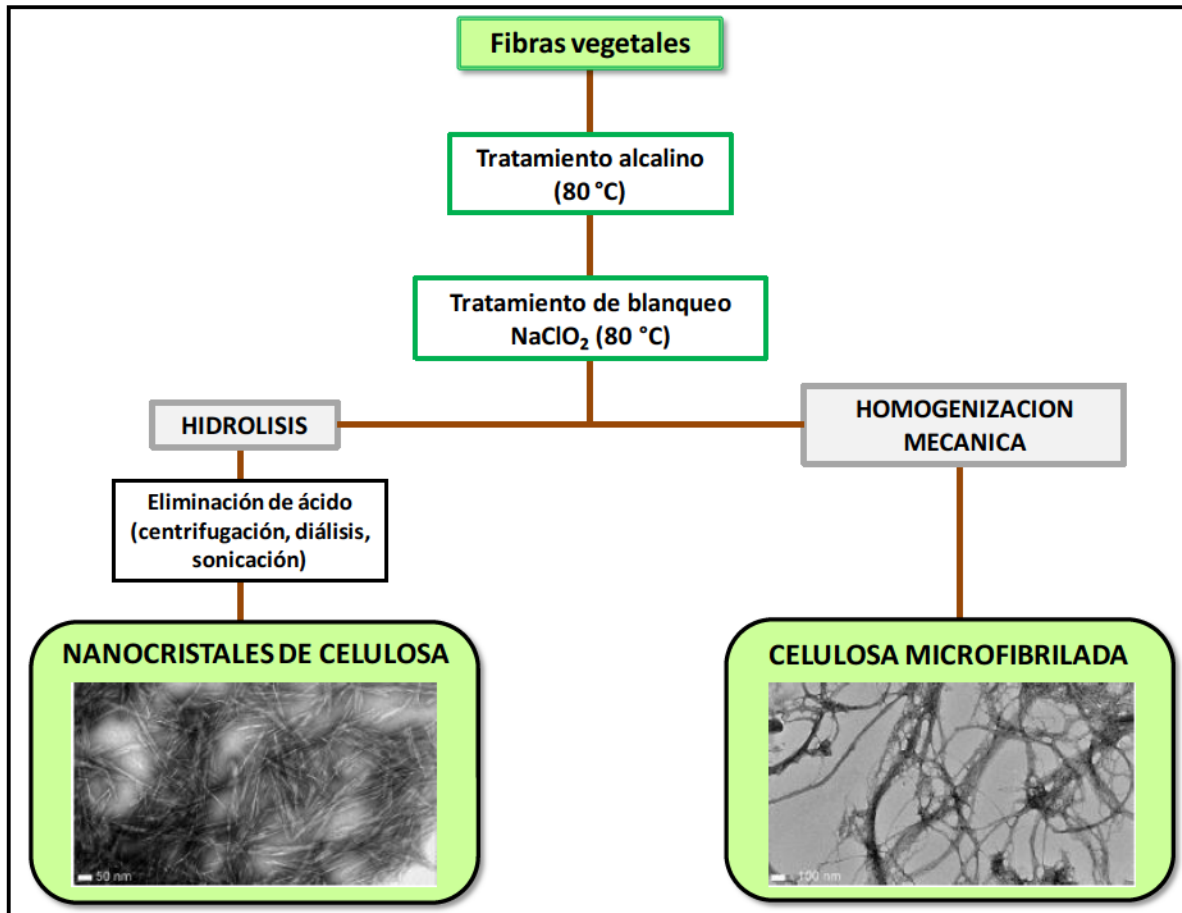


Figura 4.4. Esquema en la obtención de nanocristales de celulosa y celulosa microfibrilada a partir de fibras vegetales.

La utilización de fibras de formio como fuente de celulosa para la obtención de celulosa microfibrilada (MFC) todavía no ha sido reportada en bibliografía. Sí existen publicaciones en las que estas fibras actúan como refuerzo de resinas epoxi, o forman materiales compuestos con mezclas de residuos plásticos sintéticos, logrando mejoras en las propiedades mecánicas y en la estabilidad térmica (Newman y col., 2007; Rosa y col., 2010; Guen y Newman, 2007; Jayaraman y Halliwell, 2009). También se ha estudiado el comportamiento de las fibras de formio en ensayos de degradación acelerada, evidenciando que los productos de degradación de estas fibras son

totalmente eco-compatibles (Weston y col., 2012). Estas fibras vegetales (empleadas principalmente en la industria textil para la fabricación de hilo, plantillas de calzados, alfombras, bolsas, etc.) se obtienen de las hojas de una planta monocotiledónea herbácea perenne llamada *Phormium tenax*, también conocida como lino de Nueva Zelanda (Carr y col., 2005). En la Argentina el cultivo de esta planta se inició experimentalmente hace más de 40 años con la introducción de plantas traídas directamente de Nueva Zelanda, radicándose fundamentalmente en las islas del Delta formado por las Provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, zona en donde se dieron las mejores condiciones naturales y ventajas económicas para su cultivo, dada la adecuación de los terrenos, la facilidad de riego, el acceso a transporte cercano y la cercanía al mercado de transformación, industrialización y consumo (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina: <http://www.minagri.gob.ar/site/institucional/biblioteca>).

El uso potencial de nanocompuestos como portador o vehículo de compuestos activos en el campo del envasado de alimentos está actualmente siendo explorado con mucha atención porque, como se mencionó en el capítulo anterior, los nanorefuerzos presentes en la formulación podrían modular la liberación de los principios activos. La tendencia actual en 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, pimienta, tomillo, romero y clavo (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; Pelissari y col., 2009). 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 (Gutiérrez y col., 2009; Sánchez-González y col., 2011).

El aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.) es un inhibidor efectivo de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* así como de numerosos microorganismos deteriorantes (Cressy y col., 2003; Mytle y col., 2006). El principal activo identificado es el eugenol (Burt, 2004), cuya molécula se grafica en la **Figura 4.5**.

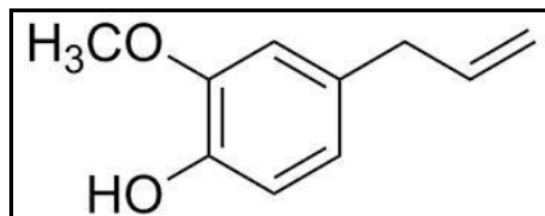


Figura 4.5. Estructura del eugenol, principio activo mayoritario del aceite esencial de clavo.

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 (Gómez-Estaca y col., 2010). Salgado y col. (2013) estudiaron la adición de aceite esencial de clavo a formulaciones en base a concentrados proteicos de girasol para obtener películas biodegradables y comestibles, con propiedades antioxidantes *in vitro* y antimicrobianas. Esas películas lograron retardar la auto-oxidación lipídica y el desarrollo de bacterias mesófilas totales aplicadas para la preservación de hamburguesas de sardinas refrigeradas. Echeverría (2012) estudió sistemas nanocompuestos de matriz proteica en base a proteínas de soja y montmorillonita (MMT), con la adición a estas formulaciones de aceite esencial de clavo de olor. Al analizar la actividad antioxidante *in vitro* de estos materiales, este autor evidenció que las películas proteicas de soja presentaban una actividad antioxidante muy débil, otorgada por compuestos polifenólicos co-extraídos con las proteínas de soja (isoflavonas, ácido clorogénico, cafeico, ferúlico) durante la obtención de los aislados proteicos, y en parte también a las proteínas mismas o a algunos péptidos que de ellas deriven. Al incorporar 10% de arcilla a las formulaciones proteicas, Echeverría (2012) observó un aumento en la actividad antioxidante, evidenciando que la MMT facilitaría la liberación de los compuestos polifenólicos. Con la incorporación de aceite esencial de clavo a las formulaciones nanocompuestas, logró incrementar la actividad antioxidante así como otorgar propiedades antimicrobianas a las películas resultantes, observando que la difusión de los distintos agentes activos que componen al aceite esencial podían variar con el contenido de arcilla, debido a la posible intercalación de sus moléculas en la estructura de la arcilla, provocando una liberación selectiva de los mismos al medio. Por último, 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 auto-oxidación lipídica durante todo el período de almacenamiento estudiado, sin

observar indicio de la difusión de los metales presentes en la arcilla al músculo de pescado en el tiempo analizado.

En un sistema diferente formado por gelatina, sepiolita y aceite esencial de clavo, Giménez y col. (2012) también observaron que la presencia de la arcilla favorecía la liberación gradual de los compuestos fenólicos presentes. Mascheroni y col. (2010) desarrollaron un sistema de liberación para el carvacrol basado en una matriz de gluten de trigo reforzadas con MMT que fue eficiente en retener y proteger al agente antimicrobiano activo durante la etapa de procesamiento. Quilaqueo Gutiérrez y col. (2012), estudiaron la funcionalidad de películas nanocompuestas en base a carboximetilcelulosa y montmorillonita aditivadas con extracto de murta, y observaron que mientras el agregado de MMT mejoró significativamente las propiedades mecánicas y de barrera (al vapor de agua, O₂ y CO₂) de las películas de CMC, el extracto de murta le otorgó propiedades antioxidantes, plastificó la matriz y modificó las propiedades de barrera a gases de manera diferencial según el contenido de arcilla adicionado.

Similares comportamientos podrían ocurrir en matrices proteicas con agregado de nanofibras de celulosa, aunque estos sistemas han sido mucho menos explorados en la literatura. Algunos autores han realizado estudios de liberación controlada de compuestos activos o enzimas propuestos para envasado de alimentos, pero se tratan de superficies diferentes a un material nanocompuesto. Por ejemplo, Cozzolino y col. (2013) estudiaron la capacidad de liberación de lisozima a partir de matrices de celulosa microfibrilada (MFC) adsorbidas sobre sustratos plásticos, en alimentos modelo (agua, y agua/etanol), encontrando que la MFC permite la rápida liberación de la enzima estudiada.

4.2. Objetivos

Obtener nanorefuerzos de celulosa microfibrilada a partir de fibras de formio, determinar el efecto que causa su adición a matrices proteicas de soja y analizar la activación de los sistemas nanocompuestos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a través del agregado de aceite esencial de clavo de olor a la formulación.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Materiales

Se utilizó el mismo aislado proteico de soja descrito en la sección 3.3.1, glicerol (Anedra, Argentina) y aceite esencial de clavo de olor *Syzygium aromaticum* L. (AEC, Eladiet SA., España).

La celulosa microfibrilada (MFC) se preparó a partir de fibras de formio (*Phormium tenax*) cultivadas en Tigre (Buenos Aires, Argentina) y adquiridas a la empresa Silkum (Argentina). El resto de los reactivos utilizados para llevar a cabo las experiencias que se describen a continuación fueron todos de calidad p.a.

4.3.2. Obtención y caracterización de los nanorefuerzos de celulosa

4.3.2.1. Pre-tratamiento de las fibras

Las fibras de formio fueron cortadas ($\approx 5-10$ mm) y sometidas a dos tratamientos alcalinos con NaOH (1 N) a 80 °C durante 2 h, y dos tratamientos de blanqueo con H₂O₂ (3% v/v), también a 80 °C durante 2 h. Luego de cada tratamiento, las fibras fueron separadas por filtración y lavadas con agua destilada y finalmente secadas en una estufa de convección forzada a 80 °C, obteniendo así las fibras blanqueadas.

4.3.2.2. Obtención de celulosa microfibrilada (MFC)

Las fibras de formio pre-tratadas se dispersaron en agua destilada (1% p/v) durante 16 h a temperatura ambiente. La suspensión resultante se sometió a tratamiento mecánico en un molinillo de fricción ultra-fina, cuyo nombre comercial es “Super Masscolloider” (Masuko Sangyo Co, Japón) a velocidad fija (3.125 rpm) y se analizó el efecto del número de ciclos de homogeneización (10-100 ciclos) sobre las propiedades de las nanofibras resultantes. A la dispersión de MFC resultante se le agregaron 10 gotas de cloroformo por litro para evitar la contaminación microbiana. La misma fue conservada a 4 °C hasta su empleo.

4.3.2.3. Caracterización de la celulosa microfibrilada (MFC)

La longitud de las fibras fue determinada en un equipo analizador de fibras MorFi LB-01 (Techpap, Francia) empleando una dispersión de 0,3 g fibra/L, usando el software MorFi v7.13.00. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

La morfología se observó con un microscopio de fuerza atómica (AFM). Se colocó 1 gota de la dispersión de fibras sobre un porta-muestra de mica, que luego se llevó a estufa por 10 min a 40 °C. La muestra se analizó en un equipo NanoScope III (Veeco Instruments, China), en modo *tapping*, utilizando una sonda cantilever de silicona. A partir de las imágenes se calculó el diámetro de la MFC utilizando el software Nanoscope 6.13.

Por último, el índice de cristalinidad (ICr) fue calculado a partir de los espectros de difracción de rayos X (DRX), obtenidos según la metodología descrita en la sección 3.3.4, a diferencia que los datos de difracción se obtuvieron de $2\theta = 5 \sim 60^\circ$ en un modo de tiempo fijo con un intervalo de paso de $0,10^\circ$, a una velocidad de paso de $2^\circ/\text{min}$ sobre pequeñas muestras de las suspensiones de MFC previamente secadas 3 h a 60°C , formando películas delgadas de nanofibras. El ICr fue calculado según la Ecuación 4.1 usando los valores de intensidad correspondientes a la difracción de la estructura cristalina y la fracción amorfa, según el método propuesto por Segal y col. (1959).

$$\text{ICr} = \left[\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Donde: I_{002} es la intensidad máxima del pico cristalino a 2θ entre $22-23^\circ$, y I_{am} es la intensidad mínima del pico ubicado a 2θ entre 18 y 19° .

4.3.3. Obtención de las películas nanocompuestas

Se obtuvieron películas con y sin AEC por *casting* a partir de dispersiones acuosas de SPI, plastificante y MFC. Dispersiones formadas por 5 g de SPI, 1,25 g de glicerol y 0, 4, 8, y 12 g MFC/100 g de SPI en 100 mL de agua destilada se mezclaron durante 2,5 h a 150 rpm y 20°C con un agitador vertical con hélices planas (Dragon LAB OS20-PRO, China), ajustando el pH a 10,5 con NaOH 2 N. En el caso de las películas adicionadas con aceite esencial de clavo, se agregaron 0,5 mL de AEC a las dispersiones antes mencionadas a las 2,25 h de agitación. 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 h. 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.

4.3.4. Caracterización de las dispersiones filmogénicas mediante ensayos reológicos

La viscosidad aparente (η_{app}) y el comportamiento de flujo de las dispersiones filmogénicas se evaluaron en un reómetro ReoStress 600 (Termo Haake, Karlsruhe, Alemania) con un sensor de platos paralelos de superficie rugosa con una diferencia de 1 mm entre platos. Las dispersiones se mantuvieron a 20 °C con un baño termostático (Circulator DC50 Thermo Haake, Alemania) conectado a la cubierta que rodea al sistema del sensor durante el ensayo. Se realizó un ensayo rotacional en donde el gradiente de velocidad de deformación se aumentó de 0 a 500 s⁻¹ en 2 min, se mantuvo constante a 500 s⁻¹ durante 1 min y luego se disminuyó desde 500 hasta 0 s⁻¹ en 2 min. Se registró el esfuerzo de corte (τ) en función del gradiente de velocidad de deformación (D) y así 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 y 500 s⁻¹ de cada dispersión filmogénica. El umbral de fluencia (τ_0) y los índices de flujo (n) y consistencia (K) fueron determinados ajustando los resultados experimentales mediante un software específico (HAAKE RheoWin 3.30.0000, Thermo Scientific, Alemania) con el modelo reológico de Herschel-Bulkley (Ecuación 4.2).

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

Ecuación 4.2

Donde: τ es el esfuerzo de corte (Pa), τ_0 es el umbral de fluencia o esfuerzo de corte en el momento inicial (Pa), K es el índice de consistencia (Pa sⁿ), D es el gradiente de velocidad de deformación (1/s) y n es el índice de flujo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.3.5. Caracterización de las películas

Las películas fueron caracterizadas mediante la determinación del espesor, color, opacidad, contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua, temperatura

de transición vítrea (T_g), propiedades mecánicas en tracción, y morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y difracción de rayos X (DRX) según las metodologías descritas en la sección 3.3.4. Además se realizaron caracterizaciones de ángulo de contacto, permeabilidad al oxígeno (O_2), morfología (mediante microscopía electrónica de barrido, SEM), actividad antioxidante, y actividad antimicrobiana de las películas según se describe a continuación.

4.3.5.1. Ángulo de contacto

Mediante la medida del ángulo de contacto se evaluó la hidrofobicidad superficial de las películas a temperatura ambiente con un goniómetro Ramé-Hart Modelo 250 (Ramé-Harts Instrument, 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 al instante. Se utilizó un analizador de imágenes para medir el ángulo formado entre la base, compuesta por la superficie de la película (en la cara expuesta al aire durante su formación) en contacto con la gota de agua, y la tangente a la gota de agua. Cada valor de ángulo de contacto considerado corresponde al valor medio de los ángulos de contacto iniciales medidos en ambos lados de la gota. Los resultados informados son los valores promedio de diez mediciones.

4.3.5.2. Permeabilidad al O_2

Se midió la velocidad de transmisión de O_2 a través de la película con un equipo OX-TRAN 2/21 (MOCON, Estados Unidos) según la norma ASTM D3985-02. Muestras de cada película se colocaron en las celdas de medida exponiendo una superficie de 50 cm^2 al permeante. Dicha celda se acondicionó a 23 °C y 65% de HR, a presión de 760 mm de Hg, y el gas permeante fue 100% O_2 . Se realizaron ciclos de medida de 60 min durante el tiempo necesario hasta que la lectura del equipo coincidiera 3 veces (equilibrio de permeación alcanzado), siendo esa la lectura final. Los resultados se expresaron según la velocidad de transmisión de O_2 a través de la película en mL O_2/m^2 día; y según su permeabilidad al oxígeno (OP) calculada dividiendo la velocidad de transmisión de O_2 por la presión de oxígeno y multiplicándola por el espesor de la muestra en mL $O_2 \mu m/m^2$ día kPa. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

4.3.5.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras de película se cortaron en tiras de 1 x 3 cm, y se fracturaron sumergiéndolas en nitrógeno líquido. Las probetas así obtenidas se dispusieron sobre una cinta adhesiva doble faz y se metalizaron con oro en un Sputter Coater S150B (Edwards, Inglaterra). Posteriormente, las superficies de las películas (cara expuesta al aire) y el área transversal de las fracturas se observaron en un microscopio electrónico de barrido SEM 505 (Philips, Holanda), con un voltaje de aceleración de 10 kV, a diferentes aumentos (50X en la superficie, y 300X en el área transversal de las películas).

4.3.5.4. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las películas proteicas se determinó de acuerdo a la capacidad de secuestrar radicales catiónicos de $ABTS^+$ (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)).

Preparación del radical $ABTS^+$: el radical $ABTS^+$ fue producido a partir de una solución acuosa 7mM de ABTS (Fluka, Sigma-Aldrich, Alemania), a la que se le agregó 2,45 mM de persulfato de potasio (Anedra, Argentina) y se la almacenó durante 12-16 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Previo a su utilización, la solución se diluyó con buffer fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,4 hasta obtener una absorbancia a 734 nm de $0,70 \pm 0,03$ en un espectrofotómetro (Beckman DU650, Alemania).

Realización del ensayo: muestras de película previamente pesadas se colocaron en 50 mL de agua destilada y se mantuvieron 24 h en agitación a 90 rpm. Posteriormente se determinó la actividad antioxidante de los solubles, los cuales fueron diluidos (1/40) en buffer fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,4. A partir de estas muestras diluidas, se tomaron 100 μ L y fueron mezclados con 900 μ L de la solución del radical $ABTS^+$, agitándolos durante 2 min en vortex, y a los 6 min se midió su absorbancia a 734 nm. Los resultados fueron expresados en mmol equivalente de ácido gálico por g de película soluble, basado en la realización de una curva de calibración de ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.3.5.5. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas proteicas y nanocompuestas con y sin agregado de AEC se determinó por el método de difusión en agar contra 4 especies microbianas (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*) seleccionadas por su importancia como agentes responsables de ETA's (enfermedades transmitidas por los alimentos), según el método propuesto por Gómez-Estaca y col. (2010). Las cepas fueron obtenidas de la Colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

Estas cepas bacterianas fueron crecidas en caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Francia) durante 24 h a 37 °C, para llegar a una concentración de 1×10^8 UFC/mL (DO=0,6 medida a $\lambda=600\text{nm}$). Posteriormente, 100 μL de este caldo nutritivo conteniendo a cada cepa bacteriana fueron sembrados en placas de Petri conteniendo agar nutritivo (Biokar Diagnostics, Francia). Discos de 1,5 cm de diámetro fueron colocados sobre las superficies inoculadas y las placas fueron incubadas 24 h a 37 °C. Se realizaron placas control de cada cepa colocando 20 μL de antibiótico como control (cloranfenicol 0,3% p/v, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Después de la incubación, las áreas claras que rodeaban a los discos fueron consideradas como magnitud de la actividad antimicrobiana, las cuales se midieron manualmente con un calibre (en mm) y se calculó el porcentaje de inhibición comparando el diámetro del halo formado con el diámetro del disco de película ensayado. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento de cada cepa bacteriana evaluada. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.3.6. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y expresados como la media \pm desviación estándar. Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey con un nivel de significación $\alpha = 0,05$, utilizando el programa SYSTAT (versión 12, Systat Software, Inc., Chicago, Estados Unidos).

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Obtención y caracterización de la celulosa microfibrilada obtenida a partir de fibras de formio

En la Figura 4.6 se muestran fotografías de las fibras de formio sin tratar y las pre-tratadas. Las fibras sin tratar presentaron una coloración y aspecto similar al publicado por otros autores para fibras de formio (Rosa y col., 2010). De las imágenes se puede apreciar que el tratamiento alcalino y de blanqueo generó un cambio de color en las fibras cortadas, y se aprecia en la Figura 4.6 B que las mismas tienden a aglomerarse después del pre-tratamiento a causa de los lavados y posterior secado a 80 °C. La diferencia de color se debe justamente a la eliminación de hemicelulosas y ligninas.

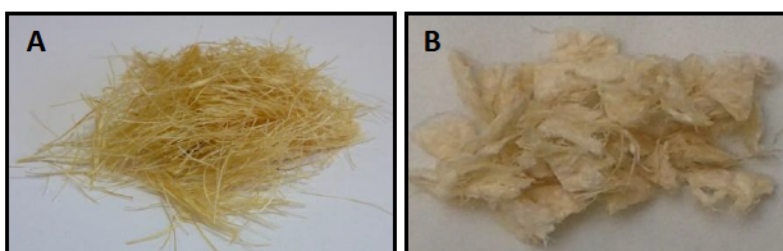


Figura 4.6. Fibras de formio (*P. tenax*) sin tratamiento (A) y pre-tratadas con tratamientos alcalino y blanqueo (B).

Las fibras pre-tratadas (Figura 4.6 B) se dispersaron en agua y se sometieron a un tratamiento mecánico en un molinillo de fricción ultra-fina con el fin de obtener la celulosa microfibrilada. Se analizó el efecto del número de ciclos de homogeneización (entre 10 y 100 ciclos) a velocidad fija (3125 rpm) sobre las dimensiones de las nanofibras resultantes. Se seleccionó el proceso que utilizaba 50 ciclos de homogeneización, ya que bajo estas condiciones se lograron obtener fibras a escala nanométrica, con diámetros de 50-60 nm y $485 \pm 2 \mu\text{m}$ de largo aproximadamente. Dimensiones similares fueron descritas por otros autores para MFC (Lavoine y col., 2012 y 2014; Siqueira y col., 2010; Siró y Plackett, 2010).

En la Figura 4.7 se muestra el aspecto visual de la suspensión acuosa conteniendo la MFC resultante de la homogeneización, así como también el aspecto de estas nanofibras visualizado por microscopía de fuerza atómica.

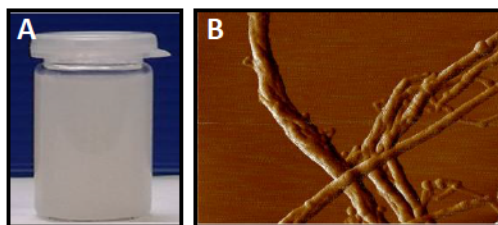


Figura 4.7. Celulosa microfibrilada (MFC) obtenida a partir de fibras de formio (*P. tenax*). Aspecto visual de la suspensión **(A)**; y microscopía de fuerza atómica (AFM) de las nanofibras obtenidas **(B)**.

A partir de la **Figura 4.7 A** puede observarse que la suspensión de MFC conservó un aspecto similar a un gel débil, que no floculó ni sedimentó. Habibi y col. (2009) obtuvieron suspensiones de MFC de aspecto similar a partir de cáscaras de higos y atribuyeron el hecho que las suspensiones no floculaban o sedimentaban a la presencia de hemicelulosas (4-*O*-Metilglucuroxilano) y pectinas residuales sobre la superficie de las nanofibras que estarían aportando polisacáridos ácidos necesarios para que las suspensiones de MFC sean estables. Por su parte, Lavoine y col. (2014) trabajaron con MFC obtenida de pulpa de *Eucalyptus*, pre-tratada enzimáticamente (2 h con endoglucanasa) y luego sometida a un tratamiento mecánico mediante un homogeneizador y obtuvieron suspensiones de MFC estables y con aspecto a gel, que atribuyeron a la gran área específica de las nanofibras y a la homogeneidad lograda en la dispersión, corroborada por FE-SEM (microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo). La microfotografía AFM en la **Figura 4.7 B** permite observar la forma cilíndrica característica de la MFC y la relación de aspecto (L/d) elevada ($\cong 8900$) característica de estas nanofibras (Lavoine y col., 2012).

En la **Figura 4.8** se muestra el difractograma de rayos X de la MFC. En el mismo se pudieron observar dos picos definidos a $2\theta = 14,6$ y $22,6^\circ$. El segundo pico puede atribuirse al plano (002) de la forma polimórfica celulosa I, también informada por otros autores (Bras y col., 2010; Lu y col., 2010). Mientras que la zona anterior, ángulos menores $12-17^\circ$, corresponden a la intensidad dispersada por la parte amorfa. Cabe señalar que la magnitud relativa de estos picos depende de la orientación de las nanofibras, que la determinación de DRX para MFC se realizó en una película de MFC seca, y que el secado induce a una fuerte orientación plana que no ocurre para las películas compuestas (Dufresne, 2012). A partir de estos picos se calculó el índice de cristalinidad que resultó ser 35,5%.

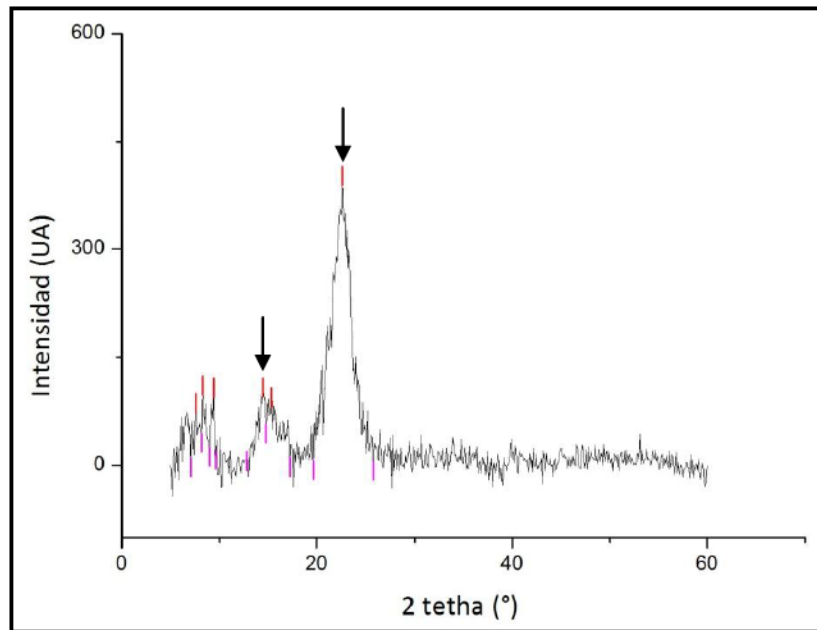


Figura 4.8. Difractograma obtenido a partir de una película seca de MFC.

Otros autores han obtenido MFC con 86 a 92% de cristalinidad por homogeneización de pulpa de *Eucaliptus* y pino (Besbes y col., 2011), y con 10-15% de cristalinidad para MFC a partir de pulpa de remolacha azucarera (Agoda-Tandjawa y col., 2010).

4.4.2. Caracterización reológica de las dispersiones filmogénicas

La **Tabla 4.1** resume las características reológicas de las dispersiones filmogénicas. Los valores experimentales de esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad de deformación se ajustaron satisfactoriamente al modelo de Herschel-Bulkley, obteniéndose coeficientes de correlación mayores a 0,99 para todos los casos.

Tabla 4.1. Comportamiento reológico de dispersiones filmogénicas en base a proteína de soja y glicerol a pH 10,5 con agregado creciente de MFC (0, 4, 8, y 12 g cada 100 g de SPI), con y sin el agregado de aceite esencial de clavo. **(A)** Parámetros reológicos según modelo de Herschel-Bulkley: umbral de fluencia (τ_0), índice de consistencia (K), y de flujo (n). **(B)** Viscosidad aparente a diferentes gradientes de velocidad de deformación (D= 60 y 500/s).

AEC	MFC (g/100 g SPI)	A. Parámetros reológicos según modelo de Herschel-Bulkley			B. Viscosidad aparente (mPa s)	
		τ_0 (Pa)	K (Pa s ⁻ⁿ)	n	D= 60/s	D= 500/s
SIN	0	0,09 ± 0,02 e	0,03 ± 0,01 d	0,87 ± 0,04 a	20,2 ± 1,2 e	15,3 ± 0,3 g
	4	1,23 ± 0,03 c	0,05 ± 0,01 d	0,80 ± 0,01 bc	46,9 ± 1,7 d	19,4 ± 0,4 f
	8	2,71 ± 0,04 b	0,08 ± 0,01 d	0,76 ± 0,01 c	80,8 ± 1,2 c	26,1 ± 0,3 de
	12	4,67 ± 0,17 a	0,18 ± 0,01 c	0,64 ± 0,01 d	124,6 ± 2,5 b	31,4 ± 0,6 c
CON	0	0,54 ± 0,03 d	0,08 ± 0,01 d	0,81 ± 0,01 bc	49,1 ± 0,9 d	28,2 ± 0,3 cd
	4	1,20 ± 0,06 c	0,05 ± 0,01 d	0,83 ± 0,02 ab	47,6 ± 1,1 d	21,2 ± 1,1 ef
	8	3,20 ± 0,28 b	0,49 ± 0,07 b	0,54 ± 0,01 e	130,3 ± 1,5 b	36,7 ± 3,7 b
	12	4,17 ± 0,39 a	1,04 ± 0,06 a	0,44 ± 0,01 f	175,3 ± 1,1 a	44,5 ± 2,1 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La dispersión proteica de SPI presentó un comportamiento de flujo pseudoplástico ($n < 1$) con valor bajo de umbral de fluencia (τ_0) e índice de consistencia (K). Cuando se evaluó la viscosidad aparente (η_{app}) tanto a bajas como a altas velocidades de deformación (D= 60 y 500/s respectivamente), la dispersión proteica de SPI mostró bajos valores de η_{app} , siendo de $20,2 \pm 1,2$ y $15,3 \pm 0,3$ mPa s para D= 60 y 500/s respectivamente. Este comportamiento coincide con resultados publicados para dispersiones acuosas de aislado proteico de soja similares (Echeverría y col., 2014).

Al incorporar MFC a las formulaciones proteicas de SPI, se acentuó progresivamente el comportamiento pseudoplástico de las dispersiones formadoras de películas, con una disminución en el índice de comportamiento de flujo (n) y éstas se volvieron más viscosas (aumentó el índice de consistencia y la viscosidad aparente). Si bien este aumento en las viscosidades aparentes se dio en todo el rango de velocidades de corte analizadas, el incremento con el contenido de MFC fue más importante a velocidades de corte bajas. Estos cambios pueden atribuirse a que el

agregado de MFC aumenta la cantidad de sólidos de la formulación, y a la probable interacción de las proteínas de soja (SPI) con las nanofibras (MFC) a través de puentes de hidrógeno (Siqueira y col., 2010) logrando un mayor grado de empaquetamiento (Lavoine y col., 2012). Las dispersiones de SPI con la máxima concentración de MFC agregada (12 g cada 100 g de SPI) exhibieron viscosidades aparentes altas ($124,6 \pm 2,5$ mPa s a $D= 60/s$). Aún así, su fluidez fue adecuada para permitir la eliminación de las burbujas generadas durante la agitación de las dispersiones y el procesamiento de las películas por *casting*. Por encima de esa concentración de MFC no fue posible obtener películas homogéneas debido a que las viscosidades de esas formulaciones aumentaban a un punto tal que disminuía marcadamente su fluidez, se complicaba su mezclado y se dificultaba la remoción de las burbujas incluidas en la dispersión. El secado de estas dispersiones filmogénicas conduciría a la formación de películas heterogéneas (con defectos).

Al incorporar AEC a las formulaciones, el comportamiento de flujo pseudoplástico se volvió más pronunciado, especialmente con el incremento de la concentración de MFC en la formulación, observándose una disminución en el índice de flujo (n). Asimismo, se observó un incremento en la consistencia de las dispersiones filmogénicas (mayores valores de K y de viscosidad aparente). El aumento de la viscosidad aparente de las dispersiones filmogénicas con 8 y 12 g de MFC cada 100 g de SPI con la adición de AEC puede atribuirse a las posibles interacciones que se generan entre los distintos componentes (SPI, MFC y AEC) y al aumento en la masa de las formulaciones (Burt, 2004; Echeverría, 2012).

4.4.3. Caracterización de las películas proteicas y nanoreforzadas control y adicionadas con AEC

4.4.3.1. Apariencia

Todas las formulaciones empleadas resultaron en películas proteicas y nanocompuestas continuas y homogéneas, sin observarse exudado oleoso lo que indica la eficiencia de la matriz proteica para retener a la cantidad de AEC adicionada (0,5 mL/g SPI). En este sentido, Ventureira (2010) ha descrito que las proteínas de soja poseen buenas propiedades emulsificantes, tanto para formar como para estabilizar emulsiones de aceite en agua (O/W). En la Figura 4.9 se muestran fotografías de las películas obtenidas con concentraciones de nanofibras extremas, 0 y 12 g de MFC/ 100 g de SPI, control y adicionadas con AEC.

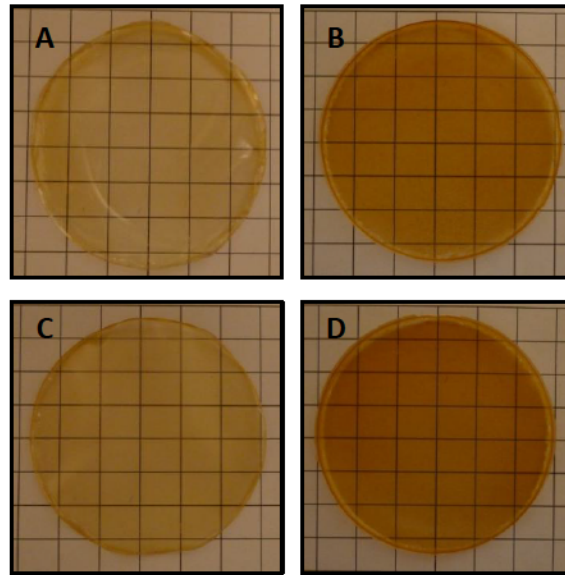


Figura 4.9. Apariencia de películas proteicas sin AEC (A), películas proteicas con AEC (B), películas nanocompuestas con 12 g MFC/100 g SPI (C) y películas proteicas nanocompuestas con 12 g MFC/100 g SPI y AEC (D).

La **Tabla 4.2** presenta el espesor de las películas proteicas de soja con concentraciones crecientes de MFC, con y sin el agregado de AEC. El agregado de MFC a la formulación aumentó progresiva y suavemente el espesor de las películas nanocompuestas resultantes, lo que evidenciaría que a pesar del mayor contenido de sólidos, existe una buena compactación de la matriz proteica, anticipando una buena afinidad entre las proteínas de soja y las nanofibras. Al aditivar a las formulaciones proteicas y nanocompuestas con AEC, el espesor de las películas también aumentó, debido al mayor contenido de masa en la formulación. Pero el hecho que las películas no presenten un aspecto oleoso a pesar del alto contenido de aceite agregado, evidenciaría la posibilidad de retener al aceite en la matriz proteica o nanocompuesta.

Tabla 4.2. Espesor de películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC adicionadas o no con AEC.

AEC	MFC (g/100 g SPI)	Espesor (μm)
SIN	0	64,8 \pm 5,0 e
	4	66,9 \pm 5,2 de
	8	69,1 \pm 5,5 cd
	12	71,9 \pm 4,0 bc
CON	0	67,6 \pm 5,0 de
	4	74,3 \pm 5,7 b
	8	81,9 \pm 6,2 a
	12	84,6 \pm 7,2 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La **Tabla 4.3** presenta los parámetros de color CIE $L^*a^*b^*$, la variación de color (ΔE) y la opacidad de las películas proteicas de soja con concentraciones crecientes de MFC, adicionadas o no con AEC. El agregado de nanofibras a la formulación modificó levemente la luminosidad y el parámetro a^* ; sólo el parámetro b^* aumentó en una mayor proporción, fortaleciendo suavemente la coloración amarillenta propia de las películas proteicas de soja. En consecuencia, se observó un aumento en la variación de color (ΔE). El agregado del aceite esencial de clavo afectó en mayor medida la coloración de las películas proteicas y nanocompuestas, dado que el aceite utilizado presentaba una coloración amarillenta *per se*. Este efecto se manifestó en una disminución de la luminosidad (L^*), y un aumento de los parámetros a^* , b^* y la variación de color (ΔE) viéndose los efectos mayores para las películas que contenían 8 y 12 g de MFC/100 g de aislado. Cabe señalar que con el agregado del aceite esencial cambia el sentido de la modificación del parámetro a^* (hacia los rojos), lo que se visualizó en la apariencia de las películas que tomaron una coloración anaranjada, tal como se observa en la **Figura 4.9**. En este mismo sentido Pereda y col. (2010) informaron efectos de amarillamiento para películas de caseína adicionadas con aceite de tung, que atribuyeron a la propia coloración del aceite.

Tabla 4.3. Parámetros de color L*, a*, b* y variación de color (ΔE), y opacidad de películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC adicionadas o no con AEC.

AEC	MFC (g/100 g SPI)	Parámetros de color Hunter-Lab				Opacidad (UA/mm)
		L*	a*	b*	ΔE	
SIN	0	90,3 ± 0,8 ab	-2,5 ± 0,2 c	14,9 ± 1,4 e	15,7 ± 1,7 d	2,0 ± 0,1 e
	4	90,6 ± 0,6 a	-2,9 ± 0,2 cd	15,7 ± 0,8 e	15,4 ± 1,0 d	2,4 ± 0,1 d
	8	89,3 ± 0,6 bc	-3,0 ± 0,1 d	17,7 ± 0,3 d	18,1 ± 0,5 c	3,6 ± 0,1 c
	12	88,6 ± 0,2 c	-3,1 ± 0,1 d	19,2 ± 0,1 c	19,8 ± 0,1 c	3,8 ± 0,1 b
CON	0	82,8 ± 1,4 d	1,9 ± 0,5 b	27,8 ± 1,3 b	30,1 ± 2,0 b	3,4 ± 0,2 c
	4	81,4 ± 0,6 e	2,1 ± 0,1 b	28,1 ± 0,7 b	30,5 ± 1,4 b	3,9 ± 0,1 b
	8	78,2 ± 0,9 f	3,5 ± 0,3 a	29,7 ± 0,3 a	34,1 ± 0,8 a	4,0 ± 0,1 b
	12	77,8 ± 0,4 f	3,7 ± 0,1 a	29,8 ± 0,1 a	34,3 ± 0,3 a	4,4 ± 0,1 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

En cuanto a la opacidad, hubo un marcado efecto del agregado de la MFC a las películas proteicas, evidenciado en un aumento progresivo con la adición de cantidades crecientes de MFC. Para la máxima concentración de nanofibras incorporada, la opacidad prácticamente se duplicó respecto a las películas control ($2,0 \pm 0,1$ y $3,8 \pm 0,1$ para 0 y 12 g de MFC cada 100 g de SPI respectivamente). Además de aumentar el espesor de las películas, la presencia de las nanofibras estaría aumentando la dispersión de la luz y disminuyendo así la transmitancia, tal como lo indicaron diferentes autores para películas nanocompuestas en base a otros biopolímeros y MFC (Lavoine y col., 2012). Cuando el tamaño de partícula es menor, este efecto se reduce y resulta en películas más transparentes, como el caso de los nanocristales de celulosa a partir de fibras de formio (*Phormium tenax*) informado por Fortunati y col. (2014), en los que las dimensiones del refuerzo son más pequeños que la MFC empleada en este trabajo ($d= 5-10$ nm / $L= 100-200$ nm vs. $d=50-60$ nm / $L= 485$ μ m respectivamente).

La adición de AEC a las películas proteicas y nanocompuestas aumentó aún más la opacidad en todos los casos. Yang y Paulson (2000) reportaron que las diferencias en la opacidad de películas con agregado de lípidos son determinadas por las propiedades ópticas de los lípidos

incorporados. La presencia de una fase dispersa no miscible promueve el aumento de la opacidad debido a la diferencia en el índice de refracción de las fases, al tamaño de partícula y a la concentración de la fase dispersa (Monedero y col., 2009; Pérez-Mateos y col., 2009; Pereda y col., 2010). La presencia de gotas de AEC en la matriz de proteína de soja estaría generando una mayor dispersión de la luz, reduciendo así la luz transmitida a través de la película y aumentando su opacidad (Prodpan y col., 2007).

4.4.3.2. Susceptibilidad al agua

En la **Tabla 4.4** se presenta el contenido de agua, la solubilidad en agua y el ángulo de contacto de las películas proteicas y nanocompuestas con y sin agregado de AEC.

Tabla 4.4. Contenido de agua, solubilidad en agua y ángulo de contacto de películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC adicionadas o no con AEC.

AEC	MFC (g/100g SPI)	Contenido de agua (%)	Solubilidad (%)	Ángulo de contacto (°)
SIN	0	15,72 ± 0,30 c	32,12 ± 1,62 f	90,45 ± 2,49 a
	4	15,47 ± 0,15 c	33,17 ± 0,50 ef	90,53 ± 2,28 a
	8	15,40 ± 0,10 c	36,67 ± 1,79 de	89,10 ± 1,41 a
	12	14,67 ± 0,13 c	37,46 ± 0,45 cd	88,95 ± 3,30 a
CON	0	22,48 ± 0,60 ab	38,47 ± 0,63 abc	89,35 ± 2,07 a
	4	22,45 ± 0,43 ab	41,21 ± 0,28 bcd	90,72 ± 1,88 a
	8	21,86 ± 0,39 b	42,08 ± 2,15 ab	90,62 ± 2,01 a
	12	23,09 ± 0,59 a	43,46 ± 2,11 a	91,05 ± 2,48 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El agregado de MFC a las películas proteicas no afectó el contenido de agua ni el ángulo de contacto. Sí fue evidenciado un aumento en la solubilidad en agua con 8 y 12 g de MFC cada 100 g de SPI. A pesar de la cristalinidad presente en las películas nanocompuestas debida a la presencia de MFC (y no así en las películas proteicas), el contenido de agua no se modificó. Por otra parte, el

hecho que no haya variado el ángulo de contacto da un indicio que la MFC está bien embebida en la matriz proteica. Es evidente que la presencia de las fibras no cambia la naturaleza hidrofílica de las películas, ni en la superficie ni en el interior de la misma, y que estas estarían interactuando con las proteínas, principalmente por puentes de hidrógeno (Siró y col., 2010), interfiriendo o modificando el entrecruzamiento entre cadenas polipeptídicas propio de las películas proteicas. Este cambio en el patrón de enlaces, debe ser el responsable del aumento de la solubilidad, teniendo en cuenta que tal vez las nuevas interacciones proteína-proteína o proteína-fibra podrían desestabilizarse durante el ensayo prolongado de solubilidad, impidiendo que si se llego a formar la red de MFC, esta hubiese podido prevenir la solubilización de la matriz proteica. Por su parte, la adición de AEC aumentó el contenido de agua y la solubilidad en agua de las películas proteicas y nanocompuestas, sin evidenciar cambios en el ángulo de contacto en ningún caso. Dada la naturaleza oleosa del aceite esencial, podríamos considerar como inesperados los resultados encontrados. Así, por ejemplo, Pereda y col. (2010) observaron mayores hidrofobicidades superficiales (dado por un aumento en el ángulo de contacto) al adicionar aceite de tung a películas proteicas de caseína obtenidas por *casting*; Salgado y col. (2013) y Ahmad y col. (2012) observaron disminuciones en la solubilidad de películas proteicas de girasol adicionadas con aceite de clavo, y de gelatina aditivada con aceite de bergamota y limoncillo. Los resultados obtenidos en este trabajo estarían evidenciando la posibilidad de que el aceite esencial de clavo se encontrara disperso en la matriz proteica y nanocompuesta, estabilizado justamente por las buenas propiedades emulsificantes de las proteínas de soja y el incremento en la viscosidad de las dispersiones fimo génicas causada por la incorporación de MFC. La posibilidad que se forme una película o capa proteica alrededor de la gota de lípido estabilizándola explicaría por qué no se observaron diferencias en la hidrofobicidad superficial de las películas y por qué las películas no presentaron una apariencia oleosa al tacto. Se podría suponer que MFC y AEC están bien embebidos en la matriz proteica. Por otra parte esas gotas de lípidos dispersas provocarían cambios en la conformación proteica, tales que los grupos hidrofóbicos de las proteínas estarían interactuando con el aceite y los hidrofílicos queden más disponibles tanto para retener agua como para interactuar con la fibra. Estos cambios conformacionales probablemente sean también los que provocaron el aumento en el espesor, así como modificaron el patrón de enlaces proteína-proteína que estabilizan la película, aumentando su solubilidad en agua. En concordancia con estos resultados Gómez-Estaca y col. (2010) y Pires y col. (2013) reportaron que la adición de aceites esenciales de citronela, tomillo, cilantro y clavo de olor a películas preparadas con

proteínas de merluza y con gelatina-quitosano aumentaron su solubilidad en agua, debido a la formación de nuevas interacciones entre las proteínas y los aceites esenciales, que debilitaron la red de proteínas. Echeverría (2012) también observó que al agregar aceite esencial de clavo a películas proteicas y nanocompuestas en base a proteínas de soja y MMT, aumentaba el contenido de agua de las películas pero sin modificar su solubilidad en agua.

4.4.3.3. Propiedades de barrera

Las propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno de las películas proteicas y nanocompuestas en base a proteínas de soja y celulosa microfibrilada, adicionadas o no con aceite esencial de clavo se resumen en la **Tabla 4.5**.

Tabla 4.5. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP) de películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC adicionadas o no con AEC (n/d= no determinado).

AEC	MFC (g/100 g SPI)	WVP x 10 ⁻¹¹ (g H ₂ O/m Pa s)	OP (mL O ₂ μm/m ² día kPa)
SIN	0	14,95 ± 1,83 a	48,97 ± 1,92 b
	4	15,70 ± 1,92 a	52,32 ± 0,61 b
	8	08,90 ± 0,65 b	47,07 ± 2,13 b
	12	09,77 ± 0,36 b	47,88 ± 1,54 b
CON	0	09,66 ± 0,56 b	n/d
	4	09,24 ± 0,11 b	n/d
	8	06,89 ± 0,24 b	113,30 ± 3,20 a
	12	07,12 ± 0,56 b	106,62 ± 3,25 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El agregado de MFC a las formulaciones proteicas disminuyó los valores de WVP de las películas conteniendo 8 y 12 g de MFC cada 100 g de SPI evidenciando que éstas nanofibras estarían causando una mayor tortuosidad en el camino a recorrer por las moléculas de vapor de agua al pasar a través de la película, generando un mayor efecto barrera. Además, el grado de

cristalinidad de las nanofibras también podría tener un efecto favorable sobre la capacidad barrera de las matrices nanocompuestas (García de Rodríguez y col., 2006; Paralikar y col., 2008). Con la adición de AEC a las formulaciones, se disminuyó la WVP de las películas, siendo esta disminución menor al incrementar el contenido de fibras en la formulación, al punto tal que no se observan diferencias significativas en la WVP de las películas proteicas y nanocompuestas adicionadas con clavo y la disminución no llega a ser estadísticamente diferente para las películas nanocompuestas con 8 y 12 g de MFC cada 100 g de SPI, con y sin clavo. Probablemente este efecto esté relacionado con la naturaleza oleosa del AEC, como lo han mencionado diferentes autores para otras matrices biopolímero-lípido, como almidón de mandioca-quitosano y aceite esencial de orégano (Pelissari y col., 2009), o caseínas de sodio y aceite de tung (Pereda y col., 2010). Cabe resaltar que cuando los lípidos se dispersan en la matriz polimérica su efecto sobre WVP depende de varios factores, tales como el tipo y la concentración de lípidos, hidrofobicidad, tamaño de partícula y la estabilidad de la emulsión (Debeaufort y Voilley, 1995; Pérez-Gago y Krochta, 2001). Así existen ejemplos en los que el agregado de aceites esenciales no modifica la WVP de películas proteicas, o incluso la aumentan levemente (Salgado y col., 2013; Ahmad y col., 2012; Giménez y col., 2012). En este sentido, Echeverría (2012) no observó modificaciones en el valor de WVP al agregar aceite esencial de clavo a películas nanocompuestas en base a proteínas de soja-MMT. A partir de los resultados encontrados en este trabajo, los efectos propios de la presencia de la MFC y del aceite esencial en un punto saturarían, por lo que no se observó un efecto mayor para las películas con contenidos más elevados de MFC y AEC.

En la **Tabla 4.5** y en la **Figura 4.10** se presentan las permeabilidades al oxígeno y la velocidad de transmisión de este gas a través de las películas estudiadas. Por inconvenientes técnicos propios del ensayo, no fue posible determinar estas propiedades en las películas proteicas y nanocompuestas con 4 g de MFC cada 100 g de SPI adicionadas con aceite esencial de clavo.

