

El Proyecto Integrador “Derivados oxidados de glicerol: Obtención e impregnación en film polimérico comercial” desarrollado por “Lesser Florencia Alejandra y Ovejero Humia María Fernanda”, alumnas de la carrera de Ingeniería Química, ha sido dirigido por:

.....
Prof. Dra. Magario, Ivana

Departamento de Química Industrial y Aplicada – FCEFyN-UNC

Directora del Proyecto Integrador

.....
Prof. Dr. Gañan, Nicolás

Departamento de Química Industrial y Aplicada – FCEFyN-UNC

Co - Director del Proyecto Integrador



Facultad de
Ciencias Exactas
Físicas y Naturales

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Escuela de Ingeniería Química

El presente Proyecto Integrador de la carrera de Ingeniería Química
ha sido aprobado el / / mereciendo la calificación de
.....(.....)

Firmas Tribunal Evaluador

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Proyecto Integrador: “Derivados oxidados de glicerol: Obtención e impregnación en film polimérico comercial”

Autores:

LESSER, Florencia Alejandra

OVEJERO HUMIA, María Fernanda

Este proyecto integrador fue enviado a la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales para cumplir con los requerimientos de obtener el grado académico de Ingeniero Químico.

Córdoba, Argentina - Mayo de 2018

Agradecimientos

Queremos agradecer por el acompañamiento durante todo el proceso a Gañan Nicolás, quien logró transmitir su conocimiento. Admiramos su capacidad de síntesis y objetividad durante el desarrollo de las actividades.

A Magario Ivana, por su eterna paciencia y respeto. Por guiarnos brindando todo su conocimiento y experiencia en el área y fomentar siempre al avance del proyecto con una mirada crítica. Por entender las distintas situaciones que fueron surgiendo y resolverlas de la mejor manera posible. Admiramos su pasión por la investigación y su capacidad de transmitir todo su conocimiento siempre que lo requerimos.

Por la participación a Adrián Parodi, quien nos brindó diariamente su conocimiento y contención, con el cual compartimos este proceso de aprendizaje nutriéndonos y superándonos progresivamente. Por sus charlas y tiempo compartido fue un gran compañero y guía.

A Carolina Merlo por tener la voluntad de prestar sus conocimientos sobre bioactividad, enseñarnos y acompañarnos con amabilidad y paciencia.

A Fabián Kröhl (Karlsruher Institute of Technology) quien formó parte del grupo de investigación junto a Adrián Parodi, por sus charlas y palabras de ánimo durante el proceso.

A Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET) y Facultad de Ciencias Químicas (FCQ-UNC) lugares donde hicimos bioactividad y ensayo de IR, e ICTA por dejarnos utilizar sus instalaciones.

A nuestras familias y amigos quienes con amor nos acompañaron y apoyaron durante todo el proceso de aprendizaje que culminó en el presente proyecto integrador. Por brindarnos fortaleza y contención durante los momentos más difíciles.

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| Agradecimientos..... | 5 |
| Tabla de contenido..... | 7 |
| Índice de figuras..... | 10 |
| Índice de tablas..... | 12 |
| Tabla de abreviaturas..... | 13 |
| Resumen..... | 15 |
| Capítulo 1: Introducción y marco teórico..... | 16 |
| 1.1 Introducción..... | 17 |
| 1.2 Glicerol..... | 17 |
| 1.2.1 Usos tradicionales del glicerol..... | 18 |
| 1.2.2 Revalorización del glicerol..... | 20 |
| 1.2.2.1 Oxidación del glicerol..... | 21 |
| 1.2.2.1.1 Oxidación con hematín..... | 23 |
| 1.2.2.1.2 Oxidación por reacción de Fenton..... | 24 |
| 1.3 Inmovilización de catalizadores en soportes sólidos..... | 25 |
| 1.4 Bioactividad..... | 27 |
| 1.5 Impregnación con CO ₂ supercrítico..... | 28 |
| 1.5.1 Envases de alimentos. Envases activos..... | 28 |
| 1.5.2 Materiales involucrados en envases activos..... | 29 |
| 1.5.2.1 Ácido poliláctico..... | 30 |
| 1.5.3 Incorporación de compuestos en envases activos..... | 31 |
| 1.5.3.1 Fluidos supercríticos..... | 32 |
| 1.5.3.2 Dióxido de carbono supercrítico..... | 33 |
| 1.5.3.3 Impregnación supercrítica..... | 33 |
| 1.6 Objetivo general..... | 35 |
| 1.6.1 Objetivos específicos..... | 35 |
| Capítulo 2: Bioactividad..... | 36 |
| 2.1 Introducción..... | 37 |
| 2.1.1 Método de dilución..... | 37 |
| 2.1.2 Determinación de la MIC..... | 38 |
| 2.1.2.1 Indicadores redox..... | 38 |