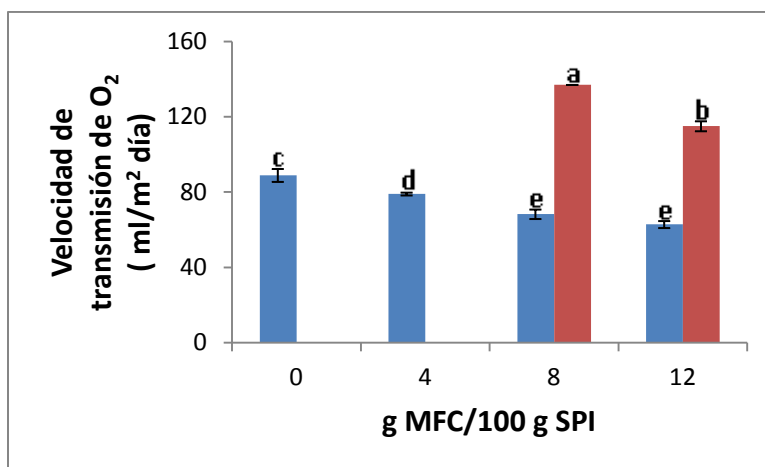


Figura 4.10. Velocidad de transmisión del oxígeno a través de las películas proteicas de soja con distinto contenido de MFC, sin (●) o con el agregado de aceite esencial de clavo (●). Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Es posible observar que si bien la presencia de las fibras no pareciera modificar la permeabilidad al oxígeno, sí logra disminuir la velocidad de transmisión del O₂ progresivamente con el aumento de la concentración de nanofibras a la formulación. Esto probablemente se deba entonces al mayor espesor de las películas con cantidades crecientes de fibra. Nuevamente la disminución en la velocidad de transmisión de O₂ con el agregado de MFC puede deberse a la mayor tortuosidad del camino a recorrer en presencia de las fibras y a la existencia de zonas cristalinas dentro de la película (dado que se ha reportado que la elevada cristalinidad de la celulosa contribuye a conseguir buenas propiedades barrera porque la región cristalina de la celulosa es prácticamente impermeable a las moléculas de oxígeno) (Syverud y Stenius, 2009; Dufresne, 2012), más que a un cambio de hidrofobicidad de la misma, teniendo en cuenta que presentaban el mismo contenido de agua. Por su parte, Plackett y col. (2010), también observaron disminuciones en las permeabilidades al oxígeno al agregar MFC a películas de amilopectina.

El agregado de aceite esencial de clavo aumentó considerablemente la permeabilidad al O₂ de las películas que contenían 8 y 12 g de MFC cada 100 g de SPI y también su velocidad de transmisión en un 100 y 183% para cada película nanocompuesta respectivamente. Este efecto empobrecedor de la capacidad barrera al O₂ podría tener su fundamento en que estas películas poseen mayor afinidad por este gas hidrofóbico debido a la fase oleosa presente en la matriz, la que favorece la difusión del gas a través de la misma. Y también a un posible efecto plastificante que estuviera ejerciendo tanto el aceite esencial como la mayor cantidad de agua presente, facilitando los procesos de difusión del gas dentro de la matriz (Plackett y col., 2010; Dufresne, 2012).

4.4.3.4. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas proteicas de soja con concentraciones crecientes de MFC, con y sin el agregado de AEC, fueron evaluadas en ensayos de tracción y los resultados se muestran en la Figura 4.11.

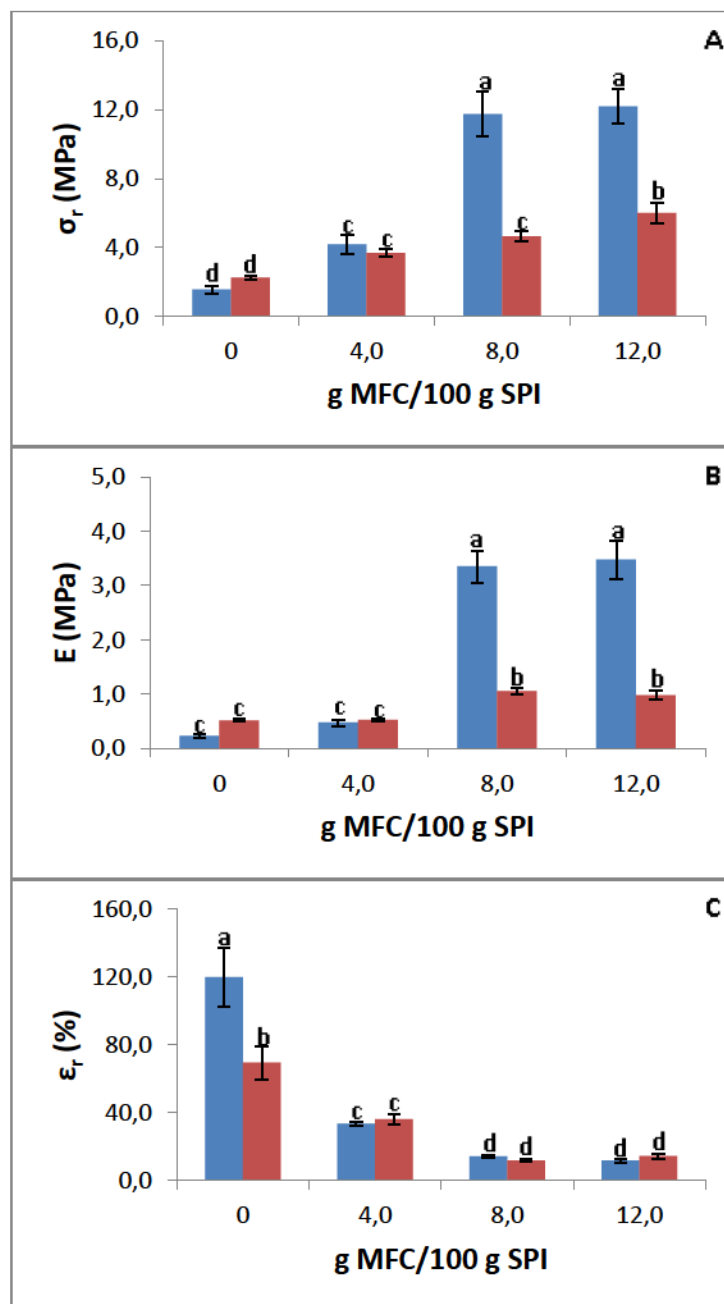


Figura 4.11. (A) Propiedades mecánicas medidas en tracción de películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC, sin (●) y con el agregado de aceite esencial de clavo (●): tensión a la ruptura (σ_r) (A), módulo de Young (E) (B) y elongación a la ruptura (ϵ_r) (C). Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Con el agregado de MFC a la formulación se logró mejorar significativamente el comportamiento mecánico de las películas. El efecto refuerzo alcanzado se reflejó en un importante aumento de la resistencia a la tracción y módulo de Young en detrimento de la elongación de las películas. Los valores de tensión y módulo de Young aumentaron de manera significativa en un 784 y 1496% respectivamente, mientras que la elongación a la ruptura disminuyó en un 90% para la máxima cantidad de MFC incorporada (12 g/ 100 g de SPI) respecto de la película proteica. Es importante señalar que las propiedades de las películas con 8 y 12 g de MFC/ 100 g de SPI no mostraron diferencias en sus propiedades, siendo significativamente distintas que las de concentraciones menores. En este mismo sentido, Lu y col. (2010) informaron que al seguir aumentando la cantidad de carga se sobrepasaba el umbral de interacciones entre la nanofibra y la matriz, de manera de que las mejoras no continuaban aumentando significativamente, dado que las fibras comenzaban a agregarse reduciendo la tensión y el módulo.

Diversos autores han logrado mejoras en las propiedades mecánicas de distintas matrices con la adición de nanofibras de celulosa. Bras y col. (2010) informaron mejoras en la tensión a la ruptura y módulo elástico del orden del 374 y 530% cuando incorporaron 10 g de nanofibras de celulosa cada 100 g de polímero, obtenidas de fibras de bagazo de caña de azúcar a materiales en base a caucho natural. Estos autores sugieren que el efecto refuerzo ocurre por un fenómeno de percolación o escurrimiento de las nanofibras en la matriz, que forman una red continua de nanopartículas de celulosa unidas a través de puentes de hidrógeno (Samir y col., 2005; Dufresne, 2008 a y b). Similares resultados obtuvieron Lu y col. (2010), al trabajar con nanocompuestos en base a MFC y poli-vinil alcohol (PVA), que atribuyeron a una fuerte interacción entre la MFC y el polímero, basada en la percolación de la MFC en la matriz. Por su parte, la adición de AEC provocó una disminución de la resistencia a la rotura y el módulo de Young sin llegar a modificar su elongación. Estos resultados estarían confirmando el posible efecto plastificante del aceite esencial en las matrices proteicas y nanocompuestas, ya sugerido al analizar su permeabilidad al oxígeno y que podría también explicar el aumento del contenido de agua y la solubilidad de las películas adicionadas con el aceite. Similares resultados se obtuvieron en películas de almidón de mandioca-quitosano con el agregado de aceite esencial de orégano. 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; Pelissari y col., 2009), mientras que otros han reportado mejoras en las propiedades mecánicas (Fabra y col.,

2008; Pereda y col., 2010). Por su parte, Echeverría (2012) también observó similares resultados con el agregado de aceite esencial de clavo a matrices nanocompuestas en base a proteínas de soja-MMT, y al igual que en este trabajo observó que en los materiales aditivados, el nanoreforzo lograba reforzar en parte la matriz. Para el sistema estudiado en este trabajo de Tesis el agregado de 8 g de MFC/ 100 g de SPI pareciera ser adecuado para llegar a formar la matriz de celulosa percolada en la matriz proteica.

4.4.3.5. Temperatura de transición vítrea

La temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas proteicas de soja con concentraciones crecientes de MFC adicionadas o no con AEC fue determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Valores de temperatura de transición vítrea (T_g) de películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC adicionadas o no con AEC.

AEC	MFC (g/100 g SPI)	T_g (°C) DCS
SIN	0	$-35,05 \pm 4,60$ a
	4	$-34,14 \pm 4,37$ a
	8	$-33,20 \pm 3,54$ a
	12	$-31,96 \pm 5,36$ a
CON	0	$-35,59 \pm 0,19$ a
	4	$-31,62 \pm 0,21$ a
	8	$-34,40 \pm 0,02$ a
	12	$-31,07 \pm 9,47$ a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

No se observaron diferencias en las T_g de las películas proteicas ni con el agregado de MFC, ni cuando las mismas se adicionaron con AEC. En cuanto al agregado de las nanofibras, otros autores han reportado la ausencia de modificaciones de la T_g con el agregado creciente de

nanofibras de celulosa independientemente de la matriz polimérica (Chazeau y col., 1999; Inglés y Dufresne, 2001; Bras y col., 2010). Aunque existen otros trabajos que sí obtuvieron aumentos en la Tg de nanocompuestos reforzados con nanofibras de celulosa, que se han atribuido a una correcta dispersión de las nanofibras en la matriz polimérica que restringía la movilidad de las cadenas de polímero (Mukherjee y col., 2014; Fortunati y col., 2014).

El efecto plastificante del aceite esencial de clavo en la matriz proteica y en las películas nanocompuestas estudiadas en este capítulo, no se logró visualizar en la Tg de los materiales. Salgado y col. (2013) sí lograron ver una disminución de las Tg en películas proteicas de girasol adicionadas con la misma concentración de aceite esencial de clavo, que no se había manifestado en las propiedades barrera y mecánicas de las películas.

4.4.3.6. Morfología

La morfología de las películas proteicas de soja con concentraciones variables de MFC, adicionadas o no con AEC, fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y difracción de rayos X (DRX).

En la **Figura 4.12** se muestran las imágenes obtenidas por SEM de la superficie y el área transversal de las películas estudiadas. De las imágenes es posible observar que todas las películas resultaron homogéneas y densas, lo que implica una buena afinidad de todos los componentes de la formulación. Dado que no es posible visualizar la MFC por SEM debido a que la resolución es baja, las imágenes estarían dando idea al menos de la presencia de agregados de estas nanofibras (Krishnamachari y col., 2011). Tanto en las imágenes superficiales como en el área trasversal se observa que estos agregados de celulosa microfibrilada y el aceite esencial de clavo se encuentran dispersos y adheridos a la matriz proteica.

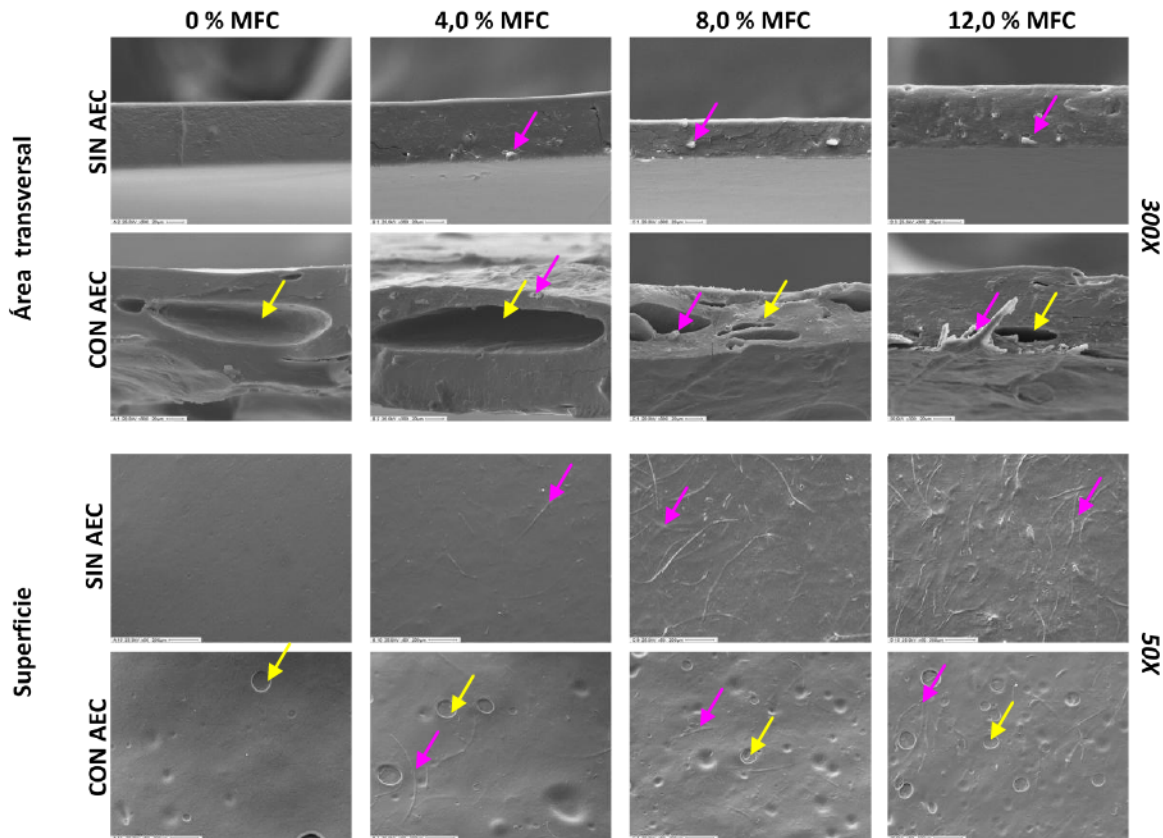


Figura 4.12. Microscopía electrónica de barrido de películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC, adicionadas o no con AEC. Se señala la presencia de agregados de MFC (●), junto con los sitios ocupados por el AEC (●).

En la **Figura 4.12** se señala con flechas coloreadas la presencia de los agregados, junto con las huellas en donde estaban las gotas de AEC. Estas micrografías permiten explicar los efectos refuerzo y plastificante mencionados anteriormente para la MFC y AEC respectivamente.

La presencia de AEC pareciera suavizar las superficie de las películas nanocompuestas (no observándose tanto las fibras en esas superficies) mientras que las gotas de aceite parecieran hacerse más pequeñas, y por ende estar mejor dispersas en las matrices proteicas con 8 y 12 g de MFC/ 100 g de SPI. Fortunati y col. (2014) evidenciaron similares apariencias en películas de ácido poliláctico reforzadas con nanocristales de celulosa obtenidos de fibras de formio y plastificadas con limoneno. En la **Figura 4.13** se observa con más detalle la buena adherencia de las fibras y de las gotas de aceite en la matriz proteica y el menor tamaño de estas últimas para películas con 8 g de MFC/ 100 g de SPI respecto de las proteicas. Existen varios trabajos sobre el efecto emulsionante de MFC o NCC, o incluso nanocristales de almidón, en los que se han utilizado estas

nanopartículas para estabilizar emulsiones o/w (estabilización *Pickering*, en la que partículas sólidas son empleadas como surfactantes) (Kalashnikova y col., 2012; Capron y Cathala, 2013).

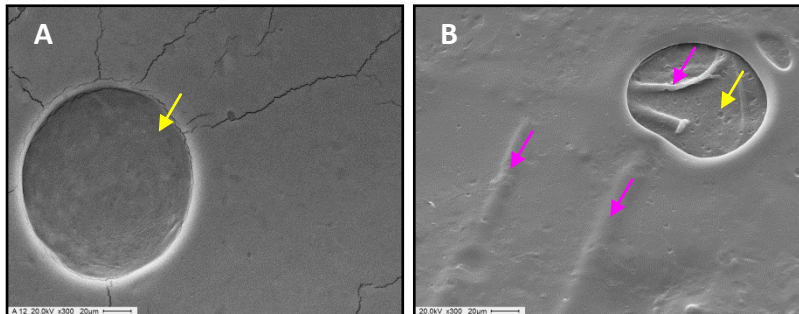


Figura 4.13. Detalle la superficie de **(A)** película proteica con AEC sin MFC, y **(B)** película proteica con AEC con 8% p/p de MFC respecto a SPI. Aumento de 300 X. Se señala la presencia de agregados de MFC (●), junto con las huellas en donde estaban las gotas de AEC (●).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las películas nanocompuestas conteniendo 12 g de MFC/ 100 g de SPI control y adicionadas con AEC fueron evaluadas a 20000, 50000, 100000 y 200000X, y las microfotografías resultantes se muestran en la **Figura 4.14**.

En las mismas se puede observar que la MFC se encuentra distribuida en la matriz proteica pudiendo para esta concentración ya existir cierta agregación de las fibras. En las microfotografías de las formulaciones con AEC esta agregación no aparece tan claramente, y si pueden apreciarse las huellas de la presencia de las gotas del AEC que estaría interaccionando con la proteína y/o la MFC, tal como se observó en la **Figura 4.12**.

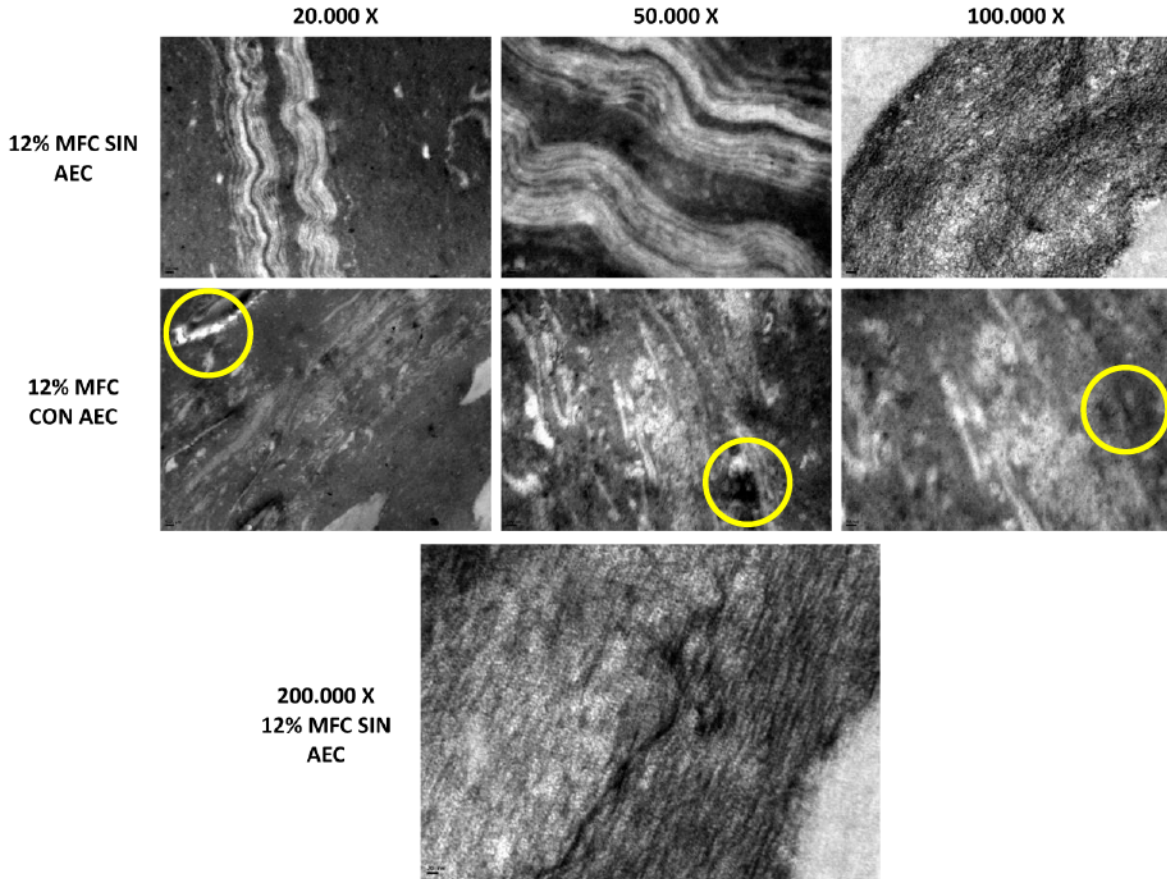


Figura 4.14. Microscopía electrónica de transmisión de películas proteicas de soja reforzadas con 12,0 g de MFC cada 100 g de SPI sin y con agregado de AEC. Se señala la presencia de huellas en donde estaban las gotas de AEC (●).

La Figura 4.15 muestra los difractogramas de rayos X de las películas nanocompuestas con y sin el agregado de aceite esencial, comparadas con el correspondiente a la MFC pura. Los difractogramas de las películas nanocompuestas corresponden a la sumatoria de los correspondientes a la MFC y el de la matriz proteica (no mostrado) que presenta un levantamiento ancho en esta zona debido a su naturaleza amorfa no ordenada. Al aumentar la concentración de MFC en la formulación, el pico característico de celulosa I (a $22,6^\circ$) se hace más notorio. Estos difractogramas dan idea que la matriz semicristalina de celulosa estaría impregnada en la matriz proteica amorfa. Cabe señalar también, tal como se mencionó anteriormente, que la magnitud relativa de los picos propios de celulosa depende de la orientación de las nanofibras y no necesariamente van a ser iguales al medir la MFC pura que la del nanocompuesto. Por último, el agregado de AEC no modificó el patrón de los difractogramas descriptos.

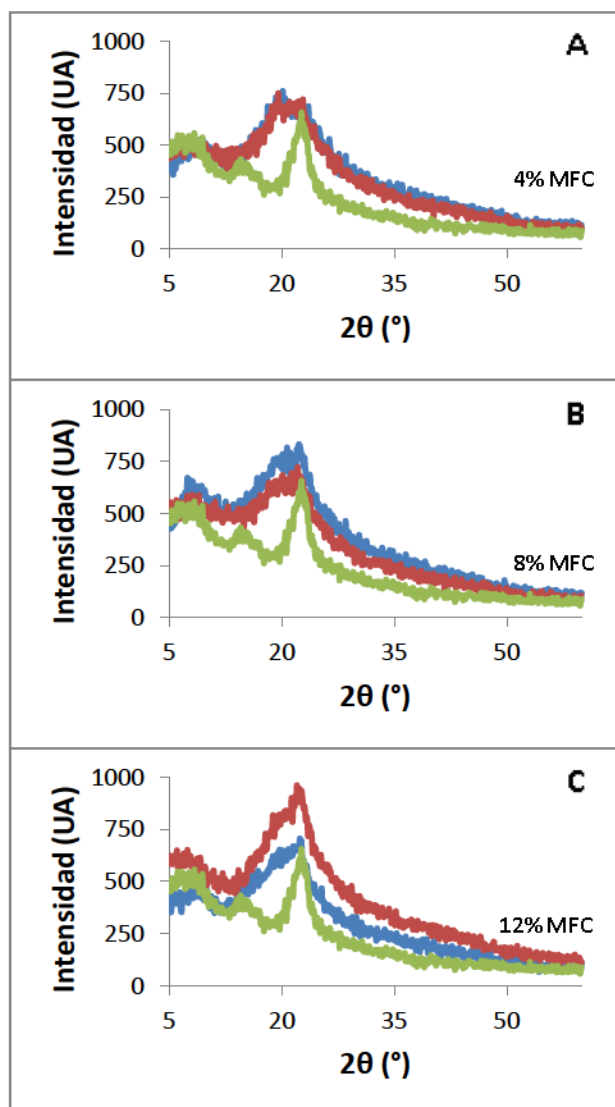


Figura 4.15. Patrones de difracción de rayos X (DRX) de películas nanocompuestas en base a proteína de soja y 4 (A), 8 (B) y 12 (C) g MFC cada 100 g SPI (●) y adicionadas con AEC (●), junto con el patrón de difracción de la MFC (●).

4.4.3.7. Propiedades antioxidantes

Las propiedades antioxidantes de las películas proteicas con agregado creciente de MFC, adicionadas o no con AEC, fueron evaluadas *in vitro* mediante el ensayo de ABTS⁺. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.16. Es importante señalar que las determinaciones se realizaron sobre la fracción de película que se disuelve en agua; cuando las muestras tienen la misma cantidad de activos añadidos, las diferencias son debidas a que se liberen o no, es decir que estén más dispuestos para interactuar con el medio.

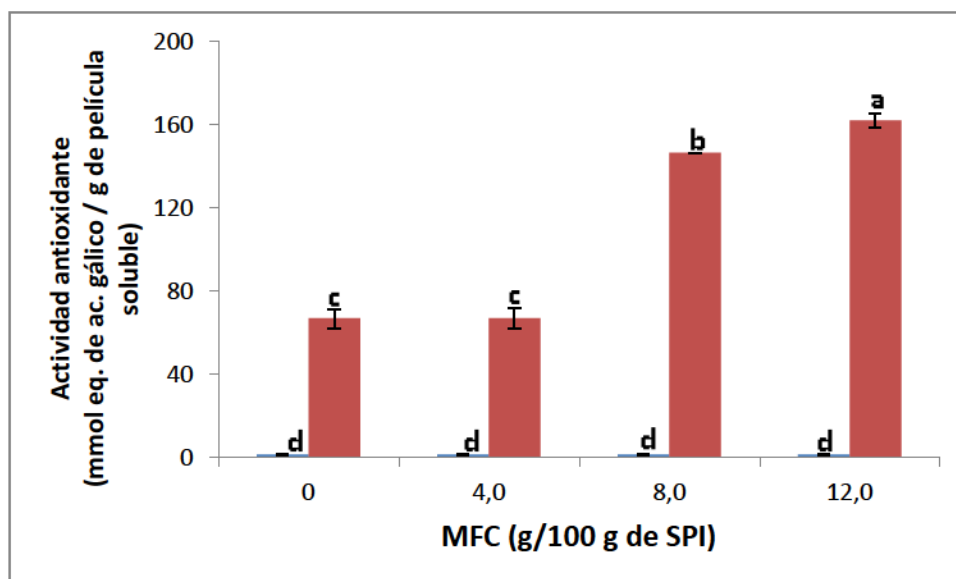


Figura 4.16. Actividad antioxidante de películas proteicas de soja con agregados crecientes de MFC, sin (●) y con aceite esencial de clavo (●). Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

En todos los casos de MFC incorporada, las películas de SPI presentaron una baja actividad antioxidante, probablemente debida a, como ya a sido mencionado, la presencia de compuestos polifenólicos (isoflavonas principalmente) co-extraídos en la obtención del SPI. La adición de AEC incrementó notoriamente la capacidad antioxidante de las películas proteicas y nanocompuestas debido a la presencia de compuestos fenólicos presentes en el mismo, principalmente eugenol, ácido gálico y cafeico (Dudonné y col., 2009). Otros autores también lograron efectos similares empleando este aceite esencial en matrices proteicas (Echeverria 2012; Salgado y col., 2013). Las películas proteicas nanocompuestas adicionadas con igual concentración de AEC presentaron mayor actividad antioxidante al aumentar la concentración de MFC de la matriz. Este resultado sugiere que el agregado de MFC estaría favoreciendo la liberación de los compuestos activos que poseían actividad antioxidante en el aceite esencial.

4.4.3.8. Propiedades antimicrobianas

Las propiedades antimicrobianas de las películas proteicas con agregados crecientes de MFC, aditivados o no con AEC se estudiaron frente a cuatro cepas de bacterias: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar.

En la Figura 4.17 se presentan los efectos de aplicar discos de las diferentes películas sobre el crecimiento de las cepas después de 24 h de incubación a 37 °C.

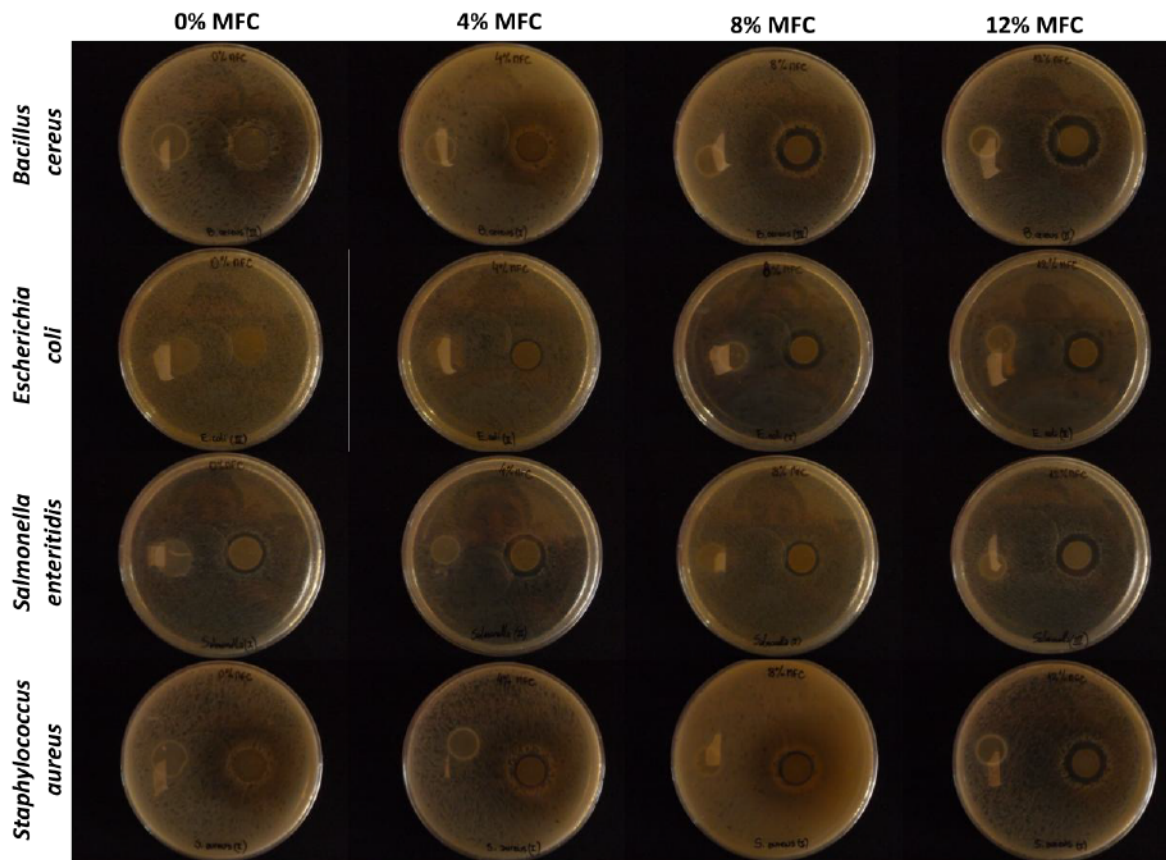


Figura 4.17. Ensayos de difusión en discos de agar de películas proteicas de soja con agregados crecientes de MFC, sin y con agregado de AEC (disco izquierdo y derecho respectivamente en cada placa), evaluadas frente a *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* luego de 24 h de incubación a 37 °C.

El agregado de AEC le otorgó a las películas proteicas y nanocompuestas en base a soja y MFC una importante actividad antimicrobiana frente a las bacterias ensayadas, seleccionadas por ser importantes causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's). Esta actividad se evidenció por la aparición de halos sin crecimiento microbiano alrededor de los discos de estas películas. Esos halos (observados únicamente en las películas con AEC) fueron medidos y considerados para calcular el % de inhibición del desarrollo microbiano (Figura 4.18).

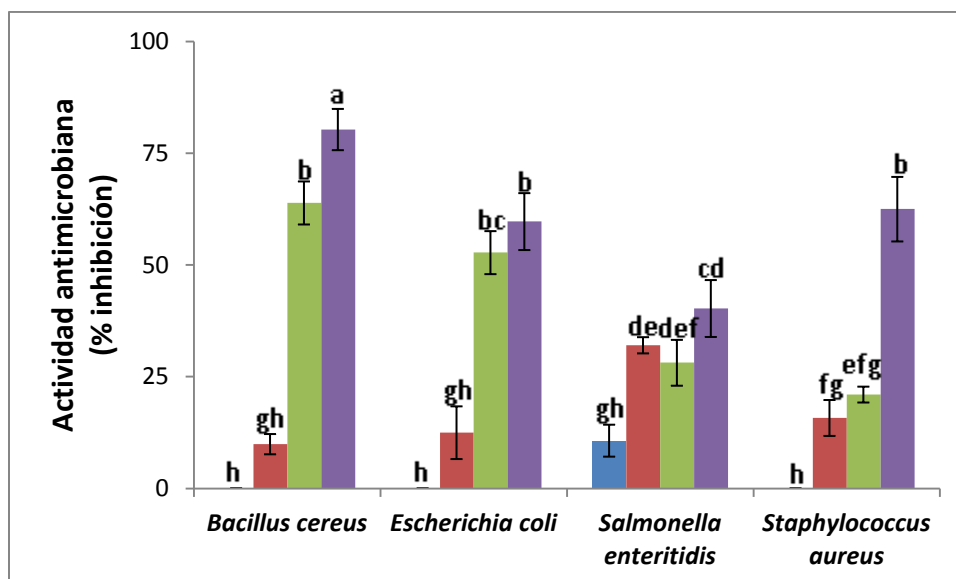


Figura 4.18. Actividad antimicrobiana evaluada en *B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. aureus* representada como el % de inhibición de las películas proteicas de soja con agregado creciente de MFC: 0 (●); 4 (●); 8 (●); y 12 (●) g de MFC cada 100 g de SPI, adicionadas con AEC. Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La actividad antimicrobiana fue incrementada progresivamente al aumentar la concentración de MFC frente a los cuatro microorganismos analizados, lo que sugiere en sumatoria a lo demostrado en la medida de la actividad antioxidante, que el agregado de MFC estaría modulando la liberación de los compuestos activos presentes en el AEC, en este caso facilitándolo. La mayor actividad antimicrobiana podría ser atribuida, al menos en parte, a la mayor dispersión del aceite en la matriz proteica (con gotas más pequeñas), lo que le daría una mayor disponibilidad.

B. cereus fue la cepa más vulnerable a la actividad antimicrobiana del AEC, seguida de *S. aureus* y *E. coli*. Por otro lado, *S. enteritidis* fue la única cepa bacteriana inhibida en su crecimiento en ausencia de MFC en la película empleada, lo que podría deberse exclusivamente a la alta susceptibilidad de esa bacteria a los compuestos activos del AEC, sin importar el momento en que se libere.

Pelissari y col. (2009) obtuvieron similares efectos antimicrobianos frente a *B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. aureus* cuando fueron expuestos frente a discos de películas de almidón de mandioca-quitosano y aceite esencial de orégano. La tendencia en la actividad antimicrobiana de esas películas fue similar a las obtenidas en este trabajo, siendo los géneros *Bacillus sp.* (Gram +) y *Salmonella sp.* (Gram -) los que mayor y menor halo de inhibición presentaron respectivamente. Muchos autores encontraron que en general los aceites esenciales son más efectivos frente a

bacterias Gram + como se encontró en este trabajo (Burt, 2004; Zivanovic y col., 2005). Esto puede estar relacionado a que las bacterias Gram - presentan una membrana externa de lipopolisacáridos adicional que rodea a la pared celular de las mismas, la que estaría restringiendo la difusión de los compuestos hidrófobos (Burt, 2004). Zivanovic y col. (2005) proponen que el mecanismo de la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos de los aceites esenciales radica en la capacidad de atacar a los fosfolípidos de membrana, causando un aumento de permeabilidad de la misma y generando fuga de componentes celulares que se encontraban en el interior del citoplasma, o bien los aceites esenciales pueden interaccionar con enzimas localizadas en la pared celular afectando el correcto metabolismo del microorganismo.

4.5. Conclusiones

Fue posible obtener celulosa microfibrilada (MFC) a partir de fibras de formio por tratamiento mecánico, constituida por nanofibras de celulosa con diámetros de 50-60 nm, largos promedios de 485 μm y una cristalinidad de 35,5%. Estas nanofibras incorporadas en películas proteicas de soja lograron un fuerte efecto refuerzo que se visualizó en mejoras en las propiedades mecánicas y de barrera sin modificar en gran medida su apariencia y sin afectar la Tg de los materiales. Tales mejoras pudieron atribuirse a la buena compatibilidad entre las nanofibras y las proteínas de soja, y a la posible formación de una red de nanofibras embebida o incrustada en la matriz proteica, que podría ya estar formada para formulaciones conteniendo 8% de MFC.

El agregado de aceite esencial de clavo a las películas proteicas y nanocompuestas las activó con importantes propiedades antioxidantes y antimicrobianas y provocó cierta plastificación de las matrices (observada principalmente en las propiedades mecánicas, solubilidad y contenido de agua) y una modificación diferencial en las propiedades de barrera, dado que aumentó la permeabilidad al oxígeno y disminuyó la WVP.

La presencia de nanofibras en la matriz proteica provocó también una modificación en la liberación de los compuestos activos presentes en el aceite esencial. Al aumentar la concentración de nanofibras se observó un aumento en las propiedades antioxidantes así como en la actividad antimicrobiana de las películas frente a distintas bacterias de importancia en enfermedades transmitidas por alimentos. Esta mayor actividad pudo correlacionarse con una mejor distribución

del aceite esencial en presencia de las fibras, con menores tamaños de gota, que podrían atribuirse al efecto emulsificante propio de estos nanorefuerzos, según publicaciones actuales.

5. Películas en base a proteínas de soja procesadas por *tape casting*

5.1. Introducción

Las propiedades de las películas basadas en proteínas, al igual que las de otros polímeros en general, son dependientes tanto de la formulación como de las condiciones en las que se procesan (Lafargue y col., 2007). Si bien se han logrado mejorar estas propiedades a través de distintas estrategias, lo que ha implicado la posibilidad de ampliar la aplicabilidad de estos materiales, aún hoy día uno de los desafíos más importantes del área es lograr aumentar la escala de producción. Independientemente de la técnica de procesamiento utilizada, el material proteico resultante es esencialmente una matriz con estructura de gel tridimensional reorganizada con bajo contenido de agua, en la que las interacciones entre las proteínas y los demás componentes están muy favorecidas.

El objetivo está fijado en alcanzar el escalado de estos materiales a través de técnicas de procesamiento que sean ambientalmente seguras y que puedan ser fácilmente alineadas con los procesos industriales disponibles, como extrusión, calandrado, moldeo por soplado de extrusión, inyección y procesos de termoformado. Esto implica a los procesos secos, que se basan en las propiedades termoplásticas de las proteínas. Comparadas con los polímeros termoplásticos sintéticos más comunes, las proteínas presentan algunas dificultades para ser procesadas mediante estas técnicas. La polidispersidad, las interacciones intermoleculares heterogéneas, la presencia frecuente de nodos físicos y enredos en las cadenas de proteínas y la formación de algunos enlaces covalentes intermoleculares se deben considerar cuando las proteínas son procesadas en condiciones de baja hidratación y alta temperatura. Los factores más importantes de modificación de la estructura proteica durante el procesamiento son la temperatura y el esfuerzo de corte. Estos factores conducirán a una gran reestructuración del material proteico debido al desplegamiento de las cadenas poliméricas, su ruptura como consecuencia del estrés mecánico y su reactividad debido al aumento de temperatura. Por otra parte la temperatura aplicada durante el procesamiento puede degradar tanto los polipéptidos así como también a otros componentes de la formulación. Por estas razones la vía húmeda sigue siendo muy utilizada y existe un interés especial en poder escalar estos procesos.

La técnica de *tape casting* es una de las alternativas que está siendo estudiada para escalar la producción de películas en base a biopolímeros tradicionalmente preparados por *casting* (de Oliveira Romera y col., 2012; de Moraes y col., 2013; Scheibe y col., 2014; Vogelsang y col., 2014). Esta técnica (también llamada *spread casting* o *knife coating*) es bien conocida en la industria del papel, plástico, cerámica y pintura (Richard y Twiname, 2000). En este proceso se coloca una solución o dispersión de la formulación deseada en una tolva, que posee un aplicador, cuya altura puede ajustarse con tornillos micrométricos (Hotza, 1997) y regularse así el espesor del material en formación. La suspensión se moldea como una capa fina sobre un soporte (cinta), debido al movimiento de la cinta portadora (en procesos continuos, como se ilustra en la **Figura 5.1**), o bien debido al movimiento de un dispositivo aplicador (*doctor blade*) en procesos discontinuos (Hotza, 1997; de Moraes y col., 2013). Finalmente, las suspensiones se secan sobre el soporte, por conducción de calor, circulación de aire caliente (convección) o radiación infrarroja (IR). Los espesores de los materiales obtenidos oscilan entre 20 μm y 1 mm. Es posible preparar películas multicapa repitiendo los pasos de *tape casting* con otras formulaciones sobre el material previamente formado (Tanimoto y col., 2005).

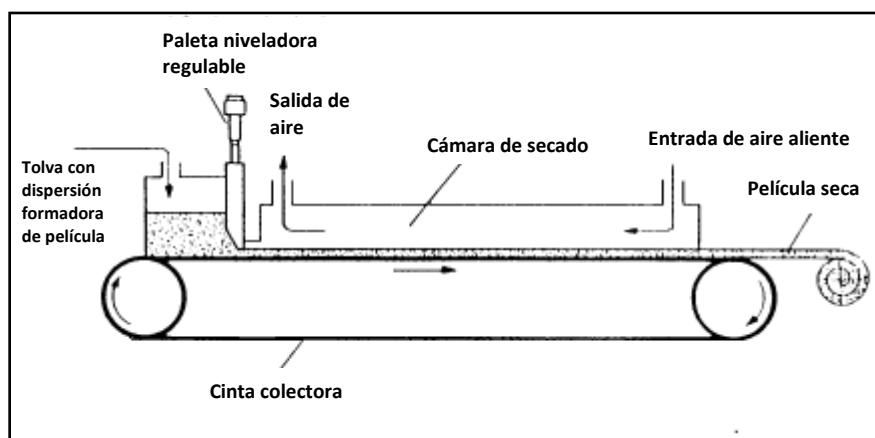


Figura 5.1. Equipamiento de *tape casting* de procesamiento continuo (Hotza, 1997).

En la mayoría de los trabajos que se han reportado en la literatura, las películas en base a proteínas de soja son producidas por la metodología de *casting*. Esta técnica involucra el secado de una solución coloidal compleja, constituida básicamente por la proteína, el solvente y usualmente un plastificante, previamente vertida sobre un soporte adecuado. Las condiciones de secado pueden influir en las propiedades finales del material dado que el calor desnaturaliza a las proteínas (Tapia-Blácido y col., 2005). Asimismo durante el secado la eliminación progresiva de

agua puede, al modificar la conformación de las proteínas y su grado de desplegamiento, afectar las interacciones inter e intramoleculares (enlaces covalentes S-S, interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos y de hidrógeno). Se sabe que las proteínas de soja pueden interactuar con mayor facilidad por enlaces disulfuro cuando se encuentran desnaturalizadas (Mauri y Añón, 2006). De esta manera la cohesión de la matriz final que depende de estas interacciones determinará las propiedades de la película obtenida (Denavi y col., 2009). Por ejemplo, Gennadios y col. (1996) demostraron que es posible mejorar las propiedades de barrera a la humedad de películas en base a proteínas de soja empleando tratamientos térmicos de curado. Por su parte, Pérez-Gago y col. (1999) informaron que películas formuladas en base a proteínas de suero de leche y desnaturalizadas previamente por calor, tenían mayor resistencia a la tracción que las de las proteínas nativas. Otros estudios mostraron para diferentes proteínas procesadas por *casting*, entre ellas las de soja, que el tratamiento térmico mejora la resistencia mecánica y hace a las películas más resistentes al agua (Gennadios y col., 1996; Rhim y col., 2000). Más recientemente, Denavi y col. (2009) demostraron que las propiedades mecánicas y la solubilidad en agua de películas procesadas por *casting* pueden ser modificadas por la temperatura y la humedad relativa empleadas en la etapa de secado y que los efectos de las condiciones de secado en las propiedades de las películas en base a proteínas de soja difirieren según las proteínas se encuentren inicialmente en estado nativo o desnaturalizado.

En el campo de los biopolímeros se ha intentado mejorar las propiedades mecánicas a través del agregado de fibras de distinto origen, y la susceptibilidad al agua con el agregado de lípidos, entre otras posibilidades. El *tape casting* como tecnología de obtención de películas en base a biopolímeros presenta también interés por permitir procesar sistemas compuestos. Varios autores han evaluado el efecto del agregado de fibras de distinto origen en diferentes matrices poliméricas. Así Wallerdorfer y col. (1998) y Kumar y Zhang (2009) estudiaron el empleo de fibras de lino, ramio, yute, y de palma sobre matrices de poliésteres, polisacáridos y mezclas de almidón, y en todos los casos evidenciaron mejoras en la resistencia mecánica de los materiales resultantes. También se ha evaluado la incorporación de fibras celulósicas de diferente longitud, microcristalina, orientadas o no, a formulaciones proteicas (Salgado y col., 2008). Müller y col. (2009), y Dias y col. (2011), demostraron el efecto refuerzo y la disminución de la permeabilidad al vapor de agua de películas de almidón y fibras celulósicas a partir de papel crudo (fibras de 1,2 mm de largo x 0,1 mm de diámetro) obtenidas por *casting*. Empleando el mismo tipo de fibras, de Moraes y col. (2013), y Scheibe y col. (2014), obtuvieron películas de almidón reforzadas por *tape casting*,

obteniendo materiales con resistencia a la ruptura más alta y menor porcentaje de elongación respecto a las películas sin fibras. A partir de este tipo de materiales se han podido desarrollar bolsas biodegradables en base a almidón y fibras con potencial aplicación para el envasado de productos con superficies secas, como algunos frutos y ropa (Scheibe y col., 2014).

El agregado de lípidos a formulaciones en base a biopolímeros (proteínas y polisacáridos) tiene la finalidad de reducir especialmente su permeabilidad al vapor de agua. Dependiendo de la aplicación de la película, puede requerirse que ejerza un efecto barrera para favorecer la retención de humedad y evitar la deshidratación, como es el caso de los alimentos vegetales envasados (Cisneros-Zeballos y Krochta, 2003). Con lípidos y proteínas es posible obtener dos tipos de películas: *i*) laminadas (en las que los lípidos se aplican como una capa separada sobre la de proteína a partir de una dispersión o del fundido), y *ii*) emulsionadas (en las que los lípidos están uniformemente distribuidos en la matriz proteica) (Prodpran y col., 2007; Soazo y col., 2011; Pérez-Gago y Rhim, 2014). La ventaja de las películas compuestas radica en que la formación de una cobertura total por parte de la materia lipídica asegura una disminución en el valor de WVP. Es también importante que la mejora introducida por la utilización de estas técnicas resulte estable con el paso del tiempo para evitar la separación de fases. Por su parte, las películas emulsionadas generan mayor interés a nivel industrial ya que necesitan un solo paso de secado en contraposición con los dos que precisan las bicapas, y que además, usadas como recubrimientos, pueden aplicarse a temperatura ambiente. Entre los distintos lípidos estudiados, las ceras se encuentran entre los más efectivos para incorporar en formulaciones para la producción de películas compuestas con distintos biopolímeros (Denavi y col., 2005).

La influencia de las condiciones de procesamiento sobre las propiedades de películas proteicas por *tape casting* no ha sido muy estudiada a la fecha así como tampoco la eficacia del agregado de ceras y fibras a esas formulaciones con el fin de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera. Estos conocimientos permitirán evaluar el potencial de esta técnica como estrategia de escalado en la producción de películas proteicas.

5.2. Objetivos

Analizar el procesamiento de películas proteicas y compuestas: proteína-fibras y proteína-lípidos por *tape casting*, como estrategia de escalado en la producción de estos materiales.

En particular en este capítulo se estudió:

- la influencia de las condiciones de secado (temperatura y método de secado) sobre las propiedades de películas proteicas de soja obtenidas por *tape casting*.

- la influencia del agregado de fibras celulósicas en las propiedades físicas y químicas de películas compuestas de matriz proteica de soja obtenidas por *tape casting*.

- la formación de películas emulsionadas en base a proteínas de soja y ceras (de abeja y carnauba) por *tape casting* con mejores propiedades de barrera al vapor de agua.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Materiales

Se utilizó el mismo aislado proteico de soja descrito en la sección 3.3.1. Las fibras de celulosa fueron suministradas en forma de papel crudo tipo *kraft* por Klabin S.A. (Brasil), y se utilizaron ceras de abeja y carnauba (Quimidrol, Brasil). El resto de los reactivos utilizados fue de calidad p.a.

5.3.2. Tratamiento y caracterización de las fibras de celulosa

5.3.2.1. Tratamiento

Con el fin de facilitar la incorporación de las fibras en la dispersión filmogénica, el papel crudo tipo *kraft* se cortó en pequeños trozos y se preparó una suspensión acuosa mezclando 10 g de papel con 300 mL de agua destilada durante 24 h (Figura 5.2). Posteriormente dicha suspensión fue tratada en un procesador a cuchillas (Minipimer Philips 600W-HR1364, Brasil).



Figura 5.2. Papel crudo tipo Kraft desmenuzado y en hidratación.

5.3.2.2. Morfología de las fibras

Las fibras fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM), para lo cual se tomó una muestra de la suspensión de fibras y se secó a 105 °C hasta peso constante. Posteriormente, una porción de esas fibras fueron colocadas sobre una cinta bifaz, y se recubrieron con una capa de oro de aproximadamente 60 nm en un metalizador (Baltec SCD 0005, Suiza). Para el análisis fue utilizado un microscopio electrónico de barrido (Philips XL-30, Ámsterdam) con fuente de electrones de tungsteno y detector de electrones secundarios y retropropagados. Las imágenes se observaron utilizando el software Sizemeter, desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos, de la Universidad Federal de Santa Catalina, (UFSC), Brasil.

5.3.2.3. Contenido de lignina

El contenido de lignina fue determinado por el método denominado lignina Klason (TAPPI T222 om-98). Se trabajó con el material libre de extractivos (carbohidratos de bajo peso molecular, ácidos grasos, resinas, fitoesteroles, y otros compuestos solubles en agua). Para ello, primero se preparo una suspensión de celulosa en agua que se secó en estufa a 105 °C hasta alcanzar peso constante, y a la muestra seca se le extrajeron los compuestos solubles en solventes orgánicos por la técnica de Soxhlet utilizando una solución etanol:tolueno (1:2 en volumen). Del material libre de extractivos, se tomaron 1,2 g y se maceraron en 12 mL de ácido sulfúrico al 72% en baño de agua caliente con una temperatura de 25-30 °C durante 1 h. Luego, el material fue diluído en 336 mL de agua destilada y transferido a un balón de 1000 mL, en donde se hirvió con reflujo durante 4 h. Se filtró la dispersión en papel de filtro previamente secado y pesado, y se lavó

el residuo obtenido con 2000 mL de agua caliente. El papel de filtro con la muestra (lignina) fue colocado en estufa a 105 °C hasta la obtención de peso constante, y el contenido de lignina se calculó según la Ecuación 5.1, en donde se dividió la masa de lignina obtenida por la masa de la muestra antes de la extracción, y se llevó a porcentaje.

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{\text{masa de lignina (g)}}{\text{masa de fibras (g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5.1.}$$

5.3.2.4. Contenido de celulosa

El contenido de celulosa se determinó al tratar 5 g de la muestra libre de extractivos (obtenida como se mencionó anteriormente) con 125 mL de una solución alcohólica de ácido nítrico (Browning, 1967) bajo reflujo durante cuatro ciclos de 1 h. Después de cada ciclo, la solución alcohólica de ácido nítrico fue removida por filtración y se adicionó un nuevo volumen de la solución. Al final de los cuatro ciclos, la celulosa fue filtrada, lavada y colocada en estufa a 105 °C hasta la obtención de peso constante. El contenido de celulosa se calculó según la Ecuación 5.2, en donde se dividió la masa de celulosa obtenida por la masa de la muestra antes de la extracción, y se llevó a porcentaje.

$$\text{Celulosa (\%)} = \frac{\text{masa de celulosa (g)}}{\text{masa de fibras (g)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5.2.}$$

5.3.3. Formación de películas por *tape casting*

El equipo de *tape casting* empleado para la formación de las películas se muestra en Figura 5.3. El mismo consta de una plataforma metálica termostaticada de 30 x 84 cm fijada a una mesada, que constituye la superficie de secado de las películas. La misma presenta un circuito de agua interno que se conecta a un baño termostático con circulación de agua mediante una manguera de entrada y otra de salida en cada uno de sus laterales, que se emplea cuando se evalúa el secado por conducción permitiendo seleccionar la temperatura de secado. Sobre la plataforma metálica y apoyado en dos guías automatizadas para su desplazamiento a lo largo de la misma, está instalado un dispositivo aplicador. Este dispositivo presenta una tolva con una paleta metálica niveladora regulable mediante dos tornillos micrométricos (*doctor blade*, BYK, China),

que se utilizan para contener y aplicar a lo largo de la plataforma metálica la dispersión filmogénica. El espesor de aplicación se fijó en 2 mm, y la velocidad de desplazamiento en 1,8 cm/s. Entre la plataforma metálica del equipo y el dispositivo aplicador, se colocó una película de tereftalato de polietileno de 2,5 mm (Mylar®, Dupont, Brasil) para facilitar el desmolde de las películas formadas después del secado. Además, a dos metros encima del equipo se colocó un ventilador para circular el aire y asegurar la eliminación de vapor de agua durante el secado.

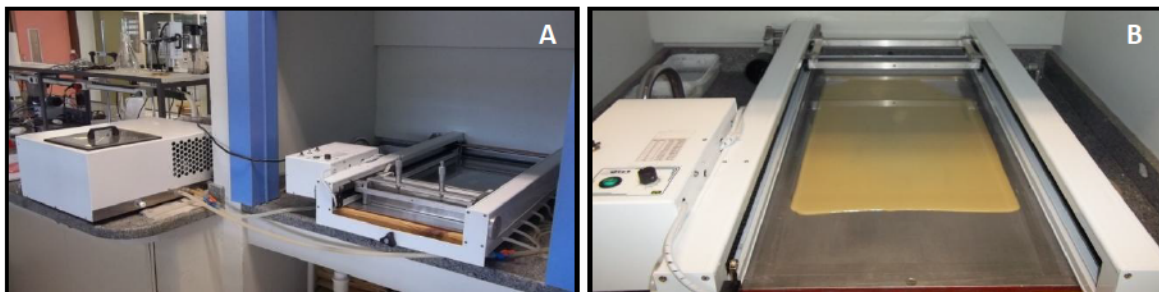


Figura 5.3. Equipo de *tape casting* utilizado en este trabajo, conectado a un baño con circulación de agua para obtener la temperatura de secado **(A)**. Dispersión proteica de soja formadora de película secándose por conducción **(B)**.

5.3.3.1. Selección de la concentración óptima de proteínas

Inicialmente se evaluaron dispersiones filmogénicas con distinta concentración de SPI con el fin de seleccionar la concentración óptima de proteínas para procesar las películas en el equipo de *tape casting*. Para esto se prepararon dispersiones formadas con 5,0, 10,0, 10,5, 11,0 y 12,5% p/v de SPI y glicerol al 30% p/p respecto de la concentración de SPI a pH de 10,5. Las películas se obtuvieron en el equipo de *tape casting* secando por conducción (tal como se muestra en la Figura 5.3 B), para lo que se ajustó la temperatura del baño a 60 °C. La dispersión filmogénica se volcó en la tolva del dispositivo aplicador, se puso en marcha el desplazamiento del mismo, y la dispersión se aplicó de manera homogénea sobre toda la plataforma metálica cubierta por la película de Mylar®. Pasado el tiempo de secado se retiró la película formada del equipo.

5.3.3.2. Evaluación del efecto del tipo y temperatura de secado

Con la concentración de proteína de soja seleccionada como óptima y manteniendo la cantidad de glicerol y el pH, se evaluaron las condiciones de secado. Se obtuvieron películas proteicas de soja por conducción de la misma manera que se describió anteriormente ajustando la

temperatura del baño de agua a 40, 50 y 60 °C (C40, C50, C60) (Figura 5.3 B). Por otra parte se evaluó el secado por radiación infrarroja (IR). Para ello, sobre el mismo equipo antes descrito (sin utilizar el calentamiento de la plataforma por circulación de agua) se montaron ocho lámparas IR con regulador de potencia, dispuestas en dos filas de cuatro a 50 cm de la plataforma tal como se muestra en la Figura 5.4). Las películas se prepararon en el equipo armado de esta manera de la misma forma que se describió anteriormente, con la salvedad que se retiró el dispositivo aplicador una vez distribuida la dispersión filmogénica. Se utilizó un termómetro de infrarrojo (TESTO 610, Alemania) para monitorear la temperatura de la superficie de secado, que se reguló a 60 °C (IR60).

En todos los casos mencionados, las películas proteicas de soja se retiraron de la plataforma del equipo una vez secas y se acondicionaron a 20 °C y 58% de HR en desecadores con soluciones saturadas de NaBr durante 48 h antes de ser caracterizadas.



Figura 5.4. Imágenes que muestran el equipamiento utilizado durante el procesamiento de películas proteicas de soja secadas por radiación IR.

5.3.3.3. Evaluación del agregado de fibras a la formulación

Las películas compuestas proteína de soja-fibras se obtuvieron y almacenaron de la misma manera que se describió anteriormente. Dispersiones filmogénicas preparadas con la concentración de SPI óptima y glicerol ya descrita, con el agregado de 0, 2,5, 5,0, y 7,5 g de fibras/ 100 g de aislado (C60, 2,5F, 5,0F, y 7,5F respectivamente) se procesaron y almacenaron de la misma manera que se describió anteriormente, usando secado por conducción a 60 °C. Cabe aclarar que la película control sin fibras se trata de la misma formulación que se evaluó en el secado por conducción a 60 °C en la sección anterior (C60).

5.3.3.4. Evaluación del agregado de ceras a la formulación

Se prepararon dispersiones filmogénicas conteniendo la concentración de proteína de soja y glicerol óptima sin agregado de cera de abeja o carnauba, siendo esta muestra la misma formulación analizada en el estudio de las temperaturas de secado por conducción a 60 °C (C60), y con agregado de 5,0, 7,5, y 10,0 g de cera de abeja o carnauba (Tabla 5.1). Para lograr la emulsificación de las ceras en las dispersiones proteicas, inicialmente las dispersiones se agitaron magnéticamente con calentamiento (\cong 80 °C), luego se agregaron las ceras sólidas y por último se emulsificaron en un Ultraturrax a 12.600 rpm durante 3 min manteniendo la temperatura. Teniendo en cuenta que las proteínas podrían afectarse por el tratamiento térmico y la homogeneización adicional usada para emulsificar las ceras, se preparó un control proteico tratado de igual manera que para formar las emulsiones pero sin ceras (OC). Las emulsiones resultantes se sometieron a vacío (-400 mm de Hg 2 min) con el fin de eliminar las burbujas, y posteriormente se procesaron en *tape casting* secando por conducción a 60 °C como se describió anteriormente.

Tabla 5.1. Nomenclatura experimental.

Nomenclatura	Componentes adicionales a la formulación base (g/100 g de SPI)	Tecnología de secado	Temperatura de secado (°C)
C40		Conducción	40
C50		Conducción	50
C60	---	Conducción	60
IR60		Radiación IR	60
2,5F	2,5 de fibras celulósicas		
5,0F	5,0 de fibras celulósicas	Conducción	60
7,5F	7,5 de fibras celulósicas		
0C	---	Conducción	60
5,0AB	5,0 de cera de abeja		
7,5AB	7,5 de cera de abeja	Conducción	60
10,0AB	10,0 de cera de abeja		
5,0Ca	5,0 de cera de carnauba		
7,5Ca	7,5 de cera de carnauba	Conducción	60
10,0Ca	10,0 de cera de carnauba		

5.3.4. Caracterización de las dispersiones filmogénicas mediante ensayos reológicos

A partir de las dispersiones filmogénicas con distintas cantidades de proteína de soja, 5,0, 10,0, 10,5, 11,0, y 12,5% p/v de SPI, se realizaron ensayos reológicos empleando la misma metodología descrita en la sección 4.3.4. A diferencia de lo realizado en esa sección, se determinaron los índices de flujo (n) y consistencia (K) ajustando los resultados experimentales con el modelo reológico de Ostwald de Waele (Ecuación 5.3).

$$\tau = K D^n$$

Ecuación 5.3

Donde: τ es el esfuerzo de corte (Pa), K es el índice de consistencia (Pa s^n), D es la velocidad de deformación (s^{-1}) y n es el índice de comportamiento de flujo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.3.5. Estudio de la cinética de secado durante el procesamiento

Se estudió la cinética de secado de películas formadas a partir de una formulación seleccionada como óptima, secadas por convección a 40, 50 y 60°C y por radiación infrarroja a 60°C. Se determinaron las curvas de secado midiendo la pérdida de agua de la dispersión filmogénica en función del tiempo de secado de las películas procesadas en el sistema esquematizado en la Figura 5.5. El mismo consta de una placa de aluminio (15 cm x 15 cm) cubierta con una película de Mylar®, calefaccionada por una resistencia eléctrica y con control de temperatura o por el sistema de lámparas IR descrito anteriormente (Figura 5.3 B). La parte inferior de la placa se encuentra aislada térmicamente y dispuesta sobre una balanza semi-analítica (Marte AS2000C, Brasil) posicionada dentro de una cámara cerrada. Se emplearon moldes de metal para controlar el espesor de la dispersión filmogénica a evaluar, como se muestra en la Figura 5.5 B antes del secado. El peso de la formulación se midió cada 5 min durante el proceso de secado hasta peso constante y se monitoreó dicho proceso realizando termofotografías de las dispersiones cada 10 min, empleando una cámara termográfica (FLIR T-360, Estados Unidos) fijada a 80 cm de la placa de secado. La temperatura del material se controló mediante tres termocuplas situadas entre la dispersión y la placa, conectadas a un sistema de adquisición de datos (Agilent 34970A, Estados Unidos) acoplado al software Agilent Benchlink Data Logger 3 (Agilent, v. 4.00.00, Estados Unidos). La humedad relativa y la temperatura fueron monitoreadas con un psicrómetro digital portátil (TESTO 610, Alemania). Los experimentos se llevaron a cabo con una humedad relativa de 55-60% y una temperatura ambiente de 20-25 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

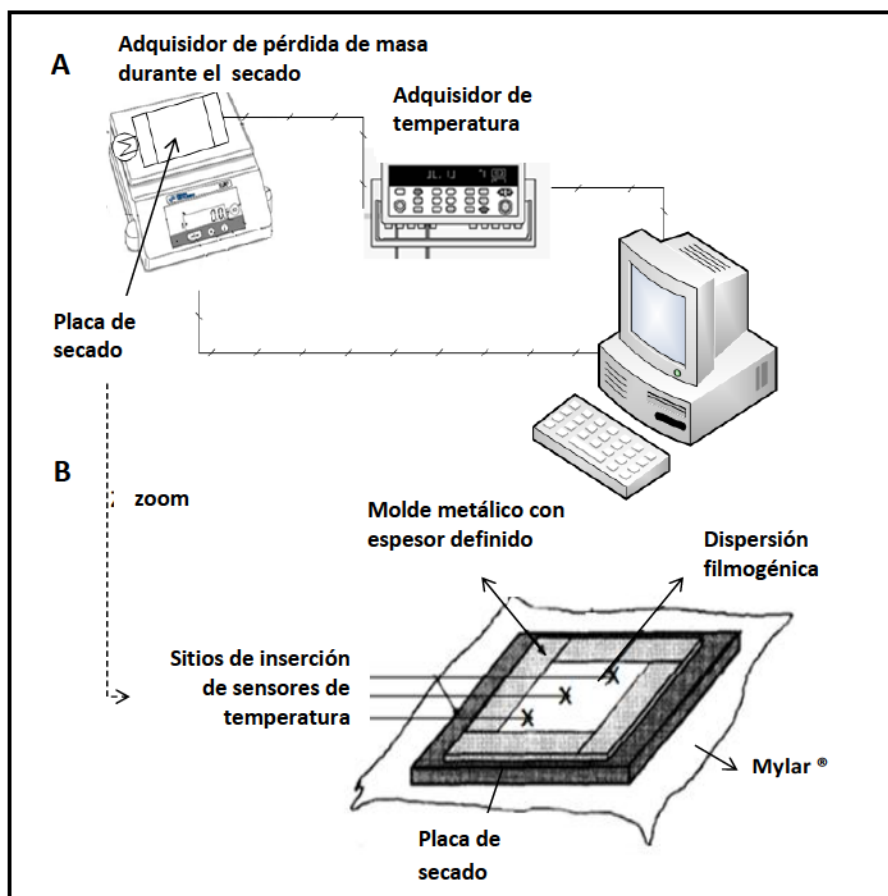


Figura 5.5. Dispositivo utilizado para la determinación de las cinéticas de secado (A). Esquema de la chapa de aplicación de la dispersión filmogénica (B).

De las curvas obtenidas se determinó la velocidad inicial de secado, ajustando la primera parte de la curva de secado (de velocidad constante) con la ecuación lineal que se detalla en la Ecuación 5.4.

$$\Delta X/\Delta t = X(t)-X(t_{-1}) / (t - t_{-1})$$

Ecuación 5.4

Donde: $\Delta X/\Delta t$ es la velocidad de secado (g/g s), X es el contenido de agua de la muestra, t es el tiempo considerado en el punto de secado medido y t_{-1} es el tiempo anterior considerado.

5.3.6. Caracterización de las películas

Las películas se caracterizaron según su espesor, color, opacidad, contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua (WVP), propiedades mecánicas en tracción, y

temperatura de transición vítrea (T_g); y según su ángulo de contacto y morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM), de acuerdo a las técnicas descritas en la sección 3.3.3 y 4.3.5. Además se determinó la densidad, las propiedades mecánicas en punción y la capacidad de termosellado como se describe a continuación.

5.3.6.1. Densidad

La densidad de la película (ρ) se calculó por la Ecuación 5.5, según lo propuesto por Larotonda y col. (2005).

$$\rho = m/A\delta$$

Ecuación 5.5

Donde: A es el área de la muestra (2 cm x 2 cm), m es la masa de los sólidos (determinados a partir de muestras acondicionadas en un desecador con pentóxido de fósforo durante 20 días), y δ es el espesor promedio de la película, calculado con un micrómetro digital (Mitutoyo Co., Japón) en diferentes regiones de las muestras (80 cm x 30 cm). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.3.6.2. Propiedades mecánicas en punción

Se evaluó la resistencia máxima a la punción según el método propuesto por Gontard y col. (1992), con algunas modificaciones. Se empleó un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra) con una sonda de punta plana de 3 mm de diámetro y una base circular adecuada para tal medición. La punción se realizó a una velocidad de 0,5 mm/s determinándose la fuerza máxima a la ruptura (N) y la distancia en ese punto (mm). A partir de las medidas obtenidas se informó la fuerza máxima (F_m , en N) y la deformación a la ruptura (D_m , en %), calculada como la hipotenusa formada entre la distancia a la ruptura y el radio de la base empleada en la medición.

5.3.6.3. Capacidad y calidad de termosellado

Se evaluó la resistencia de sellado según norma ASTM F88-00 (2004). Se cortaron dos tiras de película de 76 x 25 mm de lado, que se sellaron térmicamente por su lado más corto utilizando una termoselladora de cinta, tal como se muestra en la Figura 5.6.



Figura 5.6. Disposición de las probetas de película termoselladas para medir la resistencia del sellado empleando un texturómetro.

La resistencia al termosellado, indicador de la calidad de cierre, se evaluó en un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra) equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG. Se ensayaron las probetas luego que el sellado llegara a temperatura ambiente aplicando una tensión de 0,5 mm/s. La fuerza mínima (N) necesaria para que ocurra la falla del sellado se obtuvo mediante el software Texture Expert V.1.22 (Stable Micro Systems, Inglaterra). Además se observó visualmente y se informó el modo de falla de los cierres: adhesiva, cohesiva o por delaminación del material según la norma mencionada (Figura 5.7). Se ensayaron 5 probetas para cada formulación.

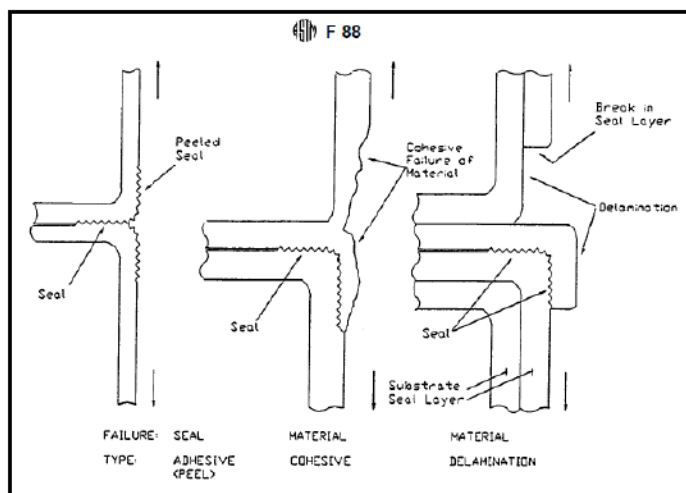


Figura 5.7. Representación esquemática de los modos de falla de sellado según la norma ASTM F88-00 (2004).

5.3.7. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y expresados como la media \pm desviación estándar. Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey con un nivel de significación $\alpha = 0,05$, utilizando el programa SYSTAT (versión 12, Systat Software, Inc., Chicago, Estados Unidos).

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Selección de la concentración proteica adecuada para el procesamiento por *tape casting*

Se prepararon dispersiones filmogénicas en agua conteniendo distintas concentraciones de aislado proteico: 5,0; 10,0; 10,5; 11,0; y 12,5% p/v, con una concentración de glicerol fijada al 30% p/p respecto de la cantidad de aislado proteico a pH 10,5. Esas dispersiones fueron caracterizadas según sus propiedades reológicas y utilizadas para preparar películas proteicas de soja por *tape casting* secando por conducción a 60 °C, con el fin de seleccionar la formulación más adecuada para procesar a las películas por esta tecnología. Intentando extrapolar los procesos usados en el laboratorio para obtener las películas proteicas de soja por *casting* y a modo de comparación, se evaluó también una dispersión conteniendo 5,0% p/v de SPI (Mauri y Añón, 2006 y 2008); Denavi y col., 2009; Salgado y col., 2010 y 2011; Echeverría y col., 2014).

Para procesar por *tape casting* las dispersiones filmogénicas deben presentar un comportamiento de flujo pseudoplástico con una viscosidad elevada a bajas velocidades de deformación (cuando la dispersión está en la tolva) de manera de evitar su escurrimiento hacia la placa (o cinta) y la sedimentación de las partículas; y una viscosidad intermedia a las velocidades de deformación típicas del proceso para garantizar condiciones apropiadas de flujo debajo del aplicador y sin que no se escurra de la cinta (Gardini y col., 2010).

La Figura 5.8 y la Tabla 5.2 muestran las características reológicas de las dispersiones filmogénicas con diferentes concentraciones de SPI. Los valores experimentales pudieron ajustarse satisfactoriamente al modelo de Ostwald de Waele (Ecuación 5.1) con coeficientes de correlación de $R^2 > 0,99$ en todos los casos. Todas las dispersiones exhibieron un comportamiento de flujo pseudoplástico ($K > 0$, $0 < n < 1$), observándose la disminución de los valores de viscosidad aparente

al aumentar la velocidad de deformación (D). En la **Tabla 5.2** se presentan las viscosidades aparentes que presentan las distintas formulaciones a la velocidad de deformación que se aplica en el equipo de *tape casting* en las condiciones de trabajo ($D= 9/s$), que surge de relacionar la velocidad de aplicación de la dispersión (1,8 cm/s) respecto del espesor con que este es regulado (2 mm), espacio por donde fluirá la dispersión filmogénica (Steffe, 1996).

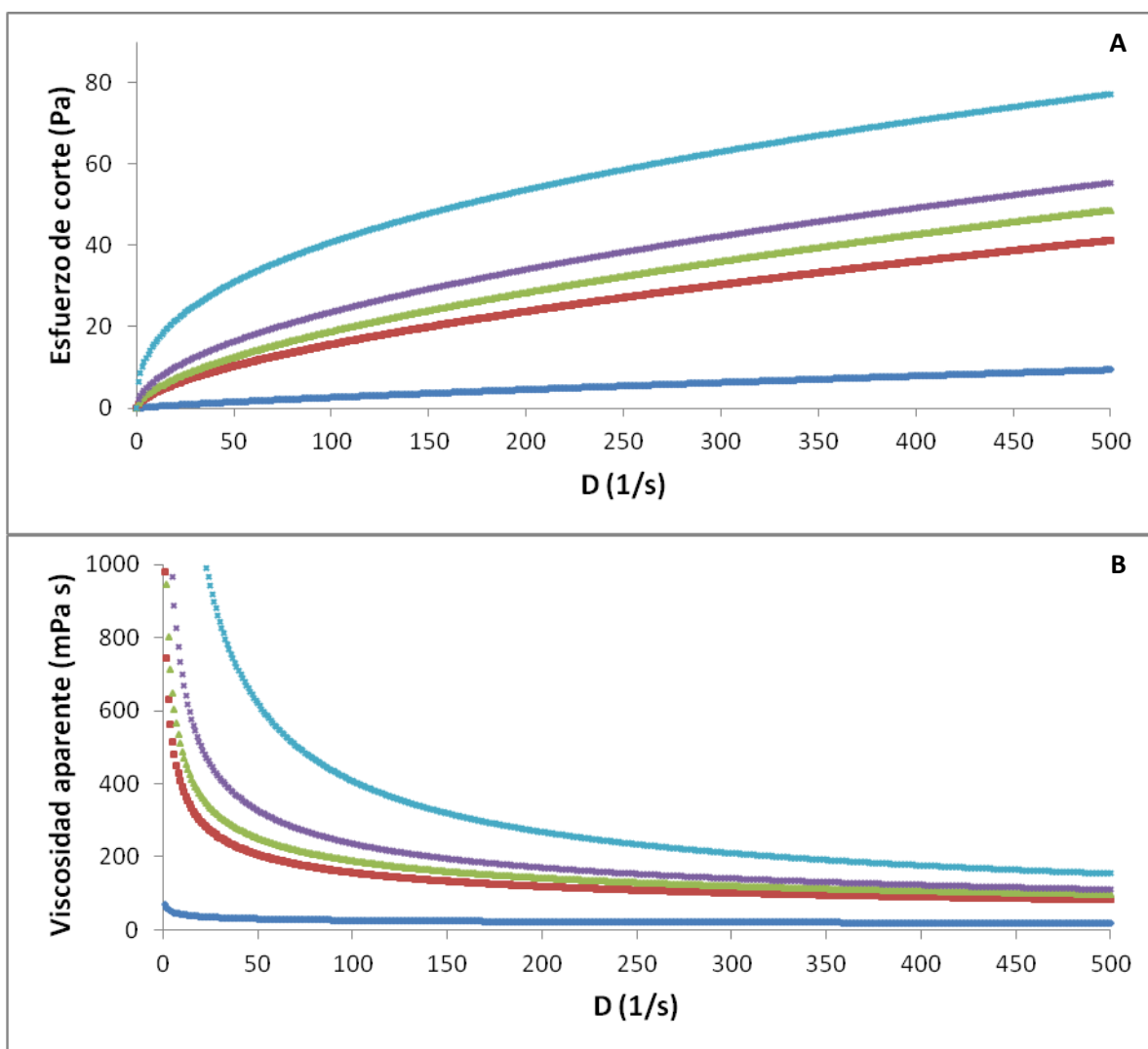


Figura 5.8. Curvas de esfuerzo de corte (A) y viscosidad aparente (B) en función de la velocidad de deformación (D) de dispersiones filmogénicas con concentraciones crecientes de SPI: (●) 5,0; (●) 10,0; (●) 10,5; (●) 11,0 y (●) 12,5 g de SPI por cada 100 mL de dispersión.

El comportamiento pseudoplástico de las dispersiones se acentuó progresivamente con el incremento del contenido de proteína en la formulación, mostrando una importante disminución en el índice de comportamiento de flujo (n), con un incremento en la viscosidad de las

dispersiones (indicado por altos valores de K y de viscosidad aparente). Este incremento en la viscosidad fue más pronunciado a valores de baja velocidad de deformación (D). Como era de esperar las dispersiones más concentradas presentaron viscosidades más altas, probablemente porque las proteínas de esas suspensiones proteicas son organizadas más densamente y con mayores posibilidades de interacción (*entanglement*).

Tabla 5.2. Características reológicas de las dispersiones filmogénicas con contenidos crecientes de SPI: **(A)** índice de consistencia (K) y de comportamiento de flujo (n); **(B)** valores de viscosidad aparente calculada a velocidades de deformación (D) de 9/s.

g SPI/100 mL	A. Parámetros de Ostwald de Waele			B. Viscosidad aparente (mPa s)
	$K (Pa s^n)$	n	r^2	$D= 9 s^{-1}$
5,0	0,068 ± 0,010 c	0,792 ± 0,012 a	0,999	53,7 ± 2,7 e
10,0	0,979 ± 0,038 bc	0,602 ± 0,008 b	0,999	393,4 ± 6,1 d
10,5	1,260 ± 0,196 bc	0,588 ± 0,012 b	0,999	510,4 ± 57,2 c
11,0	2,062 ± 0,267 b	0,530 ± 0,018 c	0,999	740,6 ± 53,7 b
12,5	6,568 ± 1,118 a	0,396 ± 0,025 d	0,997	2232,2 ± 117,7 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Para las concentraciones de SPI extremas analizadas los comportamientos reológicos no resultaron adecuados para procesar las muestras por *tape casting*. La dispersión conteniendo 5,0% p/v de SPI, si bien resultó adecuada para lograr eliminar las burbujas formadas durante la agitación previo al moldeo, presentó una baja viscosidad y una tendencia a derramarse de la superficie de la plataforma metálica del equipo. Contrariamente a estos resultados, Echeverría (2012) en el intento de escalar la producción de películas proteicas y nanocompuestas en base a proteína de soja y montmorillonita, logró obtenerlas mediante *spread coating* (tecnología similar al *tape casting*) utilizando 5% p/v de SPI pero en un equipo semi-continuo con un diseño diferente, no describiendo inconvenientes como los encontrados en este trabajo. Por el contrario la dispersión con 12,5% p/v de SPI, presentó un aumento significativo en su viscosidad acompañado de un aumento importante de K y una disminución de n. Estas características (la alta viscosidad y K) dificultaron su moldeo en el equipo, siendo sus películas heterogéneas debidas a la retención de una gran cantidad de burbujas en la matriz proteica. Las dispersiones restantes presentaron

comportamiento intermedio. La dispersión que contenida 10,5% p/v de SPI fue seleccionada para continuar procesando por *tape casting* en este equipo, ya que presentó una fluidez adecuada durante la etapa de aplicación de la dispersión sobre la plataforma y su viscosidad permitió la eliminación de las burbujas. Las dispersiones con 10,0% p/v de SPI tendían a seguir fluyendo una vez aplicadas sobre la superficie metálica del equipo, mientras que las de 11% p/v de SPI resultaron en películas con una cantidad significativa de burbujas remanentes en la matriz.

A partir de estos resultados, se seleccionó seguir trabajando por tape casting a partir de dispersiones acuosas que contenían 10,5% p/v de SPI y 30% p/p de glicerol (respecto de la cantidad de SPI), a pH 10,5.

5.4.2. Influencia de las condiciones de secado (temperatura y método de secado) sobre las propiedades de películas proteicas de soja obtenidas por *tape casting*

En esta parte del trabajo se evaluó el efecto de dos metodologías de secado en el procesamiento por *tape casting* sobre las dispersiones ya seleccionadas: secado por *conducción* a 40, 50 y 60 °C (C40, C50, C60) y secado con radiación infrarroja a 60°C (IR60), sobre la cinética del secado y las propiedades físicas y químicas de las películas proteicas obtenidas.

La temperatura y la humedad relativa del ambiente afectan la formación de las películas, y en consecuencia su funcionalidad. Denavi y col. (2009) evaluaron el secado de películas proteicas de soja obtenidas por *casting* a distintas temperaturas (34, 40, 55, 70 y 76 °C) y humedades relativas (24, 30, 45, 60 y 66% de HR), obtenidas a partir de un aislado proteico de soja nativo (elaborado a partir de la harina de soja desgrasada) y otro comercial de similares características al empleado en este trabajo. Estos autores encontraron que el efecto del aumento de la temperatura de secado aumentó la resistencia mecánica de los materiales y una disminución en la solubilidad, sin afectar los parámetros de color y seleccionaron el tratamiento de secado a 60 °C y 60% de HR como óptimo para el aislado nativo, y 70 °C y 30% de HR para el aislado comercial. Por su parte, nuestro Laboratorio ha venido trabajando principalmente por *casting*, secando en general a las formulaciones proteicas con 5% p/v de proteína durante aproximadamente 3 h a 60 °C (Mauri y Añón, 2006 y 2008; Salgado y col., 2008 y 2011; Ortiz y col., 2013; Echeverría y col., 2014).

5.4.2.1. Cinética de secado

La cinética de secado durante la preparación de las películas proteicas de soja se analizó para obtener el tiempo de secado en cada metodología evaluada (40C, 50C, 60C, IR60). En cada caso se obtuvieron medidas del peso de la dispersión filmogénica proteica hasta peso constante. La Figura 5.9 muestra las curvas de pérdida de agua en función del tiempo para todas las condiciones de secado evaluadas. De las mismas se obtuvieron los tiempos de secado que fueron 7,4 h para C40, 2,8 h para C50, 1,4 h para C60 y 1,5 h para IR60. Claramente se observa una disminución importante de los tiempos de secado con el aumento de la temperatura, que llega a ser de 6 h cuando se comparan los procesos a 40 y 60 °C por conducción, no observándose diferencias en las curvas correspondientes a distintas técnicas de secado (conducción y radiación) a la misma temperatura (60 °C). La reducción del tiempo de secado con el aumento de la temperatura tiene una implicancia práctica muy importante al intentar escalar estos procesos, ya que una de las desventajas siempre atribuidas al procesamiento por *casting* son los largos tiempos de secado. En la Figura 5.9 también se muestran las termofotografías sobre la curva de secado correspondiente al proceso realizado a 40 °C por conducción (a modo de ejemplo) donde es posible observar la evolución homogénea del secado sobre la superficie de aplicación de la dispersión. La diferencia de coloración indica las zonas de menor temperatura (verdes) basadas en la escala termográfica, que pasa por los colores amarillo, naranja y rojo a medida que la temperatura aumenta hasta llegar a calentar toda la placa de color rojo (temperatura homogénea en toda la superficie).

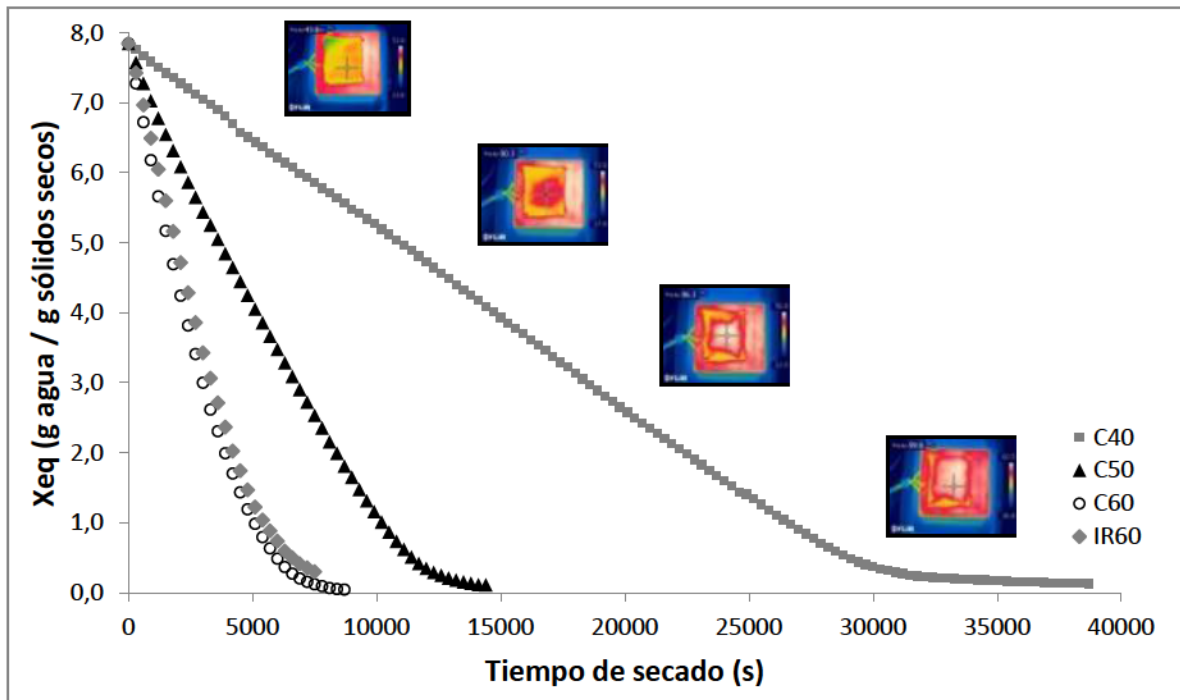


Figura 5.9. Cinéticas de secado (contenido de humedad vs tiempo de secado) de películas de proteína de soja procesadas por *tape casting* a 40, 50 y 60 °C por conducción o a 60 °C por la radiación (IR).

El proceso de secado de materiales con alto contenido de humedad se suele dividir en dos períodos definidos por el comportamiento de la tasa de secado. En la Figura 5.10 se muestran las curvas de velocidad de secado en función del tiempo. Los procesos en los que se secó por conducción presentaron dos períodos distintos definidos por el comportamiento de la tasa de secado, lo que es característico de materiales con alto contenido de humedad (Reis y col., 2013). En el primero, se observó una tasa de secado constante en el que predominó la evaporación del agua libre en la superficie del material, mientras que en el segundo, la tasa fue decreciendo, lo que según Geankoplis (1993), es una indicación de que la migración interna de la humedad hacia la superficie no logró equiparar la tasa de evaporación en la superficie del material.

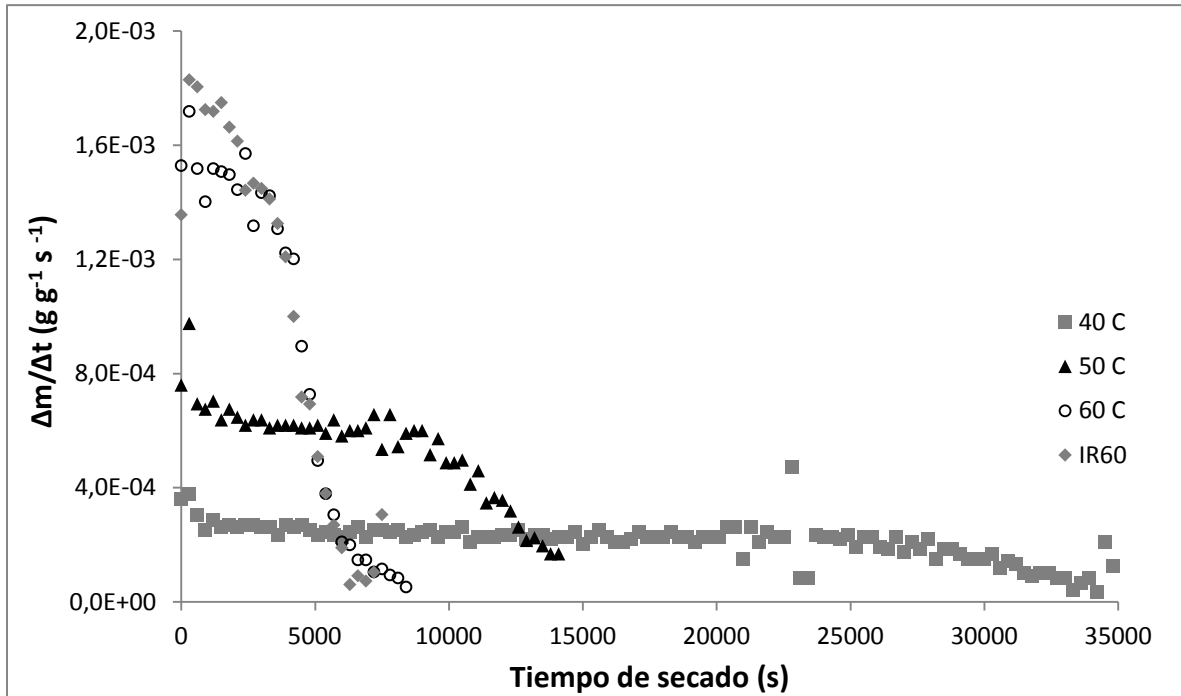


Figura 5.10. Velocidades de secado de las dispersiones proteicas de soja a 40, 50, y 60 °C por conducción o a 60 °C por radiación (IR) en función del tiempo de procesamiento.

Con el aumento de la temperatura se observó un aumento significativo del valor de la velocidad de secado constante y una disminución de la fracción de tiempo que llevó esta etapa en el procesamiento, en el que hay predominancia de la evaporación del agua libre de la superficie del material, tal como describieron otros autores al secar soluciones de biopolímeros (Daud y Armstrong, 1988; Moreira y col., 2011; Reis y col., 2013; Moraes y col., 2014), pero para todos los casos el valor de humedad crítica (transición entre el período a tasa constante y el período a tasa decreciente) estuvo entre 60 y 75% de contenido de agua (en base húmeda). Así por ejemplo, a 60 °C, los valores de velocidad de secado constante fueron siete veces mayores que los correspondientes para las películas secadas a 40 °C y el tiempo de esta etapa respecto del total de secado, representó el 74, 67 y 42% para los materiales procesados por conducción a 40, 50 y 60 °C, respectivamente.

5.4.2.2. Caracterización de las películas secadas a diferentes temperaturas por conducción y a 60 °C por radiación

5.4.2.2.1. Apariencia

En la **Tabla 5.3** se presentan el espesor, los parámetros de color y la opacidad de las películas proteicas de soja obtenidas por *tape casting* secadas por conducción a 40, 50 y 60 °C y por radiación IR a 60 °C (IR60).

Tabla 5.3. Espesor, parámetros de color (L^* , a^* , b^* , ΔE) y opacidad de películas de SPI secadas a 40, 50 y 60 °C por conducción o a 60 °C por radiación (IR60).

Muestra	Espesor (μm)	Parámetros de Hunter-lab				Opacidad (UA/mm)
		L^*	a^*	b^*	ΔE	
C40	105,8 ± 17,3 b	84,5 ± 1,4 a	-1,8 ± 0,3 a	31,2 ± 3,1 a	32,2 ± 3,3 a	2,3 ± 0,08 a
C50	107,8 ± 12,5 b	86,1 ± 0,5 a	-2,2 ± 0,1 a	29,6 ± 0,9 a	30,1 ± 1,0 a	1,8 ± 0,14 b
C60	104,2 ± 14,6 b	86,1 ± 2,0 a	-2,1 ± 0,4 a	28,0 ± 2,6 a	28,7 ± 3,0 a	1,6 ± 0,04 b
IR60	185,3 ± 31,4 a	85,4 ± 3,3 a	-1,9 ± 0,7 a	30,7 ± 5,4 a	31,4 ± 6,1 a	1,1 ± 0,05 c

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Todas las películas secadas por conducción, independientemente de la temperatura empleada durante el secado, presentaron espesores similares ($\approx 105 \mu\text{m}$), que resultaron significativamente más delgados que los de las películas secadas por IR ($\approx 185 \mu\text{m}$). Teniendo en cuenta que *i*) todas las películas se prepararon a partir de formulaciones idénticas (igual concentración de proteína y glicerol, e igual pH); *ii*) que la dispersión filmogénica se extendió sobre la plataforma metálica utilizando el mismo espacio en el dispositivo aplicador y control de espesor; y *iii*) que todas las películas presentaron similar contenido de agua como se demuestra en la **Tabla 5.4**, las variaciones en el espesor se debieron probablemente a las diferentes conformaciones que las proteínas adoptan durante el período de secado cuando el agua fue eliminada progresivamente y que podrían estar relacionados con la diferencia en la evolución de las tasas de eliminación de agua durante el secado por conducción y radiación infrarroja observada al analizar las cinéticas de secado.

Para todas las condiciones de secado las películas presentaron una coloración amarillenta, típica de las películas proteicas de soja, no observándose diferencias en los parámetros de color CIE L*, a*, b*, y ΔE (Tabla 5.3) en concordancia con lo encontrado por Denavi y col. (2009) al estudiar el efecto de la temperatura y la humedad relativa utilizadas en el secado de películas proteicas de soja obtenidas por *casting*. Pero sí se observó una disminución de la opacidad de las películas al aumentar la temperatura de secado por conducción, que se hace aún más significativa al secar mediante radiación IR.

5.4.2.2.2. Susceptibilidad al agua

La Tabla 5.4 muestra el contenido de humedad, la solubilidad, la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y el ángulo de contacto de las películas de proteína de soja procesadas por *tape casting* y secadas a 40, 50 o 60 °C por conducción o a 60 °C por radiación IR.

Tabla 5.4. Contenido de humedad, solubilidad, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y ángulo de contacto de las películas preparadas con SPI secadas en diferentes condiciones.

Muestra	Contenido de agua (%)	Solubilidad (%)	WVP x 10 ⁻¹⁰ (g/m Pa s)	Ángulo de contacto (°)
C40	12,04 ± 0,51 a	33,70 ± 0,01 a	1,32 ± 0,19 a	75,13 ± 4,40 a
C50	12,79 ± 0,19 a	33,62 ± 2,42 a	1,47 ± 0,33 a	67,66 ± 7,41 ab
C60	12,15 ± 0,12 a	31,23 ± 1,28 a	0,95 ± 0,21 a	56,07 ± 5,33 b
IR60	12,25 ± 0,22 a	32,69 ± 1,91 a	1,61 ± 0,68 a	66,03 ± 5,80 ab

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Todas las películas presentaron aproximadamente el mismo contenido de agua ($\approx 12\%$) luego de ser almacenadas. También mostraron similares solubilidades en agua y permeabilidades al vapor de agua. Estos resultados concuerdan con los demostrados por Denavi y col. (2009), quienes tampoco observaron diferencias en la solubilidad de películas proteicas de soja procesadas por *casting* utilizando distintas condiciones de secado al trabajar con un aislado de soja desnaturalizado. Las bajas solubilidades encontradas en este trabajo ($\approx 32\%$) respecto a lo reportado por Denavi y col. (2009) dan indicio de un alto entrecruzamiento proteico y una baja

hidrofilicidad de las matrices, lo que se manifiesta también en el bajo contenido de agua de las películas luego de almacenarlas a 58% HR.

Se ha reportado que en películas hidrofílicas (tales como de pectina, amilosa, éteres de celulosa, caseinato de sodio y proteínas de soja) la WVP aumenta con el espesor de la película (McHugh y col., 1993; Ghorpade y col., 1995). Este efecto no se verificó en este estudio, dado que las películas secadas por IR que presentaron espesores significativamente mayores mostraron similares WVP que las secadas por conducción. Si bien este resultado también daría indicio del menor carácter hidrofílico de estas matrices, dado por el entrecruzamiento alcanzado con todas las condiciones analizadas, los valores de WVP obtenidos están en el rango de los publicados para películas de proteínas de soja obtenidas por *casting* (Denavi y col., 2009; Salgado y col., 2011). En este sentido, Salgado y col. (2015) estudiaron la funcionalidad de películas proteicas de soja con distintas propiedades estructurales, que no presentaron diferencias significativas en su contenido de agua y en su permeabilidad al vapor de agua, lo que atribuyeron a la naturaleza hidrofílica propia de las proteínas, pero sí mostraron modificaciones en su solubilidad debido a que esta propiedad dependería principalmente de las interacciones que estabilizaban la red de proteínas.

Al analizar los valores de ángulos de contacto (**Tabla 5.4**), se observa que al aumentar la temperatura de secado por conducción la hidrofobicidad superficial de las películas disminuyó, y que frente a la misma temperatura, las películas secadas por radiación IR presentaron mayores hidrofobicidades superficiales. Esto sugiere que la conformación y el grado de agregación de las proteínas en al menos la superficie de las películas es diferente. Cabe señalar que el ángulo de contacto fue evaluado en relación a la superficie expuesta al aire. En el caso de las películas secadas por radiación IR la superficie analizada fue la que estuvo expuesta directamente a la fuente de calor. El mayor ángulo de contacto de estas películas frente a las secadas a igual temperatura pero por conducción podría atribuirse al menos en parte a que al deshidratarse primero en la superficie, las proteínas se reacomoden exponiendo sus zonas más hidrofóbicas en ese sentido, dejando a las hidrofílicas inicialmente hacia el centro de la película. En cuanto al efecto de la temperatura, es sabido que tanto la temperatura como el pH alcalino favorecen la agregación, y la formación de interacciones hidrofóbicas y de puentes disulfuro entre proteínas. Si esto ocurriera, las proteínas podrían estar exponiendo sus residuos más hidrofílicos hacia la superficie, disminuyendo su hidrofobicidad superficial. Pero cabe señalar, que los cambios conformacionales que podrían explicar los cambios de hidrofobicidades superficiales, no afectarían

la naturaleza hidrofílica de la matriz dado que no se observaron diferencias ni en el contenido de agua ni en la WVP.

5.4.2.2.3. Propiedades mecánicas

En la Tabla 5.5 se presentan las propiedades mecánicas medidas en tracción de las películas estudiadas, representadas por la tensión a la ruptura (σ_r), el módulo de Young (E) y la elongación a la ruptura (ϵ_r).

Tabla 5.5. Propiedades mecánicas medidas en tracción de películas proteicas de soja obtenidas por *tape casting* bajo diferentes condiciones de secado: tensión a la ruptura (σ_r), módulo de Young (E) y elongación (ϵ_r).

Muestra	σ_r (MPa)	E (MPa)	ϵ_r (%)
C40	5,64 ± 0,83 bc	3,44 ± 0,31 b	72,37 ± 7,24 ab
C50	5,15 ± 0,40 c	2,49 ± 0,25 c	74,77 ± 9,27 a
C60	7,53 ± 0,56 a	4,25 ± 0,38 a	47,64 ± 9,89 c
IR60	6,04 ± 0,96 b	2,35 ± 0,15 c	59,98 ± 11,46 bc

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Las películas secadas a 60 °C por conducción presentaron mayor resistencia a la tracción y módulo de Young y menor elongación a la rotura que las secadas a 40 y 50 °C con la misma metodología, y que las secadas a igual temperatura pero por radiación IR. Denavi y col. (2009) observaron aumentos en la resistencia a la tracción pero acompañados de un aumento en la elongación a la rotura para las películas obtenidas por *casting* al aumentar la temperatura de secado, siendo los aumentos variables dependiendo de la humedad relativa durante el secado. Teniendo en cuenta que todas las películas estudiadas en este trabajo tienen el mismo contenido de plastificante (agua y glicerol), las diferencias encontradas en las propiedades mecánicas deben atribuirse a un mayor entrecruzamiento. Probablemente en estas matrices sean los puentes disulfuro los responsables en estas mejoras, cuya formación se favorece con la temperatura y el pH alcalino. En trabajos previos realizados por *casting*, se ha descrito que los puentes disulfuro tienen una importancia fundamental en la estabilización de las películas proteicas de soja y en la

mejora de su resistencia mecánica (Mauri y Añón, 2006; Salgado y col., 2008). Perez-Gago y Krochta (2001), señalaron que los materiales con mayor capacidad de estabilizarse a través de enlaces covalentes puentes disulfuro son más resistentes, e incluso a veces más elongables, dependiendo esto más de la distribución de los mismos que de su número (Salgado y col., 2010). Esto último también podría explicar porque estas matrices más entrecruzadas no resultaron ser menos solubles ni modificaron el carácter hidrofílico-hidrofóbico de la matriz que podría afectar el contenido de agua y la WVP.

El mayor entrecruzamiento, responsable del aumento de la resistencia mecánica de las películas proteicas procesadas por *tape casting* secando a 60 °C por conducción también se reflejó en la temperatura de transición vítrea de estos materiales, mostrada en la **Tabla 5.6**. La Tg de estos materiales resultó ser significativamente mayor que las obtenidas con las otras condiciones de secado evaluadas. Teniendo en cuenta que todas las películas presentan el mismo contenido de proteína y de plastificante (agua y glicerol), la mayor restricción al movimiento de las cadenas peptídicas en estas matrices debe atribuirse al mayor entrecruzamiento entre cadenas peptídicas.

Tabla 5.6. Temperaturas de transición vítrea (obtenidas por DSC) para las películas proteicas de soja procesadas por *tape casting* bajo distintas condiciones de secado.

Muestra	Tg (°C) medida por DSC
C40	-20,8 ± 0,8 b
C50	-21,1 ± 0,5 b
C60	-16,5 ± 0,7 a
IR60	-19,8 ± 0,3 b

Letras distintas dentro de la columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5.4.2.2.4. Resistencia del termosellado

Todas las películas procesadas bajo distintas condiciones de secado presentaron la capacidad de termosellarse, lo que resulta interesante para algunas aplicaciones de estos materiales, ya que a modo de ejemplo los mismos podrían utilizarse para formar bolsas, como lo han hecho Scheibe y col. (2014) a partir de películas de almidón de mandioca y fibras celulósicas obtenidas por *tape casting*. La **Figura 5.11** muestra la resistencia del sellado de los distintos materiales al someterlos a un ensayo en tracción.