| | | |
|--|--|----|
| 2.1.3 | Microorganismos de análisis | 39 |
| 2.2 | Materiales y métodos | 41 |
| 2.2.1 | Determinación de la densidad del inóculo mínima capaz de reducir la rezasurina | 41 |
| 2.2.2 | Determinación de MIC y MBC | 42 |
| 2.3 | Resultados y discusión | 42 |
| Capítulo 3: Inmovilización de hematín en hojuelas de quitosano | | 45 |
| 3.1 | Introducción | 46 |
| 3.2 | Materiales y métodos | 47 |
| 3.2.1 | Inmovilización de hematín | 47 |
| 3.2.1.1 | Modificación superficial: incorporación de APTS | 48 |
| 3.2.1.2 | Modificación superficial: glutaraldehído | 48 |
| 3.2.1.3 | Unión covalente del hematín..... | 48 |
| 3.2.1.4 | Inactivación de grupos carbonilo..... | 49 |
| 3.2.2 | Calibrado para determinación de concentración de hematín..... | 49 |
| 3.2.3 | Determinación de la actividad catalítica hacia el fenol..... | 50 |
| 3.3 | Resultados y discusión | 52 |
| 3.3.1 | Inmovilización | 52 |
| 3.3.2 | Actividad catalítica hacia fenol..... | 53 |
| Capítulo 4: Reacciones de oxidación del glicerol | | 54 |
| 4.1 | Introducción | 55 |
| 4.2 | Materiales y métodos | 55 |
| 4.2.1 | Determinación de gliceraldehído mediante el reactivo de Schiff .. | 55 |
| 4.2.2 | Cromatografía gaseosa | 57 |
| 4.2.3 | Actividad catalítica hacia el fenol | 58 |
| 4.2.4 | Estudio de optimización | 59 |
| 4.3 | Oxidación con hematín inmovilizado..... | 59 |
| 4.3.1 | Condiciones de reacción | 59 |
| 4.3.2 | Resultados y discusión | 60 |
| 4.4 | Oxidación con hematín libre..... | 63 |
| 4.4.1 | Estudio de optimización..... | 63 |
| 4.4.2 | Evaluación del efecto del pH | 64 |
| 4.4.3 | Evaluación del efecto de la concentración de hematín..... | 65 |
| 4.4.4 | Resultados..... | 65 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 4.4.4.1 | Optimización | 65 |
| 4.4.4.2 | Efecto del pH..... | 68 |
| 4.4.4.3 | Evaluación del efecto de la concentración de hematín | 68 |
| 4.4.4.4 | Actividad catalítica hacia fenol | 69 |
| 4.5 | Oxidación con método Fenton | 70 |
| 4.5.1 | Condiciones de reacción | 70 |
| 4.5.2 | Resultados y discusión | 71 |
| Capítulo 5: | Impregnación con CO ₂ supercrítico | 79 |
| 5.1 | Introducción | 80 |
| 5.2 | Materiales y métodos | 80 |
| 5.3 | Resultados y discusión | 82 |
| Capítulo 6: | Conclusiones | 86 |
| 6.1 | Conclusiones | 87 |
| 6.2 | Perspectivas a futuro | 88 |
| Capítulo 7: | Anexos | 89 |
| 7.1 | Anexo 1 | 90 |
| 7.2 | Anexo 2..... | 93 |
| Capítulo 8: | Bibliografía | 95 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Glicerol..... | 18 |
| Figura 1.2. Procesos de revalorización del glicerol [7] (politrimetilentereftalato o PTT)..... | 21 |
| Figura 1.3. Oxidación del glicerol [9]. | 22 |
| Figura 1.4. Estructura del hematín. | 23 |
| Figura 1.5. Mecanismo de polimerización de etilfenol (EP) propuesto por Joseph Akkara [12]. | 24 |
| Figura 1.6. Glutaraldehído (Gt)..... | 26 |
| Figura 1.7. APTS..... | 27 |
| Figura 1.8. Ácido poliláctico..... | 30 |
| Figura 1.9. Ácido láctico con sus isómeros D (figura superior izquierda) y L (figura inferior izquierda)..... | 31 |
| Figura 1.10. Diagrama de fases Presión-Temperatura. | 33 |
| Figura 2.1. Estructura de la resazurina. | 38 |
| Figura 2.2. Reducción de resazurina en células vivas [60]. | 39 |
| Figura 2.3. Escherichia coli. | 40 |
| Figura 2.4. Staphylococcus aureus. | 40 |
| Figura 2.5. Pseudomona aeruginosa. | 41 |
| Figura 2.6. Determinación de la densidad del inóculo mínima capaz de reducir rezasurina. EC (<i>Escherichia coli</i>), Sau (<i>Staphylococcus aureus</i>), Pse (<i>Peudomona aeruginosa</i>)..... | 43 |
| Figura 2.7. Izquierda – Crecimiento de <i>P. Aeruginosa</i> a 6,25 mg/L de GA; derecha – Inhibición de <i>E. Coli</i> a 6,25 mg/L de GA..... | 44 |
| <i>E. Coli</i> | 44 |
| <i>P. Aeruginosa</i> | 44 |
| Figura 3.1. (a) Estructura idealizada de la quitina, (b) quitina 100% desacetilada, (c) quitosano copolímero intermedio entre a y b [1]. | 47 |
| Figura 3.2. Proceso de inmovilización de hematín sobre hojuelas de quitosano. | 48 |
| Figura 3.3. Curva de calibración de hematín a 387 nm..... | 50 |
| Figura 3.4 Reacción de determinación catalítica hacia fenol..... | 51 |
| Figura 3.5. Condensación aldólica del glutaraldehído. [65]..... | 53 |