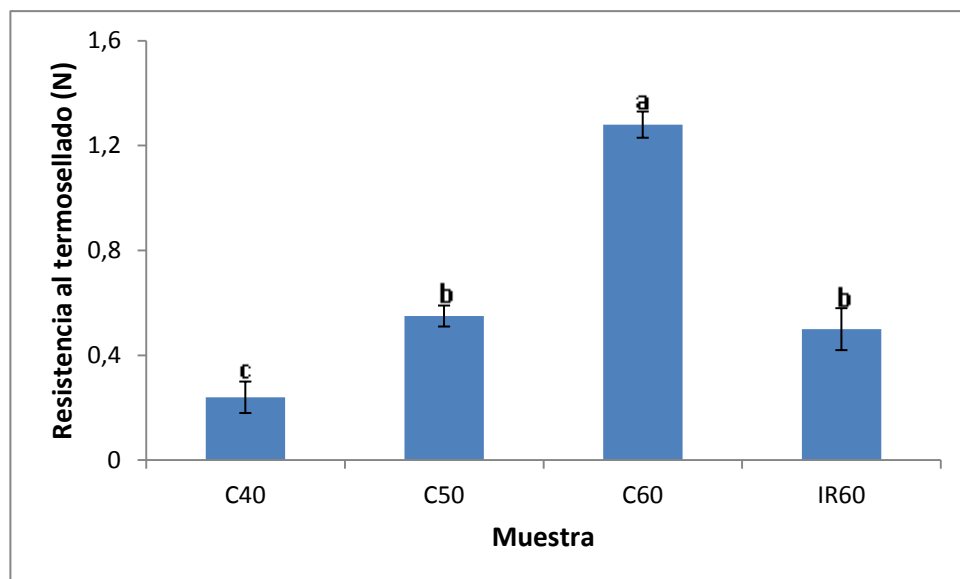


Figura 5.11. Resistencia al termosellado de películas procesadas por *tape casting* a diferentes temperaturas por conducción (C40, C50, C60) o por radiación (IR60). Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La resistencia al termosellado aumentó progresivamente con la temperatura de secado de las películas para los materiales procesados secando por conducción, y a igual temperatura, las películas secadas por conducción mostraron una resistencia del termosellado superior que las secadas por radiación IR. Es de esperar que las características superficiales de los materiales tuvieran cierta influencia sobre la adhesión que ocurre finalizado el proceso. Pareciera existir una correlación entre las resistencias del termosellado y los ángulos de contacto tal como se observa en la **Figura 5.12**. La disminución de la hidrofobicidad superficial (menor ángulo de contacto), podría favorecer la adhesión de las películas durante el termosellado favoreciendo su resistencia. Si bien cabría suponer que en estos materiales delgados el proceso de termosellado vaya mas allá de la superficie, dado que con el calentamiento ocurre casi un ablandamiento general del material, en todos los casos el tipo de falla al realizar el ensayo fue adhesiva, lo que apoyaría la influencia del efecto superficial.

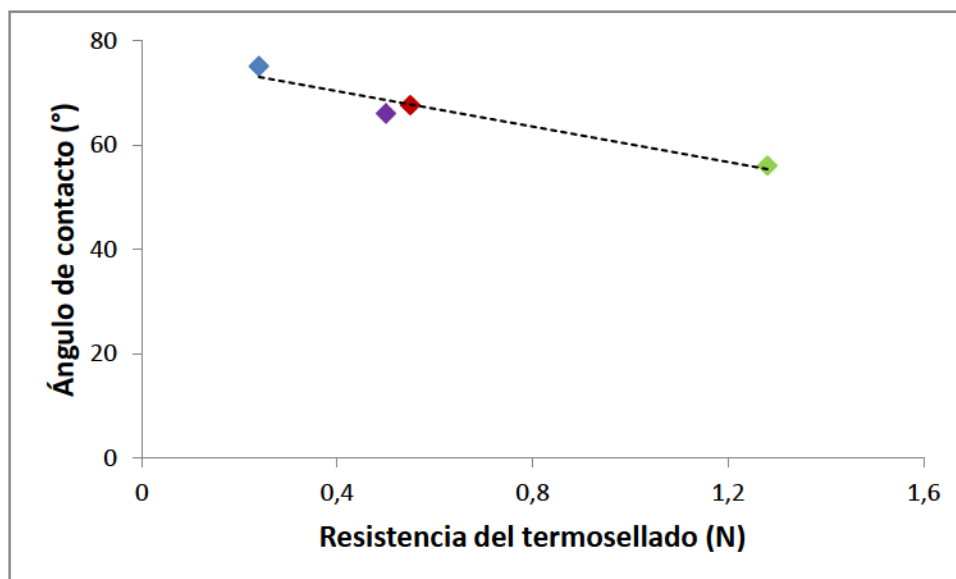


Figura 5.12. Asociación entre la resistencia al termosellado y el ángulo de contacto de películas procesadas por *tape casting* y secadas a 40 (●), 50 (●) y 60 °C (●) por conducción o radiación IR (●).

*En función de los resultados obtenidos se seleccionó como condición de secado para seguir procesando por *tape casting* el calentamiento por conducción a 60 °C.*

5.4.3. Películas compuestas en base a proteínas de soja y fibras celulósicas procesadas por *tape casting*

El uso de fibras celulósicas en la formulación de materiales biopoliméricos ha sido una de las alternativas más tradicionales estudiadas en la obtención de películas compuestas, ya que logran mejorar sus propiedades mecánicas (Angle's y Dufresne, 2001; Chen y col., 2009; Teixeira y col., 2009; Müller y col., 2009 a y b; de Moraes y col., 2013; Sheibe y col., 2014). Además, los materiales resultantes generalmente resultan más económicos y livianos (menor densidad) además de ser biodegradables y biocompatibles, dado que las fibras vegetales son recursos muy abundantes y renovables (Song y col., 2011). En particular, el empleo de fibras celulósicas en matrices proteicas de soja ha sido efectivo para mejorar la resistencia mecánica y la susceptibilidad al agua de las películas compuestas resultantes (Paetau y col., 1994; Kumar y Zhang, 2009).

5.4.3.1. Caracterización de las fibras empleadas

En este trabajo se emplearon fibras celulósicas obtenidas de papel comercial tipo *Kraft* (Klabin S.A., Brasil). En el proceso *kraft*, virutas de madera son sometidas a reacción con una solución que contiene hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na₂S), también conocido como “licor blanco”. Este proceso ocurre dentro de un digestor, mantenido a alta presión y temperatura. Las sustancias químicas empleadas reaccionan con la lignina, fragmentándola en sustancias de bajo peso molecular que se solubilizan en la solución alcalina y que pueden ser removidas de las fibras por varias etapas de lavado. La pulpa o pasta resultante presenta una coloración amarronada y por ese motivo no es adecuada para la producción de determinados tipos de papel. Esa coloración se debe principalmente a pequeñas cantidades de lignina que no son removidas de las fibras y son denominadas lignina residual. Para obtener pulpas totalmente blancas, es necesario remover esa lignina a través de un proceso de blanqueo. Este proceso es dificultoso, ya que la lignina residual se encuentra fuertemente ligada a las fibras. El blanqueo debe realizarse en diversas etapas, garantizando la obtención de pulpas de blancura elevada, y con mínima degradación de celulosa. Por este motivo, las fibras celulósicas utilizadas en este trabajo presentaban coloración marrón *per se* tal como se muestra en la Figura 5.2.

En la Figura 5.13 se muestran microfotografías de las fibras celulósicas utilizadas en donde se puede observar que tienen forma cilíndrica. Del análisis realizado sobre esas fotos, se concluyó que las fibras utilizadas tenían aproximadamente 30 μm de diámetro y 1,3 mm de largo en promedio. Por otra parte, estaban constituidas por un 82,5% de celulosa y retenían un 8,1% de lignina.



Figura 5.13. Microfotografías electrónicas de barrido (SEM) de las fibras celulósicas utilizadas con diferentes aumentos: 50X (A); 1.000 X (B); y 7.000X (C).

Similares características fueron descritas para fibras celulósicas a partir de papel *kraft* utilizadas por otros autores como refuerzo de matrices de almidón (de Oliveira Romera y col., 2012; de Moraes y col., 2013; Scheibe y col., 2014).

5.4.3.2. Caracterización de las películas compuestas proteína-fibra

Las películas caracterizadas en esta sección fueron formuladas a partir de 10,5% p/v SPI, 30% p/p de glicerol respecto a la proteína y agua, con el agregado de 0, 2,5, 5,0, y 7,5 g de fibras celulósicas/ 100 g de aislado proteico (C60, 2,5F, 5,0F y 7,5F), y fueron procesadas por *tape casting* secando por conducción a 60 °C.

En ensayos preliminares se evaluó la incorporación de diferentes concentraciones de fibra a las formulaciones. Si bien se intentó caracterizar reológicamente a las dispersiones filmogénicas como en la sección 5.3.4, no pudo concretarse debido a que la relación forma-tamaño de las fibras no permitió llevar adelante los ensayos rotacionales. No fue posible agregar concentraciones de fibra superiores al 7,5 g de fibras/ 100 g de SPI debido a que las dispersiones filmogénicas alcanzaban viscosidades tales que dificultaban su agitación y homogenización, así como la remoción de las burbujas que se formaban durante el mezclado.

5.4.3.2.1. Apariencia de las películas compuestas proteína-fibra

En la Figura 5.14 se presentan fotografías de las películas proteicas de soja con 0; 2,5; 5,0 y 7,5 g de fibras/ 100 g de SPI obtenidas por *tape casting*. Las mismas resultaron homogéneas, con las fibras visibles y bien dispersas en la matriz proteica.

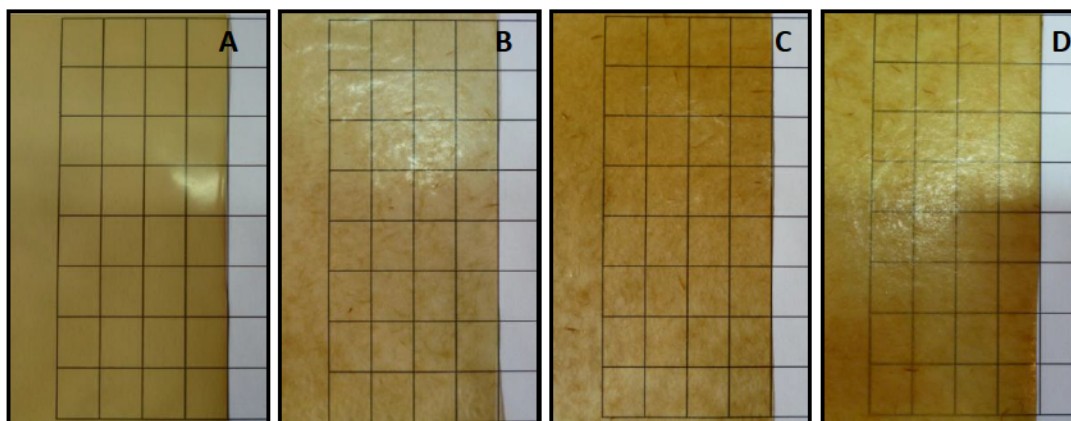


Figura 5.11. Apariencia de las películas proteicas de soja con agregado de 0 (A); 2,5 (B); 5,0 (C); y 7,5 (D) g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI obtenidas por *tape casting*.

En la Tabla 5.7 se presentan el espesor, la opacidad y la densidad de las películas compuestas en base a proteína de soja y fibras celulósicas obtenidas por *tape casting*. Al aumentar

la concentración de fibra en la formulación, aumentó el espesor de las películas pero sólo resultó estadísticamente diferente para la película que contenía 7,5 g de fibra/ 100 g de SPI. También se observó un aumento progresivo en la opacidad y una disminución de la densidad de las películas en función de la cantidad creciente de fibras incorporadas, probablemente por la diferencia de densidad de las fibras celulósicas respecto a la del aislado proteico de soja. En este sentido y en sistemas procesados por *tape casting* con almidón y fibras celulósicas, de Oliveira Romera y col. (2012), y Müller y col. (2009), también informaron que la densidad de los materiales compuestos era menor que la del almidón termoplástico por sí solo debido a la baja densidad de las fibras celulósicas. Esta disminución de la densidad implicaría una disminución en el peso del material lo que resultaría interesante para aplicaciones como envases, si al menos se conservan otras propiedades.

Tabla 5.7. Espesor, opacidad y densidad de las películas proteicas con agregado de 0, 2,5, 5,0 y 7,5 g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI obtenidas por *tape casting*.

Muestra	Espesor (μm)	Opacidad (UA/mm)	Densidad (g/cm)
C60	99,72 \pm 17,42 b	1,6 \pm 0,04 b	1,28 \pm 0,07 a
2,5F	115,72 \pm 20,12 b	1,8 \pm 0,06 b	1,05 \pm 0,04 bc
5,0F	104,87 \pm 16,16 b	2,4 \pm 0,09 a	1,15 \pm 0,06 b
7,5F	135,3 \pm 31,78 a	2,3 \pm 0,12 a	1,01 \pm 0,02 c

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Los parámetros de color de las películas compuestas en base a proteína de soja y fibras celulósicas obtenidas por *tape casting* se muestran en la **Tabla 5.8**. Se puede observar que la mayor variación de color (en todos los parámetros analizados) ocurrió cuando se incorporó 7,5 g de fibras/ 100 g de SPI, resultando en películas más oscuras dada su menor luminosidad (L^*) y con tonalidad más amarronada, evidenciado en lo mayores valores de a^* y b^* encontrados y en consecuencia en una mayor variación de color (ΔE). Esta tendencia, fue observada también al analizar el espesor.

Tabla 5.8. Parámetros de color L*, a*, b* y ΔE de las películas proteicas con agregado de 0, 2,5, 5,0, y 7,5 g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI obtenidas por *tape casting*.

Muestra	Parámetros de Hunter-lab			
	L*	a*	b*	ΔE
C60	86,1 ± 2,0 a	-2,2 ± 0,5 c	28,1 ± 2,6 b	28,8 ± 2,1 b
2,5F	87,7 ± 1,0 a	-1,9 ± 0,1 bc	25,7 ± 2,1 b	25,9 ± 2,3 b
5,0F	86,9 ± 0,7 a	-1,6 ± 0,2 b	26,6 ± 0,8 b	27,0 ± 1,0 b
7,5F	82,2 ± 1,4 b	0,2 ± 0,1 a	32,5 ± 2,2 a	34,3 ± 2,6 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5.4.3.2.2. Susceptibilidad al agua de las películas compuestas proteína-fibra

En la **Tabla 5.9** se presentan los resultados de las determinaciones relacionadas con la sensibilidad al agua de las películas compuestas en base a proteína de soja y fibras celulósicas obtenidas por *tape casting*. No se observaron diferencias en el contenido de agua, ni en la solubilidad y permeabilidad al vapor de agua de las películas con el agregado de las fibras celulósicas. Müller y col. (2009) describieron menores contenidos de agua para películas de almidón con fibras celulósicas incorporadas y lo explicaron por una baja afinidad al agua de las fibras respecto al almidón. En este trabajo las fibras no estarían modificando el carácter hidrofílico propio de las matrices proteicas lo que podría dar indicios de una interacción importante entre proteínas y fibras evitando la aparición de sitios con mayor retención de agua. Esas interacciones podrían favorecer el hecho que las fibras estuvieran embebidas en la matriz proteica y en consecuencia no observarse diferencias en las hidrofobicidades superficiales de las películas. Los valores encontrados de estas propiedades son característicos para películas hidrofílicas obtenidas a partir de proteínas de soja (Kumar y Zhang, 2009).

Tabla 5.9. Susceptibilidad al agua de las películas proteicas de soja con agregado de 0, 2,5, 5,0, y 7,5 g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI obtenidas por *tape casting*.

Muestra	Contenido de agua (%)	Solubilidad (%)	WVP x 10 ⁻¹⁰ (g / m Pa s)	Ángulo de contacto (°)
C60	12,15 ± 0,12 a	31,23 ± 1,28 a	1,05 ± 0,19 ab	56,07 ± 5,33 b
2,5F	12,53 ± 0,23 a	33,94 ± 2,13 a	0,88 ± 0,15 b	49,33 ± 5,55 ab
5,0F	12,23 ± 0,07 a	35,01 ± 0,26 a	1,04 ± 0,25 ab	56,76 ± 7,75 a
7,5F	12,36 ± 0,28 a	33,74 ± 0,62 a	1,58 ± 0,19 a	46,56 ± 3,14 ab

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5.4.3.2.3. Propiedades mecánicas de las películas compuestas proteína-fibra

La **Tabla 5.10** muestra las propiedades mecánicas medidas en ensayos de tracción y punción de las películas compuestas en base a proteína de soja y fibras celulósicas obtenidas por *tape casting*.

Tabla 5.10. Propiedades mecánicas determinadas en ensayos en tracción y punción de películas proteicas de soja con agregado de 0, 2,5, 5,0, y 7,5 g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI obtenidas por *tape casting*: tensión a la ruptura (σ_r), módulo de Young (E), elongación (ϵ_r), fuerza máxima a la punción (F_m) y deformación máxima en punción (D_m).

Muestra	σ_r (MPa)	E (MPa)	ϵ_r (%)	F_m (N)	D_m (%)
C60	7,53 ± 0,56 d	4,25 ± 0,38 a	47,64 ± 9,89 a	12,57 ± 1,94 c	7,56 ± 1,11 a
2,5F	9,20 ± 0,77 c	3,34 ± 0,23 b	12,13 ± 4,14 b	13,05 ± 0,54 bc	5,99 ± 2,51 a
5,0F	12,39 ± 0,65 b	4,32 ± 0,25 a	8,11 ± 0,75 b	16,72 ± 0,83 ab	7,32 ± 1,34 a
7,5F	15,34 ± 1,65 a	4,04 ± 0,41 a	8,99 ± 0,75 b	18,08 ± 1,96 a	6,03 ± 0,90 a

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El agregado de fibras provocó un aumento en la resistencia a la tracción, y una disminución en la elongación a la ruptura, sin modificar el módulo elástico. En general la literatura demuestra que con el agregado de fibras, las tensiones máximas a la ruptura aumentan, así como

también lo hace el módulo de Young debido al alto módulo específico de las fibras (Ma y col., 2005; de Oliveira Romera y col., 2012; Müller y col., 2009; de Moraes y col., 2013; Scheibe y col., 2014). La ausencia de las mejoras en el módulo de Young podría atribuirse a la naturaleza y calidad de la fibra utilizada. El agregado de fibras celulósicas también provocó un aumento en la resistencia a la punción pero sin modificar la deformación máxima. Con el agregado de un 7,5 g de fibras/ 100 g de SPI la resistencia a la punción aumentó en un 43% respecto de las películas proteicas de soja. Es evidente que las fibras ejercieron un efecto refuerzo importante que se manifestó principalmente en el aumento de la resistencia a la ruptura y en la disminución de la elongación sin modificar la solubilidad en agua de las películas.

5.4.3.2.4. Morfología de las películas compuestas proteína-fibra

Las mejoras en las propiedades mecánicas descritas anteriormente evidencian la buena adhesión de las fibras a la matriz proteica que fue verificada por SEM. En la Figura 5.15 se muestran las microestructuras de la superficie y del área transversal de las películas proteicas y compuestas en base a proteínas de soja y fibras celulósicas obtenidas por *tape casting*. De las mismas es posible observar una distribución homogénea y al azar de las fibras celulósicas en la matriz de proteína (sin una orientación preferencial de las fibras, dadas por el procesamiento). También se observa que las fibras están impregnadas dentro de la matriz continua de proteínas llegando a ejercer el efecto refuerzo descrito, y como va aumentando la concentración de fibras en las formulaciones. Similares distribuciones fueron observadas por Müller y col. (2009) en películas en base a almidón y fibras celulósicas procesadas por *tape casting*.

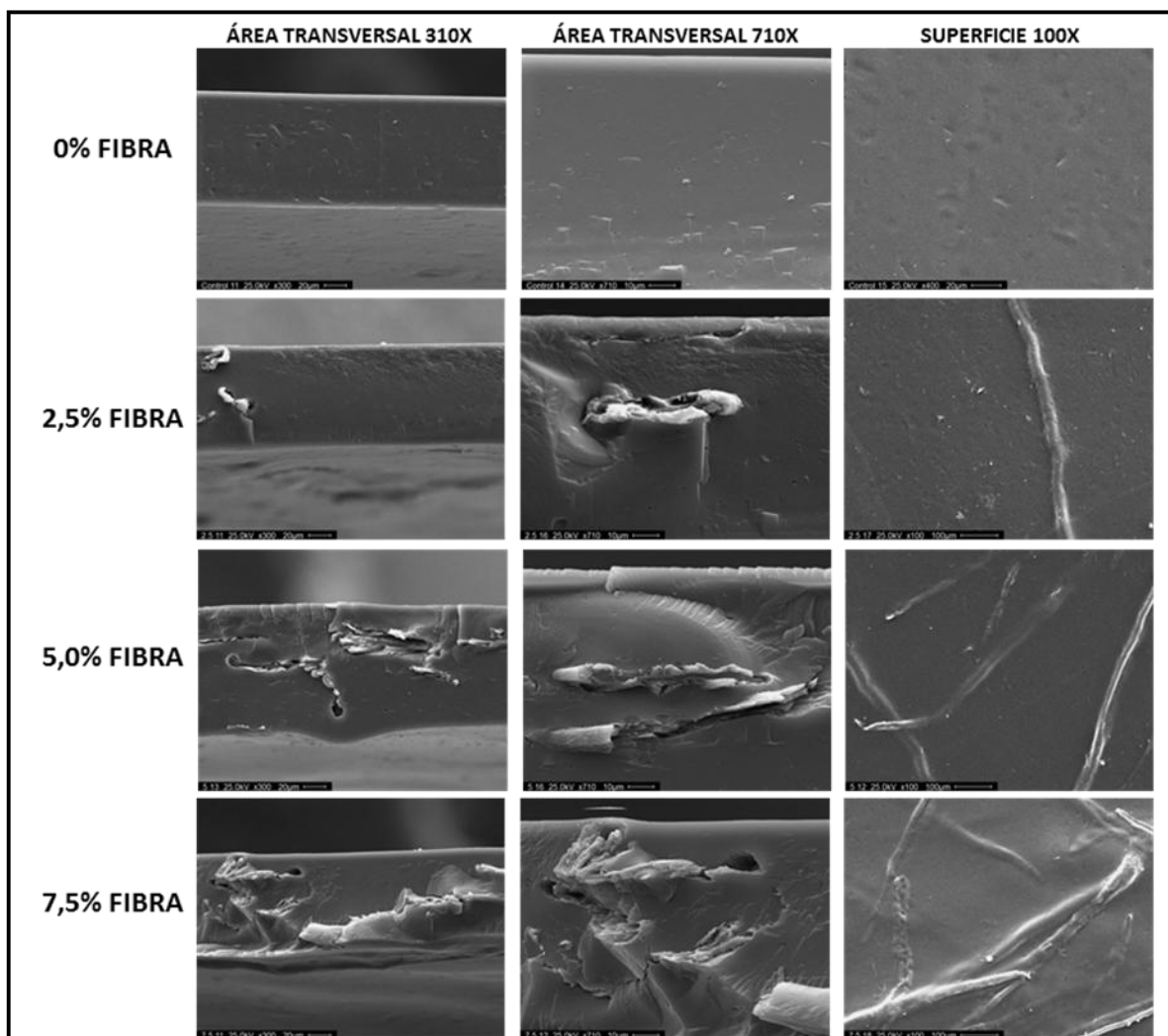


Figura 5.15. Microfotografías SEM del área transversal y de la superficie de películas proteicas de soja con agregado de 0, 2,5, 5,0 y 7,5 g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI obtenidas por *tape casting*.

Las interacciones proteína-fibra probablemente hayan exigido un reacomodamiento en la conformación de las proteínas que provocó diferencias en el entrecruzamiento de la matriz continua (interacciones proteína-proteína), provocando en parte el aumento del espesor de las películas, así como disminuciones en la temperatura de transición vítrea. En la **Tabla 5.11** se presentan los valores de Tg, observándose que disminuye con el agregado de fibras pero independientemente de las cantidades agregadas. Pero cabe señalar que si bien esta modificación provocó cambios en la movilidad de las cadenas peptídicas, no provocó aparentemente cambios en su naturaleza hidrofílica y en la solubilidad de las mismas.

Tabla 5.11. Temperaturas de transición vítrea calculadas por DSC para las películas proteicas de soja con 0, 2,5, 5,0, y 7,5 g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI.

Muestra	Tg (°C)
C60	-16,5 ± 0,7 a
2,5F	-19,4 ± 0,1 b
5,0F	-18,4 ± 0,4 b
7,5F	-18,5 ± 0,5 b

Letras distintas dentro de la columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5.4.3.2.5. Resistencia del termosellado de las películas compuestas proteína-fibra

Por último se evaluó la resistencia del sellado térmico de las películas. En la **Tabla 5.12** se presentan los valores que describen la resistencia del sellado térmico a la tracción. Al aumentar la concentración de fibra en la formulación, disminuyó progresivamente la resistencia del sellado, encontrándose durante el ensayo para todas las formulaciones falla de tipo adhesiva. Es evidente que la presencia de las fibras interfiere en la adhesión de las películas al calentarse y presionarse.

Tabla 5.12. Resistencia del termosellado de las películas proteicas de soja con 0, 2,5, 5,0, y 7,5 g de fibras celulósicas cada 100 g de SPI.

Muestra	Resistencia del termosellado (N)
C60	1,228 ± 0,162 a
2,5F	0,529 ± 0,112 b
5,0F	0,341 ± 0,130 bc
7,5F	0,225 ± 0,097 c

Letras distintas dentro de la columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

En síntesis los resultados muestran que es posible obtener materiales compuestos de matriz proteica de soja reforzados con fibras celulósicas tratadas fácilmente a partir de papel, por tape casting. El refuerzo se observó en el aumento de su resistencia a la tracción y punción, en detrimento de su elongación, pero sin modificar la susceptibilidad a la humedad de las películas. Las propiedades pueden atribuirse a la buena impregnación de las fibras en la matriz proteica, lo que además provocó un aumento en la opacidad de las películas. Los resultados obtenidos inducen

a continuar con este trabajo, pero empleando fibras naturales de mejor módulo mecánico, suponiendo esta una vía de alcanzar aún mejores propiedades mecánicas.

5.4.4. Películas compuestas en base a proteínas de soja y ceras de abeja y carnauba obtenidas por *tape casting*

En esta parte del trabajo se evaluó la obtención de películas compuestas preparadas por *tape casting* a partir de dispersiones proteicas de soja y glicerol emulsionadas con cantidades variables de cera de abeja y carnauba, 5,0; 7,5; y 10,0 g de cera/ 100 g de SPI (5,0AB; 7,5AB; 10,0AB al usar cera de abeja y 5,0Ca; 7,5Ca; y 10,0Ca al usar cera de carnauba). Teniendo en cuenta que las proteínas pueden haberse afectado por el tratamiento térmico usado para emulsificar las ceras, se agregó un control proteico tratado de igual manera que para formar las emulsiones pero sin ceras (OC) al control no sometido al proceso de emulsificación. Es importante mencionar que fue necesario hacer rápidamente el paso entre la obtención de la dispersión-emulsión filmogénica y la aplicación de la misma en la plataforma del equipo *tape casting*, ya que durante este tiempo y debido al descenso de la temperatura de las emulsiones, las ceras comenzaban a solidificar. Todas las películas se procesaron por *tape casting* secando a 60 °C por conducción.

5.4.4.1. Apariencia de las películas emulsionadas proteína-ceras

Fue posible obtener películas homogéneas para todas las formulaciones evaluadas. Ninguna presentó aspecto oleoso al tacto lo que estaría indicando una correcta incorporación de las ceras en las matrices proteicas, debido a la capacidad emulsificante de las proteínas de soja (Ventureira, 2010). En la Figura 5.16 se muestran las fotografías de las mismas.

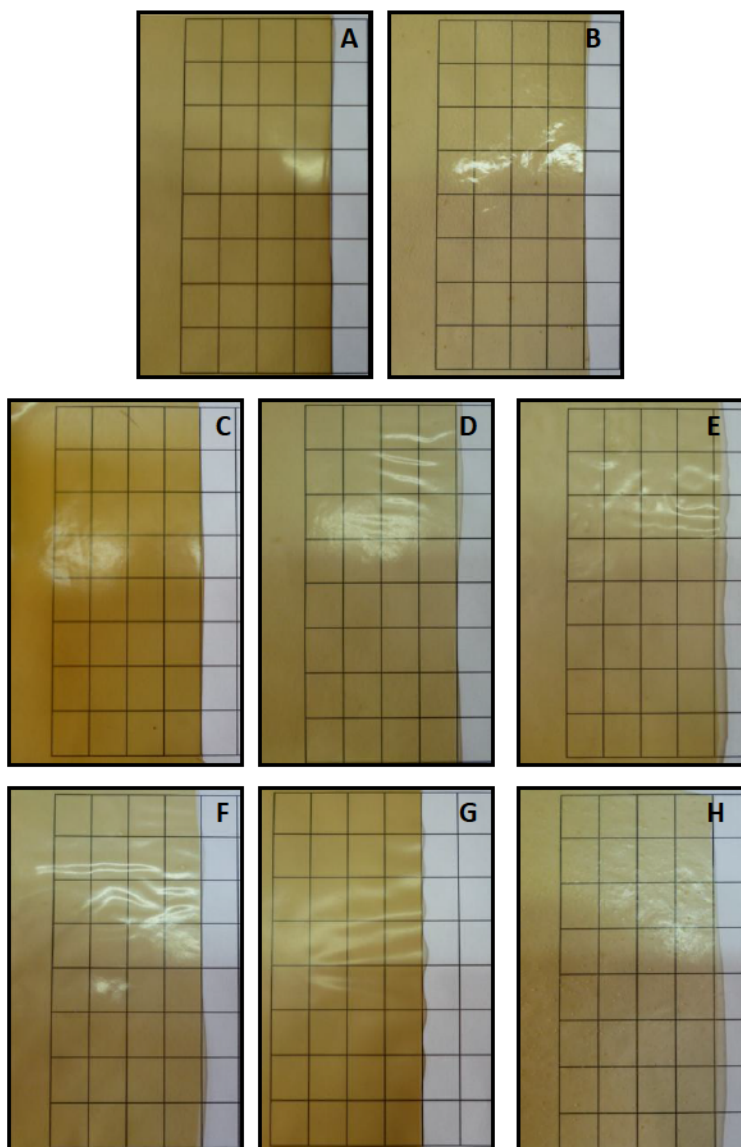


Figura 5.16. Apariencia de las películas proteicas de soja: control sin cera formulado sin calentamiento **(A)**; control sin cera formulado con calentamiento a 80 °C **(B)**; películas emulsionadas con 5,0, 7,5 y 10,0 g de cera de abeja cada 100 g de SPI respectivamente **(C, D, E)**; películas emulsionadas con 5,0, 7,5 y 10,0 g de cera de carnauba cada 100 g de SPI respectivamente **(F, G, H)**.

En la **Figura 5.17** se presenta el espesor de las películas compuestas en base a proteína de soja y ceras de abeja y carnauba, con sus dos controles (C60 y 0C) obtenidas por *tape casting*. Sólo se observó un aumento significativo en el espesor para las películas con mayores contenidos de cera (10,0 g de cera de abeja y 7,5 y 10,0 g de cera de carnauba cada 100 g de SPI), seguramente debido al mayor contenido de sólidos en la formulación y a la menor compactación en esos sistemas. Los valores medios de espesor de las películas compuestas formuladas estuvieron entre 100 y 144 μm .

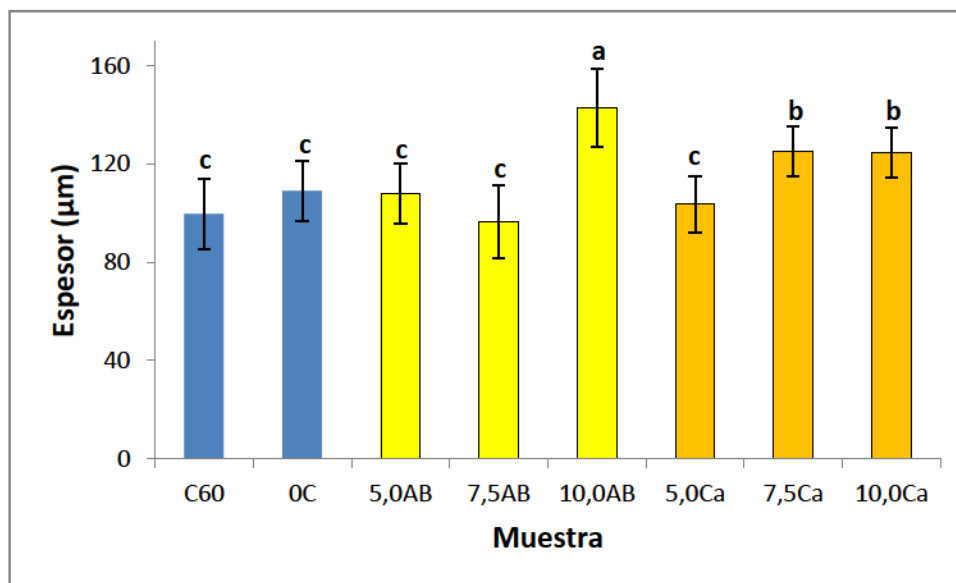


Figura 5.17. Espesor de las películas proteicas de soja sin cera (●) y con ceras de abeja, AB (●), y carnauba, Ca (●) emulsionadas. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Como se observa en la **Figura 5.16**, las películas proteicas de soja emulsionadas con ceras de abeja y carnauba presentaron apariencia amarillenta propia de este tipo de materiales en base a proteína de soja y también a la presencia de las ceras que tenían esta tonalidad antes de ser utilizadas, como se muestra en la **Figura 5.18**.



Figura 5.18. Apariencia de las ceras de abeja (A) y carnauba (B) sólidas empleadas en este trabajo.

Los parámetros de color fueron medidos y los resultados se resumen en la **Tabla 5.13**. El calentamiento y agitación de las dispersiones sin ceras (OC), generó películas con una variación de color menos intensa (menor ΔE) que podría atribuirse a su menor tonalidad amarillenta (menor b^*) que la película control (C60). Posiblemente el proceso de homogeneización realizado para lograr la emulsificación que implica un tratamiento térmico, podría mejorar la dispersión de los aislados proteicos, favoreciendo procesos de agregación-disociación que conduzca a cierta modificación del entrecruzamiento. El agregado de ceras a la formulación no varió en gran medida la coloración propia de las películas proteicas, exceptuando los valores encontrados para la

película que contenía 5 g de cera de abeja/ 100 g de SPI. No se observaron diferencias en el valor de L*, y solo pequeños aumentos en el valor de a* y algunas variaciones de b*, que se tradujeron en aumentos en las variaciones del ΔE y una cierta tonalidad más anaranjada. Monedero y col. (2009) estudiaron el efecto del agregado de ceras de abeja y ácido oleico a películas compuestas en base a proteína de soja empleando glicerol como plastificante. En este trabajo los autores informaron que el agregado de cera de abeja incrementó los valores de L* de las películas, asignando dicho cambio a la suavización del color propio de la matriz de proteína, dado que los autores sostuvieron que la cera no aportaba coloración. Es de señalar que esto depende de la pureza de la cera utilizada, así como también del proceso de obtención de las emulsiones y las películas.

Tabla 5.13. Parámetros de color L*, a*, b* y ΔE de las películas proteicas de soja control (C60 y 0C) y con agregado de 5,0, 7,5 y 10,0 g ceras de abeja y carnauba cada 100 g de SPI emulsionadas obtenidas por *tape casting*.

Muestra	Parámetros de color			
	L*	a*	b*	ΔE
C60	86,1 ± 2,0 bcd	-2,2 ± 0,5 de	28,1 ± 2,6 bc	28,8 ± 3,1 bc
0C	87,8 ± 0,9 ab	-2,3 ± 0,2 e	24,5 ± 1,2 de	24,8 ± 1,4 d
5,0AB	78,6 ± 0,8 e	0,5 ± 0,2 a	38,3 ± 1,3 a	41,1 ± 1,3 a
7,5AB	86,6 ± 1,5 bc	-1,8 ± 0,2 cd	26,3 ± 2,6 cd	26,9 ± 3,0 cd
10,0AB	89,6 ± 1,0 a	-2,1 ± 0,1 cde	21,5 ± 1,7 e	21,4 ± 2,0 e
5,0Ca	85,7 ± 1,0 cd	-1,9 ± 0,2 cd	27,8 ± 2,1 c	28,6 ± 2,3 bc
7,5Ca	84,5 ± 0,4 d	-1,4 ± 0,1 b	30,8 ± 0,6 b	31,8 ± 0,7 b
10,0Ca	86,0 ± 1,0 bcd	-1,8 ± 0,2 bc	28,4 ± 1,8 bc	29,0 ± 2,0 bc

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de α = 0,05.

En la **Figura 5.19** se presenta la opacidad de las películas proteicas de soja emulsionadas con ceras de abeja y carnauba. El tratamiento de la dispersión de proteína y glicerol a pH 10,5 a 80 °C y Ultraturrax (0C), resultó en una película con una opacidad menor que la del control agitada magnéticamente sin calentamiento y secadas a 60 °C (C60). Es evidente que la agitación por

Ultraturrax facilitó la dispersión proteica y favoreció en la formación de películas con menor opacidad. Al agregar las ceras emulsionadas, los valores de opacidad de las películas obtenidas aumentaron significativamente para todos los contenidos de cera de abeja y de carnauba. Similares resultados obtuvieron Monedero y col. (2009) para películas proteicas de soja cuando emplearon cera de abeja y ácido oleico como fases hidrofóbicas. La presencia de glóbulos de cera con un índice de refracción distinto al de la fase continua estaría aumentando la dispersión de la luz y disminuyendo así la transmitancia de la película (Yang y Paulson, 2000; Prodpan y col., 2007).

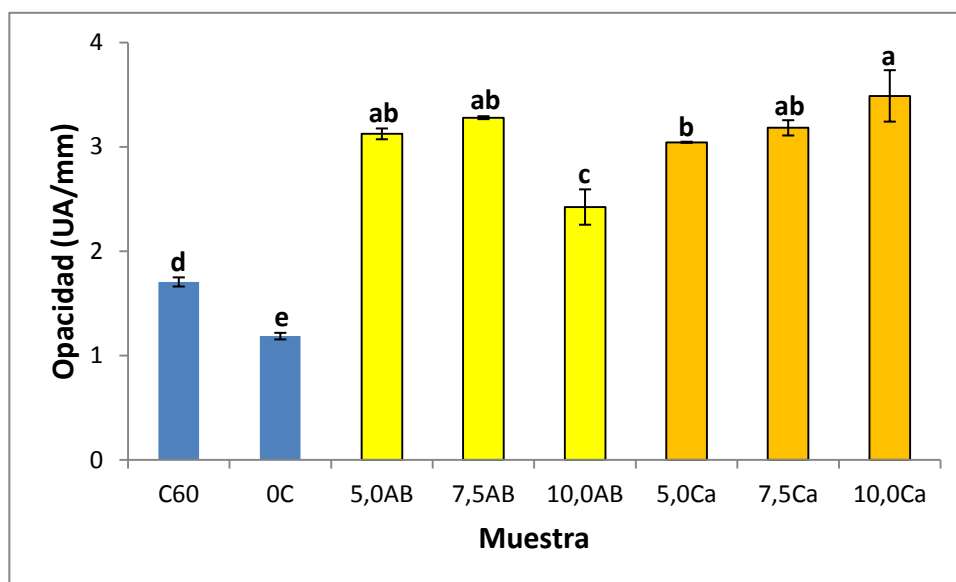


Figura 5.19. Opacidad de las películas proteicas sin cera (●) y con ceras de abeja, AB (●), y carnauba, Ca (●) emulsionadas. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La densidad de las películas proteicas y emulsionadas con ceras de abeja y carnauba se presenta en la **Figura 5.20**. La película proteica sometida al tratamiento a 80 °C presentó una densidad menor al control C60, lo que nuevamente evidencia una reestructuración de las proteínas en la matriz diferente y menos compacta. En la mayoría de los casos la densidad de las películas compuestas no presentó diferencias significativas respecto de las de las películas OC, lo que debe atribuirse a las composiciones y densidades relativas de las fases oleosas y proteicas en cada formulación.

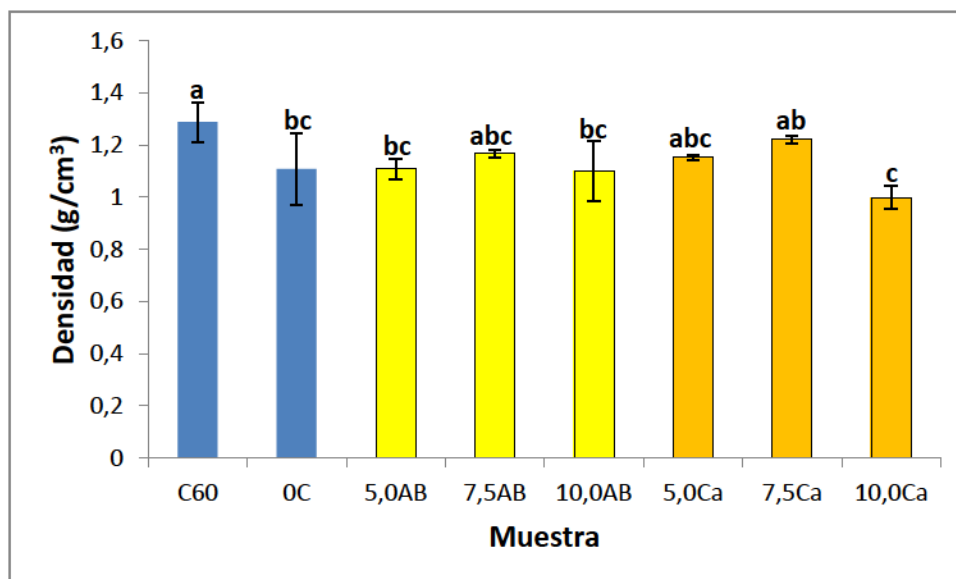


Figura 5.20. Densidad de las películas proteicas de soja sin cera (●) y con ceras de abeja, AB (●), y carnauba, Ca (●) emulsionadas. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5.4.4.2. Susceptibilidad al agua de las películas emulsionadas proteína-cera

La Tabla 5.14 presenta los valores de contenido de agua y solubilidad de las películas proteicas de soja emulsionadas con ceras de abeja y carnauba. A pesar de las diferencias en la composición, todas las películas presentaron similares contenidos de agua. Esto sugiere en presencia de la cera las proteínas se reacomodan exponiendo o interactuando con la cera a través de sus residuos hidrofóbicos. Este reacomodamiento, evidentemente lleva también a retener mayor contenido de agua.

Las películas proteicas tratadas con el tratamiento requerido para emulsificar la cera (OC) mostraron mayor solubilidad que el control sin tratamiento (C60). Es evidente que estas últimas, que presentaron mayor opacidad y densidad, presentan un mayor entrecruzamiento que provoca una disminución en su solubilidad. Por otra parte, las películas compuestas presentaron solubilidades similares que las del control OC, evidenciando que la presencia de las ceras no favorece la retención de las proteínas en la matriz. Igualmente cabe señalar que todas las películas presentaron valores de solubilidad bastante inferiores a los publicados para muchas películas proteicas, y que mantuvieron su integridad durante el ensayo.

Tabla 5.14. Contenido de agua y solubilidad de películas proteicas control (C60 y 0C) y con agregado de 5,0, 7,5 y 10,0 g de ceras de abeja y carnauba cada 100 g de SPI emulsionadas obtenidas por *tape casting*.

Muestra	Contenido de agua (%)	Solubilidad (%)
C60	11,82 ± 0,24 a	31,23 ± 1,28 c
0C	12,59 ± 0,49 a	37,78 ± 1,43 ab
5,0AB	12,06 ± 0,18 a	35,93 ± 0,57 ab
7,5AB	11,97 ± 0,49 a	39,44 ± 1,51 ab
10,0AB	12,33 ± 0,35 a	34,69 ± 0,78 b
5,0Ca	12,00 ± 0,21 a	40,77 ± 1,82 a
7,5Ca	12,46 ± 0,33 a	35,92 ± 2,16 ab
10,0Ca	11,76 ± 0,16 a	36,47 ± 0,80 ab

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La **Figura 5.21** muestra la permeabilidad al vapor de agua de las películas estudiadas. Solo la película con 7,5 g de cera de abeja/ 100 g de SPI presentó una permeabilidad significativamente menor que las de las películas control, más allá de que en otros niveles de ceras de abeja y carnauba evaluados se muestran las tendencias pero no llegan a ser estadísticamente diferentes.

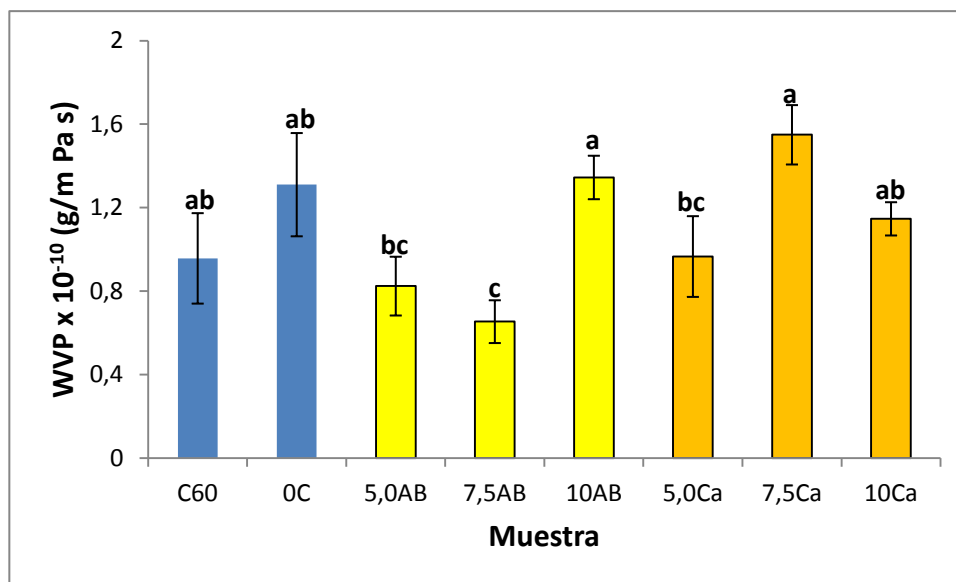


Figura 5.21. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas proteicas de soja sin cera (●) y con ceras de abeja, AB (●), y carnauba, Ca (●) emulsionadas. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Otros autores han reportado mejoras en la WVP de películas proteicas de soja y de suero con el agregado de mayores concentraciones de cera o con el agregado adicional de ácido oleico como Monedero y col. (2009) y Soazo y col. (2011). En general las mejoras en las propiedades de barrera al vapor de agua con el agregado de lípidos son alcanzadas más fácilmente cuando estos se incorporan como capas sobre las películas proteicas (Pérez-Gago y Rhim, 2014). En este sentido se realizaron algunos ensayos preliminares intentando procesar películas proteicas bicapa soja-ceras (de abeja y carnauba) por *tape casting*. Para esto, se intentó aplicar las ceras sobre películas C60 previamente formadas y sin desmoldar del equipo de *tape casting*. Las ceras de abeja y carnauba se fundieron en baño de agua caliente a 80 °C, y se aplicaron sobre la película proteica de soja seca manteniendo la superficie del equipo a 80 °C durante la aplicación. En la **Figura 5.22** se visualiza la apariencia de una bicapa de cera de abeja sobre una película proteica de soja en el equipo de *tape casting*. Fue muy dificultoso trabajar con las ceras de abeja y carnauba en estas condiciones dada su rápida solidificación, lo que provocaba heterogeneidad en el material. Otra dificultad fue la adherencia de la capa de cera sobre la película proteica. Si bien estos resultados no fueron satisfactorios, entendemos que vale la pena seguir buscando las condiciones de procesamiento adecuadas para obtener películas bicapa por *tape casting*.

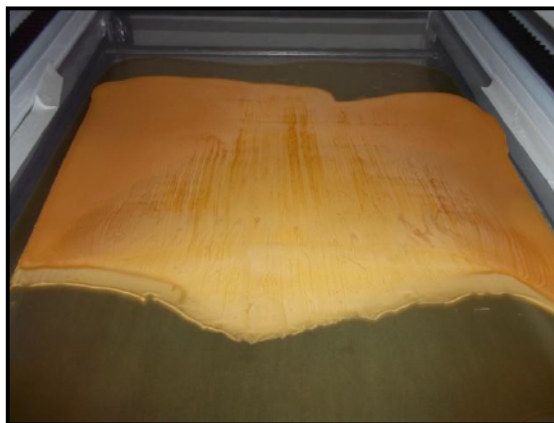


Figura 5.22. Apariencia de película bicapa en base a proteínas de soja y cera de abeja procesada por *tape casting*.

En este sentido, alternativas como la aplicación de las ceras a partir de dispersiones de las mismas en solventes no polares permitirán una mejor manipulación de las ceras, pero la evaporación de solventes orgánicos resulta problemático al pensar en un escalado del proceso. Estas consideraciones se proponen como inquietud para poder seguir avanzando en el área de materiales en base a proteína-lípidos, teniendo siempre en cuenta que las mejoras en la WVP dependen radicalmente del tipo de lípido empleado (ceras, ácidos grasos, aceites esenciales y sus mezclas) y de las interacciones de estos con la matriz biopolimérica.

5.4.4.3. Propiedades mecánicas de las películas emulsionadas proteína-cera

Las propiedades mecánicas medidas en tracción de las películas proteicas de soja emulsionadas con ceras de abeja y carnauba son presentadas en la *Tabla 5.15*. El proceso de homogeneización y calentamiento a 80 °C no modificó significativamente la resistencia a la rotura ni el módulo de Young de los materiales, pero sí provocó una disminución en su elongación a pesar que estas películas habían mostrado una menor densidad y mayor solubilidad al agua que sugerían un menor entrecruzamiento. El efecto del agregado de ceras sobre las propiedades mecánicas no dio ninguna tendencia definida. La muestra con 7,5 g de cera de abeja/ 100 g de SPI que había sido efectiva para disminuir la permeabilidad al vapor de agua, no presentó diferencia en ninguna propiedad mecánica evaluada respecto a la película control (0C). Con el agregado de la cera de carnauba se observaron similares resistencias mecánicas aunque acompañadas de menores valores de módulo y elongaciones variables. Estos resultados podrían estar evidenciando la presencia de heterogeneidades, posiblemente en la interfase cera-proteína que estarían

empobreciendo las propiedades mecánicas de los materiales. Por otra parte, la presencia de las gotas de cera podría estar interfiriendo en la formación de la matriz proteica en detrimento de su comportamiento mecánico. El agregado de algún compuesto anfílico en las formulaciones filmogénicas en base a proteína, glicerol y ceras podría llegar a actuar como compatibilizante en la interfase mejorando las propiedades mecánicas de las películas resultantes. En ese sentido Monedero y col. (2009) además de adicionarle cera de abeja a las formulaciones proteicas de soja adicionaron también ácido oleico, y pudieron demostrar que mientras la cera de abeja promovió la fragilidad de la película, el ácido oleico plastificaba las matrices aumentando su flexibilidad.

Tabla 5.15. Propiedades mecánicas medidas en tracción de las películas proteicas de soja control (C60 y 0C) y con agregado de 5,0, 7,5 y 10,0 g de ceras de abeja y carnauba cada 100 g de SPI emulsionadas obtenidas por *tape casting*: tensión a la ruptura (σ_r), módulo de Young (E), elongación (ϵ_r).