| Figura 4.1. Reacción entre el reactivo de Schiff y el aldehído..... | 55 |
| Figura 4.2. Curvas de calibración del gliceraldehído..... | 56 |
| Figura 4.3. Cromatogramas de muestras patrón..... | 57 |
| Figura 4.4. Resultados ensayos 1 y 2 medidos por método del reactivo de Schiff. | 60 |
| Figura 4.5. Ensayo 1 hematín inmovilizado aporte catalítico 0 y 24 horas. | 61 |
| Figura 4.6. Ensayo 1 hematín inmovilizado aporte no catalítico 0 y 24 hs. | 61 |
| Figura 4.7. Morfología y color de las hojuelas ensayo 1 a 3 hs de reacción. ... | 62 |
| Figura 4.8. Ensayo 2 hematín inmovilizado aporte catalítico 0 y 24 hs. | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.9. Ensayo 2 hematín inmovilizado aporte catalítico y no catalítico 24 hs. | 63 |
| Figura 4.10. Formación de burbujas durante el tercer agregado de H ₂ O ₂ | 66 |
| Figura 4.11. Visualización de hematín insoluble hasta las 3 hs de reacción. ... | 66 |
| Figura 4.12. Blanqueamiento de hematín a 5 hs (imágenes a la derecha), coloración inicial (imagen izquierda). | 67 |
| Figura 4.13. Superficie de respuesta ensayo de optimización. | 68 |
| Figura 4.14. Efecto del pH y de hematín en la generación de GA (izquierda). | |
| Figura 4.15. Generación de GA con hematín a pH 4 (derecha). | 68 |
| Figura 4.16. Concentración GA prueba hematín concentrado. | 69 |
| Figura 4.17. Sistema de reacción con hematín concentrado. | 69 |
| Figura 4.18. Curvas concentración tinta hematín libre vs tiempo. | 70 |
| Figura 4.19. Resultados lote 1 Fenton. | 72 |
| Figura 4.20. Comparación de reactivo de Schiff a 3 horas de reacción sin catalizador presente vs con catalizador presente respectivamente. | 73 |
| Figura 4.21. Resultados lote 2 Fenton. | 74 |
| Figura 4.22. Cromatogramas lote 2 Fenton. | 74 |
| Figura 4.23. Resultados lote 3 Fenton. | 74 |
| Figura 4.24. Cromatograma lote 3 Fenton. | 75 |
| Figura 4.25. Resultados lote 4 Fenton. | 76 |
| Figura 4.26. Cromatograma lote 4 Fenton. | 76 |
| Figura 4.27. Comparación de todos los lotes Fenton. | 77 |
| Figura 4.28. Sistema con catalizador activo Fenton (izquierda). Sistema sin catalizador (derecha). | 77 |
| Figura 5.1. DHA y GA isómeros funcionales. | 80 |
| Figura 5.2. Esquema del sistema de impregnación. C-1: Celda de impregnación; V: Válvulas; M: Manómetros (medidores de presión); B-1: Bomba manual. | 81 |
| Figura 5.3. Espectro FTIR del compuesto DHA puro, obtenido de NIST (National Institute of Standards and Technology, https://www.nist.gov/). | 83 |
| Figura 5.4. Espectro FTIR obtenido de PLA comercial. | 84 |
| Figura 5.5. a-Espectro DHA (violeta); b-Espectro PLA impregnado con DHA (verde); c-Espectro PLA sin impregnar (rojo). | 84 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1.1. Propiedades físicas del glicerol. | 18 |
| Tabla 2.1. Cepas de microorganismos analizados. | 39 |
| Tabla 2.2. MIC y MBC para gliceraldehído. | 44 |
| Tabla 3.1. Soluciones para curva de calibración de hematín a 387 nm. | 50 |
| Tabla 3.2. Condiciones de reacción del testeo de la actividad catalítica del hematín inmovilizado. | 51 |
| Tabla 3.4. Resultados actividad oxidativa hacia fenol. | 53 |
| Tabla 4.1. Confección de medio de reacción para cromatografía gaseosa. | 58 |
| Tabla 4.2. Condiciones de reacción del testeo de la actividad catalítica del hematín libre. | 58 |
| Tabla 4.4. Condiciones de reacción del diseño Doehlert. | 64 |
| Tabla 4.5. Condiciones de reacción con variación de pH. | 64 |
| Tabla 4.6. Condiciones de reacción prueba hematín concentrado. | 65 |
| Tabla 4.7. Actividad catalítica hacia fenol de hematín libre. | 70 |
| Tabla 4.8. Condiciones de reacción por método Fenton. | 71 |
| Las condiciones de reacción del lote 1 corresponden a las optimizadas en efluentes de la industria vitivinícola [15], faltando el tiempo en el cual la conversión hacia el gliceraldehído es máxima, se utilizó dicho lote para determinarlo. Una vez encontrado el tiempo en donde la conversión es máxima, se repitió esta condición optimizada por duplicado, el que corresponde al lote 2. | 71 |
| Tabla 5.1. Rendimiento y eficiencia de impregnación de DHA. | 82 |
| Tabla 5.2. Resultados impregnación supercrítica lote 5 Fenton. | 85 |