Muestra	σ_r (MPa)	E (MPa)	ϵ_r (%)
C60	7,53 ± 0,56 bc	4,25 ± 0,38 ab	47,64 ± 9,8 a
0C	8,67 ± 1,46 ab	4,73 ± 0,56 a	16,18 ± 3,6 c
5,0AB	5,96 ± 1,00 c	2,83 ± 0,38 d	47,95 ± 9,9 a
7,5AB	9,50 ± 1,46 a	4,58 ± 0,37 a	23,25 ± 6,7 bc
10AB	7,78 ± 1,13 b	3,68 ± 0,28 c	29,04 ± 7,9 b
5,0Ca	8,46 ± 1,66 ab	3,98 ± 0,66 bc	29,06 ± 7,9 b
7,5Ca	6,74 ± 1,09 c	3,04 ± 0,30 d	44,15 ± 5,9 a
10Ca	9,06 ± 1,21 ab	4,34 ± 0,33 ab	7,11 ± 1,33 d

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5.4.4.4. Morfología de las películas emulsionadas proteína-cera

En la Figura 5.23 se presentan las microestructuras de las películas emulsionadas con 5,0; 7,5, y 10,0% de cera de abeja y carnauba. Puede observarse una distribución homogénea de las ceras en la matriz de proteína evidenciando que el tratamiento de emulsificación empleado sería efectivo en lograr dispersar la cera homogéneamente en la matriz proteica, y que la cera permanece emulsificada luego de su procesamiento por *tape casting*. También se observa en

todos los casos que los glóbulos de cera son pequeños, y si bien se organizan homogéneamente, la fase continua (proteína), parecería estar ocupando gran área relativa, lo que podría explicar que no se haya modificado en gran medida las propiedades estudiadas.

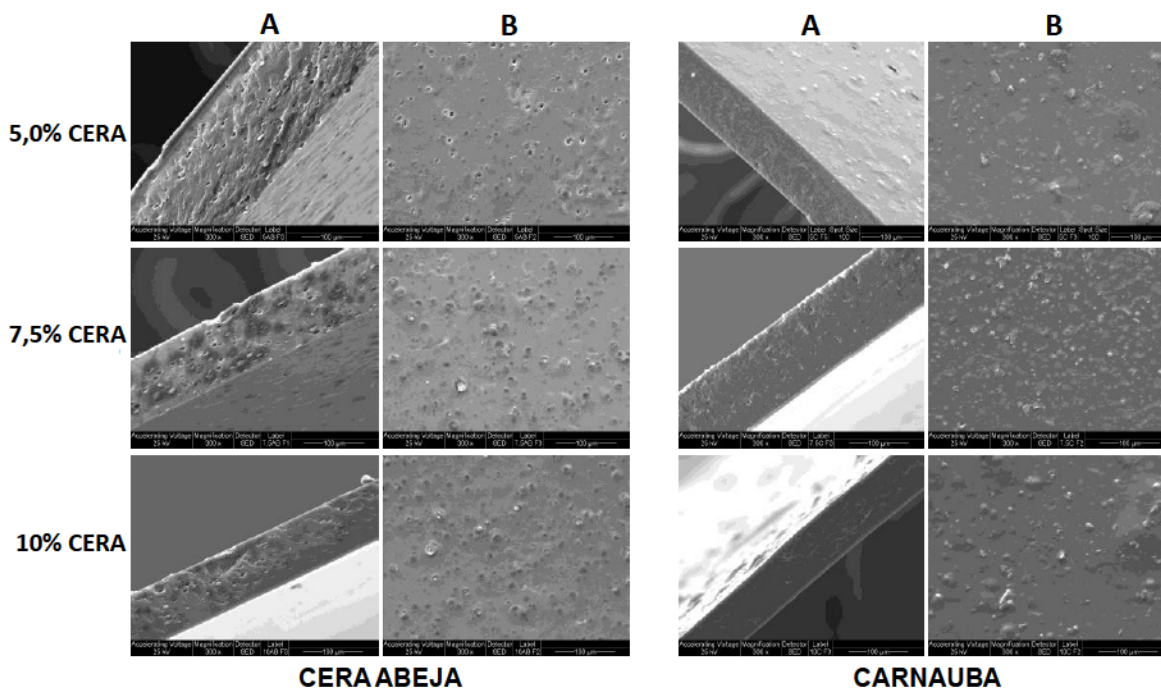


Figura 5.23. Microfotografías electrónicas de barrido (SEM) de películas proteicas de soja emulsionadas con ceras, vista de área transversal (A) y de superficie (B) a 300X.

En la Tabla 5.16 se muestran las temperaturas de transición vítrea de los materiales estudiados. Independientemente de la concentración y el tipo de cera utilizado, todas las películas sometidas al tratamiento de homogeneización y calentamiento, incluso las proteicas sin cera, presentaron similares T_g , e inferiores a las de las películas control C60. La mayor T_g en las películas C60 contribuye a pensar que las mismas presentaron un mayor entrecruzamiento, responsable de la mayor opacidad, menor solubilidad, y mayor elongación de las películas, a igual contenido de plastificantes (agua y glicerol). Por otra parte, el hecho que el agregado de cera no modifique el valor de T_g , implica que el arreglo de la matriz continua en las películas emulsionadas es similar a la proteica y explica también el hecho que no se hayan observado diferencias muy marcadas en la funcionalidad de las mismas (en el contenido de agua, solubilidad, WVP y propiedades mecánicas). Estos resultados parecen indicar que no existe una gran interacción en la interface, con lo que se podría sugerir para futuros estudios el agregado de sustancias anfífilas que favorezcan la compatibilización del sistema proteína-cera.

Tabla 5.16. Temperaturas de transición vítrea calculadas por DSC para las películas proteicas de soja control (C60 y 0C) y con agregado de 5,0, 7,5 y 10,0 g de ceras de abeja y carnauba cada 100 g de SPI emulsionadas obtenidas por *tape casting*.

Muestra	Tg (°C) medida por DSC
C60	-16,5 ± 0,7 a
0C	-18,6 ± 1,2 ab
5,0AB	-18,8 ± 0,7 ab
7,5AB	-18,6 ± 0,5 ab
10,0AB	-19,4 ± 0,2 b
5,0Ca	-19,6 ± 0,6 b
7,5Ca	-19,2 ± 0,1 b
10,0Ca	-18,5 ± 0,3 ab

Letras distintas dentro de una columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5.5. Conclusiones

Fue posible procesar películas proteicas de soja y compuestas en base a proteína-fibras celulósicas y proteína-lípidos por *tape casting*, lo que resulta muy interesante para el escalado de estos materiales al menos a escala piloto. El equipo utilizado exigió trabajar con concentraciones de proteínas superiores a las habitualmente usadas por *casting*. Al analizar las técnicas de secado se observó que las películas secadas por conducción presentaron una mejor funcionalidad que las secada por radiación, y que al aumentar la temperatura de secado (de 40 a 60°C), además de disminuir los tiempos de procesamiento, se lograron mejorar las propiedades mecánicas y la resistencia del termosellado de las películas sin afectar significativamente su apariencia y susceptibilidad al agua.

Por otra parte, el agregado de fibras celulósicas obtenidas de manera sencilla a partir de papel *Kraft*, permitió mejorar la resistencia mecánica de las películas, sin modificar su susceptibilidad al agua debido a la buena dispersión y adhesión de las fibras con la matriz proteica.

Por último, fue posible obtener películas emulsionadas en base a proteínas de soja y ceras de abeja y carnauba, y posiblemente también se pueda obtener películas bicapa a partir de los mismos componentes, por *tape casting*. Las películas emulsionadas fueron homogéneas y lograron

mantener los lípidos emulsionados y homogéneamente distribuidos en la matriz proteica, evitando otorgarle a la película una apariencia oleosa al tacto. Si bien las cantidades de cera agregadas no permitieron observar grandes cambios en las propiedades, las películas que contenían 7,5% de cera de abeja llegaron a disminuir significativamente la WVP de las películas proteicas, sin modificar sus propiedades mecánicas.

6. Películas proteicas de soja liberadoras de principios activos durante el almacenamiento envasado de alimentos vegetales

6.1. Introducción

A menudo se ha sugerido en la literatura que las películas proteicas podrían ser de utilidad para el envasado de vegetales enteros y mínimamente procesados (Baldwin y Baker, 2002) y contribuir a reducir las pérdidas poscosecha que resultan muy elevadas (se estima que ascienden a 25-50% del volumen total de la producción) (Kader, 2003 y 2005; Salunkhe y Desai, 1984). *A priori* esta estrategia resulta interesante por los beneficios medioambientales que podrían resultar de reducir el uso de polímeros no biodegradables. De todos modos la difusión de estos materiales a nivel comercial es aún muy limitada, lo cual probablemente responda a diversos factores. Uno de ellos es la necesidad compatibilizar a los biopolímeros con las condiciones de almacenamiento y distribución de los productos a envasar que en el caso de los vegetales constituye un desafío (Park, 1999). Así por ejemplo las condiciones óptimas de almacenamiento de vegetales frescos que por lo común se ubican entre 0 y 10 °C y 85-95% de HR (Kader, 2002) pueden favorecer la absorción de agua, reducir la resistencia mecánica e incrementar la permeabilidad a los gases de las películas proteicas. Si bien la elevada capacidad de las matrices proteicas de absorber agua en ambientes húmedos es desventajosa para muchas aplicaciones como envase, en ciertos casos podría resultar útil para facilitar la difusión de principios activos (Del Toro-Sánchez y col., 2010; Montero-Prado y col., 2011) incorporados a películas colocadas en productos envasados y de este modo poder realizar tratamientos de poscosecha *in situ*.

Dos problemáticas importantes responsables de un alto volumen de pérdidas en vegetales frescos y trozados son: *i)* la sobre-maduración inducida en frutos climatéricos por el etileno, y *ii)* el pardeamiento enzimático.

i) Sobre-maduración inducida en frutos climatéricos por el etileno: el etileno es una hormona vegetal involucrada en el control de la maduración en frutos climatéricos (Kader, 2002). Si bien en caso que se requiera acelerar la maduración, se realizan aplicaciones de etileno en cámaras, en muchas ocasiones en poscosecha resulta de interés minimizar sus efectos para extender la vida de los productos. Existen oxidantes de etileno disponibles comercialmente que contienen

permanganato de potasio (KMnO_4), pero su eficacia en condiciones de alta humedad relativa es limitada (Terry y col., 2007). Recientemente se ha desarrollado una tecnología basada en el uso de 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Reid y Staby, 2008), un cicloalqueno con fórmula molecular C_4H_6 gaseoso en condiciones normales de presión y temperatura. El 1-MCP es un inhibidor de la acción del etileno que se une a los receptores de esta hormona (Blankenship y Dole, 2003). Las formulaciones comerciales de 1-MCP constan de una matriz de α -ciclodextrina que retiene el 1-MCP y se libera cuando esa formulación comercial es hidratada (Watkins, 2006). Los tratamientos con 1-MCP se realizan normalmente en cámaras frigoríficas cerradas, en las que se mantiene la fruta de 12 a 24 h (Blankenship y Dole, 2003). Existen pocos estudios que hayan evaluado otros métodos de aplicación de 1-MCP. Manganaris y col. (2007) encontraron que si se sumergen ciruelas con una formulación líquida de 1-MCP antes del embalaje es posible retrasar la maduración de los frutos. Lee y col. (2006) evaluaron diferentes adsorbentes como sistemas de liberación de 1-MCP en bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE), acetato de polivinilo (PVA) y celulosa.

ii) *Pardeamiento enzimático*: el pardeamiento enzimático es un gran problema en la industria fruti-hortícola. Si bien puede ocurrir por acción tanto de polifenoloxidasas (PPO) como de peroxidadas (POD) (en presencia de O_2 y H_2O_2 como aceptores de electrones respectivamente), la reacción catalizada por la primera enzima es mucho más frecuente. La PPO posee una estructura tetramérica con cuatro átomos de cobre (Cu^{+2}) por molécula, y posee sitios de unión para compuestos aromáticos y oxígeno (Cheftel, 1998). Las reacciones de pardeamiento por PPO se resumen en la Figura 6.1.

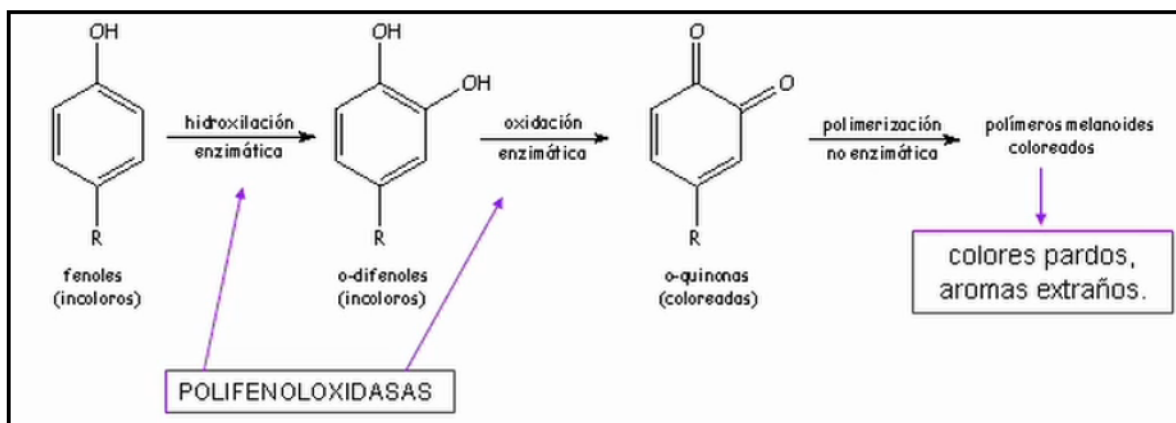


Figura 6.1. Reacciones de pardeamiento enzimático (Cheftel, 1998).

La acción de la PPO comienza con la *o*-hidroxilación de monofenoles (fenoles en los cuales el anillo bencénico contiene un único sustituyente hidroxilo) para convertirlos en *o*-difenoles (fenoles con dos sustituyentes hidroxilo). La misma enzima puede, posteriormente, catalizar la oxidación de los *o*-difenoles para formar *o*-quinonas. La rápida polimerización de las *o*-quinonas produce melaninas, de color amarronado (López Gálves y col., 1996). Se ha demostrado que el nivel de compuestos fenólicos correlaciona con el oscurecimiento en algunos productos (Prohens y col., 2007). De todos modos el grado de pardeamiento está determinado por otros factores como el grado de compartimentalización celular, la presión parcial de oxígeno dentro de los tejidos y la presencia de compuestos antioxidantes (ya sea naturales o adicionados) (Massolo y col., 2011).

Las reacciones de pardeamiento enzimático pueden inhibirse o reducirse: *i*) minimizando el contacto enzima-sustrato (reduciendo el daño mecánico), *ii*) optimizando la refrigeración (disminuye la acción de la PPO), *iii*) reduciendo el pH (disminuye así la actividad de la PPO), *iv*) desnaturalizando a la enzima (por tratamientos térmicos), *v*) empleando secuestrantes (con capacidad de formar complejos con el Cu^{+2} del sitio activo de la PPO, afectando su actividad), o *vi*) empleando agentes reductores que inhiban la reacción de óxido-reducción. Dentro de esta última estrategia el uso de ácido cítrico, ácido ascórbico y eritórbito es común en la industria alimentaria (Salunkhe y Desai, 1984). Algunos compuestos azufrados como el bisulfito de sodio (NaHSO_3), bisulfito de potasio (KHSO_3), metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), metabisulfito de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y sulfito de sodio (Na_2SO_3), se han empleado como antioxidantes. Los mismos pueden actuar tanto en solución como en fase gaseosa si las condiciones son apropiadas para la generación de SO_2 . Estos compuestos actúan en la reducción del pardeamiento enzimático tanto revirtiendo la reacción de formación de quinonas, como inactivando a la enzima (PPO) al actuar sobre el centro activo de la misma (reduciendo el Cu^{+2} a Cu^+). Un aspecto ventajoso de los antioxidantes azufrados es que poseen mayor poder residual que los ácidos cítrico y ascórbico. De todos modos su uso está siendo revisado en los últimos años debido a que se han reportado algunos síntomas de alergias en un porcentaje pequeño de la población (Grotheer y col., 2014). A pesar de esto los sulfitos se encuentran aprobados por la legislación en la Argentina (CAA, 1969) y por otros países para varios usos. Se emplean como aditivos conservantes y antioxidantes en la industria de alimentos en concentraciones de 30-200 ppm aunque en algunos frutos secos se pueden alcanzar niveles más elevados. En la actualidad es empleado comúnmente en la industria vitivinícola, de dulces, de vegetales deshidratados, enlatados, y congelados. En vegetales mínimamente procesados se

permite su utilización en papa trozada. También se encuentra difundido su uso en la conservación de uva de mesa y arándano (Golan-Goldhirsh y Whitaker, 1984). Pretel y col. (2006) lograron aumentar la capacidad de almacenamiento de uva de mesa refrigerada adicionando generadores de SO₂, sin afectar las características organolépticas de los frutos.

Con estos antecedentes en el presente capítulo se decidió explorar la posibilidad de emplear películas activas colocadas en envases de vegetales como liberadoras de principios activos de interés que permitan realizar tratamientos poscosecha durante la distribución. El racional fue aprovechar la capacidad de absorción de agua de estos materiales en condiciones normales de almacenamiento de frutos (90% HR) para facilitar la liberación de los activos en fase gaseosa. En tal sentido se evaluó el uso de películas proteicas de soja como:

1) *contenedores-liberadores (pads) de 1-metilciclopropeno (1-MCP) para extender la vida útil de frutos de tomate.*

La elección del tomate como fruto a estudiar se debe a que son muy sensibles al etileno. En este sentido, ciento cuarenta y cinco millones de toneladas de fruto de tomate se producen anualmente en todo el mundo (FAOSTAT, 2014). Aunque el almacenamiento a baja temperatura es la estrategia más común para controlar la maduración, los frutos de tomate son susceptibles al daño por frío y no deberían almacenarse por debajo de 7-10 °C. En consecuencia, existe un gran interés en encontrar estrategias complementarias tales como el control de etileno para modular la maduración de tomates.

2) *matrices liberadoras (generators) de dióxido de azufre (SO₂) para retrasar la aparición del pardeamiento enzimático de manzanas mínimamente procesadas.*

Se decidió evaluar la aplicación con manzanas trozadas, ya que el tejido de estos frutos expuesto al aire es rápidamente oxidado y pardeado, y al tratarse de un tejido claro, los cambios de color luego del éxito o fracaso del tratamiento antioxidante así como la aparición de hongos filamentosos durante el almacenamiento son más fáciles de visualizar.

6.2. Objetivos

- Desarrollar películas de proteína de soja contenedoras-liberadores (*pads*) de 1-metilciclopropeno (1-MCP) para extender la vida útil de frutos de tomate.
- Evaluar la influencia del agregado de sulfitos sobre las propiedades físicas y químicas de películas en base a proteínas de soja y analizar su potencialidad para ser empleadas como matrices liberadoras (*generators*) de dióxido de azufre (SO₂) para retrasar el pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Generación de contenedores-liberadores (*pads*) de 1-metilciclopropeno (1-MCP) para extender la vida útil de frutos de tomate

6.3.1.1. Materiales

Se utilizó como fuente de proteína un aislado proteico de soja comercial descrito en la sección 3.3.1. Como plastificante se utilizó glicerol (Anedra, p.a). El 1-metilciclopropeno (1-MCP) utilizado fue de la marca Smart-Fresh® (AgroFresh, PA, Estados Unidos), conteniendo 0,14% de 1-MCP en una matriz de ciclodextrina. Los frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Elpida), en estado verde maduro se obtuvieron del Mercado Regional de la Ciudad de La Plata.

6.3.1.2. Selección de la formulación para el liberador de 1-MCP

Se evaluó la capacidad de utilizar a las películas proteicas de soja como *pads* o contenedores de 1-MCP, para posteriormente liberarlo al hidratarse dentro de un sistema de envase conteniendo frutos. Para ello, primero se seleccionó una formulación de SPI y glicerol adecuada para este uso, en el que el material debe poseer la capacidad de hidratarse y liberar al principio activo en forma gaseosa.

i) *Obtención y caracterización de las películas proteicas de soja por casting*

En todos los casos las películas proteicas de soja se prepararon por *casting* a partir de dispersiones acuosas de aislado proteico y glicerol a diferentes pH. Las dispersiones se formaron mezclando 5 g de SPI y concentraciones variables de glicerol (20, 40 y 60 g/ 100 g de SPI) en un volumen final de 100 mL de agua destilada con agitación magnética durante 1 h a temperatura ambiente. El pH fue ajustado a 2, 7 o 10 con HCl o NaOH 2 N y las dispersiones se agitaron 30 min más. Posteriormente se generó vacío para eliminar burbujas y 10 mL de dispersiones filmogénicas se colocaron en cajas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron en estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60 °C durante 3 h. 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.

Se estudió el efecto del pH y el contenido de glicerol en las propiedades de las películas proteicas de soja con el fin de seleccionar la formulación más adecuada para generar un *pad* o contenedor capaz de liberar un principio activo gaseoso retenido en una matriz de ciclodextrina (Figura 6.2).

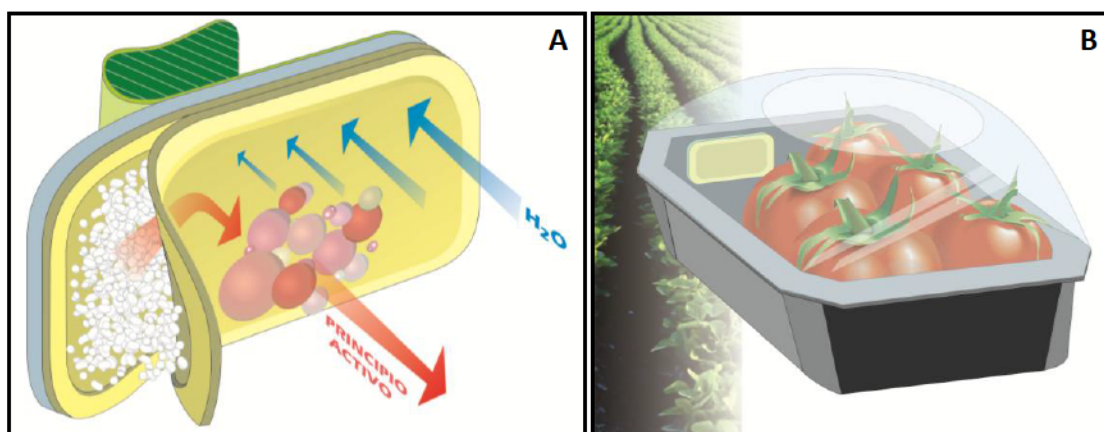


Figura 6.2. Esquema del *pad* o contenedor-liberador en base a proteína de soja con el principio activo retenido en una matriz de ciclodextrina (A). Esquema de sistema de envase que demuestra el modo de uso de los *pads* o contenedores-liberadores en base a proteína de soja para realizar el tratamiento de los frutos de tomate ya envasados (B).

A fin de evaluar las películas proteicas de soja en las condiciones de uso, las mismas se colocaron en bandejas de plástico (22,5 x 17,5 x 4,5 cm) conteniendo cuatro frutos de tomate en estado verde maduro (con un peso de aproximadamente 600 g) y se cubrieron con PVC (20 µm de espesor). Las bandejas se almacenaron a 10 °C y 85-90% de humedad relativa durante 36 h. Se

prepararon 5 bandejas para cada formulación evaluada. Se determinaron el espesor de la película, el contenido de agua, y las propiedades mecánicas como se describe en la sección 3.3.4.

ii) *Efecto de diferentes formulaciones de pads o contenedores-liberadores de 1-MCP sobre el color y la firmeza de frutos.*

Se cosecharon frutos de tomate (cv Elpida) en un estado verde maduro y se transportaron inmediatamente al laboratorio. Se descartaron los frutos con manchas, heridas u otros defectos. Se colocaron cuatro frutos (un peso aproximado de 150 g cada uno) en bandejas de plástico (22,5 × 17,5 × 4,5 cm). Para la preparación del *pad* o contenedor-liberador de 1-MCP, las películas proteicas de soja obtenidas con las diferentes formulaciones se acondicionaron durante 2 días a 58% de humedad relativa y se cortaron en cuadrados (2 × 2 cm). Un miligramo de Smart-Fresh® se pesó sobre una película y posteriormente fue cubierta con una segunda capa de película de proteína. Las dos capas de películas se termosellaron para generar contenedores de 4 cm² que contenían el 1-MCP (Figura 6.2 A). Para cada formulación se prepararon seis bandejas con un *pad* o contenedor-liberador y se recubrieron con PVC (Figura 6.2 B). Como control se prepararon bandejas de frutos sin *pad* o contenedor-liberador en base a proteína de soja, pero empacados y almacenados como se describió anteriormente.

Las bandejas se almacenaron a 10 °C (85-90% de HR) durante 36 h y posteriormente se abrieron y se mantuvieron a 20 °C durante 5 días. El color de la superficie y la firmeza de los frutos se evaluaron como se describe a continuación.

Color de los frutos almacenados: los valores de cromaticidad L*, a* y b*, se determinaron con un colorímetro Minolta, modelo CR-400 (Minolta, Osaka, Japón) y se calculó el ángulo de tono Hue ($\text{tg}^{-1} \text{ b}^*/\text{a}^*$). El color se midió en la zona ecuatorial de los frutos. Se realizaron veinticuatro mediciones para cada formulación.

Firmeza de los frutos: la firmeza se determinó en un texturómetro (Texture Analyzer) como el que se describió en la sección 3.3.4, mediante la compresión de los frutos 5 mm en la zona ecuatorial, a una velocidad de 0,5 mm/s con una sonda plana de 3 mm de diámetro. Se calculó la pendiente inicial de las curvas de compresión. Se realizaron cuarenta y ocho mediciones para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron en Newton por milímetro.

6.3.1.3. Calidad de frutos envasados con el *pad* o contenedor-liberador de 1-MCP seleccionado durante el almacenamiento poscosecha

Una vez que se determinó la formulación de la película proteica de soja adecuada, se evaluó el efecto de los liberadores de 1-MCP seleccionados sobre el mantenimiento de la calidad del fruto de tomate. Contenedores de proteína de soja (formuladas a pH 7, con 20 g de glicerol cada 100 g de SPI) conteniendo 1 mg de 1-MCP se colocaron en bandejas con cuatro frutos y se recubrieron con PVC como se indicó previamente (Figura 6.2 B). Las bandejas se almacenaron a 10 °C (≈90% HR) durante 1, 8 o 16 días. Finalizado dicho período las mismas se abrieron y se mantuvieron a 20 °C por 5 días. Las bandejas control sin *pads* o contenedores-liberadores de 1-MCP, se prepararon y se almacenaron en las mismas condiciones. Se utilizaron diez bandejas para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento. El experimento completo se repitió dos veces. Las mediciones de incidencia de podredumbres, pérdida de peso, textura y color se realizaron inmediatamente después de la toma de muestras. Asimismo se congelaron muestras de los frutos en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización para realizar otras determinaciones de calidad.

Incidencia de podredumbres: se determinó el porcentaje de frutos atacados con micelio visible. Se evaluaron ochenta frutos para cada tratamiento.

Pérdida de peso: la pérdida de peso se determinó pesando los frutos individuales al comienzo del experimento y después del almacenamiento. La pérdida de peso (WL) se calculó como:

$$WL = 100 \times (W_i - W_f) / W_i \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde: W_i y W_f son el peso inicial y final de la muestra respectivamente. Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de peso. Se realizaron 40 mediciones para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

Color y firmeza: el color superficial y la firmeza de los frutos se determinaron como se describió anteriormente.

Contenido de licopeno: los frutos congelados se procesaron en un molino (A11 Modelo, IKA Works Inc., Brasil) y 0,25 g del polvo resultante se colocó en tubos de ensayo conteniendo 5 mL de hexano: acetona: etanol (2: 1: 1). La muestra se sometió a vórtex y se mantuvo a 4 °C durante 30 min. Después de que se añadió 1 mL de agua para favorecer la separación de fases, se midió la absorbancia de la fase superior en un espectrofotómetro (Beckman, Modelo UV Mini-1240, Estados Unidos) a 503 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se calcularon mediante el uso de $\epsilon = 172000/M \text{ cm}$ (Taber y col., 2008) y se expresaron como miligramos de licopeno por kilogramo de peso fresco.

Pectinas solubles en agua (WSP): muestra de frutos se procesaron con 20 mL de agua en un Omnimixer. La suspensión se agitó en vórtex, se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. Se realizaron tres extracciones para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento. La concentración de ácidos urónicos en el WSP se determinó según el método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973. Los resultados se expresaron como gramos de ácido galacturónico por kilogramo de fruta fresca.

Azúcares: el tejido congelado se procesó en un molino (Modelo A11, IKA Works Inc., Brasil), y 1 g del polvo resultante se mezcló con 5 mL de etanol. La mezcla se agitó con vórtex, se centrifugó a $17.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C, y los sobrenadantes fueron llevados a 100 mL con agua. Los azúcares se midieron con el reactivo de antrona (Yemm y Willis, 1954). Alícuotas de 50 μL de los extractos etanólicos fueron llevados a 500 μL con agua. Se añadió lentamente a los tubos de ensayo 1 mL de antrona 0,2%, preparada en H_2SO_4 98% p/p en un baño de agua-hielo. Las muestras se calentaron a 100 °C durante 10 min, se enfrió en agua y se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro. Se empleó glucosa como estándar y los resultados fueron expresados en g/kg. Se realizaron cuatro mediciones para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

Acidez: diez gramos de pulpa de fruto fueron procesadas en un molino y se dispersaron en 100 mL de agua. Las muestras se titularon con NaOH 0,1 M hasta pH 8,2 (AOAC, 1980). Se realizaron cuatro determinaciones para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron en $\text{mmol H}^+/\text{kg}$.

Antioxidantes: los frutos congelados se molieron y aproximadamente 1 g del polvo resultante se agitó en vórtex durante 1 min en 5 mL de etanol frío y se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para las determinaciones de antioxidantes subsiguientes. El ensayo de DPPH* se realizó de acuerdo con el método de Brand-Williams y col. (1995) con modificaciones menores. Diferentes alícuotas (0-50 μ L) de extractos etanólicos se diluyeron hasta 80 μ L con agua. Después se completaron a 500 μ L agregando una solución de 60 mg/L del radical DPPH* en etanol. Las muestras se incubaron a 20 °C durante 90 min en oscuridad. Se midió la absorbancia a 515 nm y se calculó la cantidad de extracto requerido para consumir el 50% del DPPH* inicial (EC_{50}). La capacidad antioxidante se definió como $1/EC_{50}$ en 1/mg. Se realizaron tres mediciones para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

Tasa respiratoria: dos frutas que pesaban aproximadamente 300 g se incubaron en una jarra hermética (3 L) durante 20 min a 20 °C. La producción de CO_2 del fruto se midió con un sensor de infrarrojo (Alnor Compu-flujo, modelo 8650, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron por triplicado para cada tratamiento y tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresan en mililitros de CO_2 liberados por kilogramo de fruto fresco en una hora.

6.3.2. Generación de matrices liberadoras (*generators*) de dióxido de azufre (SO_2) para retrasar la aparición del pardeamiento enzimático de manzanas mínimamente procesadas

6.3.2.1. Materiales

Como fuente de proteína se utilizó el aislado proteico de soja comercial descrito en la sección 3.3.1. El glicerol empleado como plastificante y el sulfito de sodio (Na_2SO_3) fueron de la marca 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.

Las manzanas (*Red delicious*) se compraron en el Mercado Regional de Frutas y Hortalizas de la Ciudad de La Plata.

6.3.2.2. Obtención y caracterización de películas

Las películas se obtuvieron por *casting*, a partir de dispersiones acuosas de SPI al 5% p/p, con 1,25% de glicerol, a pH 7, a la que se le agregaron 0, 10, 25, 50 g de sulfito de sodio cada 100 g de proteína. Las dispersiones así formuladas se moldearon en placas, se secaron 3 h a 60 °C y se almacenaron 48 h a 20 °C y 58% de HR antes de ser caracterizadas o utilizadas.

Posteriormente, todas las películas se caracterizaron según su espesor, color, opacidad, contenido de agua, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua, y propiedades mecánicas en tracción, tal como se describió en la sección 3.3.4.

6.3.2.3. Evaluación de las películas *generators* en sistemas de envase

Se utilizaron sistemas de envase empleando bandejas plásticas de 10 x 20 x 4 cm con tapas perforadas. Sobre la parte interna de la tapa de estas bandejas, se colocaron 2 películas activas (pegadas con cinta) conteniendo la mayor concentración de sulfito (50 g de sulfito de sodio/ 100 g de SPI) como se ilustra en la Figura 6.3, y sin sulfito como control.

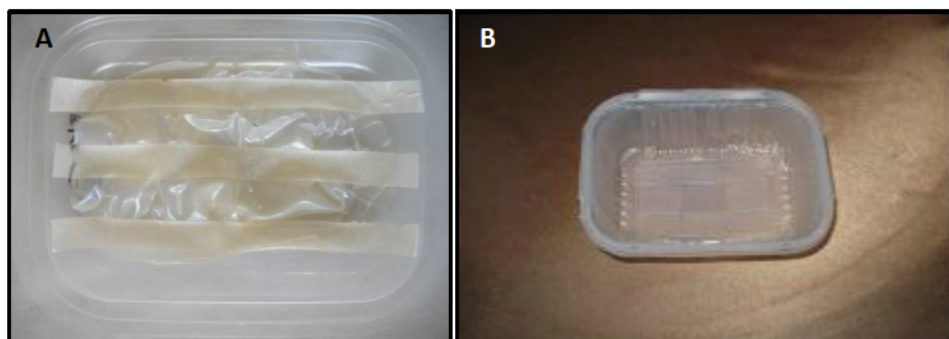


Figura 6.3. Disposición de las películas proteicas de soja con sulfito de sodio (Na_2SO_3) en el sistema de envase empleado: parte interna de la tapa con las películas (A); parte contenedora de las manzanas (B).

Se evaluó la aplicación de estos sistemas de envase para prolongar la vida útil de manzanas trozadas. Para ello, las manzanas se lavaron con abundante agua primero, y después con 150 ppm de hipoclorito de sodio, se secaron, pelaron, y se cortaron en trozos de aproximadamente 2 x 2 cm. Aproximadamente 400 g de las manzanas cortadas se colocaron en las bandejas antes descritas. Una vez colocados los frutos en las bandejas y las películas en las tapas, estas se colocaron en sus respectivas bandejas y se almacenaron durante 7 días a 10 °C. Cumplido

ese tiempo de almacenamiento se abrieron, y se determinó la inhibición del pardeamiento enzimático y el efecto del tratamiento en el sistema de envase sobre los parámetros organolépticos de las manzanas, como el pH, azúcares y acidez.

El color superficial se determinó como se describió en la sección 6.2.1.2 (el pardeamiento se siguió a partir de la evolución de la luminosidad $-L^*$) y el pH, acidez y azúcares como se indicó anteriormente. Se realizaron 24 mediciones de color de la superficie de los frutos, y se realizaron cuatro mediciones de cada parámetro de calidad para cada tratamiento evaluado.

Además se realizó una prueba del mismo sistema con papa, pero solo se realizó una evaluación visual en este caso.

6.3.3. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y expresados como la media \pm desviación estándar. Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey con un nivel de significación $\alpha = 0,05$, utilizando el programa SYSTAT (versión 12, Systat Software, Inc., Chicago, Estados Unidos).

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Generación de contenedores-liberadores (*pads*) de 1-metilciclopropeno (1-MCP) para extender la vida útil de frutos de tomate

6.4.1.1. Selección de la formulación filmogénica

Para seleccionar la formulación óptima para los *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP en base a proteína de soja, se evaluó el efecto de pH y el contenido de glicerol de la película en la resistencia a la tracción y el contenido de agua antes y después del almacenamiento dentro de envases conteniendo los frutos, dado que ambas variables modifican la absorción de agua de las matrices proteicas. El glicerol es un plastificante hidrofílico usado comúnmente en películas en base a biopolímeros, que además de provocar una disminución de la interacción entre las cadenas peptídicas (superando la fragilidad propia de las películas formadas solo por proteína), aumenta el

contenido de agua de la matriz incrementando su plastificación (Vanin y col., 2005). Por su parte, el pH afecta la carga y el grado de desnaturalización de las proteínas, lo que influye en la forma de interaccionar de las cadenas peptídicas durante la formación de las películas y finalmente en el carácter hidrofílico-hidrofóbico de los materiales resultantes (Mauri y Añón, 2006 y 2008).

En principio se formularon películas a partir de dispersiones filmogénicas preparadas mezclando 5 g de SPI y concentraciones variables de glicerol (20, 40 y 60 g/ 100 g SPI) en un volumen final de 100 mL y ajustando el pH a 2, 7 o 10. Todas las películas proteicas de soja resultantes fueron continuas y homogéneas, tal como se muestra en la **Figura 6.4**.



Figura 6.4. Apariencia de una película proteica de soja obtenida por *casting*.

En la **Figura 6.5** se presentan los resultados de las medidas de módulo de Young, contenido de agua pos-almacenamiento e inicial de las películas proteicas de soja preparadas con 20, 40, y 60 g de glicerol/ 100 g de SPI y a pH ajustado a 2, 7 y 10. En la medida que se incrementó la concentración del plastificante, el módulo de Young medido en tracción se redujo (**Figura 6.5 A**). Las películas con 40 o 60 g de glicerol/ 100 g de SPI no mostraron variaciones en las propiedades mecánicas, independientemente del pH. En contraste, películas con 20 g de glicerol/ 100 g de SPI mostraron diferente resistencia mecánica dependiendo de la concentración de protones. El mayor módulo de Young se encontró a pH 7. Esto difiere de los resultados reportados por Mauri y Añón (2006 y 2008), quienes encontraron mejores propiedades mecánicas a pHs extremos (2,0 y 10,5). Sin embargo, es importante señalar que utilizaron aislados proteicos de soja en el que las proteínas nativas son predominantes (Denavi y col., 2009). Gennadios y col. (1993) encontraron que las películas en base a aislado proteico comercial (SPI) a pHs 6-11 tenían propiedades mecánicas superiores (mayor resistencia y elongación a la rotura en tracción) que las películas a

pH 1-3, lo que puede atribuirse a una mayor prevalencia de enlaces disulfuro, que normalmente se ven favorecidas en condiciones neutras y alcalinas (Darby y Creighton, 1995).

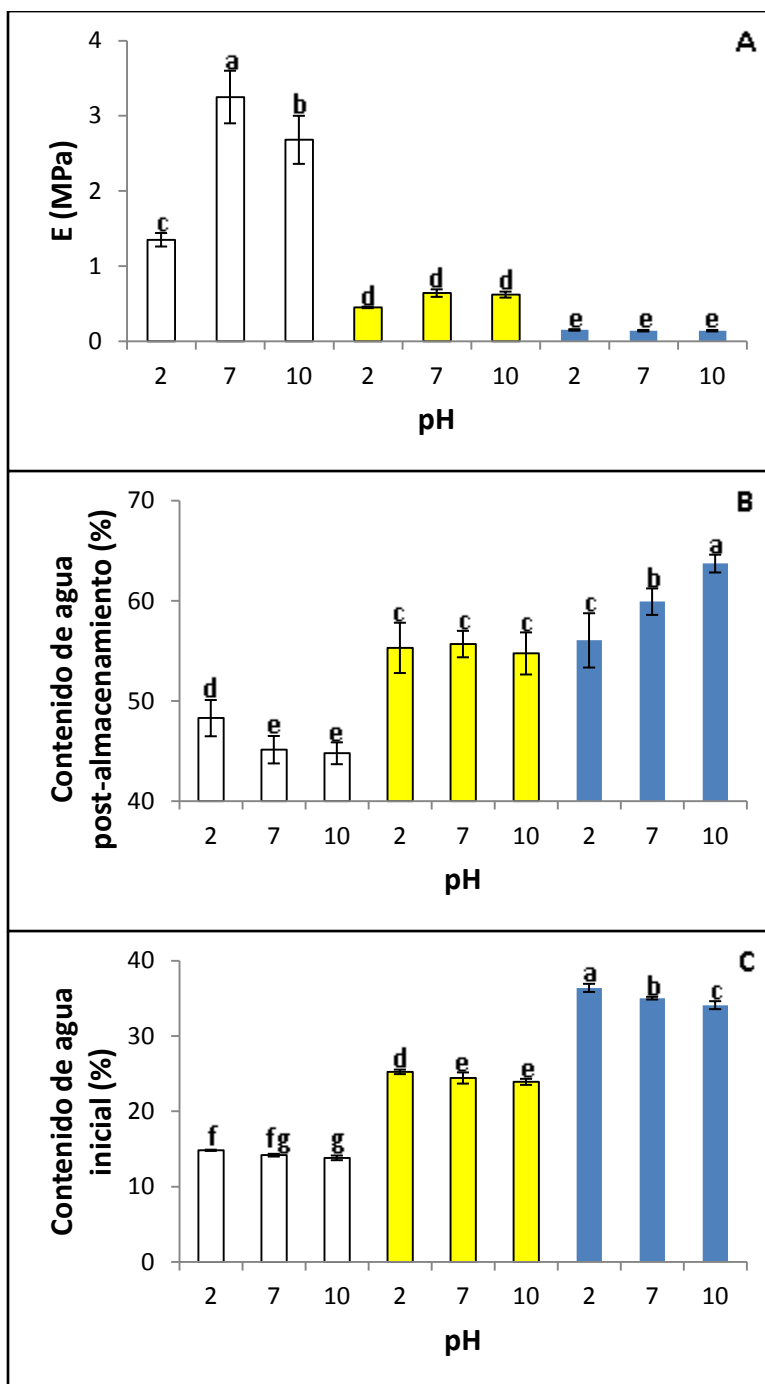


Figura 6.5. Módulo de Young (E) (A), contenido de agua de las películas luego de 36 h de almacenamiento a 10 °C en bandejas conteniendo frutos de tomate (600 g) y recubiertas con un film de PVC (B); contenido de agua antes de su uso (C) de películas proteicas de soja preparadas con 20 (○); 40 (●); 60 (●) g de glicerol cada 100 g de SPI y valores de pH ajustados (2, 7 y 10). Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El glicerol puede afectar tanto a la retención como a la absorción de agua (Kowalczyk y Baraniak, 2011; Lim y col., 1999). Una alta retención de agua antes de su uso puede ser indeseable para el liberador, ya que podría reducir la estabilidad de los principios activos. El aumento del contenido de glicerol condujo a un mayor contenido de agua después del almacenamiento (**Figura 6.5 B**), aunque estas películas presentaron contenidos elevados de agua ya antes de su uso (**Figura 6.5 C**).

Los tratamientos poscosecha con 1-MCP se realizan normalmente en cámaras herméticas antes del embalaje de la fruta, durante 12 a 24 h. En tomate, estos tratamientos han sido eficaces para retrasar la maduración y reducir el deterioro (Moretti y col., 2002; Mostofi y col., 2003). En este trabajo se quiso determinar si las diferentes películas mostraban variaciones en su capacidad de liberar 1-MCP. En consecuencia, se prepararon bandejas con frutos de tomate cubiertos con PVC (20 μm de espesor) con o sin *pads* contenedores-liberadores (control) y se analizaron los cambios en la firmeza y el color. El agua es necesaria para hidratar a la matriz de ciclodextrina y favorecer de este modo la liberación del 1-MCP de la formulación. Contenidos de agua iniciales altos podrían causar pérdidas de principio activo antes de su uso. Sin embargo, la eficacia de los contenedores-liberadores en base a proteínas de soja no se vio comprometida incluso en las películas con mayor contenido de agua inicial (60 g de glicerol/ 100 g de SPI) (**Figura 6.5**). Si bien la evaluación de los liberadores a partir de su eficacia es indirecta y se necesitan más estudios, los resultados sugieren que no se produjeron pérdidas importantes de 1-MCP. A pesar de su menor contenido de agua después de su uso (**Figura 6.5 B**), la eficacia de los contenedores-liberadores con 20 g de glicerol/ 100 g de SPI fue comparable a la de las películas con mayor concentración de plastificante. Esto indica que la absorción de agua en estas películas fue suficiente para liberar el principio activo.

En la **Figura 6.6** se presentan los resultados de las medidas de luminosidad, color y firmeza de los frutos de tomate almacenados en bandejas plásticas recubiertas con film de PVC sin (control) y con *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP en base a proteína de soja preparados con diferentes concentraciones de glicerol (20, 40, y 60 g/ 100 g de SPI) y a diferentes pH (2, 7 o 10), y almacenados a 10 °C por 7 días.

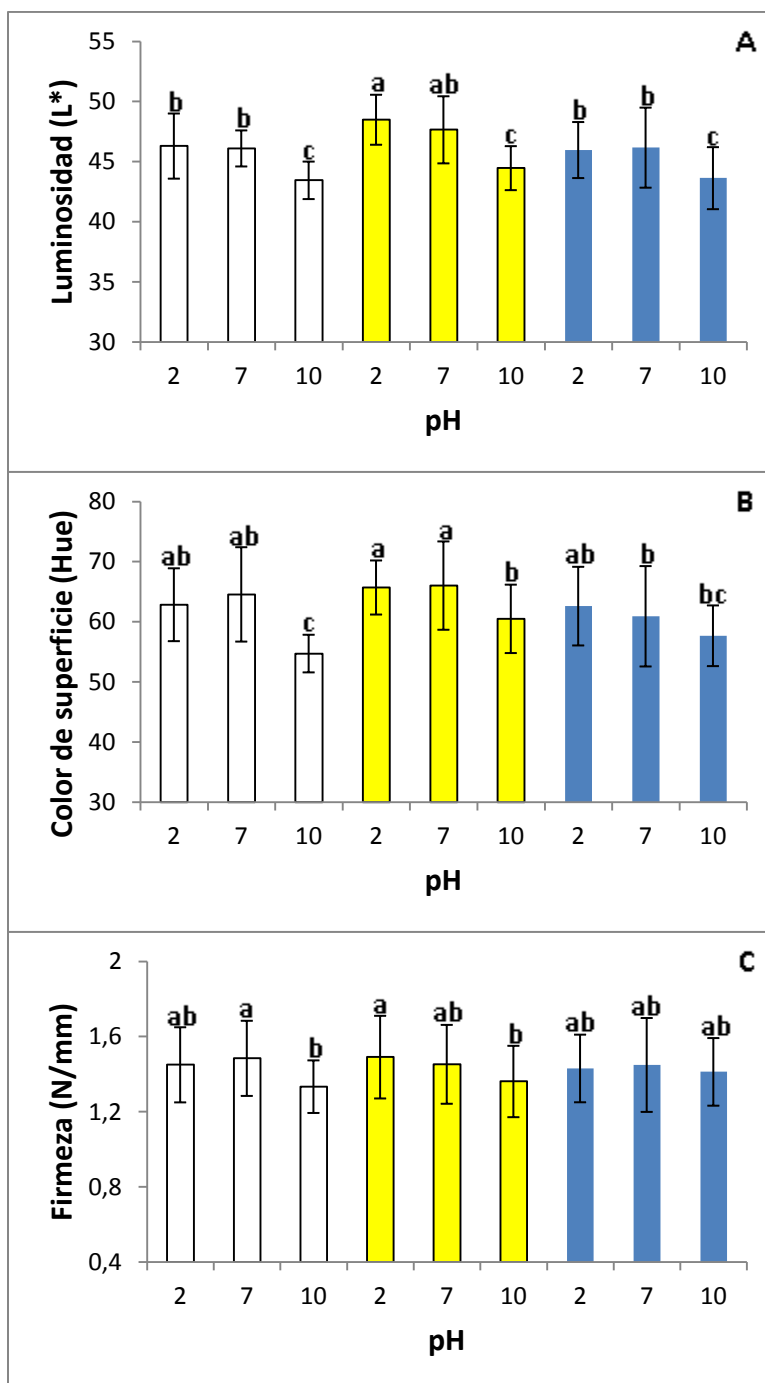


Figura 6.6. Luminosidad (L*) (A), color de superficie (Hue) (B) y firmeza (N/mm) (C) de frutos de tomate almacenados en bandejas plásticas recubiertas con film de PVC sin (control) y con *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP en base a proteína de soja preparados con diferentes concentraciones de glicerol: 20 (○); 40 (●); 60 (●) g cada 100 g de SPI y a diferentes pH (2, 7 o 10); almacenados a 10 °C por 7 días. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El pH de las películas tuvo un efecto mayor sobre la eficacia de los *pads* contenedores-liberadores que la concentración de glicerol. La capacidad de las películas a pH 10 para mantener

la luminosidad (Figura 6.6 A), el retardo en el desarrollo del color de superficie (Figura 6.6 B), y el ablandamiento (Figura 6.6 C) fue menor que la de los *pads* contenedores-liberadores neutros o ácidos. Mauri y Añón (2006) estudiaron la influencia del pH sobre las propiedades estructurales y funcionales de películas proteicas de soja nativas. La relevancia de interacciones covalentes y no covalentes que estabilizan la red de proteínas fue notablemente afectada por el pH. Las películas ácidas eran más hidrofílicas que las preparadas a pH alcalino. Aunque serían necesarios más estudios para abordarlo plenamente, la eficacia más baja de las películas alcalinas podría asociarse con una permeabilidad excesiva de la película que genera una muy rápida liberación del activo, o con la inestabilidad del 1-MCP en este medio. En base de las mejores propiedades mecánicas, menor contenido de agua inicial y eficacia para retrasar la maduración, se seleccionaron las películas de proteína de soja con un 20% de glicerol como el más adecuado para la liberación de 1-MCP. Por otra parte, puesto que las películas a pH neutro presentaron mejores propiedades mecánicas y serían potencialmente más compatibles con otros principios activos fueron las seleccionadas para los ensayos subsiguientes.

6.4.1.2. Calidad de frutos de tomate envasados con los *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP durante el almacenamiento poscosecha

Se realizó un segundo conjunto de experimentos para evaluar los efectos de la liberación de los *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP seleccionados (20 g de glicerol/ 100 g de SPI y pH 7) en la incidencia de podredumbres y el avance de la maduración de los frutos de tomate bajo diferentes regímenes de almacenamiento. Hotchkiss y col. (2007) incorporaron un complejo de 1-MCP/ α -ciclodextrina en varias películas de embalaje comunes mediante termocompresión. Pero los tratamientos térmicos intensos pueden reducir la estabilidad de estos compuestos gaseosos retenidos en matrices de ciclodextrina (Astray y col., 2009). En los liberadores generados en el presente trabajo el 1-MCP se incorpora después de la producción de la película proteica evitando la exposición a altas temperaturas.

Los *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP seleccionados se pusieron en bandejas conteniendo a los tomates, se recubrieron con PVC, y se almacenaron durante tres períodos diferentes de tiempo a 10 °C y posteriormente se transfirieron a 20 °C durante 5 días. Se evaluaron como control las bandejas correspondientes sin *pads* contenedores-liberadores. En la Figura 6.7 se muestran los resultados de la incidencia de podredumbres de los frutos control y con *pads*

contenedores-liberadores de 1-MCP almacenados a 10 °C por 1, 8 y 16 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días. Se encontró un bajo porcentaje de podredumbres en los envases con los *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP.