Tabla de abreviaturas

| | |
|--------|---|
| (AAP) | 4-aminoantipirina |
| (AP) | Active Packaging |
| (APTS) | 3-aminopropiltriétoxissilano |
| (CG) | Cromatografía gaseosa |
| (DHA) | Dihidroxiacetona |
| (EP) | Etilfenol |
| (EVA) | Etilvinil Acetato |
| (EVOH) | Etilen Vinil Alcohol |
| (FDA) | Administración de Alimentos y Medicamentos |
| (FTIR) | Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier |
| (GA) | Gliceraldehído |
| (Gt) | Glutaraldehído |
| (ICTA) | Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos |
| (IR) | Infrarrojo |
| (MBC) | Concentración mínima bactericida |
| (MHB) | Mueller Hinton |
| (MIC) | Concentración mínima inhibitoria |
| (PEAD) | Polietileno de Alta Densidad |
| (PEBD) | Polietileno de Baja Densidad |
| (PET) | Tereftalato de Polietileno |
| (PI) | Proyecto integrador |
| (PLA) | Ácido poliláctico |
| (PP) | Polipropileno |
| (PS) | Poliestireno |
| (PTT) | Politrimetilentereftalato |

(PVC) Policloruro de Vinilo

(RESS) Rapid Expansion of Supercritical Solutions

(RSM) Metodología de superficie de respuesta

(SSI) Supercritical Solvent Impregnation

(Tg) Temperatura de Transición Vítrea

(TLC) Cromatografía en placa delgada

(UNC) Universidad Nacional de Córdoba

(UV) Ultravioleta

Resumen

La oxidación es una vía de revalorización del glicerol obtenido como subproducto de la producción de biodiesel. En el presente proyecto integrador se propone la obtención de sus productos oxidados por diferentes medios catalíticos. La evaluación de la bioactividad de los mismos y su impregnación en ácido poliláctico.

En primer lugar, se realizó la evaluación de bioactividad de los estándares de glicerol, dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído (GA), mediante el método de microdilución en placa utilizando resazurina como indicador redox. Se determinó que solo GA posee bioactividad en las concentraciones estudiadas.

Se inmovilizó hematóin sobre hojuelas de quitosano, obteniendo un bajo rendimiento de inmovilización posiblemente por la polimerización del glutaraldehído (Gt). Luego se oxidó el glicerol utilizando este catalizador heterogéneo y se midió su actividad catalítica. A concentraciones elevadas de reactivos se observó mayor generación de productos oxidados, confirmando su presencia mediante picos característicos en cromatogramas y por la disminución de glicerol.

Por otro lado, se oxidó el glicerol utilizando hematóin en solución. Se evaluó el efecto del pH, la concentración de hematóin y se realizó un experimento de optimización basándose en el método de Doehlert de dos variables (concentración de glicerol y concentración de peróxido de hidrógeno). Finalmente se determinó la actividad catalítica del hematóin en solución. Durante el experimento de optimización se pudo observar un efecto positivo en la relación porcentual de GA a glicerol inicial con el aumento de peróxido de hidrógeno juntamente con la disminución del glicerol. A pH 4 se obtuvieron mejores resultados de oxidación del glicerol que a pH 5.

Como método alternativo a hematóin, se oxidó el glicerol con sulfato ferroso mediante la reacción de Fenton. Por esta vía catalítica se obtuvieron mayores rendimientos de reacción en comparación a hematóin. El ensayo más productivo fue el realizado con agregado de peróxido de hidrógeno en etapas correspondiente al lote 4.

Se evaluó distintas condiciones de impregnación supercrítica en ácido poliláctico (PLA) utilizando como estándar DHA. Se logró encontrar la condición más óptima a 90 bar, velocidad de despresurización 50 bar/min y 50°C en la cual el rendimiento y la eficiencia de impregnación fueron mayores. Se impregnó con esta condición el lote con mayor concentración de producto obtenidos por Fenton.

Capítulo 1: Introducción y marco teórico

1.1 Introducción

El crecimiento de la población y el rápido desarrollo de algunos países han traído un incremento de las necesidades energéticas en todo el mundo. Debido a los altos costos del petróleo, y a su influencia en la contaminación de nuestro planeta, desde los últimos años múltiples organismos han comenzado a invertir de forma importante en nuevos proyectos para generar fuentes de energías alternativas, renovables y sostenibles para el ambiente.

En estas circunstancias, industrias relacionadas con la producción de biodiesel y bioetanol han experimentado un enorme crecimiento. La aparición de estos nuevos combustibles ha traído numerosas consecuencias a nuestra sociedad como, por ejemplo: la modificación de los precios de los alimentos o subvenciones gubernamentales para nuevos proyectos de este tipo, entre otros. Otra de las consecuencias, es la sobreproducción y acumulación de subproductos en la producción de biodiesel -como el glicerol-, que ha repercutido en el mercado. Esta producción genera un problema debido a la creciente oferta de glicerol a nivel mundial y a una demanda prácticamente estancada de éste. Este hecho podría considerarse como una oportunidad de negocio porque se cuenta con una sobreoferta de una materia prima a la cual se le puede encontrar nuevos usos que sigan siendo sostenibles y respetuosos con el ambiente.

Es precisamente en esta cuestión, donde pretendemos ofrecer una solución con el presente proyecto. Esta propuesta incluye la de evaluación de un uso alternativo del glicerol en la industria, determinando la bioactividad de los compuestos obtenidos de su primera oxidación. Para lograr tal objetivo, se pretende utilizar dos métodos de oxidación de glicerol centrados en el hierro como elemento de la catálisis: un complejo natural de éste –hematín- y la reacción de Fenton.

Para finalizar se pretende impregnar el producto obtenido en un film polimérico comercial con la posible futura aplicación del desarrollo de envases activos para alimentos, con el fin de extender la vida útil y calidad del alimento envasado.

1.2 Glicerol

El 1, 2, 3-propanotriol, glicerol, o también conocido como glicerina, es un alcohol de tres grupos hidroxilos. Su estructura química se muestra en la Figura 1.1. Es incoloro, inodoro, viscoso e higroscópico. Puede ser encontrado en todas las grasas y aceites como un éster graso y es un importante intermedio en el metabolismo de muchos organismos vivos. Fue descubierto en 1779 por Scheele por la saponificación del aceite de oliva, y Chevreul demostró en 1813 que una molécula de glicerol y 3 de ácidos grasos forman la composición de los aceites y grasas en triglicéridos [1]. Las propiedades físicas del glicerol se resumen en la Tabla 1.1.

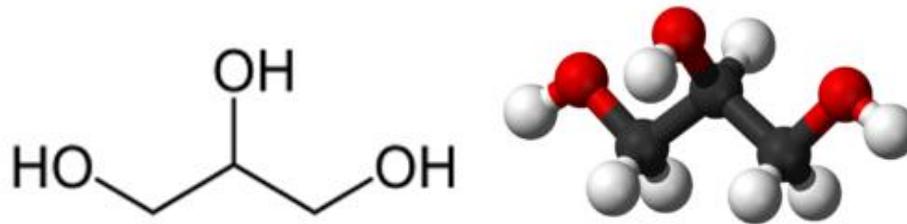


Figura 1.1. Glicerol.

Tabla 1.1. Propiedades físicas del glicerol.

| Propiedades físicas | |
|----------------------------|------------------------|
| Apariencia | Incoloro |
| Densidad | 1261 kg/m ³ |
| Viscosidad | 1,5 Pa.s |
| Masa molecular | 92,09382 g/mol |
| Punto de fusión | 291 K |
| Punto de ebullición | 563 K |
| Punto de inflamación | 433 K |
| Índice de refracción | 1,4729 |

El primer uso industrial del glicerol fue en 1866 cuando Nobel produce la dinamita, en donde el trinitrato de glicerol (nitroglicerina) es estabilizado por absorción en tierras diatomeas [2].

Este propanotriol puede ser producido a partir de dos procesos distintos:

- Saponificación o transesterificación de aceites vegetales o grasas animales, dando glicerol como subproducto.
- Producción tradicional de glicerina sintética usando epíclorhidrina.

Desde 2006, la producción de glicerol por transesterificación a partir de aceites ha superado la producción a partir de otros métodos en todo el mundo. Esto se debe al aumento de producción de biodiesel. La producción de glicerol sintético se ha reducido al mínimo ya que no es económicamente competitiva cuando se compara con otros métodos. La producción de glicerol por hidrólisis ha sido sustituida por la explotación del biodiesel.

El costo del biodiesel se puede reducir si su producción se acompaña de un aprovechamiento de la glicerina y se consiguen aplicaciones rentables para su uso. El problema que puede plantearse es que, si la glicerina es muy impura o no tiene mercado, puede llegar a convertirse en un desecho que generará costos de manejo y no ingresos.

1.2.1 Usos tradicionales del glicerol

Cabe mencionar que el glicerol se ha venido empleando hasta ahora en

cosmética, en fabricación de explosivos y en algunos productos alimenticios y farmacéuticos. Sin embargo, estos usos tradicionales son incapaces de absorber la oferta actual de glicerina. Es por eso que la utilización del subproducto rico en glicerol, generado en la producción de biodiesel, puede llevar consigo un beneficio económico, ya que si se descubre nuevas alternativas de uso que sean factibles tanto técnicamente como económicamente este puede ser explotado.