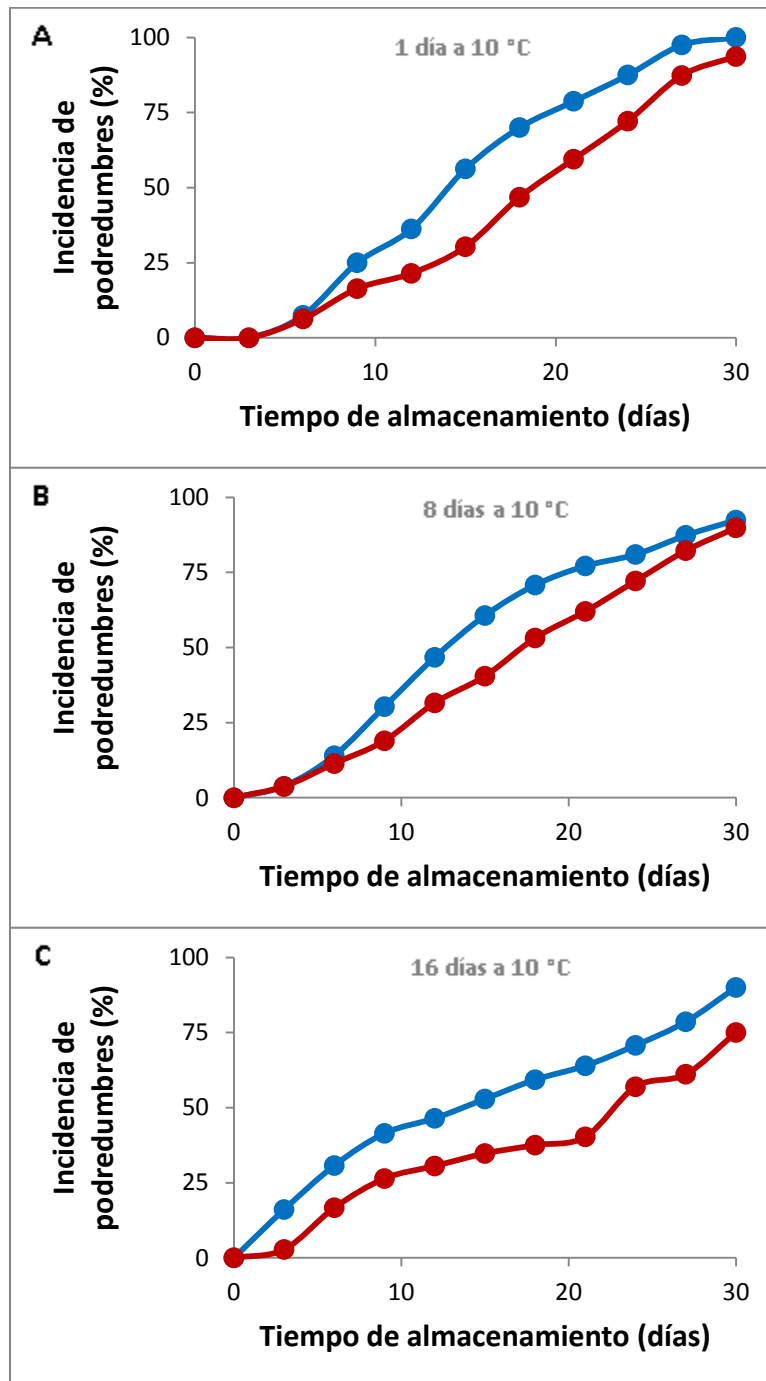


Figura 6.7. Descarte de frutos de tomate almacenados en bandejas plásticas recubiertas con film de PVC control (●) y con contenedores-liberadores de 1-MCP (pH 7 y 20 g de glicerol cada 100 g de SPI) (●) almacenados a 10 °C por: 1(A); 8(B); y 16 (C) días, y posteriormente transferidos a 20 °C.

Después de 16 días a 10 °C y 3 días a 20 °C, 15% de los frutos control mostraron claros síntomas de deterioro, en comparación con el 3% de los frutos tratados con 1-MCP. Se sabe que la susceptibilidad al ataque de hongos aumenta rápidamente a medida que se desarrollan frutos (Cantú y col., 2008).

En la Figura 6.8 se muestran las fotografías de los frutos control y con *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP almacenados a 10 °C durante 8 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días. La reducción en la incidencia de pudriciones por el efecto de la liberación de 1-MCP en los frutos tratados puede entonces ser el resultado del retardo de la maduración.



Figura 6.8. Apariencia de frutos control (A), o tratados en envase con 1-MCP (B) después de 8 días de almacenamiento a 10 °C.

En la Tabla 6.1 se muestran los resultados de las medidas de los parámetros de calidad de los frutos control y con *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP almacenados a 10 °C por 1, 8 y 16 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días.

Tabla 6.1. Pérdida de peso, acidez, azúcares, antioxidantes y tasa respiratoria de frutos de tomate almacenados en bandejas plásticas recubiertas con film de PVC sin (control) y con contenedores-liberadores en base a SPI (pH 7 y 20 g de glicerol cada 100 g de SPI) almacenados a 10 °C por 1, 8 y 16 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días.

Parámetro	Muestra	Régimen de almacenamiento			
		Día 0	1d 10 °C	8d 10 °C	16d 10 °C
			+	+	+
			5d 20 °C	5d 20 °C	5d 20 °C
Pérdida de peso (%)	Control	0 c	3,68 b	4,00 b	5,76 a
	1-MCP	0 c	3,67 b	3,93 b	4,38 a
Acidez (mmol/kg)	Control	93,98 a	77,85 b	78,77 b	72,79 b
	1-MCP	95,88 a	84,30 b	79,70 b	76,01 b
Azúcares (g/kg)	Control	24,77 a	26,09 a	25,97 a	23,90 a
	1-MCP	26,53 a	25,53 a	23,11 a	22,71 a
Antioxidantes (mg/kg)	Control	0,08 b	0,08 b	0,08 b	0,09 a
	1-MCP	0,08 b	0,08 b	0,08 b	0,09 a
Respiración (mL/kg h)	Control	23,62 a	13,07 b	12,65 b	10,91 b
	1-MCP	22,89 a	12,65 b	10,78 b	10,52 b

Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La pérdida de peso se incrementó durante el almacenamiento y después de 1 u 8 días a 10 °C y 5 días a 20 °C fue de cerca del 4% tanto en el control como en los frutos tratados (**Tabla 6.1**). Después de 16 días a 10 °C y 5 días a 20 °C la pérdida de peso fue del 6% y tampoco se detectaron diferencias entre el control y los frutos tratados con 1-MCP. Los tratamientos con 1-MCP no causaron modificaciones en la tasa respiratoria de los frutos (**Tabla 6.1**), pero redujeron la tasa de maduración en todos los tiempos de almacenamiento.

En la **Figura 6.9** se muestran los resultados de las medidas de luminosidad, ángulo Hue y contenido de licopeno de los frutos control y con *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP almacenados a 10 °C por 1, 8 y 16 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días.

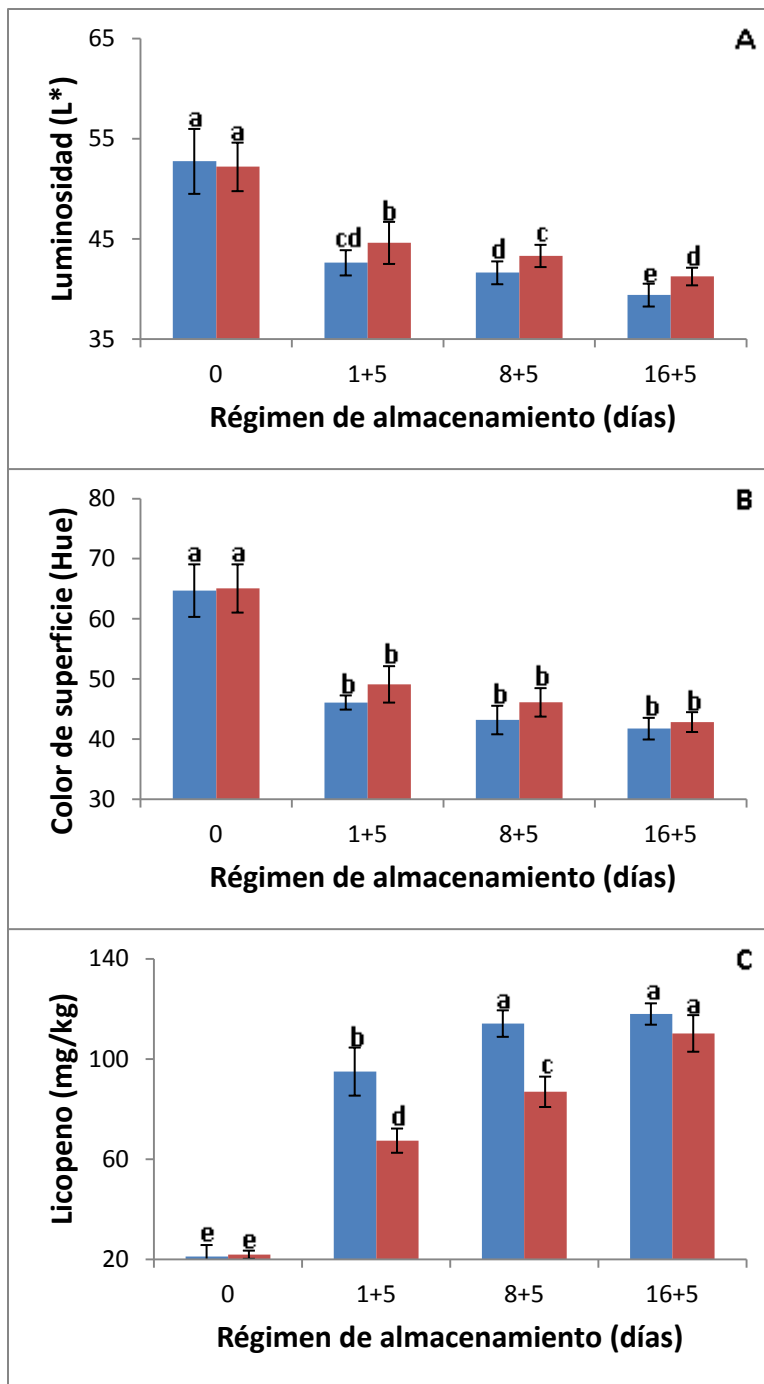


Figura 6.9. Luminosidad (A), color de superficie (Hue) (B), y contenido de licopeno (C) de frutos de tomate almacenados en bandejas plásticas recubiertas con film de PVC control (●) y con *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP en base a SPI (pH 7 y 20 g de glicerol cada 100 g de SPI) (●) almacenados a 10 °C por 1, 8 y 16 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Después de 1 u 8 días a 10 °C y 5 días a 20 °C la luminosidad de los frutos tratados con 1-MCP fue mayor que la del control (Figura 6.9 A). El ángulo de tono Hue disminuyó durante el

almacenamiento, pero fue similar en el control y en los frutos tratados con 1-MCP (**Figura 6.9 B**). Sin embargo, el contenido de licopeno más bajo observado en el fruto tratado confirmó que la maduración fue frenada por el uso de los contenedores-liberadores de 1-MCP (**Figura 6.9 C**). Cabe destacar que después de 16 días a 10 °C y 5 días a 20 °C, las diferencias en el desarrollo del color entre el control y frutos tratados fueron mínimas. Esto es tecnológicamente importante, ya que se necesita plena maduración para alcanzar la madurez organoléptica. Los tratamientos con 1-MCP no provocaron modificaciones indeseables en el contenido de azúcares o en la acidez. Finalmente, el contenido de antioxidantes hidrofílicos fue similar entre frutos control y tratados (**Tabla 6.1**).

En la **Figura 6.10** se muestran los resultados de las medidas de firmeza de los frutos control y con *pads* contenedores-liberadores de 1-MCP almacenados a 10 °C por 1, 8 y 16 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días. La distancia en las pruebas de compresión de fallo sobre el tejido no se vio afectada (**Figura 6.10 A**), pero los tomates tratados con 1-MCP mostraron una mayor resistencia a la penetración que el control (**Figura 6.10 B**). La reducción de la pérdida de textura de los tomates control también se asoció con una menor solubilización de pectinas (**Figura 6.10 C**).

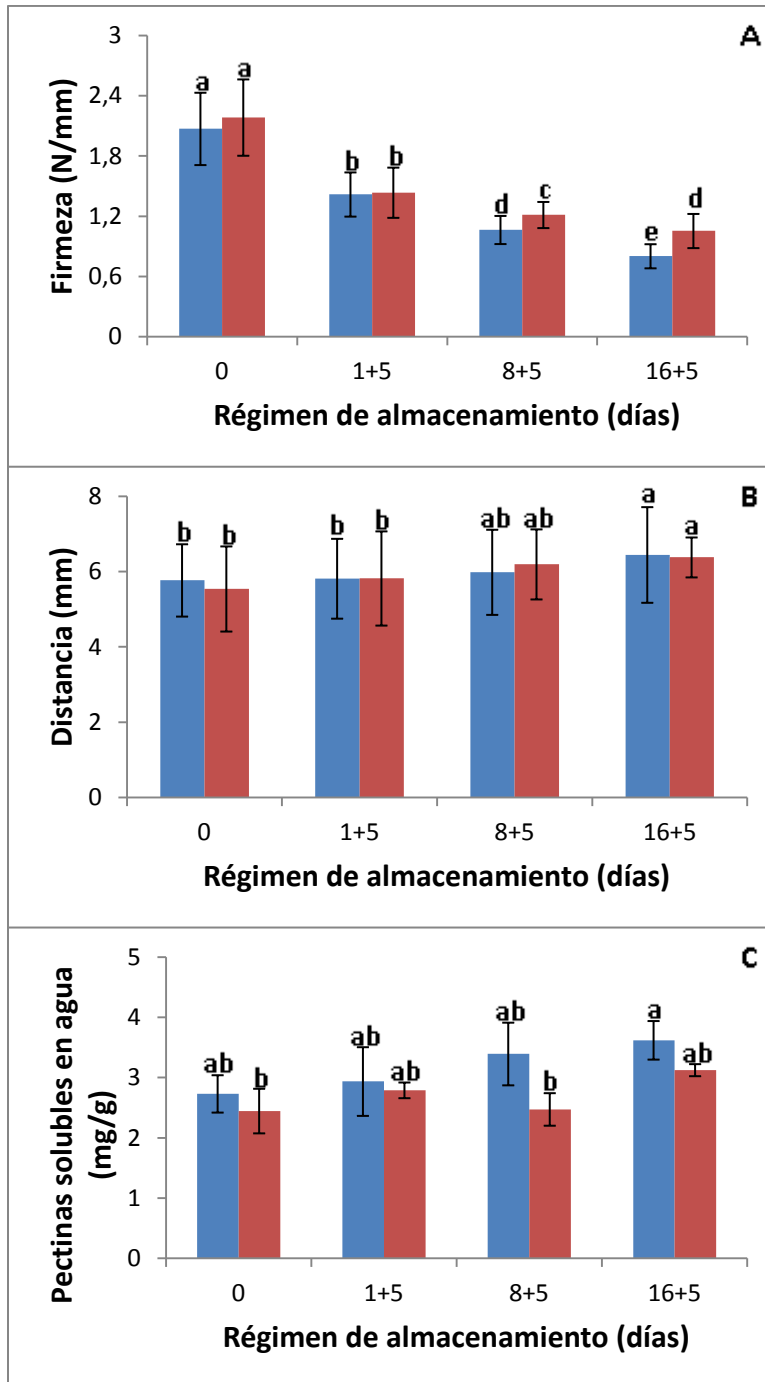


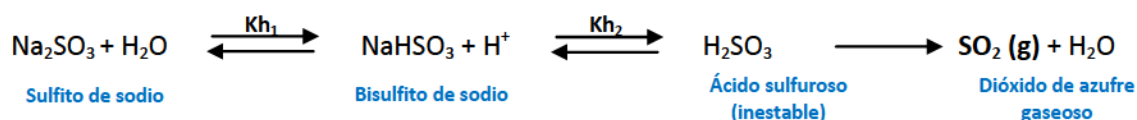
Figura 6.10. Distancia a la ruptura (A), firmeza (resistencia a la penetración) (B), y pectinas solubles en agua (C) de frutos de tomate almacenados en bandejas plásticas recubiertas con film de PVC control (●) y con *pads* contenedores/liberadores de 1-MCP en base a SPI (pH 7 y 20 g de glicerol cada 100 g de SPI) (●) almacenados a 10 °C por 1, 8 y 16 días y posteriormente transferidos a 20 °C por 5 días. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Se generaron pads contenedores-liberadores de 1-metilciclopropeno (un inhibidor de la acción del etileno) con películas proteicas de soja que incorporados en sistemas de envase con frutos de tomates, lograron retrasar la maduración y reducir el ablandamiento, la solubilización de pectinas y el ataque de hongos sin causar cambios negativos en otros atributos de calidad (azúcar, acidez y antioxidantes) de los frutos.

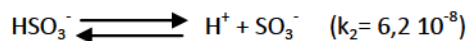
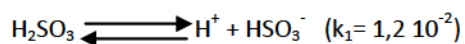
6.4.2. Generación de matrices liberadoras (*generators*) de dióxido de azufre (SO₂) para retrasar la aparición del pardeamiento enzimático de manzanas mínimamente procesadas

6.4.2.1. Caracterización de las películas proteicas de soja *generators*

Las películas de esta sección se formularon a pH 7 dado que a este pH el sulfito de sodio (Na₂SO₃) libera más lentamente el ácido sulfuroso (H₂SO₃) que si el pH fuera más ácido y no tan lentamente como lo hace a pH extremadamente básico. La obtención de dióxido de azufre a partir de sulfito de sodio se esquematiza de la siguiente manera:



Disociación del ácido sulfuroso:



Luego de su disociación completa el sulfito de sodio sufre una primer hidrólisis según $kh_1 = k_w/k_2$, formando bisulfito de sodio. Este compuesto es susceptible de una segunda reacción de hidrólisis a ácido sulfuroso según $kh_2 = k_w/k_1$. El ácido sulfuroso es muy inestable formando dióxido de azufre que se desprende en forma gaseosa. Según el principio de Le Châtelier, si existe un cambio de concentración que altera el estado de equilibrio de un sistema éste se ajustará para cancelar parcialmente dicha perturbación y el sistema alcanzará una nueva posición de equilibrio,

por lo que la reacción de disociación del ácido sulfuroso se va a desplazar hacia la formación de gas (SO_2). Si el pH hubiese sido ácido, esta reacción hubiese sido instantánea, y a pH básico más lenta. Probablemente parte del sulfito de sodio incorporado en las formulaciones se halla desprendido como gas (SO_2) durante el procesamiento de las películas, pero podrían quedar cantidades residuales del mismo y su liberación se evaluó como se describirá más adelante.

Debido a que el SO_2 ejerce un efecto antioxidante y antimicrobiano, se decidió evaluar la aplicación con manzanas trozadas, ya que el tejido de estos frutos expuesto al aire es rápidamente oxidado y pardeado, y al tratarse de un tejido claro, los cambios de color luego del éxito o fracaso del tratamiento antioxidante son más fáciles de visualizar. Por otro lado también las características claras del tejido permiten visualizar durante el almacenamiento la aparición de hongos filamentosos. La matriz proteica formada requiere hidratarse para que sea liberado el dióxido de azufre $-\text{SO}_2\text{(g)}$, el cual es liberado dentro del sistema de envase y actúa sobre las manzanas trozadas en este caso.

Se obtuvieron películas a partir de las dispersiones de SPI y glicerol a pH 7, y adicionadas con 0, 10, 25, 50 g de sulfito de sodio/ 100 g de la proteína. Las películas fueron continuas y homogéneas para todas las concentraciones de sulfito de sodio evaluadas, con algunas diferencias respecto a la apariencia, susceptibilidad al agua y las propiedades mecánicas que se describen a continuación.

En la **Tabla 6.2** se muestran los valores de espesor de las películas proteicas y adicionadas con sulfito de sodio. El contenido creciente de sulfito de sodio no afectó marcadamente el espesor de las películas, evidenciándose sólo un aumento para la máxima concentración sulfito evaluada.

Tabla 6.2. Espesor de películas proteicas de soja activadas con 0, 10, 25 y 50 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) cada 100 g de SPI.

Na_2SO_3 (g/100 g de SPI)	Espesor (μm)
0	61,9 ± 3,2 bc
10	60,6 ± 4,5 c
25	64,8 ± 3,9 b
50	69,5 ± 4,9 a

Letras distintas dentro de la columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La Figura 6.11 muestra a las películas obtenidas observándose que el agregado creciente de sulfito de sodio otorgó a las películas proteicas un aspecto más blanquecino.

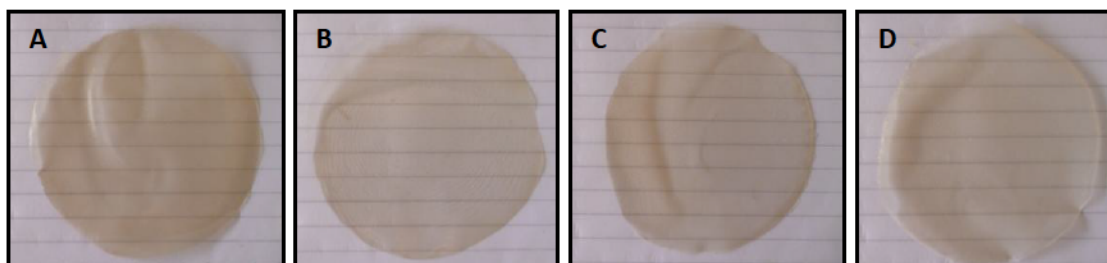


Figura 6.11. Apariencia de películas proteicas de soja activadas con: 0 (A); 10 (B); 25 (C); y 50 (D) g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) cada 100 g de SPI.

En la Tabla 6.3 se presentan los parámetros de color CIE L^* , a^* , b^* y la variación de color (ΔE) para las películas proteicas control y adicionadas con 0, 10, 25 y 50 g de sulfito de sodio/ 100 g de SPI.

Tabla 6.3. Parámetros de color CIE $L^*a^*b^*$ de películas proteicas de soja activadas con 0, 10, 25 y 50 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) cada 100 g de SPI.

Na_2SO_3 (g/100 g de SPI)	L^*	a^*	b^*	ΔE
0	$92,48 \pm 0,63$ c	$-1,26 \pm 0,14$ c	$10,69 \pm 1,09$ a	$10,30 \pm 1,20$ a
10	$93,38 \pm 0,95$ b	$-0,77 \pm 0,06$ a	$6,93 \pm 0,88$ bc	$6,60 \pm 1,25$ b
25	$94,29 \pm 0,43$ a	$-0,79 \pm 0,04$ a	$6,42 \pm 0,51$ c	$5,67 \pm 0,63$ b
50	$94,76 \pm 0,17$ a	$-0,92 \pm 0,02$ b	$7,59 \pm 0,18$ b	$6,50 \pm 0,23$ b

Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El color más claro percibido visualmente con el agregado de sulfito de sodio fue evidenciado en un aumento de la luminosidad de las películas (L^*). Por otro lado, el parámetro a^* aumentó y el ΔE y b^* disminuyeron con la adición de sulfito debido a una reducción del tono amarillo de las películas. Esto podría deberse a la prevención de la oxidación de compuestos polifenólicos (isoflavonas, ácido clorogénico, ferúlico y cafeico) presentes en el SPI durante el proceso de formación de las películas adicionadas con sulfito.

La opacidad de las películas proteicas y adicionadas con sulfito se muestra en la Figura 6.12.

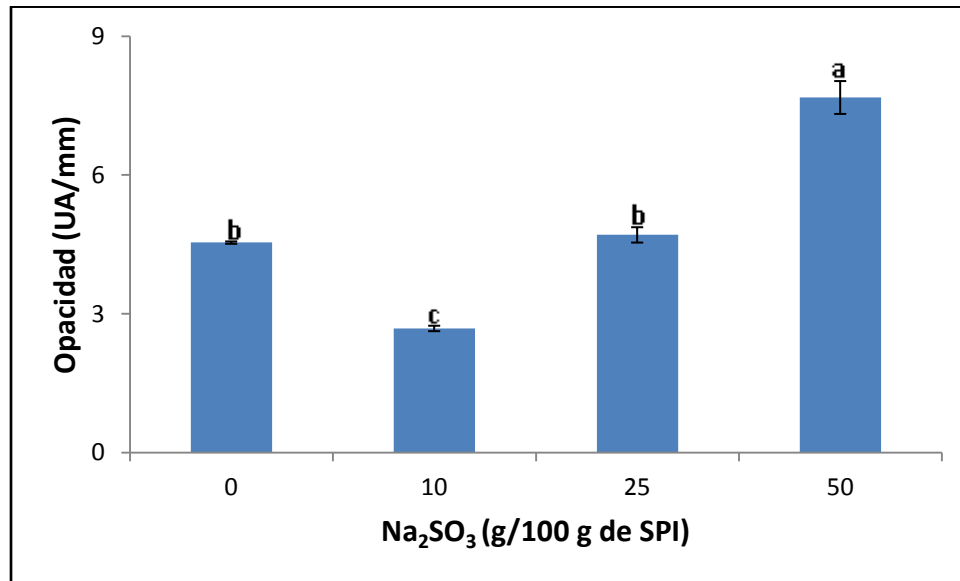


Figura 6.12. Opacidad de películas proteicas de soja activadas con 0, 10, 25 y 50 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) cada 100 g de SPI. Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El agregado de sulfito de sodio en los niveles más elevados provocó un aumento de la opacidad de las películas, que podría deberse a una pérdida de solubilidad durante el secado dada la elevada proporción de la sal en la formulación.

En la **Tabla 6.4** se presentan los valores de contenido de agua, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua de las películas proteicas y adicionadas con sulfito de sodio.

Tabla 6.4. Susceptibilidad al agua representada por el contenido de agua, la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas proteicas de soja activadas con 0, 10, 25 y 50 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) cada 100 g de SPI.

Na_2SO_3 (g/100 g de SPI)	Contenido de agua (%)	Solubilidad (%)	WVP x 10^{-11} (g H ₂ O/m Pa s)
0	17,94 ± 0,14 a	41,48 ± 2,46 c	9,06 ± 0,29 c
10	17,62 ± 0,15 ab	68,09 ± 5,70 b	8,63 ± 0,49 c
25	18,40 ± 0,91 a	72,46 ± 3,46 b	12,02 ± 1,00 b
50	16,66 ± 0,27 b	88,13 ± 2,94 a	15,09 ± 0,60 a

Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

El contenido de agua de las películas proteicas de soja no fue afectado por el agregado de concentraciones crecientes de sulfito de sodio. Sin embargo, al incrementar el contenido de sulfito en la formulación la solubilidad y permeabilidad al vapor de agua aumentaron progresivamente. Probablemente haya ocurrido una disminución en el entrecruzamiento de las proteínas de soja en las matrices en que fue incorporado el sulfito, principalmente evitando la formación de enlaces y esto estaría aumentando el grado de solubilidad y WVP. Ese aumento se demuestra también en la **Figura 6.13**, donde se evidencia la incapacidad de las películas proteicas de soja activadas con 50 g de sulfito/ 100 g de SPI de mantener su integridad después de estar en contacto con agua durante 24 h.

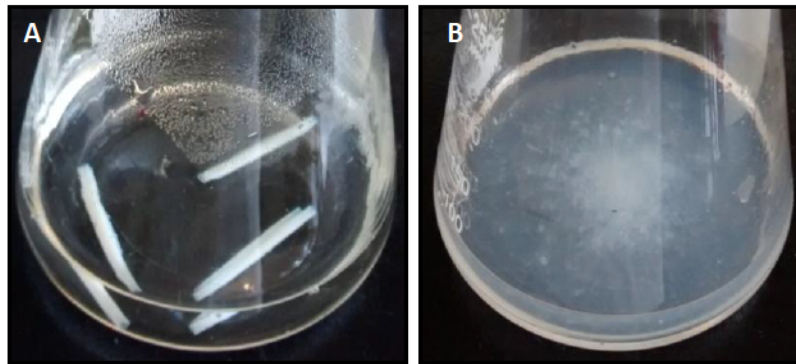


Figura 6.13. Aspecto de discos de películas proteicas de soja control **(A)**, o adicionadas con 50 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) cada 100 g de SPI **(B)** luego de 24 h de agitación en agua.

Zhang y Sun (2008) mencionaron la reducción de interacciones puentes disulfuro en fracciones de glicinina (fracción mayoritaria en la proteína de soja) tratadas con bisulfito de sodio (NaHSO_3) en concentraciones crecientes, hasta el orden de los 36 g/L, en donde aún pudieron observar puentes disulfuro entre subunidades ácidas y básicas de glicinina por análisis de SDS PAGE. A modo de comparación, en este trabajo, la concentración máxima de sulfito de sodio (Na_2SO_3) empleada fue de 25 g/L, y sería aún menos la cantidad que se hidrolice a bisulfito.

La **Figura 6.14** presenta las propiedades mecánicas medidas en tracción de las películas proteicas y adicionadas con sulfito de sodio.

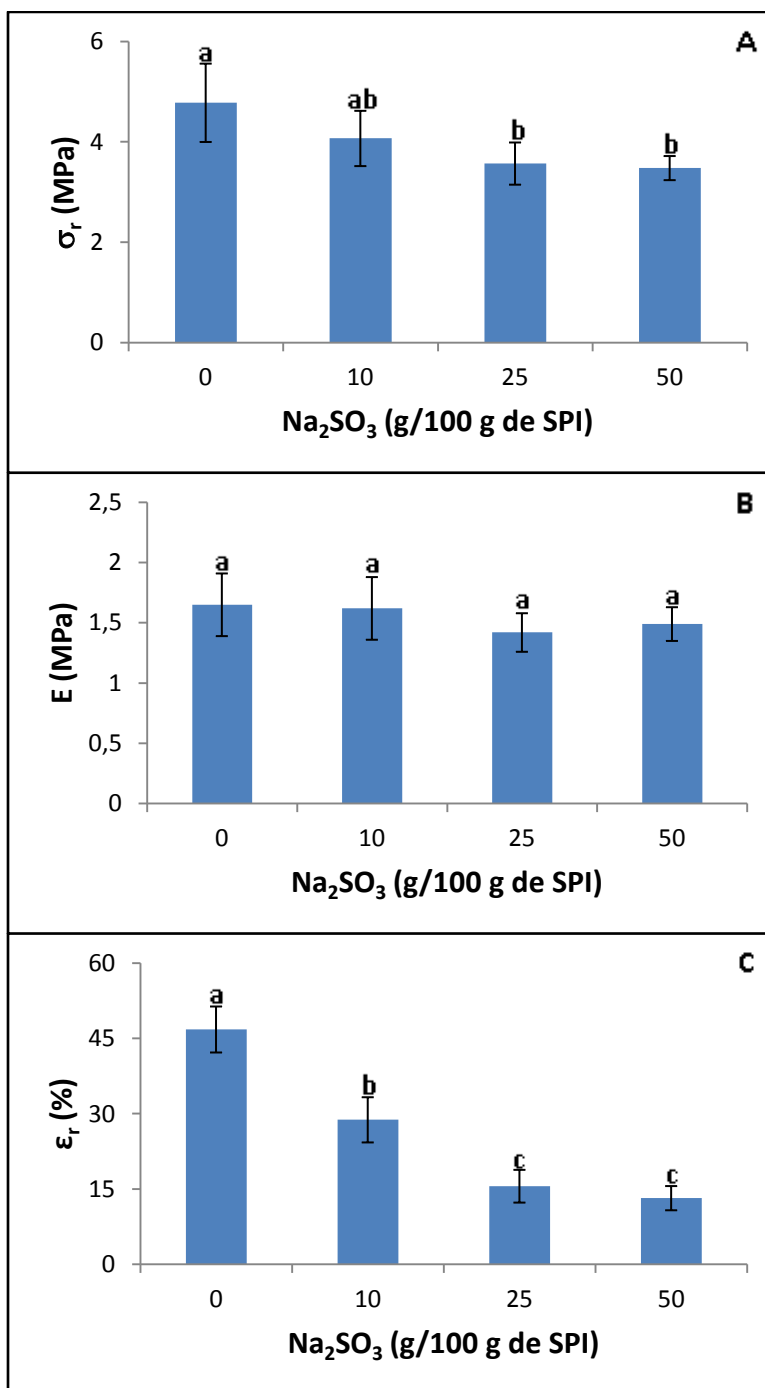


Figura 6.14. Propiedades mecánicas medidas en ensayos de tracción de películas proteicas de soja activadas con 0, 10, 25 y 50 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) cada 100 g de SPI: tensión a la ruptura (σ_r) (A); módulo de Young (E) (B); elongación a la ruptura (ϵ_r) (C). Letras distintas indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

La tensión a la ruptura disminuyó progresivamente con el agregado de sulfito de sodio a las formulaciones, aunque solo fue estadísticamente diferente para las máximas concentraciones de sulfito evaluadas (**Figura 6.14 A**). Sin embargo, no hubo efecto en el módulo de Young (**Figura**

6.14 B) pero sí una disminución gradual en la elongación a la ruptura con las cantidades de activo empleadas (Figura 6.14 C). Min y col. (2008) tampoco observaron efecto del agregado de sulfito en materiales de gluten de trigo termomoldeados en el módulo de Young. En general la resistencia y elongación de películas proteicas de soja esta asociada a la formación de puentes disulfuro durante el procesamiento, que en este caso estaría impedida por la presencia de sulfito y aún disminuida por reducción de disulfuros. En función de los valores de solubilidad y permeabilidad al vapor de agua se escogió la formulación que más susceptible fue en estas propiedades, de manera de que en la aplicación estas películas sean capaces de hidratarse en mayor medida y así poder liberar el principio activo. Se determinó evaluar a las formulaciones con 50 g de sulfito de sodio/ 100 g de SPI aplicadas en sistemas de envase para liberar dióxido de azufre (SO₂).

6.4.2.2. Efecto de la aplicación de las películas como *generators* liberadores de SO₂ en sistemas de envase

Los sistemas de envase conteniendo a las películas control y adicionadas con 50 g de sulfito de sodio/ 100 g de SPI y a las manzanas trozadas fueron evaluados después de 7 días de almacenamiento a 10 °C. Para ello las bandejas fueron abiertas y se determinó el color, pH, azúcares, y acidez de las manzanas mínimamente procesadas. En la Figura 6.15 se muestra la apariencia de los frutos después del mencionado almacenamiento.

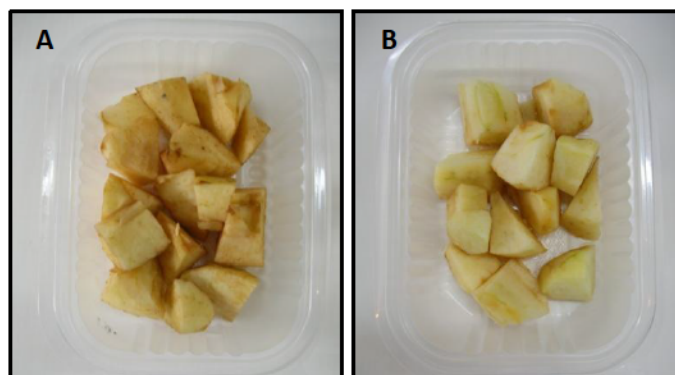


Figura 6.15. Apariencia de manzanas trozadas: control (A), o tratadas con el sistema de envase conteniendo a las películas con sulfito de sodio (Na₂SO₃) (B) luego de permanecer almacenadas a 10 °C durante 7 días.

En la Tabla 6.5 se muestran los parámetros de color L*, a*, b* y el ángulo de tono Hue de las manzanas mínimamente procesadas control y tratadas a partir del sistema de envase conteniendo películas con 0 y 50 g de sulfito de sodio/ 100 g de SPI respectivamnete.

Tabla 6.5. Parámetros de color L*, a*, b* y Hue de las manzanas mínimamente procesadas luego de 7 días de almacenamiento a 10 °C.

Na ₂ SO ₃ (g/100 g de SPI)	L*	a*	b*	Hue
0	73,6 ± 1,9 b	1,8 ± 0,6 a	39,5 ± 1,5 a	87,4 ± 2,4 a
50	84,9 ± 2,4 a	-4,5 ± 0,8 b	28,6 ± 4,1 b	80,7 ± 2,0 b

Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Se puede observar que el agregado de sulfito de sodio a las películas usadas en el sistema de envase como *generators* generó un aumento significativo de la luminosidad de los frutos evidenciado según el parámetro L*, junto con una disminución del parámetro a* y b* lo que evidencia una notable reducción en el pardeamiento de las manzanas. El ángulo de tono Hue también puso de manifiesto la menor coloración en las manzanas tratadas respecto al control dado el avance del pardeamiento del tejido en estas últimas.

En la **Tabla 6.6** se muestran los valores de pH, acidez titulable y azúcares para las manzanas mínimamente procesadas y almacenadas 7 días a 10 °C en sistemas de envase conteniendo películas proteicas control y adicionadas con 50 g de sulfito de sodio/ 100 g de SPI. Ningún parámetro de calidad de los frutos fue afectado por el tratamiento envasado a partir del empleo de los *generators* liberadores de dióxido de azufre. Este efecto implica que si bien el tratamiento con las películas adicionadas con sulfito de sodio permite retrasar el pardeamiento de las manzanas mínimamente procesadas, la calidad del producto se mantiene intacta.

Tabla 6.6. pH, acidez y contenido de azúcares de las manzanas almacenadas en sistema de envase con películas proteicas de soja activas con y sin 50 g de sulfito de sodio (Na₂SO₃) cada 100 g de SPI.

Na ₂ SO ₃ (g/100 g de SPI)	pH	Acidez (meq H ⁺ /kg)	Azúcares (g/kg)
0	4,0 ± 0,12 a	34,1 ± 2,3 a	129,6 ± 20,5 a
50	4,1 ± 0,09 a	35,8 ± 0,5 a	111,1 ± 11,7 a

Letras distintas dentro de cada columna indican diferencias con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Se generaron matrices liberadoras (generators) de dióxido de azufre (SO₂) para retrasar la aparición del pardeamiento enzimático de manzanas mínimamente procesadas con películas proteicas de soja que incorporadas en sistemas de envase con manzanas mínimamente

procesadas, lograron retrasar la aparición del pardeamiento enzimático sin afectar ningún parámetro de calidad de los frutos.

6.5. Conclusiones

La absorción de agua de las películas en base a proteína podría ser indeseable para ciertas aplicaciones. Sin embargo, podría ser aprovechada en forma ventajosa para facilitar la liberación de principios activos en tratamientos de alimentos en el envase. En este capítulo:

i) se seleccionó una formulación en base a aislado proteico de soja y glicerol para preparar películas biodegradables y generar liberadores de 1-metilciclopropeno, un inhibidor de la acción del etileno. Los *pads* contenedores-liberadores en base a proteína de soja fueron evaluados en función de su eficacia para retrasar la maduración y prevenir el deterioro poscosecha de tomate. Cuando se incorporaron en sistemas de envase con frutos, se logró retrasar la maduración y se redujo el ablandamiento, la solubilización de pectinas y el ataque de hongos sin causar cambios negativos en otros atributos de calidad (azúcar, acidez y antioxidantes). Resultan necesarios futuros estudios para continuar la evaluación de estos materiales en envases comerciales, bajo almacenamiento refrigerado continuo y para determinar la eficiencia de liberación del principio activo.

ii) se estudió el agregado de concentraciones crecientes de sulfito de sodio a películas proteicas de soja. Esto provocó cambios en la matriz proteica que se manifestaron en un cambio de su apariencia, solubilidad, WVP y propiedades mecánicas debido a la reducción de puentes disulfuro en la matriz formada generada por el sulfito. Estas películas activas, colocadas como matrices liberadoras (*generators*) de SO₂ en envases cerrados redujeron significativamente el pardeamiento de manzana mínimamente procesada sin afectar las características organolépticas durante su almacenamiento. La película activa podría funcionar para aumentar la superficie de liberación del SO₂ y permitir reducir las cantidades de sulfito. Futuros estudios resultan de interés para cuantificar la cinética de liberación de SO₂ en sistemas de envase similares a diferentes condiciones de almacenamiento y la residualidad en el producto tratado.

Los resultados sugieren que los sistemas desarrollados, *pads* contenedores-liberadores o matrices liberadoras de principios activos en base a proteína de soja podrían ser útiles para llevar

a cabo el tratamiento de poscosecha de vegetales enteros o mínimamente procesados durante el transporte o la distribución.

7. Conclusiones generales

1. Los estudios realizados en el presente trabajo de tesis permitieron mejorar la funcionalidad de las películas proteicas de soja a través de distintas estrategias:

- El agregado de montmorillonita (MMT), de fibras celulósicas obtenidas de papel y de nanofibras de celulosa a la formulación permitió mejorar la resistencia mecánica de las películas proteicas en detrimento de su elongación, sin modificar en la mayoría de los casos la sensibilidad al agua. Asimismo la adición de MMT retardó la desintegración de las películas nanocompuestas en suelo hasta dos semanas. Esto podría resultar de interés en ciertas aplicaciones en las que se requiera una mayor duración o el uso en condiciones más drásticas. Por su parte el agregado de celulosa microfibrilada a la formulación también permitió mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno, lo que podría resultar de interés en ciertas aplicaciones en *packaging*.

- El agregado de colorantes a las películas proteicas y nanocompuestas permitió obtener una variedad de materiales con distintas propiedades ópticas que inducen a pensar aplicaciones en envasado de productos sensibles a la luz. Su agregado no modificó en gran medida las propiedades físicas de las películas proteicas más allá del color, pero sí afectó el grado de intercalación y exfoliación de la MMT en los sistemas nanocompuestos desarrollados. El agregado de aceite esencial de clavo a las películas proteicas y nanocompuestas reforzadas con nanofibras de celulosa permitió obtener materiales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Asimismo el agregado de clavo provocó cierta plastificación de las matrices (observada principalmente en las propiedades mecánicas, solubilidad y contenido de agua) y una modificación diferencial en las propiedades barrera, dado que aumentó la permeabilidad al oxígeno y disminuyó la WVP. La presencia de nanofibras en la matriz proteica, facilitó la liberación de los compuestos activos presentes en el aceite esencial. Esta mayor actividad pudo correlacionarse con una mejor distribución del aceite esencial en presencia de las fibras y con menores tamaños de gota, que podrían atribuirse al efecto emulsificante propio de estos nanorefuerzos.

2. Fue posible procesar películas proteicas de soja y compuestas en base a proteína-fibras celulósicas y proteína-lípidos (emulsionadas) por *tape casting*, lo que resulta muy interesante para el escalado en la producción de estos materiales. El equipo utilizado exigió trabajar con concentraciones de proteínas superiores a las habitualmente usadas por *casting*. Al analizar las

técnicas de secado se observó que las películas secadas por conducción presentaron una mejor funcionalidad que las secadas por radiación, y que al aumentar la temperatura de secado (de 40 a 60 °C), además de disminuir los tiempos de procesamiento, se logró mejorar las propiedades mecánicas y la resistencia del termosellado de las películas, sin afectar su apariencia y susceptibilidad al agua. Por otra parte por la técnica de *tape casting* también se produjeron películas emulsionadas de proteínas de soja con 7,5% de cera de abeja con menores WVP y similares propiedades mecánicas, y películas reforzadas con fibras celulósicas con mejor resistencia a la rotura pero similar susceptibilidad al vapor de agua.

3. Finalmente fue posible avanzar en algunas aplicaciones de los materiales proteicos, pensando en usos adecuados a sus características. La alta absorción de agua de las películas, que puede considerarse como una desventaja para numerosas aplicaciones, se aprovechó para facilitar la liberación de principios activos en tratamientos de alimentos en el envase durante su transporte o distribución. Así se obtuvieron:

- *pads* contenedores-liberadores de 1-metilciclopropano (un inhibidor de la acción del etileno), que colocados dentro de un envase cerrado lograron retrasar la maduración y prevenir el deterioro poscosecha de tomate (reduciendo el ablandamiento, la solubilización de pectinas y el ataque de hongos) sin causar cambios negativos en otros atributos de calidad (azúcar, acidez y antioxidantes).
- matrices liberadoras (*generators*) de SO₂, a través de la activación de las películas proteicas con sulfito de sodio, que colocadas en envases cerrados lograron disminuir el pardeamiento de manzana mínimamente procesada sin afectar otras características organolépticas durante el almacenamiento.

8. Referencias bibliográficas

- Abdul Khalil H.P.S., Bhat A.H., Ireana Yusra A.F. (2012). Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: a review. *Carbohydr. Polym.* 87: 963–979.
- Abdul Khalil H.P.S., Davoudpour Y., Nazrul Islam Md., Mustapha A., Sudesh K., Dungan R., Jawaid M. (2014). Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: a review. *Carbohydrate Polymers* 99: 649–665.
- Agoda-Tandjawa G., Durand S., Berot S., Blassel S., Gaillard C., Garnier, C., Doublier J.-L. (2010). Rheological characterization of microfibrillated cellulose suspensions after freezing. *Carbohydrate Polymers* 80: 677–686.
- Ahmad M., Benjakul S., Prodpran T., Agustini T.W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids* 28: 189-199.
- Ahvenainen R. (2003). *Novel food packaging techniques*. CRC Press, Boca Raton. USA.
- Albert S., Mittal G.S. (2002). Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product. *Food Research International* 35: 445-458.
- 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.
- Altunkaya A., Gökmen V. (2008). Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chem.* 107: 1173-1179.
- Alvarez V.A., Vázquez A. (2004). Thermal degradation of cellulose derivates/starch blends and sisal fibre biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 84:13-21.
- Anandhan S., Bandyopadhyay S. (2011). Polymer nanocomposites: from synthesis to applications. Nanocomposites and polymers with analytical methods. Ed.: John Cuppoletti.
- Andreuccetti C, Carvalho RA, Grosso CRF. (2009). Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International* 42: 1113-1121.
- Angellier H., Choisnard L., Molina-Boisseau S., Ozil P., Dufresne A. (2004). Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. *Biomacromol.* 5, 1545–1551.
- Angellier H., Molina-Boisseau S., Dole P., Dufresne A. (2006). Thermoplastic starch- waxy maize starch nanocrystals nanocomposites. *Biomacromolecules* 7: 531–539.
- Angellier H., Molina-Boisseau S., Dufresne A. (2005a). Mechanical properties of waxy maize starch nanocrystal reinforced natural rubber. *Macromolecules* 38: 9161-9170.
- Angellier H., Putaux J.-L., Molina-Boisseau S., Dupeyre D., Dufresne A. (2005b). Starch nanocrystal fillers in an acrylic polymer matrix. *Macromolecular Symposium* 221: 95-104.
- Anglés M.N., Dufresne A. (2001). Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposite materials. 2. Mechanical Behavior. *Macromolecules* 34: 2921–2931.
- 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* 49: 4852-4858.
- AOAC. (1980). *Official methods of analysis* (13th ed.) Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 359.
- 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: 105-119.
- ASTM D3985-02. (2001). Standard Test Method for Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor. En: *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, USA.
- ASTM D6400-99 (2002). Standard specification for compostable plastics. En: *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, USA. 19428-12959.

- ASTM D644-94. (1994). Standard Test Methods for Moisture Content of Paper and Paperboard by Oven Drying. En: *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, USA. págs. 1–2.
- ASTM D88-00 (2004). Standard test method for seal strength of flexible barrier materials. En: *Annual book of ASTM standards*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.
- ASTM D882-02 (2004). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. En: *Annual book of ASTM standards*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.
- ASTM D882-91 (1991). Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. En: *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, USA. págs. 182-190.
- ASTM E96-80 (1989). Standard test methods for water vapor transmission of materials. En: *Annual book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, USA. 15: 745-54.
- ASTM F88-00 (2004). Standard Test Method for Seal Strength of Flexible Barrier Materials. En: *Annual book of ASTM Standards*. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, USA.
- Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mejuto J.C., Rial-Otero R., Simal-Gándara J. (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll.* 23, 1631–1640.
- Atarés L., De Jesús 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.
- Atef M., Rezaei M., Behrooz R. (2014). Preparation and characterization agar-based nanocomposite film reinforced by nanocrystalline cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules* 70: 537–544.
- 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: 1934-1942.
- Aulin C., Gällstedt M., Lindström T. (2010a). Oxygen and oil barrier properties of microfibrillated cellulose films and coatings. *Cellulose* 17: 559–574.
- Aulin C., Netrval, J., Wågberg, L., Lindström, T. (2010b). Aerogels from nanofibrillated cellulose with tunable oleophobicity. *Soft Matter* 6: 3298–3305.
- 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.
- Avérous L., Boquillon N. (2004). Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, 56:111-122.
- Azizi Samir M.A.S., Alloin F., Dufresne, A. (2005). Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromol.* 6: 612-626.
- Azizi S., Alloin F., Paillet M., Dufresne A. (2004). Tangling effect in fibrillated cellulose reinforced nanocomposites. *Macromol.* 37: 4313-4316.
- Baldwin E.A., Baker R.A. (2002). Use of proteins in edible coatings for whole and minimally processed fruits and vegetables. En: *Protein-Based Films and Coatings*. Ed.: Gennadios A. CRC Press, Boca Raton. Págs. 501-516.
- Barreto A.C.H., Rosa D.S., Fechine P.B.A., Mazzetto S.E. (2011). Properties of sisal fibers treated by alkali solution and their application into cardanol-based biocomposites. *Composites: Part A*, 42:492–500.
- Barron C., Varoquaux P., Guilbert S., Gontard N., Gouble B. (2002). Modified atmosphere packaging of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus* L.) with hydrophilic films. *Journal of Food Science* 67: 251-257.
- Beg M.D.H., Pickering K.L., Weal S.J. (2005). Corn gluten meal as a biodegradable matrix material in wood fibre reinforced composites. *Mat. Sci. Eng.* 412, 7-11.
- 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.
- Besbes I., Rei Vilar M., Boufi S. (2011). Nanofibrillated cellulose from Alfa, Eucalyptus and Pine fibres: preparation, characteristics and reinforcing potential. *Carbohydrate Polymers* 86: 1198-1206.
- Beyer G. (2002). Nanocomposites: A new class of flame retardants for polymers. *Plastics, Additives & Compounding* 4: 22- 28.
- Bharadwaj R., Mehrahi A., Hamilton C., Trujillo C., Murga M., Fan R., Chavira A., Thompson A. (2002). Structure-property relationships in cross-linked polyester clay nanocomposites. *Polymer* 43: 3699-3705.
- Bharadwaj R.K. (2001). Modeling the barrier properties of polymer-layered silicate nanocomposites. *Macromolecules* 34: 9189-9192.