El glicerol es usado principalmente en aplicaciones para el cuidado personal. Se usa como emulsificante, emoliente y acondicionador. También es usado en la industria farmacéutica y en la alimenticia como humectante, disolvente y endulzante. Es el principal ingrediente en productos técnicos como resinas, poliéteres, polioles y poliuretanos. El glicerol usado en aplicaciones técnicas está creciendo debido a la producción de epiclorhidrina, 1,3-propanodiol y propilenglicol [3, 4].

A continuación, se explican los principales usos tradicionales del glicerol [5,6]:

- Industria de los alimentos:

El glicerol como alimento es fácilmente digerible y no tóxico, y se metaboliza junto a los carbohidratos, aunque esté presente de alguna forma en todos los aceites vegetales y animales. En productos alimenticios el glicerol actúa como un solvente y su viscosidad permite dar cuerpo al producto. En caramelos, retarda la cristalización del azúcar, y también es utilizado como medio de transferencia de calor donde está en contacto directo con el alimento. Además, se utiliza como lubricante en las maquinarias procesadoras y empacadoras de alimentos. Los poligliceroles y los ésteres de gliceroles han incrementado su uso en los alimentos, particularmente en mantecas y margarinas.

- Explosivos:

La nitroglicerina es un éster orgánico altamente explosivo, se obtiene mezclando ácido nítrico concentrado con glicerina. Es un líquido pesado, aceitoso, incoloro o ligeramente amarillo, con una densidad de $1,60 \text{ g/cm}^3$ y un olor suave a quemado. Produce dos formas cristalinas: una con un punto de fusión de $2,8^\circ\text{C}$, y otra de $13,5^\circ\text{C}$. La nitroglicerina arde lentamente si se calienta al aire libre, pero explota al calentarla en un recipiente cerrado o si alcanza una temperatura de 218°C . Es muy sensible a los golpes por lo que resulta peligroso de transportar. Al detonar, produce alrededor de diez mil veces su propio volumen de gas. Es ocho veces más potente que la pólvora para masas iguales y trece veces más potente para volúmenes iguales.

- Industria farmacéutica:

En medicina la nitroglicerina se usa como vasodilatador para el tratamiento

de la enfermedad isquémica coronaria, el infarto agudo de miocardio y la insuficiencia cardíaca congestiva. El glicerol también es utilizado como excipiente en la mayoría de los jarabes.

- **Cosmetología:**

El glicerol es un hidratante activo o humectante, es decir que retiene la humedad. Se utiliza también en otros preparados para mejorar su conservación, ya que esta molécula permite retener el agua en el interior del envase, impidiendo que el producto se seque. La glicerina se utiliza también para fabricar jabones transparentes que pueden llegar a tener alrededor de un 15 a un 20% de glicerina pura.

- **Industria tabaquera:**

Junto con otros agentes saborizantes es aplicada en un 2% respecto al peso del tabaco. Ayuda a mantener su humedad y de esta manera impide su secado e influye en el olor a quemado del tabaco cuando es consumido. También se usa para producir tabaco para masticar, donde agrega dulzura y previene la deshidratación.

- **Lubricantes:**

El glicerol puede ser usado como lubricante en lugares donde el aceite no puede cumplir ese papel. Es recomendado su uso en compresores de oxígeno porque es más resistente a la oxidación que los aceites minerales. Se usa como lubricante de bombas y otros equipos. Para incrementar la capacidad de lubricación se le puede agregar grafito. Además, se puede reducir la viscosidad del glicerol agregándole agua, alcohol, o glicoles y puede ser incrementada por polimerización o mezclándolo con almidones.

- **Polímeros:**

El glicerol es el iniciador para que el óxido de propileno, solo o con óxido de etileno, forme polímeros al reaccionar con diisocianatos produciendo espuma flexible de uretano. Además, los poliéteres con glicerina se utilizan para formar espuma rígida de uretano.

1.2.2 Revalorización del glicerol

Las principales vías de valorización del glicerol son: la hidrogenólisis a propilenglicol, eterificación, oxidación para obtener ácidos y compuestos carbonílicos, esterificación o transesterificación a monoglicéridos, obtención de hidrógeno, carboxilación en presencia de urea para obtener carbonato de glicerol y la deshidratación para obtener acroleína. En la Figura 1.2 se pueden

observar los distintos procesos de revalorización del glicerol.

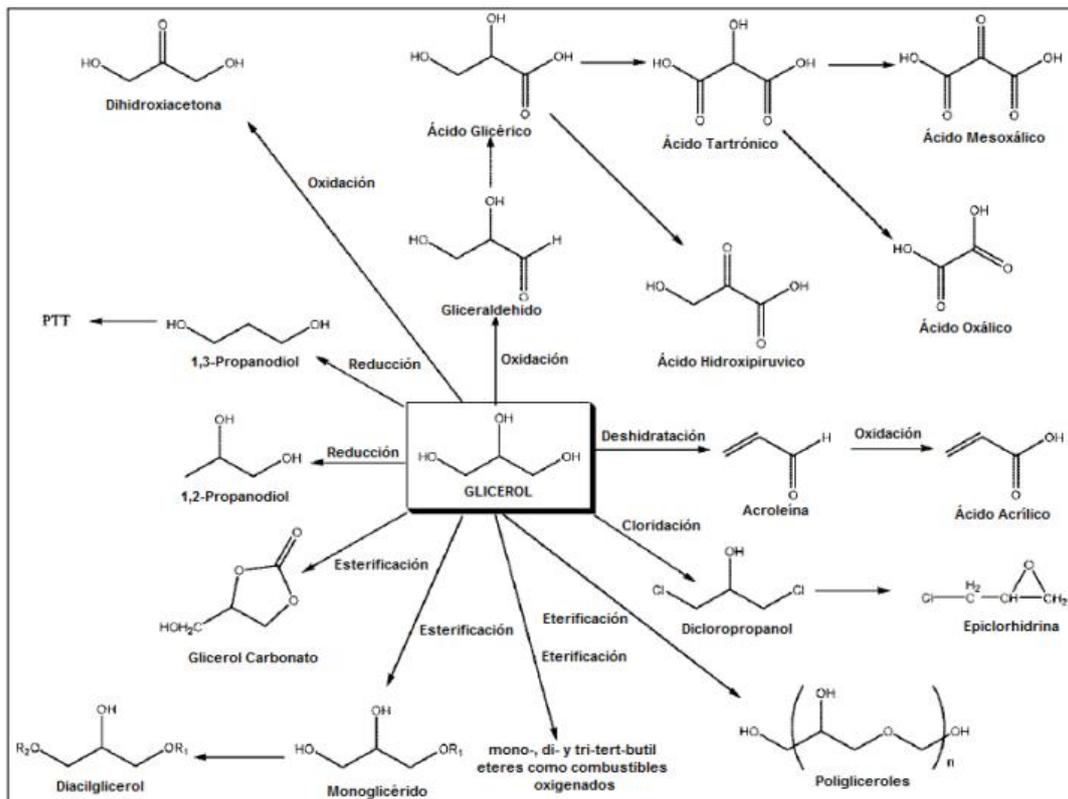


Figura 1.2. Procesos de revalorización del glicerol [7] (politrimetilentereftalato o PTT).

De los procesos de revalorización del glicerol solo cuatro se han comercializado [8]. El primero es la cloración del glicerol a epiclorhidrina utilizado para producir resinas epoxi, poliuretanos o como reactivo para producir políglicerol lineales, utilizados como aditivos en productos de cuidado personal. El segundo proceso es la esterificación de glicerol a ésteres de monoácido y diácido utilizados en la industria de alimentos y cosméticos. Otro proceso comercializado es la producción de gas sintético (CO y H₂) a partir del glicerol, utilizado como reactivo para producir metanol. El cuarto proceso de importancia industrial es la producción del 1,2- y 1,3-propanodiol y acroleína. El 1,2- y 1,3-propanodiol son productos intermedios para la industria de los polímeros, mientras que la acroleína se usa como un precursor de la metionina, utilizado como aditivo para la alimentación del ganado.

De todas las vías de valorización del glicerol mencionadas se estudiará la de oxidación y específicamente mediante el uso de catalizadores de hierro como hematina y Fenton.

1.2.2.1 Oxidación del glicerol

La oxidación del glicerol consta de una serie de reacciones que conducen a la formación de compuestos en donde se reduce la densidad de electrones de

la molécula, como aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos. Estos productos poseen gran importancia en la industria cosmética y farmacéutica con aplicaciones en la síntesis de productos farmacéuticos específicos.

Es posible obtener alrededor de 18 compuestos si cada grupo alcoholístico se oxida a aldehído, en el caso de los grupos alcoholísticos primarios, y a cetonas, en el caso de los grupos alcoholísticos secundarios, con la consecuente producción de ácidos y aldehídos de cadena más corta y eventualmente CO₂ [9].

El glicerol se oxida en primer nivel a dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído (GA) y seguidamente a diversos ácidos, como ácido glicérico, hidroxipirúvico, tartrónico, láctico, oxálico, mesoxálico, fórmico y acético. En la Figura 1.3 se pueden observar los diversos productos de la oxidación del glicerol.