- Bilbao-Sainz C., Bras J., Williams T., Sénechal T., Orts, W. (2011). HPMC reinforced with different cellulose nano-particles. *Carbohydrate Polymers* 86: 1549–1557.
- Blankenship S.M., Dole J.M. (2003). 1-Methylcyclopropene: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1–25.
- Bledzki A.K., Gassan J. (1999). Composites Reinforced with Cellulose Based Fibres. *Progress in Polymer Science* 24: 221-274.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484–489.
- Bohlmann G.M. (2005). General characteristics, processability, industrial applications and market evolution of biodegradable polymers. En: Handbook of biodegradable polymers. Inglaterra: Smithers. 183–217.
- Boluk Y., Lahiji R., Zhao L., McDermott M.T. (2011). Suspension viscosities and shape parameter of cellulose nanocrystals (CNC). *Colloids and Surfaces A* 377: 297–303.
- Bondeson D., Mathew A., Oksman K. (2006). Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. *Cellulose* 13: 171–180.
- Bourtoom T. (2008). 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 quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Sci. Technol.*, 28, 25–30.
- Bras J., Hassan M.L., Bruzesse C., Hassan E.A., El-Walki N.A., Dufresne A. (2010). Mechanical, barrier, and biodegradability properties of bagasse cellulose whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. *Industrial Crops and Products* 32: 627–633.
- Braul, M, Maldiney R. (1999). Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 403-412.
- Brinchi L., Cotana F., Fortunati E., Kenny J. M. (2013). Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. *Carbohydrate Polymer*, 94:154–169.
- Brody A.L. (1997). In A. L. Brody & K. S. Marsh (Eds.), *The Wiley encyclopedia of packaging* (2nd ed.). New York:Wiley pp. 699–704.
- Brody A.L., Bugusu B., Han J.H., Koelsch C., McHugh T.R. (2008). Innovative food packaging solutions. *J. Food Sci.* 73, 107-116.
- Brody A.L., Strupinsky E.R., Kline L.R. (2001). Active packaging for food applications. Technomic Publishing Co. Inc. USA.
- Browning B.L. (1967). Methods of Wood Chemistry, vol. II. Interscience/Wiley, New York. 498 págs.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223 – 253.
- CAA (1969). Código alimentario Argentino. En: www.anmat.gov.ar. Visitado Mar 2015.
- Calvert P. (1997). Potential applications of nanotubes. En: Carbon nanotubes. Ed. Ebbesen, T.W.CRC Press, Boca Raton, FL. 277-292.
- Cantu D., Vicente A.R., Labavitch J.M., Bennett A.B., Powell A.L.T. (2008). Strangers in the matrix: Plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends Plant Sc.* 13, 610–617.
- Cao N., Fu Y., He J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films *Food Hydrocoll.* 21: 1153-1162.
- Cao N., Yang X., Fu Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids* 23: 729-735.
- Capron I., Cathala B. (2013). Surfactant free high internal phase emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules* 14: 291-296.
- Carr D.J., Cruthers N.M., Laing R.M., Niven B.E. (2005). Fibers from three cultivars of New Zealand flax (*Phormium tenax*). *Textile Res. J.* 75: 93–98.
- Casierra-Posada F., Fonseca E., Vaughan G. (2011). Fruit quality in strawberry (*Fragaria* sp.) grown on colored plastic mulch. *Agronomía Colombiana* 29: 407-413.
- Chazeau L., Cavallé Y.-J., Canova G., Dendievel R., Bouterin B. (1999). Viscoelastic properties of plasticized PVC reinforced with cellulose whiskers. *Journal of Applied Polymer Science* 71: 1797–1808.

- Cheftel J.L., Cuq J.L., Lorient D. (1985). Capítulo 5: Amino acids, peptides and proteins. En: *Food Chemistry*. Ed.: Fennema O.R. Marcel Dekker Inc, New York, Estados Unidos.
- Cheftel, J. (1998). Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos. Vol. 1. Zaragoza. Acribia.
- Chen J.S., Poliks M.D., Ober C.K., Zhang Y., Wiesner U., Giannelis E.P. (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 Y., Cao X., Chang P.R., Huneault M.A. (2008). Comparative study on the films of poly(vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly(vinyl alcohol)/native pea starch. *Carbohydr. Polym.* 73: 8–17.
- Chen Y., Liu C., Chang P.R., Anderson D.P., Huneault M.A. (2009). Pea starch-based composite films with pea hull fibers and pea hull fiber-derived nanowhiskers. *Polymer Engineering & Science* 49: 369-378.
- Chevillard A, Angellier-Coussy H, Cuq B, Guillard V, César G, Gontard N, Gastaldi E. (2011). How the biodegradability of wheat gluten-based agromaterial can be modulated by adding nanoclays. *Polym. Degrad.&Stabil.* 96: 2088-2097.
- CHFBA. 2005. *Censo Hortiflorícola Provincia de Buenos Aires*. Ministerio de Asuntos Agrarios. Provincia de Buenos Aires. Argentina. pp 115.
- Chiumarelli M., Hubinger M.D. (2012). Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch - Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids* 28: 59-67.
- Chiumarelli M., Hubinger M.D. (2014). Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. *Food Hydrocolloids* 38:20-27.
- Cho S.Y., Lee S.Y., Rhee C. (2010). Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. *LWT - Food Science and Technology* 43: 1234-1239.
- 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.
- Chrissafis K., Antoniadis G., Paraskevopoulos K.M., Vassiliou A., Bikiaris D.N. (2007). Comparative study of the effect of different nanoparticles on the mechanical properties and thermal degradation mechanism of in situ prepared poly(ε-caprolactone) nanocomposites. *Composites Science and Technology* 67: 2165–2174.
- Cisneros-Zeballos L., Krochta J.M. (2003). Whey protein coatings for fresh fruits and relative humidity effects. *J. Food Sc.* 68: 176-181.
- Coleman J.N., Khan U., Blau W.J., Gunko Y.K. (2006). Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube-polymer composites. *Carbon* 44: 1624–1652.
- Condés M.C. (2012). Películas compuestas y nanocompuestas, biodegradables y/o comestibles, en base a proteínas de amaranto y almidones de distinto origen botánico. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, 243 págs.
- Condés M.C., Echeverría I., Añón M.C., Mauri A.N. (2015). Capítulo 15: Nanocompounds as formulating aids. En: *Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications*. Eds.: Montero M.P., Gómez-Guillén M.C., López-Caballero M.E., Barbosa-Cánovas G.V. CRC Press, Taylor & Francis Group. En prensa.
- Coughlan K., Shaw N.B., Kerry J.F., Kerry J.P. (2004). Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *Journal of Food Science* 69: 271-275.
- Cozzolino C.A., Nilsson F., Iotti M., Sacchi B., Piga A., Farris S. (2013). Exploiting the nano-sized features of microfibrillated cellulose (MFC) for the development of controlled-release packaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110: 208– 216.
- Cressy H.K., Jerrett A.R., Osborne C.M., Bremer P.J. (2003). A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *Journal of food protection* 66: 390–395.
- 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: 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: 668-671.

- Cuq B, Gontard N, Guilbert N. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chem.* 75, 1-9.
- 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.
- Curvelo A.A.S., Carvalho A.J.F., Agnelli J.A.M. (2001). Thermoplastic starch cellulosic fiber composites: Preliminary results. *Carbohydrate Polymer*, 45:183-188.
- 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.
- Dainelli D., Gotard N., Spyropoulos D., Zondervan-van den Beuken E., Tobback P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends Food Sci. Technol.* 19, S103-S112.
- Dalev P.G., Patil R.D., Mark J.E., Vassileva E., Fakirov S. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. *J. Appl. Polym. Sci.* 78: 1341-1347.
- 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). Capítulo 2: Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. En: *Edible films and coatings for food applications*. Eds.: Embuscado M.E, Huber K.C. Springer Science+Business Media, New York, Estados Unidos.
- Darby N, Creighton TE. (1995). Disulfide bonds in protein folding and stability. In B.A. Shirley (Ed.), *Protein stability and folding. Theory and practice*. Totowa, New Jersey: Humana Press. 219–252.
- Daud W.R.W., Armstrong W.D. (1988). Conductive drying characteristics of gelatinized rice starch. *Drying Technology* 6: 655-674.
- 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: 959-968.
- de Moraes J.O., Scheibe A.S., Sereno A., Laurindo J.B. (2013). Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *J. Food Engineering*, 119:800-808.
- de Oliveira Romera C., de Moraes J.O., Zoldan V.C., Pasa A.A., Laurindo J.B. (2012). Use of transient and steady-state methods and AFM technique for investigating the water transfer through starch-based films. *Journal of Food Engineering* 109: 62-68.
- de Viegler J.J. (2003). Capítulo 24: Green plastics for food packaging. En: *Novel food packaging techniques*. Ed.: Ahvenainen R. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge.
- Debeaufort F., Quezada-Gallo J.A., Delporte B., Voilley A. (2000). Edible films and coatings. Tomorrow's packaging. *J. Membrane Sci.* 180, 47-55.
- Debeaufort F., Quezada-Gallo J.A., Volley A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packaging: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38 299-313.
- Debeaufort F., Voilley A.Z. (1995). Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified films. *International Journal of Food Science and Technology* 30: 183-190.
- Del Toro-Sánchez C.L., Ayala Zavala J.F., Machi L., Santacruz H., Villegas Ochoa M.A., Alvarez-Parrilla E., González Aguilar G.A. (2010). Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *J. Incl. Phen. & Macroc. Chem.* 67: 431–441.
- Della Valle G., Buléon A., Carreau P.J., Lavoie P.-A., Vergnes B. (1998). Relationship between structure and viscoelastic behavior of plasticized starch. *Journal of Rheology* 42: 507-525.
- Denavi G., Tapia-Blácido D.R., Añón M.C., Sobral P.J.A., Mauri A.N., Menegalli F.C. (2009). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *J. Food Eng.* 90: 341–349.
- Denavi G.A., Mauri A.N., Añón M.C. (2005). Formación y caracterización de películas comestibles emulsionadas a base de proteínas de soja – cera de abejas. En: *X congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos- 1er. Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías*. Libro de Congreso. 1073:1079.
- 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. *LWT – Food Sc. & Tech.* 44: 535-542.
- Díaz-Pérez J.C. (1998). Transpiration rates in eggplant fruit as affected by fruit and calyx different temperature regimes. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7015–7020.
- Doi Y., Fukuda K. (1994). Biodegradable plastics and polymers. Ed. Elsevier. Amsterdam. págs. 479-497.
- Domenek S., Morel M., Bonicel J., Guilbert, S. (2002). Polymerization kinetics of wheat gluten upon thermosetting: a mechanistic model. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50: 5947–5954.

- 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.
- Dufresne A. (2008a). Cellulose-based composites and nanocomposites. En: Gandini A., Belgacem M.N. (Eds.), *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Great Britain, 401–418.
- Dufresne A. (2012). Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials. Walter de Gruyter
- Dufresne A., (2008b). Polysaccharide nanocrystals reinforced nanocomposites. *Canadian Journal of Chemistry* 86: 484–494.
- Dufresne A., Cavaillé J., Helbert W. (1996). New nanocomposite materials: microcrystalline starch reinforced thermoplastic. *Macromol.* 29: 7624–7626.
- Dufresne A., Cavaillé J.Y., Helbert W. (1997). Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. *Polym.Compos.* 18: 198-210.
- Dufresne A., Dupeyre D., Vignon M.R. (2000). Cellulose microfibrils from potato tuber cells: processing and characterization of starch–cellulose microfibril composites. *Journal of Applied Polymer Science* 76: 2080–2092.
- Dufresne A., Vignon M.R. (1998). Improvement of starch film performances using cellulose microfibrils. *Macromolecules*, 31:2693–2696.
- Echeverría I. (2012). Materiales biodegradables en base a proteínas de soja y montmorillonitas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, 275 págs.
- Echeverría I., Eisenberg P., Mauri A.N. (2014). Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *J. Memb. Sci.* 449: 15-26.
- Ensminger L.E., Gieseck J.E. (1939). The absorption of proteins by montmorillonitic clays. *Soil Science.* 48: 467.
- Ensminger L.E., Gieseck J.E. (1941). The absorption of proteins by montmorillonitic clays and its effect on base-exchange capacity. *Soil Science* 51: 125.
- Fabra M.J., Talens P., Chiralt A. (2008). Effect of alginate and λ -carrageenan on tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate–lipid based films. *Carbohydrate Polymers* 74: 419-426.
- Fallik E., Aharoni Y., Grinberg S., Copel A., Klein J.D. (1994). Postharvest hydrogen peroxide treatments inhibit decay in eggplant and red bell pepper. *Crop Prot.* 13: 451-454.
- Famá L.M., Pettarin V., Goyanes S.N. Bernal C.R. (2011). Starch/multi-walled carbon nanotubes composites with improved mechanical properties. *Carbohydrate Polymers* 83: 1226-1231.
- FAOSTAT (2014). FAO statistical databases, food and agriculture organization. : FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Data Center (URL: <http://faostat.fao.org/> Consultado: febrero 2015).
- Ferreira C.O., Nunes C.A., Delgadillo I., Lopes-da-Silva J.A. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International* 42: 807-813.
- 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. *Carbohydr. Polym.* 57: 401–413.
- Fortunati E., Luzi F., Puglia D., Dominici F., Santulli C., Kenny J.M., Torre L. (2014). Investigation of thermo-mechanical, chemical and degradative properties of PLA-limonene films reinforced with cellulose nanocrystals extracted from *Phormium tenax* leaves. *European Polymer Journal* 56: 77–91.
- Fortunati E., Puglia D., Monti M., Peponi L., Santulli C., Kenny J.M., Torre L. (2013). Extraction of Cellulose Nanocrystals from *Phormium tenax* Fibres. *J. Polym. Environ.* 21: 319–328
- Foulk J.A., Bunn J.M. (2001). Properties of compression-molded, acetylated soy protein films. *Industrial Crops and Products* 14: 11-22.
- Franssen L.R., Rumsey T.R., Krochta J.M. (2004). Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. *Journal of Food Science* 69: 347-350.
- Freitas I.R., Cortez-Vega W.R., Pizato S., Prentice-Hernández C., Borges C.D. (2013). Document Xanthan gum as a carrier of preservative agents and calcium chloride applied on fresh-cut apple. *Journal of Food Safety* 33: 229-238.
- Fukuzumi H., Saito T., Iwata T., Kumamoto Y., Isogai A. (2009). Transparent and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation. *Biomacromolecules* 10: 162–165.

- Galiotta 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: 3123-3130.
- Galimberti M. (2012). Capítulo 4: Rubber clay nanocomposites. En: *Advanced elastomers – Technology, properties and applications*. 91-120.
- Garcia de Rodriguez N.L., Thielemans W., Dufresne A. (2006). Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites. *Cellulose* 13: 261–270.
- García M.A., Martino M.N., Zaritzky N.E. (1998). Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria × Ananassa*) quality and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3758-3767.
- Gardini D., Deluca M., Nagliati M., Galassi C. (2010). Flow properties of PLZTN aqueous suspensions for tape casting. *Ceramics International* 36: 1687–1696.
- Geankoplis C.J. (1993). *Transport Processes and Unit Operations*, 3rd Ed. Inc. Prentice Hall, New Jersey.
- Gemili S., Yemenicioğlu A., Altinkaya, S.A. (2010). Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering* 96: 325-332.
- Gennadios A. (2002). *Protein-based films and coatings*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC. USA.
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1835–1839.
- Gennadios A., Ghorpade V.M., Weller C.L., Hanna M.A. (1996). Heat curing of soy protein films. *Transactions of the ASABE* 39: 575-579.
- Gennadios A., Hanna M.A., Kurth L.B. (1997), Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT - Food Science and Technology* 30: 337-350.
- 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.
- Gennadios A., Weller C.L., Gooding C.H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering* 21: 395-409.
- Ghanbarzadeh B., Oromiehi A.R. (2009). Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *Journal of Food Engineering* 90: 517-524.
- Ghorpade V.M., Li H., Gennadios A., Hanna M.A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Trans. ASAE* 38: 1805-1808.
- Giannelis EP. (1996). Polymer layered silicate nanocomposites *Adv. Mat.* 8, 29–35.
- Giménez B., Gómez-Guillén M.E., López-Caballero J., Gómez-Estaca J. Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. *Food Hydrocolloids* 27: 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: 1322-1327.
- Giménez B., Gómez-Guillén M.E., López-Caballero J., Gómez-Estaca J, Montero P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin–egg white films. *Food Hydrocolloids* 27: 475-486.
- Goddard R. (1990). *Packaging Materials*. Pira, Leatherhead, Surrey.
- Golan-Goldhirsh A., Whitaker J.R. (1984). Effect of Ascorbic Acid, Sodium Bisulfite, and Thiol Compounds on Mushroom Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (5):1003-1009.
- Gómez-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: 889-896.
- Gómez Estaca J., Giménez B., Gómez-Guillén C., Montero P. (2009b). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin or a commercial 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: 18-25.
- 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. *J. Food Sci.* 57: 190-195.
- 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.

- González A., Alvarez Igarzabal C.I. (2013). Soy protein e Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids* 33: 289-296.
- González A., Alvarez Igarzabal C.I. (2015). Nanocrystal-reinforced soy protein films and their application as active packaging. *Food Hydrocolloids* 43: 777-784.
- González A., Strumia M.C., Alvarez Igarzabal C.I. (2011). Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering* 106: 331–338.
- González A., Tártara L.I., Palma S.D., Alvarez Igarzabal C.I. (2015). Crosslinked soy protein films and their application as ophthalmic drug delivery system. *Materials Science & Engineering C*. En Prensa.
- González-Gutiérrez J., Partal P., García-Morales M., Gallegos C. (2010). Development of highly-transparent protein/starch-based bioplastics. *Bioresource Technology* 101: 2007-2013.
- Grim R.E., Droste J.B., Bradley W.F. (1960). A mixed-layer clay mineral associated with an evaporate. *Clays and Clay Minerals: Proceedings of the Eighth National Conference*. Págs. 228-236.
- Grotheer P., Marshall M., Simonne A. (2014). Sulfites: Separating Fact from Fiction. FCS8787 IFAS University of Florida. En: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FY/FY73100.pdf>.
- Güçbilmez C.M., Yemenicioğlu A., Arslanoğlu A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International* 40: 80-91.
- Guen M.J.L., Newman R.H. (2007). Pulped *Phormium tenax* leaf fibres as reinforcement for epoxy composites. *Composites: Part A* 38: 2109–2115.
- Guerrero P., Nur Hanani Z.A., Kerry J.P., de la Caba K. (2011). Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. *Journal of Food Engineering* 107: 41–49.
- Guilbert S. (1986). Technology and application of edible protective films. En: *Food packaging and preservation; Theory and practice*. Mathlouthi M (Ed). Elsevier Applied Science, London, UK. 371-394.
- Guilbert S., Cuq B. (2005). Material formed from proteins. En: *Handbook of biodegradable polymers*. Ed. Bastioli, C. Rapra Technology Limited, Shawbury, Shropshire, Shropshire, Inglaterra: Smithers. 339-384.
- Guilbert S., Gontard N., Gorris L.G.M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT - Food Science and Technology* 29: 10-17.
- Guilbert S., Gontard N., Gorris L.G.M. (1996). Prolongation of the shelf life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29: 10-17.
- Guilbert S., Gontard N. (1995). Edible and biodegradable food packaging. En: *Foods and packaging materials—chemical interactions*. Eds.: Ackermann P., Jägerstad M., Ohlsson, T. R. Soc. Chem., Cambridge. Págs. 159-168.
- 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.
- Gusev A.A. (2001). Numerical identification of the potential of whisker- and platelet-filled polymers. *Macromolecules* 34: 3081-3093.
- 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: 142-150.
- Habibi Y., Lucia L. A., Rojas O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: Chemistry, self assembling, and applications. *Chemical Reviews* 110: 3479–3500.
- Habibi Y., Mahrouz M., Vignon M.R. (2009). Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits. *Food Chemistry* 115: 423–429.
- Han J.H., Gennadios A. (2005). Edible films and coatings: a review. En: *Innovations in Food Packaging*. Elsevier, CA. 239–262.
- 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., Krochta J.M. (1999). Wetting properties and water vapor permeability of whey-protein-coated paper. *Transactions of the ASABE* 42: 1375-1382.
- Han J.H., Krochta J.M. (2001). Physical properties and oil absorption of whey-protein-coated paper. *Journal of Food Science* 66: 294-299.

- Hedenqvist M.S., Backman A., Gällstedt M., Boyd R.H., Gedde U.W. (2006). Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. *Composites Science and Technology* 66: 2350-2359.
- Helander I., Nurmaio-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 235-244.
- Hermansson A.M. (1978). Physicochemical aspects of soy proteins structure formation. *J. Texture Stud.* 9: 33-58.
- Hernández Silva, M.L., Guzmán Martínez B. (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 30-39.
- Hernández-Muñoz P., Almenar E., Valle V.D., Velez D., Gavara R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 110:428-435.
- Herrick F.W., Casebier R.L., Hamilton J.K., Sandberg K.R. (1983). Microfibrillated Cellulose: Morphology and accessibility. *J. Appl. Polym. Sci. Appl. Polym. Symp.* 37: 797-813.
- Herron N., Thorn D.L. (1998). Nanoparticles. Uses and relationships to molecular clusters. *Advances Materials* 10: 1173-1184.
- Hettiarachchy N.S., Eswaranandam S. (2005). Edible Films and Coatings from Soybean and Other Protein Sources. En: *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Ed.: Fereidoon Shahidi. John Wiley & Sons, Inc. 6:11.
- 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: 1876-1881.
- Hong S.-I., 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: 739-745.
- Hong Z., Zhang P., He C., Qiu X., Liu A., Chen L. (2005). Nano-composite of poly(l-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 26: 6296-6304.
- Hotchkiss J.H., Watkins C.B., Sanchez D.G. (2007). Release of 1-methylcyclopropene from heat-pressed polymer films. *J. Food Sci.* 72: E330-E334.
- Hotza D., Greil P. (1995). Review: aqueous tape casting of ceramic powders. *Materials Science and Engineering A202*: 206-217.
- Hotza, D. (1997). Colagem de Folhas Cerâmicas. *Cerâmica* 43: 283-284.
- 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., Yu J. (2006). Structure and properties of thermoplastic corn starch/montmorillonite biodegradable composites. *Journal of Applied Polymer Science* 99: 170-176.
- 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 Z.-M., Zhang Y.-Z., Kotaki M., Ramakrishna S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 63: 2223-2253.
- Inskeep W.P., Bloom P.R. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-dimethylformamide and 80% acetone *Plant Physiol.* 77: 483-485.
- Jayaraman K., Halliwell R. (2009). *Harakeke (phormium tenax)* fibre-waste plastics blend composites processed by screwless extrusion. *Composites: Part B* 40: 645-649.
- Jongjareonrak A., Benjakul S., Visessanguan W., Tanaka M. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids* 22: 449-458.
- Kader A.A. (2003). A perspective on postharvest horticulture (1978-2003). *HortSci.* 38: 1004-1008.
- Kader A.A. (2005). Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. *Acta Hort.* 682: 2169-2176.
- Kader A.A. (2002). Postharvest technology of horticultural crops. Third edition. University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311. Págs. 535.

- Kalashnikova I., Bizot H., Cathala B., Capron I. (2012). Modulation of cellulose nanocrystals amphiphilic properties to stabilize oil/water interface. *Biomacromolecules* 13: 267-275.
- Kato A., Nakai S. (1980). Hydrophobicity Determined by a Fluorescence Probe Method and its Correlation with Surface Properties of Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure* 624: 13-20.
- Khanzadi M., Jafari S.M., Mirzaei H., Chegini F.K., Maghsoudlou Y., Dehnad D. (2015). Physical and mechanical properties in biodegradable films of wheyprotein concentrate–pullulan by application of beeswax. *Carbohydrate Polymers* 118: 24–29.
- Kim K.M., Weller C.L., Hanna M.A., Gennadios A. (2002). Heat Curing of Soy Protein Films at Selected Temperatures and Pressures. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35:140–145.
- Kim YD, Morr CV. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1314-1320.
- Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström T., Ankerfors M., Gray D., Dorris A. (2011). Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50: 5438–5466.
- Klemm D., Schumann D., Kramer F., Heßler N., Koth D., Sultanova B. (2009). Nanocellulose materials – Different cellulose, different functionality. *Macromol. Symp.* 280: 60–71.
- 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: 140-145.
- Kong F., Tang J., Rasco B., Crapo, C. (2007). Kinetics of salmon quality changes during thermal processing. *Journal of Food Engineering* 83: 510-520.
- Koshiyama I. (1972). Comparison of acid-induced conformation changes between 7S and 11S globulin in soybean seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 23: 853-859.
- Kowalczyk D., Baraniak B. (2011). Effects of plasticizers, pH and heating of film forming solution on the properties of pea protein isolate films. *J. Food Eng.*, 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., Hashaikeh R., Tiner M. (2011). Modified cellulose morphologies and its composites; SEM and TEM analysis. *Micron* 42: 751–761.
- Krochta J.M. (1997). *Food Proteins and their applications*. Marcel Markk, Inc. New York, USA. Cap. 18, pp. 529-549.
- Krochta J.M., Baldwin E.A., Nisperos-Carriedo M. (1994). Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA.
- Krochta J.M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current, status, and opportunities. En: *Protein-based films and coatings*. Ed.: Gennadios A. CRC Press, Boca Raton, USA. Págs 1-42.
- 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 extrusion. *Journal of Food Engineering* 100: 480-489.
- Kumar R, Zhang L. (2009). Aligned ramie fiber reinforced arylated soy protein composites with improved properties. *Compos. Sci. Technol.* 69:555–560.
- Kumar A., Negi Y.S., Choudhary V., Bhardwaj N.K. (2014). Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste. *Journal of Materials Physics and Chemistry* 2: 1-8.
- Kunanopparat T., Menut P., Morel M.H., Guilbert S. (2008). Reinforcement of plasticized wheat gluten with natural fibers: From mechanical improvement to deplasticizing effect. *Composites: Part A* 39: 777–785.
- 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: R90–R102.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. *Nature* 227: 681-685.
- Lafargue D., Lourdin D., Doublier J-L. (2007). Film-forming properties of a modified starch/K-carrageenan mixture in relation to its rheological behavior. *Carbohydrate Polymers* 70: 101–111.
- 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.

- Larotonda, F.D.S. (2007). Biodegradable films and coatings obtained from carrageenan from *Mastocarpus stellatus* and starch from *Quercus suber*. Tesis Doctoral. Universidade do Porto, Portugal, pp. 136–140.
- Lavoine N., Desloges I., Bras J. (2014). Microfibrillated cellulose coatings as new release systems for active packaging. *Carbohydrate Polymers* 103: 528– 537.
- Lavoine N., Desloges I., Dufresne A., Bras J. (2012). Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydr. Polym.* 90: 735-764.
- LeCorre D., Bras J., Dufresne A. (2010). Starch nanoparticles: a review. *Biomacromolecules* 11: 1139-1153.
- Lee S.R., Park H.M., Lim H.T., Kang K.Y., Li L., Cho W.J., Ha C.S. (2002). Microstructure, tensile properties, and biodegradability of aliphatic polyester/clay nanocomposites. *Polymer* 43: 2495–2500.
- Lee Y.S., Beaudry R., Kim J.N., Hartec B.R. (2006). Development of a 1-methylcyclopropene (1-MCP) sachet release system. *J. Food Sci.* 71: C1–C6.
- Leerahawong A., Arii R., Tanaka M., Osako K. (2011). Edible film from squid (*Todarodes pacificus*) mantle muscle. *Food Chemistry* 124: 177-182.
- Lefebvre J., Popineau Y., Deshayes G., Lavenant L. (2000). Temperature-induced changes in the dynamic rheological behavior and size distribution of polymeric proteins for gluteins from wheat near-isogenic lines differing in HMW glutenin subunit composition. *Cereal Chemistry* 77: 193–201
- Lim LT, Mine Y, Tung MA. (1999). Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature, and glycerol content. *J. Food Sci.* 64: 616–622.
- Limpan N., Prodpran T., Benjakul S., Prasarnpran 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: 85-92.
- 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. *Polym.* 46: 2710-2721.
- 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. *Polym.* 45: 7589-7596.
- López O.V., Lecot C.J., Zaritzky N.E., García M.A. (2011). Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering* 105: 254–263.
- López-Gálvez G., Saltveit M., Cantwell M. (1996). Wound induced phenylalanine ammonia lyase activity: Factors affecting its induction and the quality of minimally processed lettuce. *Postharvest Biol. Technol.* 9: 223-233.
- López-Rubio A., Gavara R., Lagaron J. (2006). Bioactive packaging: Turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 567-575.
- Lu J., Wang T., Drzal L.T. (2008). Preparation and properties of microfibrillated cellulose polyvinyl alcohol composite materials. *Composites: Part A* 39: 738–746.
- Lu J., Wang T., Drzal L.T. (2010). Preparation and properties of microfibrillated cellulose polyvinyl alcohol composite materials. *Composites: Part A* 39: 738–746.
- Lu Y., Weng L., Cao X. (2005). Starch reinforced with cellulose crystallites from cottonseed linter. *Macromol. Biosci.* 5: 1101-1107.
- Lu Y., Weng L., Zhang L. (2004). Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromol.* 5: 1046–1051.
- Luecha J., Sozer N., Kokini J.L. (2010). Synthesis and properties of corn zein/montmorillonite nanocomposite films. *Journal of Materials Science* 45: 3529-3537.
- Ma X., Yu J., Kennedy J.F. (2005). Studies on the properties of natural fibers-reinforced thermoplastics starch composites. *Carbohydrates Polymer*, 62:19-24.
- Majdzadeh-ardakani K., Navarchian A.H., Sadeghi F. (2010). Optimization of mechanical properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* 79: 547-554.
- Manganaris G.A., Vicente A.R., Crisosto C.H., Labavitch J.M. (2007). Effect of dips in a 1-methylcyclopropene-generating solution on ‘Harrow Sun’ plums stored under different temperature regimens. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7015-7020.
- 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: 191-199.

- Marsh K., Bugusu B. (2007). Food packaging-roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science* 72: R39-R55.
- 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 Hydrocoll.* 24: 406–413.
- Massolo J.F., Concellón A., Chaves A.R., Vicente A.R. (2011). 1-Methylcyclopropene (1-MCP) delays senescence, maintains quality and reduces browning of non-climacteric eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 59: 10–15.
- Mastromatteo M., Barbuzzi G., Conte A., Del Nobile M.A. (2009). Controlled release of thymol from zein based film. *IFSET* 10, 222–227.
- Matsuda Y., Ueno K., Hirose M. (2001). Super microfibrillated cellulose process for producing the same, and coated paper and tinted paper using the same. US Patent nº6,183,596.
- Matsudomi N., Sasaki T., Kato A., Kobayashi K. (1985). Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 1251-1256.
- Mauri A.N., Añón M.C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1064-1072.
- Mauri A.N., Añón M.C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH modified microstructures. *Food Sci. Technol. Int.* 14: 119-125.
- Mauri A.N., Añón M.C. (2012). Capítulo 4: Proteínas como envases alimentarios. En: *Películas y Recubrimientos Comestibles: Propiedades y aplicaciones en alimentos*. Eds.: Olivas G.I., Soliva-Fortuní R., Martín-Belloso O., González-Aguilar G. Editorial Clave, México. Pág. 95.
- McCrum N.G., Buckley C.P., Bucknall C.B. (1996). *Principles of Polymer Engineering*, Oxford Science, New York.
- 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.
- Mehryar G.F., Al-Qadiri H.M., Swanson B.G. (2014). Edible coatings and retention of potassium sorbate on apples, tomatoes and cucumbers to improve antifungal activity during refrigerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 38: 175-182.
- Mei Y., Zhao Y., Yang J., Furr H.C. (2002). Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *Journal of Food Science* 67: 1964-1968.
- 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.
- Mihindukulasuriya S.D.F., Lim L.-T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology* 40: 149-167
- Min Z., Song Y., Zheng Q. (2008). Influence of reducing agents on properties of thermo-molded wheat gluten bioplastics. *Journal of Cereal Science* 48: 794–799.
- Mohanty A. K., Misra M., Hinrichsen G. (2000). Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: an overview. *Macromolecular Materials and Engineering* 276/277: 1–24.
- Mondry H. (1996). Packaging systems for processed meat. In S. A. Taylor, A. Raimundo, M. Severini, F.J.M. Smulders (Eds.), *Meat quality and meat packaging*. Utrecht, Holland: ECCEAMST. pp. 323–333.
- 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.
- Montero-Prado P., Rodríguez-Lafuente A., Nerin C. (2011). Active label-based packaging to extend the shelf-life of “Calanda” peach fruit: Changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biol. Technol.* 60, 211–219.
- Moraes J.O. (2013). *Produção e caracterização de filmes de amido-glicerol-fibras de celulose elaborados por tape-casting*. Tesis Doctoral. Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil. 176 págs.
- Moraes J.O., Reszka A., Laurindo J.B. (2014). Espalhamento e secagem de filme de amido glicerol fibra preparado por tape casting. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 49: 136-143.

- Moreira R., Chenlo F., Torres M. D., Silva C., Prieto D. M., Sousa A.M.M., Hilliou L., Gonçalves M.P. (2011). Drying Kinetics of Biofilms Obtained from Chestnut Starch and Carrageenan with and without Glycerol. *Drying Technology: An International Journal* 29: 1058-1065.
- Moreno M.M, Moreno A. (2008). Effect of different biodegradable and polyethylene mulches on soil properties and production in a tomato crop. *Scientia Horticulturae* 116: 256–263.
- Moretti C.L., Araujo A.L., Marouelli W.A., Silva W.L.C. (2002). 1-Methylcyclopropene delays tomato fruit ripening. *Hortic. Bras.* 20: 659–663.
- Morgan R.G., Steffe J.F., Ofoli R.Y. (1983). A generalized model for extrusion of protein dough. *Journal of Food Process Engineering* 11: 55-78.
- Morgan, A.B., and Gilman, J.W. (2003). Characterization of polymer-layered silicate (clay) nanocomposites by transmission electron microscopy and Xray diffraction: a comparative study. *Journal of Applied Polymer Science* 87: 1329–1338.
- Mostofi Y., Toivonen P.M.A., Lessani H., Babalar M., Lu C.W. (2003). Effects of 1-methylcyclopropene on ripening of greenhouse tomatoes at three storage temperatures. *Postharvest Biol. Technol.* 27: 285–292.
- Mukherjee T., Czaka M., Kao N., Gupta R.K., Choi H.J., Bhattacharya S. (2014). Dispersion study of nanofibrillated cellulose based poly(butyleneadipate-co-terephthalate) composites. *Carbohydrate Polymers* 102: 537– 542.
- Müller C.M.O., Laurindo J.B., Yamashita F. (2009a). Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. *Food Hydrocolloids* 23:1328-1333.
- Müller C.M.O., Laurindo J.B., Yamashita F. (2009b). Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. *Carbohydrate Polymers* 77: 293–299.
- Mungara P., Zhang J., Zhang S., Jane J. (2002). Soy protein utilization in compression-molded, extruded, and injection-molded degradable plastics. En: *Protein based films and coatings*. Ed.: Gennadios A. CRC Press, USA. Págs. 621-638
- 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: 102-107.
- Nadarajah D, Han JH, Holley RA. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef patties containing non-heated mustard flour. IFT Annual Meeting – USA.
- Netravali A.N., Huang X., Mizuta K. (2007). Advanced Green Composites. *Advanced Composite Materials* 16: 269–282.
- Newman R.G., Clauss E.C., Carpenter J.E.P., Thumm A. (2007). Epoxy composites reinforced with deacetylated Phormium tenax leaf fibres. *Composites: Part A* 38: 2164–2170.
- Nielsen N. (1985a). Structure of soy proteins. En: *New proteins foods 5: Seed storage proteins*. Eds.: A. Altshul, H. Wilcke. 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: 1680-1686.
- Nisperos-Carriedo M.O., Buslig B.S., Shaw P.E. (1992). Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1127-1130.
- Noishiki Y., Nishiyama Y., Wada M., Kuga S., Magoshi J. (2002). Mechanical properties of silk fibroin–microcrystalline cellulose composite films. *J. Appl. Polym. Sci.* 86: 3425-3429.
- 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: 377-384.
- Novaes Azevedo A., Ribeiro Buarque P., Oliveira Cruz O.M., Fitzgerald Blank A., Barreto Alves P., Nunes M.L., Lins de Aquino Santana L.C. (2014). Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. *Food Control* 43: 1–9.
- Ojijo V., Sinha-Ray S. (2013). Processing strategies in bionanocomposites. *Progress in Polymer Science* 38: 1543-1589.

- 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.
- 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.
- Ortiz C.M., Mauri A.N., Vicente A.R. (2013). Use of soy protein based 1-methylcyclopropene-releasing pads to extend the shelf life of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 20:281-287.
- 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: 205-210.
- Oussalah M., Caillet S., Salmieri 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. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5598-5605.
- Oz A.T., Ulukanli Z. (2012). Application of edible starch-based coating including glycerol plus oleum Nigella on arils from long-stored whole pomegranate fruits. *Journal of Food Processing and Preservation* 36: 81-95.
- 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: 215-224.
- Pääkkö M., Ankerfors M., Kosonen H., Nykänen A., Ahola S., Österberg M., Ruokolainen J., Laine J., Larsson P.T., Ikkala O., Lindström T. (2007). Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules* 8: 1934-1941.
- 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. *J. Env. Polym. Degr.* 2: 211-217.
- Paillet M., Dufresne A. (2001). Chitin whisker reinforced thermoplastic nanocomposites. *Macromol.* 34, 6527-6530.
- Pan H., Jiang B., Chen J., Jin Z. (2014). Blend-modification of soy protein/lauric acid edible films using polysaccharides. *Food Chemistry* 151: 1-6.
- Pan Y., Wu T., Bao H., Li L. (2011). Green fabrication of chitosan films reinforced with parallel aligned graphene oxide. *Carbohydrate Polymers* 83: 1908-1915.
- Paralikar S.A., Simonsen J., Lombardi J. (2008). Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanocrystals barrier membranes. *Journal of Membrane Science* 320: 248-258.
- Park H.M., Lee W.K., Park C.Y., Ha C.S. (2003). Environmentally friendly polymer hybrids. Part I mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *Journal of Materials Science* 38: 909-915.
- Park H.M., Mohanty A., Misra M., Drzal L.T. (2004). "Green" nanocomposites from cellulose acetate bioplastic and clay: effect of eco-friendly triethyl citrate plasticizer. *Biomacromolecules* 5: 2281-2288.
- Park S-I, Zhao Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1933-1939.
- Park H.J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 254-260.
- Pasquini D., de Moraes Teixeira E., da Silva Curvelo A.A., Belgacem M.N., Dufresne A. (2010). Extraction of cellulose whiskers from cassava bagasse and their applications as reinforcing agent in natural rubber. *Industrial Crops and Products* 32: 486-490.
- Paetau I., Chen C-Z., Jane J-L. (1994). Biodegradable Plastic Made from Soybean Products. 1. Effect of Preparation and Processing on Mechanical Properties and Water Absorption. *Ind. Eng. Chem. Res.* 33: 1821-1827.
- Pearson A.M. (1983). Soy proteins. En: *Developments in Food Protein-2 (edición)*. Ed.: Hudson B.J.F. Applied Science. Pub., Londres, Inglaterra. Págs. 67-108
- Pelissari F.M., Grossmann M.V.E., Yamashita F., Pineda E.A.G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7499-7504.
- Peng Z., Kong L.X. (2007). Morphology of self-assembled polyvinyl alcohol/Silica nanocomposites studied with atomic force microscopy. *Polym. Bull.* 59: 207-216.

- Pereda M., Aranguren M.I., Marcovich N.E. (2010). Caseinate films modified with tung oil. *Food Hydrocolloids* 24: 800-808.
- Pérez-Gago M.B., Krochta J.M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 996-1002.
- Pérez-Gago M.B., Rhim J.W. (2014). Capítulo 13: Edible coating and film materials: lipid bilayers and lipid emulsions. En: *Innovations in Food Packaging (Second Edition)*, Academic Press, 325-350.
- Pérez-Gago M.B., Nadaud P., Krochta J.M. (1999). Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science* 64: 1034-1037.
- Pérez-Gago M.B. (2012). Protein coatings. En: *Edible Coatings to Improve Food Quality (2nd edition)*. Eds.: Baldwin E.A., Hagenmaier R. CRC Press. Florida, USA. pp. 13-77.
- Pérez-Mateos M., Montero P., Gómez-Guillén M.C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids* 23: 53-61.
- Petersen 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 and Technology* 10: 52-68.
- Peterson L., Oksman K. (2006). Biopolymer based nanocomposites: comparing layered silicates and microcrystalline cellulose as nanoreinforcement. *Comp. Sci. Technol.* 66: 2187-2196.
- Petersson L., Kvien I., Oksman K. (2007). Structure and thermal properties of poly(lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposites materials. *Composites Science and Technology* 67: 2535-2544.
- 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: 1891-1896.
- Pires C., Ramos C., Teixeira B., Batista I., Nunes M. L., Marques A. (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids* 30: 224-231.
- Plackett D., Anturi H., Hedenqvist M., Ankerfors M., Gällstedt M., Lindström T., Siró I. (2010). Physical properties and morphology of films prepared from microfibrillated cellulose and microfibrillated cellulose in combination with amylopectin. *Journal of Applied Polymer Science* 117: 3601-3609.
- Pomet M., Redl A., Guilbert S., Morel M-H. (2005). Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials. *Journal of Cereal Science* 42: 81-91.
- Pretel M.T., Martínez-Madrid, M.C., Matínez J.R., Carreño J.C., Romojaro F. (2006). Prolonged storage of 'Aledo' table grapes in a slightly CO₂ enriched atmosphere in combination with generators of SO₂. *LWT* 39: 1109-1116.
- Prodpran T., Benjakul S., Artharn A. (2007). Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 605-614.
- Prohens J., Rodríguez-Burruezo A., Raigón M.D., Nuez F. (2007). Total phenolic concentration and browning susceptibility in a collection of different varietal types and hybrids of eggplant: implications for breeding for higher nutritional quality and reduced browning. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 132: 638-646.
- Puppo M.C., Añón M.C. (1999). Soybean protein dispersions at acid pH thermal and rheological properties. *Journal of Food Science* 64: 50-56.
- Quezada Gallo J.A., Frédéric Debeaufort F.C., Voilley A. (2000). Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science* 180: 37-46.
- Quilaqueo Gutiérrez M., Echeverría I., Ihl M., Bifani V., Mauri A.N. (2012). Carboxymethylcellulose-montmorillonite nanocomposite films activated with murta (*Ugni molinae Turcz*) leaves extract. *Carbohydrate Polymers* 87: 1495-1502.
- Rangavajhyaba N., Ghorpade V., Hanna M. (1997). Solubility and molecular properties of heat-cured soy protein films. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4204-4208.
- Rao Y.Q. (2007). Gelatine-clay nanocomposites of improved properties. *Polymer* 48: 5369-5375.
- Ray S.S., Okamoto M. (2003). Polymer/layered silicate nanocomposite: a Review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science* 28: 1539-1641.

- Raybaudi-Massilia R.M., Rojas-Graü M.A., Mosqueda-Melgar J., Martín-Belloso O. (2008). Comparative study on essential oils incorporated into an alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples. *J. Food Prot.*, 71, 1150–1161.
- Rayner M., Ciolfi V., Maves B., Stedman P., Mittal G.S. (2000). Development and application of soy-protein films to reduce fat intake in deep-fried foods. *J Sci Food Agric* 80: 777-782.
- Reddy M.M., Vivekanandhan S., Misra M., Bhatia S.K., Mohanty A.K. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science* 38: 1653-1689.
- Redl A., Morel M.H., Bonicel J., Guilbert S., Vergnes B. (1999a). Rheological properties of gluten plasticized with glycerol: dependence on temperature, glycerol content and mixing conditions. *Rheologica Acta* 38: 311–320.
- Redl A., Morel M.H., Bonicel J., Vergnes B., Guilbert, S. (1999b). Extrusion of wheat gluten plasticized with glycerol: influence of process conditions on flow behavior, rheological properties, and molecular size distribution. *Cereal Chemistry* 76: 361–370.
- Reid M.S., Staby G.L. (2008). A brief history of 1-methylcyclopropene. *HortSci.* 43: 83–85.
- Reis R.C., Correa P.C., Devilla I.A., Santos E.S., Ascheri D.P.R., Servulo A.C.O., Medeiros e Souza A.B. (2013). Drying of yam starch (*Discorea* ssp.) and glycerol filmogenic solutions at different temperatures. *LWT - Food Science and Technology* 50: 651-656.
- Remondetto G.E., González R.J., Añón M.C. (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. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4937-4941.
- Rhim J.W., Ng P.K. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 411–433.
- Rhim J.W., Wu Y., Weller C.L., Schnepf M. (1999). Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. *J. Food Sci.* 64: 149-152.
- Rhim J-W., Perry K.W.N.G. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47: 411–433.
- Richard M.E., Twiname E.R. (2000). Tape Casting: Theory and Practice. American Ceramics Society, USA, p 293.
- Rico D., Martín-Diana A.B., Barat J.M., Barry-Ryan C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 373-386.
- 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.
- 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: 634-641.
- Rooney ML. (1995). *Active Food Packaging*. Blackie Academic & Professional. UK. pp 74-110.
- Rosa I.M.D., Santulli C., Sarasini F. (2010). Mechanical and thermal characterization of epoxy composites reinforced with random and quasi-unidirectional untreated *Phormium tenax* leaf fibers. *Materials and Design* 31: 2397–2405.
- 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: 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.
- Rouilly A., Rigal L. Agro-materials: a bibliographic review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 42: 441-479.
- Sakurada I., Nukushina Y., Ito T. (1962). Experimental determination of the elastic modulus of crystalline regions in oriented polymers. *Journal of Polymer Science* 57: 651–660.

- Salas C., Rojas O.J., Lucia L.A., Hubbe M.A., Genzer J. (2013). On the surface interactions of proteins with lignin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5: 199–206.
- Salgado P. (2009). Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicaciones en la industria alimentaria. Tesis doctoral. UNLP.
- Salgado P., Fernández G., Drago S., Mauri A. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids* 25: 1433-1440.
- Salgado P.R., Drago S.R., Molina Ortiz S.E., Petruccelli S., Andrich O., González R.J., Mauri A.N. (2012). Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT - Food Science and Technology* 45: 65-72.
- Salgado P.R., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén M.C., Mauri A.N., Montero M.P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids* 33: 74-84.
- Salgado P.R., Molina Ortiz S.E., Denavi G.A., Bosch M.A., Añón M.C., Mauri A.N. (2015). Influence of initial protein structure on the properties of soybean protein edible films. En: *Soy-Based Bioplastics*. Eds.: Thakur V.K., Thakur M.K., Kessler M.R. Ed.: Smithers Rapra Publisher, UK. En prensa.
- Salgado P.R., Molina Ortiz S.E., Petruccelli S., Mauri A.N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids* 24: 525-533.
- Salgado P.R., Schmidt V.C., Molina Ortiz S.E., Mauri A.N., Laurindo J.B. (2008). Biodegradable foams based on cassava starch, sunflower proteins and cellulose fibers obtained by a baking process. *Journal of Food Engineering* 85:435–443.
- Salunkhe D.K., Desai B.B. (1984). *Postharvest biotechnology of fruits*. Volume I. CRC press Inc. USA.
- Samir A.M.A., Alloin F., Dufresne A. (2005). Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules* 6: 612–626.
- Samir, M. A. S. A., Alloin, F., Gorecki, W., Sanchez, J., & Dufresne, A. (2004). Nanocomposite polymer electrolytes based on poly (oxyethylene) and cellulose nanocrystals. *J. Phy. Chem. B* 108: 10845–10852.
- Sanchez-Garcia M., Lagaron J. (2010). Novel clay-based nanobiocomposites of biopolyesters with synergistic barrier to UV light, gas, and vapour. *Journal of Applied Polymer Science* 118: 188–99.
- 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: 246-253.
- Scarascia-Mugnozza G., Schettini E., Vox G., Malinconico M. Immirzi B., Pagliara S. (2006). Mechanical properties decay and morphological behaviour of biodegradable films for agricultural mulching in real scale experiment. *Polymer Degradation and Stability* 91: 2801-2808.
- Scheibe A.S. (2012). Produção e caracterização de embalagem biodegradável de amido de mandioca e fibras usando a técnica de *tape-casting*. Tesis doctoral. Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil. 131 págs.
- Scheibe A.S., De Moraes J.O., Laurindo J.B. (2014). Production and characterization of bags from biocomposite films of starch-vegetal fibers prepared by tape casting. *J. Food Process Eng.*, 37 (5):482-492.
- Schmidt V.C.R., Porto L.M., Laurindo J.B. (2013). Water vapor barrier and mechanical properties of starch films containing stearic acid. *Industrial Crops and Products* 41: 227–234.
- Seacheol M., Krochta J.M. (2007). Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 2964-2969.
- Segal L, Creely J.J., Martin A.E., Conrad C.M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal* 29: 786-794.
- 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: 639-644.
- 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.
- Shih, F.F. (1994). Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effects on film properties. *J. AOCS* 71: 1281-1285
- Shiukhy S., Raeini-Sarjaz M., Chalavi V. (2014). Colored plastic mulch microclimates affect strawberry fruit
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299: 152–153.

- 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., Khansari S., Yarin A.L., Pourdeyhimi B. (2012). Effect of Chemical and Physical Cross-Linking on Tensile Characteristics of Solution-Blown Soy Protein Nanofiber Mats. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51: 15109–15112.
- Sinha-Ray S., Okamoto M. (2003a). Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science* 28: 1539–1641.
- Sinha-Ray S., Okamoto M. (2003b). New polylactide/layered silicate nanocomposites: open a new dimension for plastics and composites. *Macromolecular Rapid Communications* 24: 815–840.
- Siqueira G., Bras J., Dufresne A. (2010). Cellulosic bionanocomposites: a review of preparation, properties and applications. *Polymers* 2: 728-765.
- Siqueira G., Bras J., Dufresne A. (2009). Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites. *Biomacromolecul.* 10: 425-432.
- 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: 770-775.
- Siró I., Plackett D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* 17: 459–494.
- Sirviö J.A., Lämätäinen H., Niinimäki J., Hormi O. (2013). Sustainable packaging materials based on wood cellulose. *RSC Adv.* 3: 16590–16596.
- Sitio web del portal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina. En: <http://www.minagri.gob.ar/site/institucional/biblioteca>. Consultado: febrero de 2015.
- 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: 781-785.
- Soazo M., Rubiolo A.C., Verdini R.A. (2011). Effect of drying temperature and beeswax content on physical properties of whey protein emulsion films. *Food Hydrocolloids* 25: 1251-1255.
- Song Y., Zheng Q. (2014). Ecomaterials based on food proteins and polysaccharides. *Polymer Reviews* 54: 514-571.
- Song, F., Tang, D-L., Wang, X-L. & Wang, Y-Z. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: A review. *Biomacromolecules*, 12, 3369-3380.
- Sonia A., Dasan K.P., Alex R. (2013). Celluloses microfibrils (CMF) reinforced poly (ethylene-co-vinyl acetate)(EVA) composites: Dynamic mechanical, gamma and thermal ageing studies. *Chemical Engineering Journal* 228: 1214-1222.
- Sorgentini D.A., Wagner J.R., Añón M.C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationships of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2471-2479.
- Sorrentino A., Gorrasi G., Vittoria V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology* 18: 84-95.
- Sorrentino A., Tortora M., Vittoria V. (2006). Diffusion behavior in polymer–clay nanocomposites. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 44: 265–274.
- Sothornvit R., Krochta J.M. (2005). Plasticizers in edible films and coatings. En: *Innovations in Food Packaging*, Elsevier, CA, 403-433.
- Staswick P.E., Hermodson M.A., Nielsen N.C. (1984). Identification of the cystines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 13431-13435.
- Steffe I.F. (1996). *Rheological Methods in Foods Processing Engineering*. Second edition. Freeman Press, Michigan.
- 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: 266-276.
- Sudesh K., Iwata T. (2008). Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean* 36: 433-442.

- Sultanbawa Y. (2011). Plant antimicrobials in food applications: Minireview. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Ed.: A. Méndez-Vilas. 1084-1093.
- Suriyamongkol P., Weselake R., Narine S., Moloney M., Shah S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. A review. *Biotechnology Advances* 25: 148-175.
- Swenson H.A., Miers J.C., Schultz T.H., Owens H.S. (1953). Pectinate and pectate coatings. II. Application to nut and fruit products. *Food Technol.* 7:232–235.
- Syverud K., Stenius P. (2009). Strength and barrier of MFC films. *Cellulose* 16: 75-85.
- Taber H., Perkins-Veazie P., Li S., White W., Rodermeil S., Xu Y. (2008). Enhancement of tomato fruit lycopene by potassium is cultivar dependent. *HortSci.* 43: 159–165.
- 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.
- Tanimoto Y., Hayakawa T., Nemoto K. (2005). Tape-casting technique can prepare beta-TCP sheets with uniform thickness and flexibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 73: 157-163.
- Tapia-Blácido D., Sobral P.J., Menegalli F.C. (2005). Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering* 67: 215–223.
- Tapia-Blácido D.R., do Amaral Sobral P.J., Menegalli F.C. (2013). Effect of drying conditions and plasticizer type on some physical and mechanical properties of amaranth flour films. *LWT - Food Science and Technology* 50: 392-400.
- TAPPI. (2000-2001). Acid-Insoluble Lignin in Wood and Pulp. T222om-98. TAPPI Test Methods. Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Atlanta, USA.
- Tashiro K., Kobayashi M. (1991). Theoretical evaluation of three-dimensional elastic constants of native and regenerated celluloses: Role of hydrogen bonds. *Polymer* 32: 1516–1526.
- Teixeira E.M., Pasquini D., Curvelo A.A.S., Corradini E., Belgacem M.N., Dufresne A. (2009). Cassava bagasse cellulose nanofibrils reinforced thermoplastic cassava starch. *Carbohydrate Polymers* 78: 422-431.
- Terry L.A., Ilkenhans T., Poulston S., Rowsell L., Smith A.W.J. (2007). Development of new palladium-promoted ethylene scavenger. *Postharvest Biol. Technol.* 45: 214–220.
- Tetto J.A., Steeves D.M., Welsh E.A., Powell B.E. (1999). Biodegradable poly(caprolactone)/clay nanocomposites. *ANTEC*. 1628–1632.
- 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.
- Thanh V.H., Shibasaki, K. (1976). Major proteins of soybean seeds - straightforward fractionation and their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 1117-1121
- Thanh V.H., Shibasaki K. (1978). Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 692-695.
- Thellen C., Orroth C., Froio D., Ziegler D., Lucciarini J., Farrell R., D'Souza N.A., Ratto J.A. (2005). Influence of montmorillonite layered silicate on plasticized poly (L-lactide) blown films. *Polymer* 46: 11716–11727.
- Trotignon J., Verdu J., Piperaud M., Dobraczinski A. (1989). Précis de matières plastiques: Structures, Propriétés, Mise en oeuvre et Normalisation AFNOR, 4 Ame Ed. Nathan, Paris.
- Tunc S., Angellier H., Cahyana Y., Chalier P., Gontard N., Gastaldi E. (2007). Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *J. Membr. Sci.* 289: 159-168.
- Turbak A.F., Snyder F. W., Sandberg K. R. (1983). Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. *J. Appl. Polym. Sci. Appl. Polym. Symp.* 37: 815 – 827.
- Turhan K.N., Özge Erdohan Sancak Z., Ayana B., Ergođdu 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.
- Tzortzakis NG. (2007). Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *IFSET*. 8: 111–116.
- Urbain W.M. (1977). Radiation Chemistry of Proteins. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam.
- Utsumi S., Matsumura Y. (1997). Structure-function relationships of soy proteins. En: *Food Proteins and Their Applications*. Ed.: Damodaran S., Paraf A. Marcel Dekker, New York. Págs: 257-291.

- van der Zee, M. (2005). Capítulo 1: 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. Págs. 1-22.
- 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*. Dinamarca: KVL. 13-44.
- Vanin F.M., Sobral P.J.A., Menegalli F.C., Carvalho R.A., Habitante AMQB. (2005). Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids* 19: 899-907.
- 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: 65-74.
- Ventureira J.L. (2010). Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto. Tesis Doctoral. ISBN 978-950-34-0815-5. Universidad Nacional de La Plata, 195 págs.
- Vermeiren L., Devlieghere F., van Beest M., de Kruijt N., Debevere J. (1999). Developments in the active packaging of food. *Trends Food Sc. & Technol.* 10: 77-86.
- Vieira M.G.A., da Silva M.A., dos Santos L.O., Beppu M.M. (2011). Natural based plasticizers and biopolymer films: a review. *Eur. Polym. J.* 47: 254-263.
- Vioque J., Sanchez R., Pedroche J., Yust M., Millán F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y Aceites* 52: 127-131.
- Vladimirov V., Betchev C., Vassiliou A., Papageorgiou G., Bikiaris D. (2006). Dynamic mechanical and morphological studies of isotactic polypropylene/fumed silica nanocomposites with enhanced gas barrier properties. *Composites Science and Technology* 66: 2935-2944.
- Vogelsang D.F., Perilla J.E., Buitrago G., Algecira N.A. (2014). Preparation of biopolymer films by aqueous tape casting processing. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 30: 435-448.
- Wagner J.R., Sorgentini D.A., Añón M.C. (1996). Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1881-1889.
- Wagner J.R., Guéguen J. (1995). Effects of dissociation, deamidation and reducing treatment on structural and surface active properties of soy glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1993-2000.
- Wollerdorfer M., Bader H. (1998). Influence of natural fibers on the mechanical properties of biodegradable polymers. *Industrial Crops and Products* 8: 105-112.
- Wambua P., Ivens J., Verpoest I. (2003). Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics. *Composites Science and Technology* 63: 1259-1264.
- Wang M., Olszewska A., Walther A., Malho J.-M., Schacher F.H., Ruokolainen J., Ankerfors M., Laine J., Berglund L., Österberg M., Olli I. (2011). Colloidal ionic assembly between anionic native cellulose nanofibrils and cationic block copolymer micelles into biomimetic nanocomposites. *Biomacromolecul.* 12: 2074-2081.
- Watkins C.B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.* 24: 389-409.
- Weber C.J. (2000). Bio-based packaging materials for the food industry: status and perspectives. Frederiksberg: KVL. 136 págs.
- Weber C.J., Haugaard V., Festersen R., Bertelsen G. (2002). Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Additives and Contaminants* 19: 172-177.
- Weller C., Gennadios A., Saravia R. (1998). Edible bilayer films from zein grain sorghum wax or carnauba wax. *LWT Food Sci. Technol.* 31: 279-285.
- Weston R.J., Smith G.J., Scheele S.M., Williams S.H. (2012). Accelerated hydrothermal degradation of fibres of *Phormium tenax* (New Zealand flax). *Journal of Cultural Heritage* 13: 413-418.
- Wolf W.J. (1970). Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18: 969-976.
- Wollerdorfer M., Bader H. (1998). Influence of natural fibers on the mechanical properties of biodegradable polymers. *Industrial Crops and Products* 8: 105-112.

- Wonish A., Polfer P., Kraft T. (2011). A Comprehensive Simulation Scheme for Tape Casting: From Flow Behavior to Anisotropy Development. *J. Am. Ceram. Soc.* 94: 2053-2060.
- Wu Y., Weller C.L., Hamouz F., Cuppet S.L., Schnepf M. (2002). Development and application of multicomponent edible coatings and films: a review. *Advances in Food and Nutrition Research* 44: 347-394.
- Xu X., Liu F., Jiang L., Zhu J.Y., Haagenson D., Wiesenborn D.P. (2013). Cellulose Nanocrystals vs. Cellulose Nanofibrils: A Comparative Study on Their Microstructures and Effects as Polymer Reinforcing Agents. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5: 2999-3009.
- Yamauchi F., Yamagishi, T., Iwabuchi S. (1991). Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Review International* 7: 283-322.
- Yang L., Paulson A.T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International* 33: 571-578.
- Yemm E.W., Willis A.J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57: 508-514.
- Yildirim A., Mavi A. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argenta* Desf Ex DC), sage (*Salvia tribola* L.), and black tea (*Camelia sinensis*) extracts. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5030-5034.
- Zahedi Y., Ghanbarzadeh B., Sedaghat N. (2010). Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering* 100: 102-108.
- Zhang H., Mittal G. (2010). Biodegradable protein-based films from plant resources: a review. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 23: 203-220.
- Zhang J., Mungara P., Jane J. (2001). Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer* 42: 2569-2578.
- Zhang L., Sun X.S. (2008). Effect of Sodium Bisulfite on Properties of Soybean Glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11192-11197.
- Zhao R., Torley P., Halley P.J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science* 43: 3058-3071.
- Zhuang R., Beuchat L.R., Chinnan M.S., Shewfelt R.L., Huang Y.W. (1996). Inactivation of *Salmonella montevideo* on tomatoes by applying cellulose-based edible films. *J. Food. Prot.* 59: 808-812.
- Zimmermann T., Bordeanu N., Strub E. (2010). Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. *Carbohydrate Polymers* 79: 1086-1093.
- Zimmermann T., Pöhler E., Geiger T. (2004). Cellulose fibrils for polymer reinforcement. *Advanced Engineering Materials* 6: 754-761.

ANEXO I: REVISION BIBLIOGRÁFICA

USO COMBINADO DE TRATAMIENTOS FÍSICOS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES EN LOS PRODUCTOS FRESCOS

Resumen

En esta revisión se describen los principios generales y las tendencias recientes en recubrimientos comestibles de productos frescos. También se discuten algunas de las características que pueden vincular a las aplicaciones de recubrimientos con los métodos físicos empleados en el manejo poscosecha (atmósferas modificadas, tratamientos térmicos e irradiación). Los recubrimientos de productos enteros y mínimamente procesados frescos deben considerarse un complemento a un control adecuado de la temperatura. En ese sentido los trabajos orientados a determinar la eficacia de recubrimientos comestibles deberían comparar sus beneficios bajo condiciones adecuadas de almacenamiento poscosecha (temperaturas óptimas y alta humedad relativa con un retraso mínimo en las aplicaciones). En la última década se han realizado numerosas investigaciones para generar combinaciones de recubrimientos comestibles que respondan a las necesidades específicas de las frutas y hortalizas. Mejoras sustanciales en las propiedades de los materiales (por ejemplo, a través de la evaluación de los constituyentes de la matriz novedosos, así como mediante el desarrollo de recubrimientos en multi-capa, *blends* o nanocompuestos) son todavía posibles. A pesar de su larga historia relativa como tratamientos para reducir el deterioro y su clasificación conjunta como metodologías amigables con el ambiente, las tecnologías de recubrimientos y los métodos físicos poscosecha han evolucionado en forma independiente. La combinación de ambas estrategias puede ser útil para aumentar los beneficios desde el punto de vista del mantenimiento de la calidad de los alimentos. En lugar de limitarse a lograr efectos aditivos como consecuencia de la aplicación de varios tratamientos en forma secuencial creemos que la colaboración activa entre los investigadores que trabajan en tratamientos físicos de poscosecha y recubrimientos comestibles ofrece oportunidades para desarrollar enfoques innovadores que maximizan los beneficios de estos tratamientos. Una de las áreas a explorar más profundamente es la aplicación de tratamientos físicos durante o después de la formación de los recubrimientos, lo que puede mejorar las propiedades de los materiales induciendo en forma simultánea respuestas horméticas en los vegetales. Las estrategias de generación de atmósferas modificadas inducidas por el empleo de recubrimientos deben ser

revisadas y mejoradas. La potencialidad de utilizar tratamientos físicos leves post-recubrimiento para inducir cambios favorables en los materiales y facilitar la liberación de los principios activos es un área que aún debe ser explorada. Por último, la investigación dirigida a resolver las dificultades técnicas que surgen durante los procesos de escalado a nivel comercial es necesaria para facilitar la transferencia de aplicaciones de recubrimientos de la academia a la industria.

Palabras clave: recubrimientos, biopolímeros, tratamientos físicos

1. Tecnología poscosecha en el siglo 21: re-utilización y mejora de herramientas tradicionales

La ciencia de la poscosecha ha avanzado en forma marcada en los últimos años. La secuenciación de algunas especies de frutas y vegetales importantes, el desarrollo de metodologías de alto rendimiento analítico (*omic*), y el progreso del conocimiento de la regulación epigenética de desarrollo de las plantas está contribuyendo a aumentar nuestra comprensión sobre la fisiología de las frutas y hortalizas frescas [1-4]. Algunas tecnologías relativamente nuevas, como la de un inhibidor de la acción del etileno, el 1-metilciclopropeno, y el refinamiento de atmósferas controladas dinámicas han proporcionado otras formas de modular la maduración y la senescencia [5-8]. A pesar de este progreso el principal desafío a escala mundial sigue siendo el desarrollo de herramientas que permitan mantener la seguridad, la calidad nutricional y organoléptica de los productos recién cosechados y reducir las altas pérdidas que se producen durante la distribución y el almacenamiento [9].

En los últimos años se ha incrementado el interés del empleo de tratamientos físicos (tratamientos térmicos de alta temperatura, irradiación) y recubrimientos comestibles naturales para prevenir el deterioro de frutas y hortalizas [10]. La concepción de estas técnicas como “amigables con el ambiente” [11] ha despertado el interés de la industria y la academia. Los tratamientos físicos poscosecha y las aplicaciones de recubrimientos comestibles han evolucionado de forma relativamente independiente. Sin embargo, pueden tener un grado de complementariedad en el manejo de poscosecha. En este trabajo se describen brevemente las características generales y las tendencias en aplicaciones de recubrimientos comestibles en productos frescos. Asimismo analizamos el potencial existente para combinar tecnologías de recubrimiento y métodos físicos apropiados.

2. Recubrimientos comestibles para frutas y verduras: usos y formulaciones

Los recubrimientos comestibles consisten en una capa delgada de material de protección aplicada por inmersión o aspersión que se puede consumir como una parte del producto [12,13]. El principal interés en el empleo de recubrimientos comestibles se basa generalmente en su potencial para prevenir la pérdida de calidad y extender la vida útil de los productos mediante la modificación de sus propiedades superficiales. Los recubrimientos se han utilizado en las frutas y hortalizas frescas desde hace tiempo. Algunos registros indican que los cítricos ya eran encerados en China en los siglos XII y XIII [14]. Las suspensiones de aceites o ceras en agua estuvieron entre las primeras formulaciones para los recubrimientos de frutas, probablemente utilizados para reducir la deshidratación. Desde estas prácticas tempranas los objetivos de las aplicaciones de recubrimientos se han expandido. Las frutas y hortalizas pueden ser recubiertas para:

- i) mejorar el brillo superficial,
- ii) reducir la abrasión,
- iii) evitar la absorción de olores indeseables,
- iv) minimizar la fuga de solutos,
- v) establecer una barrera a la pérdida de humedad,
- vi) cambiar los niveles de O₂ y CO₂ dentro de los productos modulando así la maduración y senescencia,
- vii) retrasar la descomposición,
- viii) mejorar la estabilidad y la seguridad de los productos mediante la inclusión de ingredientes funcionales tales como antioxidantes y antimicrobianos.

Una variedad de materiales, incluyendo lípidos, polisacáridos y proteínas, solos o en combinación, se han utilizado en la formulación de recubrimientos comestibles [12,15]. Las matrices de los recubrimientos generalmente poseen un constituyente principal, al que se añaden otros componentes tales como plastificantes, emulsionantes, refuerzos, aditivos y disolventes (por ejemplo, agua y alcoholes). La enorme variedad de materiales utilizados y sus posibles combinaciones, proporcionan sistemas de recubrimiento con una amplia gama de propiedades físicas y químicas adaptables a diferentes aplicaciones.

a. Constituyentes de la matriz principal

Los principales componentes de la matriz utilizados en aplicaciones de recubrimientos son hidrocoloides, lípidos y sus mezclas (compuestos) [16]. Se han evaluado polisacáridos (derivados de celulosa, alginato, pectina, almidón, quitosano, carragenina y gomas) y proteínas (de origen vegetal como proteína de soja, gluten de trigo, zeína de maíz, y de fuentes animales tales como gelatina, suero de leche, caseína y queratina) [17,18]. Especial interés se ha dedicado a la reutilización de subproductos industriales (gelatina, proteína de soja, suero de leche y quitosano de la industria de la carne, las semillas oleaginosas, quesos y mariscos, respectivamente) [19].

Tanto las películas y recubrimientos de proteínas y polisacáridos suelen presentar excelentes propiedades de barrera contra el oxígeno y el aroma, pero tienen alta permeabilidad al vapor de agua [19]. Diferentes fuentes de lípidos incluyendo a las ceras (cera de abeja, de candelilla, de carnauba), ácidos grasos libres, alcoholes grasos, ácidos grasos y ésteres de sacarosa, y resinas de terpenos comestibles tales como goma laca se han utilizado para el recubrimiento de frutas y hortalizas [18,20-22], que por lo general aumentan el brillo superficial y limitan la pérdida de agua. Por último, los recubrimientos compuestos son producidos por la combinación de dos o más de los componentes antes mencionados ya sea en la forma de emulsiones, recubrimientos multicapa o mezclas [23,24]. En las emulsiones de lípidos e hidrocoloides el tipo de lípido empleado, su ubicación, fracción de volumen, fase polimórfica y las condiciones de secado poseen un impacto significativo sobre las propiedades de barrera [25]. El tamaño del componente disperso en una emulsión también tiene un gran efecto sobre las características del recubrimiento. Este puede variar desde 0,2 hasta 50 micrones en macro-emulsiones y de 10 a 100 nm en micro-emulsiones [26-28]. Los recubrimientos multicapa comúnmente resultan en una mejor barrera al vapor de agua que los emulsionados. Sin embargo, el hecho de que deben ser generados en varios pasos por la deposición secuencial de los materiales de interés representa una desventaja tecnológica. Una estrategia alternativa prometedora para mejorar las propiedades de los recubrimientos comestibles es la formulación con mezclas de biopolímeros [29,30].

Al igual que en el campo de los polímeros sintéticos, la nueva generación de materiales en el área de los biopolímeros de origen natural se centra en la obtención de bio-nanocompuestos. Estos materiales consisten en una matriz de biopolímero reforzada con nanopartículas (partículas que tienen al menos una dimensión en el intervalo de 1-100 nm). Estos materiales presentan mejores propiedades mecánicas y de barrera, estabilidad térmica, resistencia química y aspecto a niveles de carga bajos (5-10%) que los materiales tradicionales debido al área superficial elevada

de las nanopartículas, que le permite interactuar fuertemente con los demás componentes [31,32]. La adición de nanoarcillas, como montmorillonita a las formulaciones de proteínas y polisacáridos ha mejorado las propiedades mecánicas y de barrera de las películas biopoliméricas [33,34]. Las nanofibras de celulosa, quitina y almidón mejoraron las propiedades mecánicas películas de caseína, almidón y quitosano [35-37]. Los nanocompuestos también podrían resultar de utilidad para modular la liberación de ingredientes activos incorporados en la matriz polimérica [28-41].

b. Plastificantes y emulsionantes

Diferentes ingredientes se pueden incorporar en las matrices de recubrimiento comestible para mejorar o modificar su funcionalidad. Los plastificantes se añaden comúnmente en recubrimientos de polisacáridos y en base a proteínas para disminuir la fragilidad [42-44]. Los plastificantes comunes utilizados en recubrimientos comestibles incluyen agua, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa, polietilenglicol, ácidos grasos y monoglicéridos [42]. Añadidos en diferentes proporciones (15-40% en relación con el principal constituyente de la matriz) los plastificantes puede mejorar la flexibilidad de las películas, la susceptibilidad a la humedad, disminuir sus propiedades de resistencia y de barrera contra la humedad y el oxígeno [45]. Los plastificantes hidrófobos, tales como ésteres de citrato también están siendo estudiados [46].

La funcionalidad de los constituyentes principales de la matriz también puede modificarse a través de tratamientos químicos, físicos o enzimáticos [47-49]. Tratamientos de este tipo en proteínas pueden en ciertos casos ser empleados para reducir la solubilidad de material, generar matrices más fuertes y aumentar la hidrofobicidad de la superficie [49-50]. Los químicos tradicionalmente empleados pueden ser no aptos para materiales comestibles debido a su toxicidad. En estos casos la modificación enzimática por tratamientos con transglutaminasa, lipoxidasa, lisil-oxidasa, polifenol oxidasa y peroxidasa pueden ser útiles. La fosforilación de proteínas de soja por una proteína quinasa también se ha utilizado para modular la solubilidad y la capacidad emulsionante de los materiales [51]. Las propiedades de los polisacáridos pueden también modificarse cambiando su grado de polimerización, y su grado de sustitución (grado de acetilación o metilación) [52].

Los emulsionantes son agentes tensioactivos de carácter anfífilo capaces de reducir la tensión superficial de lípido-agua o agua interfaz de aire. Pueden ser añadidos para mejorar las propiedades de humectación de las formulaciones y su adherencia a la superficie de la fruta o

vegetal [53]. Los recubrimientos de proteína y lípidos o polisacáridos y lípidos a menudo requieren la adición de emulsionantes para facilitar la dispersión del componente lipídico en un medio acuoso. Algunos emulsionantes comunes incluyen los ésteres de polietilen-sorbitol, algunos ácidos grasos y sales y fosfolípidos tales como lecitina [46,54,55].

c. Aditivos

La funcionalidad de recubrimientos comestibles se puede ampliar añadiendo a las formulaciones antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, sabores, nutrientes y especias. Estos compuestos podrían al ser retenidos en la superficie de los alimentos mejorar la estabilidad y la seguridad de los productos [56-60]. Agentes antimicrobianos comunes tales como sales de ácido propiónico, benzoico y sórbico han sido incorporadas. Recubrimientos en base a almidón con sorbato de potasio se aplicaron sobre la superficie de frutillas frescas para reducir el crecimiento microbiano [61]. Recubrimientos de hidroxipropilmetilcelulosa con etanol fueron eficaces para inactivar *Salmonella montevideo* en tomates frescos [62]. Enzimas antimicrobianas tales como la lisozima han sido incorporados en recubrimientos de quitosano para controlar *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* [63]. Los aceites esenciales han sido también ampliamente empleados como antimicrobianos naturales para frutas y hortalizas recubiertas [64]. Curiosamente, el quitosano muestra efectos antimicrobianos *per se* [65-67].

Trabajos iniciales publicados por Swenson y col. [68] mostraron que recubrimientos con pectato o zeína conteniendo butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) y ácido cítrico redujeron la rancidez de nueces. Los antioxidantes como el ácido ascórbico también se han incorporado en recubrimientos comestibles para reducir el pardeamiento enzimático en champiñones trozados [69]. Los recubrimientos de goma xántica conteniendo α -tocoferol mejoraron la calidad nutricional y redujeron los cambios en el color superficial de zanahorias *baby* peladas [70]. También se han incorporado potenciadores de textura. Hernández-Muñoz y col. [71] observaron que la adición de gluconato de calcio (1%) para la formulación de recubrimientos de quitosano aumentó la firmeza de frutillas refrigeradas. Agentes de sabor y colorantes también pueden añadirse a los recubrimientos comestibles para mejorar la calidad sensorial de los productos. Sin embargo, muy poco se ha informado respecto a estas aplicaciones. Finalmente, algunos investigadores han tratado de incorporar micronutrientes o bio-activos de interés a las formulaciones [63-72].

3. Desafíos en tecnologías de recubrimiento comestibles

Varios trabajos muestran que los beneficios obtenidos por el empleo de recubrimientos pueden ser sustanciales [73-77]. Sin embargo, en comparación con el gran número de estudios reportados en la literatura, relativamente pocas aplicaciones han sido adoptadas por la industria. Esto podría ser en parte debido a que aunque diversas materias primas empleadas son generalmente subproductos industriales, los costos de adquisición, transporte, distribución y almacenamiento de estos materiales, así como la infraestructura para la producción de recubrimientos a gran escala podrían ser en algunos casos aún demasiado elevados. Asimismo la modificación de los procedimientos establecidos, los cambios en las operaciones unitarias y de diseño en líneas de procesamiento y la necesidad de implementar programas de capacitación específicos podrían ser otro factor que ha ralentizado la transferencia de esta tecnología. Los trabajos futuros orientados a contribuir a re-categorizar a los recubrimientos como una "tecnología generalizada" deberían centrarse en:

- i) optimizar las formulaciones y las condiciones de proceso a fin de mejorar aún más las de los recubrimientos;
- ii) anticipar preocupaciones de los consumidores potenciales, especialmente cuando se evalúan formulaciones activadas. Por ejemplo la nanotecnología ofrece oportunidades para desarrollar estrategias novedosas [78]; pero el debate sobre los beneficios y riesgos potenciales del consumo humano de algunas nanopartículas todavía está abierto y la legislación sobre este tema es en muchos casos todavía difusa;
- iii) la predicción de posibles dificultades en los procesos de escalado puede ser muy útil. Procedimientos simples a nivel de laboratorio, tales como la generación de recubrimientos continuos evitando daños y abusos en el manejo de temperatura y retrasos puede ser un reto en los entornos comerciales;
- iv) en algunos casos, la evaluación de recubrimientos se ha realizado inaceptablemente a altas temperaturas y a humedades relativas muy bajas para las frutas y hortalizas. Esto puede sobreestimar los beneficios de los recubrimientos comestibles. Los recubrimientos deben ser considerados en productos enteros y frescos cortados un complemento a la refrigeración adecuada. Estudios orientados tecnológicamente deben evaluar sus beneficios en condiciones óptimas de almacenamiento (temperatura y humedad relativa).

4. Intersección entre la tecnología de recubrimientos de frutas y métodos físicos de poscosecha

a. Los tratamientos físicos antes o durante la formación del recubrimiento

La aplicación de métodos físicos a las materias primas puede modificar las propiedades de los recubrimientos [79,80]. Los tratamientos térmicos, de alta presión y de irradiación han demostrado inducir cambios en la funcionalidad de las películas. Los efectos son generalmente más marcados en las propiedades mecánicas, de solubilidad y de permeabilidad al vapor de agua [81-88].

Los tratamientos térmicos suaves se utilizan en algunos casos para acelerar la formación de los recubrimientos [89,90,91]. El proceso de secado que se aplica a películas y recubrimientos de proteína puede afectar el tipo y cantidad de interacciones covalentes (puentes disulfuro) y no covalentes (interacciones hidrofóbicas, iónicas y enlaces de hidrógeno), y por consiguiente las propiedades de los materiales [92]. También para los polisacáridos la temperatura de secado puede afectar las características de las películas [93]. Del mismo modo, la humedad relativa y la presión durante el período de secado también se ha demostrado que afectan las propiedades de biopolímeros de soja y amaranto [92,94,95]. Aunque estos tratamientos físicos han sido en muchos casos optimizados en base a las necesidades de material, pueden ser potencialmente explotados para inducir respuestas horméticas en las materias primas, lo que podría maximizar el resultado final del tratamiento combinado en el mantenimiento de la calidad.

b. Los tratamientos físicos después de la formación de recubrimiento

Estos enfoques pueden incluir i) la atmósfera modificada que se establece en los productos recubiertos debido al cambio de permeabilidad a los gases (CO₂, O₂, etileno) de los frutos vegetales, o ii) cualquier cambio en el ambiente orientado a inducir una respuesta deseable en el producto y en el recubrimiento propiamente dicho.

i) Atmósferas modificadas inducidas por el recubrimiento: una vez que se estableció el recubrimiento, el intercambio de gases entre la fruta y el medio ambiente se ve afectado, proporcionando la oportunidad de generar atmósferas modificadas en el interior de frutos individuales. La composición gaseosa en el equilibrio está determinada por una serie de factores de los productos, por las propiedades del recubrimiento y por las condiciones ambientales.

Factores del producto: la tasa respiratoria del vegetal es un factor determinante de la atmósfera modificada alcanzada. Esto depende de la especie, de la variedad y de su estado de desarrollo [96]. La producción y la acumulación de etileno puede ser importante sobre todo en los productos climatéricos recubiertos en las que puede aumentar la respiración.

Características del recubrimiento: todos los factores que afectan a la transferencia de masa a través de la película y el proceso de difusión tales como permeabilidad al O₂ y CO₂ y el espesor determinarán la atmósfera establecida. Los plastificantes, en general, aumentan la permeabilidad de la película. La polimerización y/o grado de entrecruzamiento de las proteínas o polisacáridos, así como los grupos funcionales/sustituyentes presentes en los polímeros modulan la permeabilidad del recubrimiento. Los recubrimientos de proteínas y polisacáridos en general presentan alta permeabilidad a las sustancias polares, tales como vapor de agua, y baja permeabilidad a las sustancias no polares, como el oxígeno. Los recubrimientos de proteínas parecen tener permeabilidad al oxígeno más baja que los de celulosa. Además de la permeabilidad absoluta de los diferentes recubrimientos, su selectividad también es un determinante principal de la atmósfera establecida [97,98].

Condiciones ambientales: las frutas y hortalizas recubiertas se almacenan en su mayoría a humedades relativas entre el 85-95%. En estas condiciones, algunos recubrimientos pueden hidratarse, cambiando sustancialmente sus propiedades físicas y químicas [28,99]. En general, a una humedad relativa baja, la permeabilidad a los gases de materiales en base a proteínas y polisacáridos es menor que la del polietileno, lo que los hace materiales interesantes para ciertas aplicaciones. Sin embargo, la permeabilidad de estos recubrimientos es altamente dependiente de la humedad relativa [100]. Por ejemplo, la permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono puede aumentar hasta mil veces cuando estos materiales se llevan y mantienen a alta humedad relativa. En materiales en base a proteínas, este efecto es mucho mayor para los gases "hidrófilos" (CO₂) que para los gases "hidrófobos" (O₂) [101]. Es importante destacar que muchos de los métodos estándar de caracterización de materiales utilizan humedades relativas que están lejos (58%) de aquellos en los que se van a utilizar en el recubrimiento de frutas y hortalizas frescas.

La temperatura de almacenamiento también tiene una alta influencia en la atmósfera alcanzada, ya que afecta de forma exponencial la tasa de respiración frutas y hortalizas. Las variaciones en la cadena de frío pueden dar lugar a la fermentación en productos recubiertos

[103]. Las presiones parciales de CO₂ y O₂ en la atmósfera de almacenamiento también pueden influir en los niveles de gases en el equilibrio a través de alteraciones en la tasa de respiración.

ii) Tratamientos físicos post-recubrimiento: como se indicó previamente algunos tratamientos físicos pueden ser utilizados para inducir cambios deseables en la fisiología vegetal [103]. La evaluación de los tratamientos térmicos post-recubrimiento ha recibido poca atención hasta ahora. Se puede esperar que la irradiación UV post-recubrimiento afecte poco al vegetal dada su baja penetración. Algunos trabajos han demostrado que las propiedades funcionales de los biopolímeros también mejorarse si se los somete a algunos tratamientos físicos después de su formación. La resistencia a la tracción de las películas de proteína de soja se mejoró por irradiación UV o γ . Esto es probablemente debido al alto contenido de tirosina y fenilalanina que pueden entrecruzarse como consecuencia de la irradiación [104,105]. Los cambios en el medio ambiente después de la cosecha también pueden ser potencialmente explotados para modular las propiedades funcionales de recubrimientos activados [106]. Cuando se incorporaron a envases de tomate *pads* en base a proteína de soja activadas con 1-metilciclopropeno, absorbieron agua facilitando la liberación del activo y retrasando la maduración [107]. El empleo de tratamientos térmicos compatibles con los vegetales durante el almacenamiento también puede ser considerado una estrategia para modificar la velocidad de difusión de los aditivos presentes en la matriz del recubrimiento. En algunos casos también podrían contemplarse como una estrategia para aumentar la velocidad de las reacciones dependientes de la temperatura entre ingredientes de recubrimiento (ej. reacciones enzimáticas). La liberación de compuestos activos presentes en los recubrimientos por medios fotoquímicos (por ejemplo la radiación UV-vis) puede ser otra estrategia para explorar.

5. Conclusiones

Los recubrimientos comestibles y los métodos físicos de poscosecha tienen una historia relativamente larga como tratamientos para reducir el deterioro de las frutas y hortalizas almacenadas y se han concebido como enfoques amigables con el ambiente para complementar la refrigeración. Si bien ambas estrategias han evolucionado de manera independiente, la aplicación combinada podría maximizar los efectos beneficiosos sobre el mantenimiento de la calidad de los productos frescos. Los recubrimientos deben ser considerados como un tratamiento

complementario al control de temperatura adecuado en los productos frescos enteros y cortados. En consecuencia, los estudios tecnológicamente orientados deberían comparar sus beneficios contra los controles sometidos al adecuado manejo poscosecha y su almacenamiento (refrigeración y alta humedad relativa). Esto determinará de manera inequívoca sus beneficios en relación con las prácticas de manejo recomendadas. Resulta importante continuar los trabajos que se vienen desarrollando para maximizar la funcionalidad de los recubrimientos para frutas y hortalizas. La colaboración activa entre los tecnólogos poscosecha y científicos de materiales puede ser de utilidad para acercar a estos dos campos. Los enfoques innovadores que vayan más allá de la búsqueda de efectos aditivos por aplicación de recubrimientos y tratamientos físicos combinados serán valiosos. Algunas de las áreas que pueden ser exploradas incluyen la aplicación de tratamientos físicos antes o durante la formación de los recubrimientos que puede mejorar las propiedades de los materiales y simultáneamente inducir respuestas horméticas en los vegetales. Resulta necesario avanzar en la optimización de las atmósferas modificadas generadas en vegetales recubiertos. La viabilidad del uso de tratamientos físicos leves luego de la formación de los recubrimientos para facilitar la liberación de los principios activos todavía necesita ser determinada. Por último la realización de investigaciones que apunten a resolver las dificultades técnicas que surgen durante los procesos de escalado puede ayudar a aumentar la transferencia de aplicaciones de recubrimientos de la academia a la industria.

6. Referencias

1. Tikunov YM, Molthoff J, de Vos RCH, Beekwilder J, van Houwelingen A, van der Hooft JJJ, Nijenhuis-de Vries M, Labrie CW, Verkerke W, van de Geest H, Zamora MV, Presa S, Rambla JL, Granell A, Hall RD, Bovy AG. Non-smoky GLYCOSYLTRANSFERASE1 prevents the release of smoky aroma from tomato fruit. *Plant Cell* 2013: 25:3067-3078.
2. Molassiotis A, Tanou G, Filippou P, Fotopoulos V. Proteomics in the fruit tree science arena: New insights into fruit defense, development, and ripening. *Proteomics* 2013: 13:1871-1884.
3. Ay N, Janack B, Humbeck K. Epigenetic control of plant senescence and linked processes. *Journal of Experimental Botany* 2014: 65:3875-3887.
4. Karlova R, Chapman N, David K, Angenent GC, Seymour GB, De Maagd RA. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany* 2014: 65:4527-4541.
5. Martínez-Romero D, Bailén G, Serrano M, Guillén F, Valverde JM, Zapata P, Castillo S, Valero D. Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of ethylene action: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2007: 47:543-560.
6. Sozzi GO, Beaudry RM. Current perspectives on the use of 1-methylcyclopropene in tree fruit crops: An international survey. *Stewart Postharvest Review* 2007:3:8.

7. Watkins CB. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances* 2006: 24:389-409.
8. Rizzolo A, Grassi M, Vanoli M. 1-Methylcyclopropene application, storage temperature and atmosphere modulate sensory quality changes in shelf-life of 'Abbé Fétel' pears. *Postharvest Biology and Technology* 2014: 92:87-97.
9. FAO (2013a) Food waste harms climate, water, land and biodiversity – new FAO report. September 2013. Available online at: <http://www.fao.org/news/story/en/item/196220/icode/>. Accessed 21 Oct 2014.
10. Pérez-Gago MB, Gonzales-Aguilar GA, Olivas GI. Edible coatings for fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Review* 2010: 6:1-14.
11. Guilbert, S. Technology and application of edible protective films. In: *Food packaging and preservation; Theory and practice*. Mathlouthi M (Ed). Elsevier Applied Science, London, UK, 1986:371-394.
12. Ukai NY, Shingo I, Kurume TT, Fukuoka KM. Preservation of agricultural products, U.S. Patent, 1976: 3,997,674.
13. Gennadios A, Weller CL. Moisture adsorption by grain protein films. *American Society of Agricultural Engineers* 1994: 37:535-539.
14. Hardenburg RE. Wax and related coatings for horticultural products: a bibliography. *Agriculture, Agricultural Research Service Bulletin* 1967: 51:1-15.
15. Kester JJ, Fennema OR. Edible films and coatings: A review. *Food Technology* 1986: 40:47-59.
16. Poverenov E, Rutenberg R, Danino, S, Horev, B, Rodov, V. Gelatin-chitosan composite films and edible coatings to enhance the quality of food products: Layer-by-layer vs. Blended formulations. *Food and Bioprocess Technology* 2014: 7:3319-3327.
17. Rojas-Graü MA, Salvia-Trujillo L, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Edible films and coatings. decontamination of fresh and minimally processed produce 2012: 247-275.
18. Park HJ, Byun YJ, Kim YT, Whiteside WS, Bae HJ. Processes and applications for edible coating and film materials from agropolymers. In: *Innovations in Food Packaging: Second Edition* 2013: 257-275.
19. Baldwin EA, Hagenmaier R, Bai J. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality, Second Edition*. Ed. CRC Press. Boca Raton, FL, USA, 2012.
20. Paredes-López O, Camargo-Rubio E, Gallardo-Navarro Y. Use of coatings of candelilla wax for the preservation of limes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1974: 25:1207-1210.
21. Lawrence JF, Iyengar JR. Determination of paraffin wax and mineral oil on fresh fruits and vegetables by high temperature gas chromatography. *Journal of Food Safety* 1983: 5:119-129.
22. Warth AH. *The chemistry and technology of waxes*, Reinhold, New York, 1986:37-192.
23. Mantilla N, Castell-Perez ME, Gomes C, Moreira RG. Multilayered antimicrobial edible coating and its effect on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). *LWT-Food Science and Technology* 51: 2013:37-43.
24. Sipahi RE, Castell-Perez ME, Moreira RG, Gomes C, Castillo A. Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). *LWT - Food Science and Technology* 2013: 51:9-15.
25. Gontard N, Duchez C, Cuq J, Guilbert S. Edible composite films of wheat gluten and lipids water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology* 1994: 29:39-50.
26. Kamper SL, Fennema O. Water Vapor Permeability of Edible Bilayer Films. *Journal of Food Science* 1984: 49:1478-1481.

27. Kamper SL, Fennema O. Water Vapor Permeability of an Edible, Fatty Acid, Bilayer Film. *Journal of Food Science* 1984(b): 49:1482-1485.
28. Hagenmaier RD, Shaw PE. Moisture permeability of edible films made with fatty acid and (hydroxypropyl)methylcellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1990:38:1799-1803.
29. Ban W, Song J, Argyropoulos DS, Lucia LA. Improving the physical and chemical functionality of starch-derived films with biopolymers. *Journal of Applied Polymer Science* 2006: 100:2542-2548.
30. Famá L, Gerschenson L, Goyanes S. Starch-vegetable fiber composites to protect food products. *Carbohydrate polymers* 2009: 75:230-235.
31. Rhim JW, Perry KW. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2007: 47:1-24.
32. Zhao R, Torley P, Halley PJ. Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science* 2008: 43:3058–3071.
33. Echeverría I, Eisenberg P, Mauri AN. Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *Journal of Membrane Science* 2014: 449:15–26.
34. Quilaqueo Gutiérrez M, Echeverría I, Ihl M, Bifani V, Mauri AN. Carboxymethylcellulose-montmorillonite nanocomposite films activated with murta (*Ugni molinae* Turcz) leaves extract. *Carbohydrate Polymers* 2012: 87:1495-1502.
35. Pereda M, Amica G, Rác I, Marcovich NE. Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *Journal of Food Engineering* 2011: 103:76-83.
36. Xie F, Pollet E, Halley PJ, Avérous L. Starch-based nano-biocomposites. *Progress in Polymer Science* 2013: 38:1590-1628.
37. Rubentheren V, Ward TA, Chee CY, Tang CK. Processing and analysis of chitosan nanocomposites reinforced with chitin whiskers and tannic acid as a crosslinker. *Carbohydrate Polymers* 2015: 115:379-387.
38. Tunc C, Angellier H, Cahyana Y, Chalier P, Gontard N, Gastaldi E. Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science* 2007: 289:159–168.
39. Mascheroni E, Chalier P, Gontard N, Gastaldi E. Designing of a wheat gluten/montmorillonite based system as carvacrol carrier: Rheological and structural properties. *Food Hydrocolloids* 2010: 24:406–413.
40. Cortez-Vega WR, Pizato S, De Souza JTA, Prentice C. Using edible coatings from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) protein isolate and organo-clay nanocomposite for improve the conservation properties of fresh-cut 'Formosa' papaya. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2014: 22:197-202.
41. Zambrano-Zaragoza ML, Mercado-Silva E, Ramirez-Zamorano P, Cornejo-Villegas MA, Gutiérrez-Cortez E, Quintanar-Guerrero D. Use of solid lipid nanoparticles (SLNs) in edible coatings to increase guava (*Psidium guajava* L.) shelf-life. *Food Research International* 2013: 51:946-953.
42. Sothornvit R, Krochta JM. Plasticizers in edible films and coatings. In: *Innovations in Food Packaging*, Elsevier, CA, 2005: 403-433.
43. Han JH, Gennadios A. Edible films and coatings: a review. In: *Innovations in Food Packaging*. Elsevier, CA, 2005:239–262.
44. Oz AT, Ulukanli Z. Application of edible starch-based coating including glycerol plus oleum *Nigella* on arils from long-stored whole pomegranate fruits. *Journal of Food Processing and Preservation* 2012: 36:81-95.
45. Vanin FM, Sobral PJA, Menegalli FC, Carvalho RA, Habitante AMQB. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids* 2005: 19:899–907.

46. Andreuccetti C, Carvalho RA, Grosso CRF. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International* 2009; 42:1113–1121.
47. Audic J-L, Chaufer B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal* 2005; 41:1934-1942.
48. Vaz CM, De Graaf LA, Reis RL, Cunha AM. In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: Effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. *Polymer Degradation and Stability* 2003; 81:65-74.
49. Galletta G, Di Gioia L, Guilbert S, Cuq B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science* 1998; 81:3123-3130.
50. Tang C-H, Jiang Y, Wen Q-B, Yang X-Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology* 2005; 120:296-307.
51. Campbell NF, Shih FF, Marshall WE. Enzymatic phosphorylation of soy protein isolate for improved functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40:403-406.
52. Dastidar TG, Netravali AN. Improving resin and film forming properties of native starches by chemical and physical modification. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 2012; 6:1-24.
53. Krochta JM. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current, status, and opportunities. In: Gennadios, A. (ed.), *Protein-based films and coatings*. CRC Press, Boca Raton, USA, 2002:1-42.
54. Bravin B, Peressini D, Sensidoni A. Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52:6448-6455.
55. Rodriguez M, Osés J, Ziani K, Maté JI. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International* 2006; 39:840-846.
56. Mehyar GF, Al-Qadiri HM, Swanson BG. Edible coatings and retention of potassium sorbate on apples, tomatoes and cucumbers to improve antifungal activity during refrigerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation* 2014; 38:175-182.
57. Martinez-Avila GCG, Aguilera AF, Saucedo S, Rojas, R, Rodriguez, R, Aguilar, CN. Fruit wastes fermentation for phenolic antioxidants production and their application in manufacture of edible coatings and films. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014; 54:303-311.
58. Karaca H, Pérez-Gago MB, Taberner V, Palou L. Evaluating food additives as antifungal agents against *Monilinia fructicola* in vitro and in hydroxypropyl methylcellulose-lipid composite edible coatings for plums. *International Journal of Food Microbiology* 2014; 179:72-79.
59. Fagundes C, Pérez-Gago MB, Monteiro AR, Palou L. Antifungal activity of food additives in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible coatings against *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology* 2013; 166:391-398.
60. Freitas IR, Cortez-Vega WR, Pizato S, Prentice-Hernández C, Borges CD. Document Xanthan gum as a carrier of preservative agents and calcium chloride applied on fresh-cut apple. *Journal of Food Safety* 2013; 33:229-238.
61. García MA, Martino MN, Zaritzky NE. Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria × Ananassa*) quality and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46:3758-3767.
62. Zhuang R-Y, Beuchat LR. Effectiveness of trisodium phosphate for killing *Salmonella montevideo* on tomatoes. *Letters in Applied Microbiology* 1996; 22:97-100.
63. Park S-I, Zhao Y. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52:1933-1939.

64. Novaes Azevedo A, Ribeiro Buarque P, Oliveira Cruz OM, Fitzgerald Blank A, Barreto Alves P, Nunes ML, Lins de Aquino Santana LC. Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. *Food Control* 2014; 43:1–9.
65. Kannat SR, Rao MS, Chawla SP, Sharma A. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. *LWT - Food Science and Technology* 2013; 53:321-326.
66. Bordenave N, Grelier S, Coma V. Hydrophobization and antimicrobial activity of chitosan and paper-based packaging material. *Biomacromolecules* 2010; 11:88-96.
67. Papineau AM, Hoover DG, Knorr D, Farkas DF. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology* 1991; 5:45-47.
68. Swenson HA, Miers JC, Schultz TH, Owens HS. Pectinate and pectate coatings. II. Application to nut and fruit products. *Food Technology* 1953; 7:232-235.
69. Nisperos-Carriedo MO, Buslig BS, Shaw PE. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40:1127-1130.
70. Mei Y, Zhao Y, Yang J, Furr HC. Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *Journal of Food Science* 2002; 67:1964-1968.
71. Hernández-Muñoz P, Almenar E, Valle VD, Velez D, Gavara R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry* 2008; 110:428-435.
72. Han C, Zhao Y, Leonard SW, Traber MG. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology* 2004; 33:67-78.
73. Gennadios A, Weller CL, Gooding CH. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering* 1994; 21:395-409.
74. Gennadios A, Hanna MA, Kurth LB. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *LWT - Food Science and Technology* 1997; 30:337-350.
75. Miller KS, Krochta JM. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology* 1997; 8:228-237.
76. Baldwin EA, Nisperos MO, Chen X, Hagenmaier RD. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology* 1996; 9: 151-163.
77. Li P, Barth MM. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. *Postharvest Biology and Technology* 1998; 14:51-60.
78. Kalia, A., Parshad, V.R. Novel trends to revolutionize preservation and packaging of fruits/fruit products: Microbiological and nanotechnological perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015; 55: 159-182.
79. Vu KD, Hollingsworth RG, Salmieri S, Takala PN, Lacroix M. Development of bioactive coatings based on γ -irradiated proteins to preserve strawberries. *Radiation Physics and Chemistry* 2012; 81:1211-1214.
80. Junqueira-Gonçalves MP, Tapia A, Rodriguez C, Roschztardtzt FI, Valenzuela X, Aguirre P. Extension of strawberry shelf-life by irradiated edible coating. *Italian Journal of Food Science* 2011; 23:125-130.
81. Koehler P, Kieffer R, Wieser H. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten III. Studies on gluten films. *Journal of Cereal Science* 2010; 51:140-145.
82. Mauri AN, Añón MC. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006; 86:1064-1072.

83. Mauri AN, Añón MC. Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International* 2008; 14:119-125.
84. Rangavajhyala N, Ghorpade V, Hanna M. Solubility and Molecular Properties of Heat-Cured Soy Protein Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45:4204-4208.
85. Rhim JW, Gennadios A, Handa A, Weller CL, Hanna MA. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48:4937-4941.
86. Condés MC, Añón MC, Mauri AN. Amaranth protein films from thermally treated proteins. *Journal of Food Engineering* 2013; 119:573-579.
87. Ruan RR, Xu L, Chen PL. Water vapor permeability and tensile strength of cellulose-based composite edible films. *Applied Engineering in Agriculture* 1998; 14:411-413.
88. Cieśla K, Salmieri S, Lacroix M. γ -irradiation influence on the structure and properties of calcium caseinate-whey protein isolate based films. Part 2. Influence of polysaccharide addition and radiation treatment on the structure and functional properties of the films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54:8899-8908.
89. Arnon H, Granit R, Porat R, Poverenov E. Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: A layer-by-layer approach. *Food Chemistry* 2015; 166:465-472.
90. Badwaik LS, Borah PK, Deka SC. Antimicrobial and enzymatic antibrowning film used as coating for bamboo shoot quality improvement. *Carbohydrate Polymers* 2014; 103:213-220.
91. Tapia-Blácido DR, Sobral PJA, Menegalli FC. Effects of drying temperature and relative humidity on the mechanical properties of amaranth flour films plasticized with glycerol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2005; 22:249-256.
92. Denavi G, Tapia-Blácido DR, Añón MC, Sobral PJA, Mauri AN, Menegalli FC. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering* 2009; 90:341-349.
93. Flores S, Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson L. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International* 2007; 40:257-265.
94. Tapia-Blácido DR, Sobral PJA, Menegalli FC. Effect of drying conditions and plasticizer type on some physical and mechanical properties of amaranth flour films. *LWT - Food Science and Technology* 2013; 50:392-400.
95. Thakhiew W, Devahastin S, Soponronnarit S. Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. *Journal of Food Engineering* 2010; 99:216-224.
96. Fonseca SC, Oliveira SAR, Brecht JK. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *Journal of Food Engineering* 2002; 52:99-119.
97. Guilbert S, Gontard N, Gorrís LGM. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT - Food Science and Technology* 1996; 29:10-17.
98. Barron C, Varoquaux P, Guilbert S, Gontard N, Gouble B. Modified atmosphere packaging of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus* L.) with hydrophilic films. *Journal of Food Science* 2002; 67:251-257.
99. Hagenmaier RD, Shaw PE. Permeability of shellac coatings to gases and water vapor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991; 39:825-829.
100. Cisneros-Zevallos L, Krochta JM. Internal modified atmospheres of coated fresh fruits and vegetables: Understanding relative humidity effects. In: *Innovations in Food Packaging*, Elsevier, CA, 2005:173-184.
101. Guilbert S, Cuq B. Material formed from proteins. In: *Handbook of biodegradable polymers*. Ed. Bastioli, C. Rapra Technology Limited, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, Inglaterra: Smithers. 2005:339-384.

102. Farber JN, Harris LJ, Parish ME, Beuchat LR, Suslow TV, Gorny JR, Garrett EH, Busta FF. Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce. 2003. In: E. Allen Foegeding, E.A. (Ed.). *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety* 2003: 142-160.
103. Lurie S. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 1998: 14:257–269.
104. Gennadios A, Rhim JW, Handa A, Weller CL, Hanna MA. Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. *Journal of Food Science* 1998: 63:225-228.
105. Gueguen J, Viroben G, Noireaux P, Subirade M. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products* 1998: 7:149-157.
106. Pinheiro AC, Bourbon AI, Quintas MAC, Coimbra MA, Vicente AA. K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2012: 16:227-232.
107. Ortiz CM, Mauri AN, Vicente AR. Use of soy protein based 1-methylcyclopropene-releasing pads to extend the shelf life of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2013: 20:281-287.