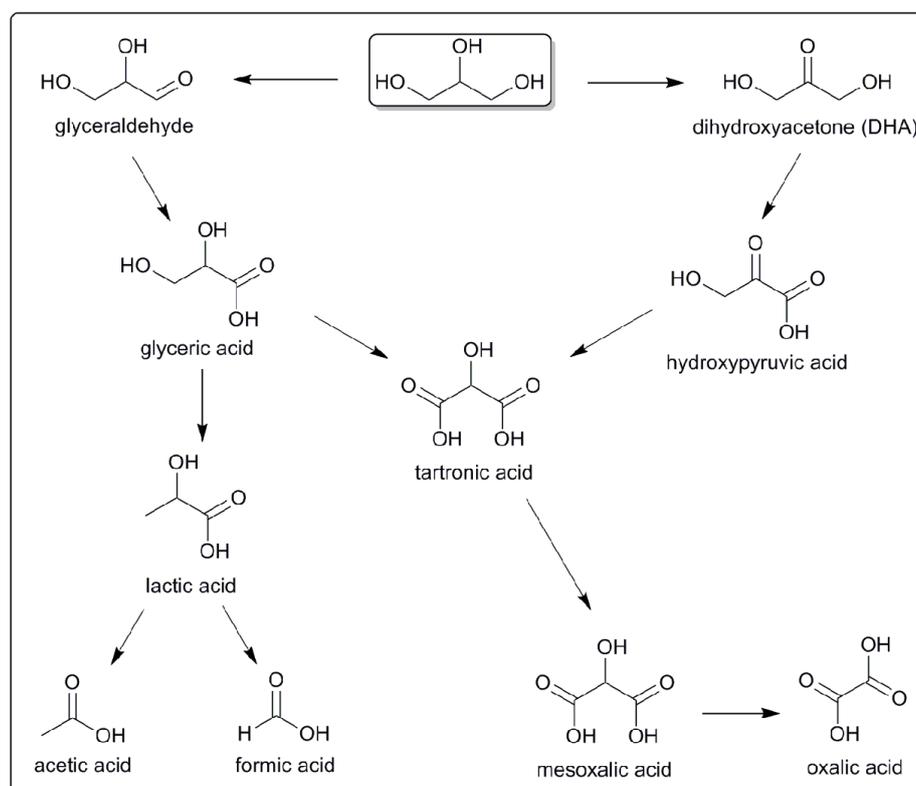


Figura 1.3. Oxidación del glicerol [9].

La ruta de obtención de estos productos varía en función de las condiciones de reacción, como la temperatura, pH, concentraciones y catalizador utilizado. Así, la selectividad de una ruta hacia un producto específico estará condicionada por la elección de los parámetros mencionados.

Para lograr oxidar el glicerol se propone utilizar hierro, mediante hematóin y sulfato ferroso (reacción de Fenton) como catalizadores, utilizando peróxido de hidrógeno como agente oxidante.

1.2.2.1.1 Oxidación con hematín

Las cromoproteínas porfirínicas están compuestas por un grupo prostético denominado porfirina. Este grupo está compuesto por un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales y unido mediante cuatro enlaces de coordinación a un átomo metálico en el centro. Los hidrocarburos presentes en los anillos son en su mayoría los causantes de las reacciones nucleofílicas y electrofílicas, a las que se ven sometidas las porfirinas. Estos anillos son estructuras compartidas entre la clorofila y la hemoglobina. Si poseen en el centro un átomo de hierro se conforma el llamado grupo hemo que permite fluir en su interior libremente electrones, los cuales son localizados en otros sitios.

La hemoglobina y mioglobina pertenecen a las hemoproteínas y catalizan el transporte de electrones durante la producción de energía celular, del oxígeno durante la respiración y del citocromo B y C. Por otro lado, las catalasas y peroxidasas catalizan la reducción del H_2O_2 en distintos sistemas. La principal aplicación de las protoporfirinas es su uso como catalizadores en reacciones de oxidación en síntesis orgánica [10].

Hematín es una protoporfirina IX unida mediante enlaces de coordinación a un átomo de hierro unido a un hidroxilo. La estructura del hematín se puede observar en la Figura 1.4.

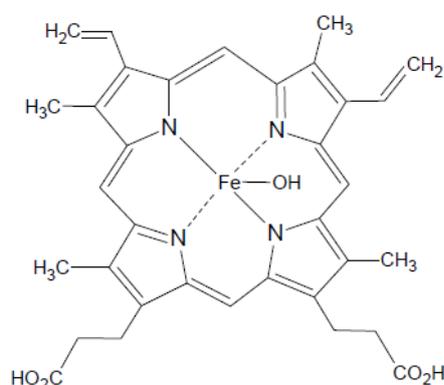


Figura 1.4. Estructura del hematín.

Es utilizada normalmente como antiparasitaria y antiprotozoos y fue caracterizada durante el desarrollo de drogas contra la malaria [11]. Su aplicación como catalizador fue probada exitosamente en la polimerización del etilfenol (EP), en presencia de H_2O_2 que oxida el átomo de hierro central de hematín, generando un estado intermedio capaz de oxidar a sustratos reductores como el etilfenol [12]. Mössbauer y Akkara propusieron un mecanismo catalítico para hematín mediante estudios de espectroscopía (Figura 1.5.) en el cual el peróxido de hidrógeno coordina la quinta posición del hematín y provoca la ruptura del grupo-OH durante la formación del compuesto intermedio I. Además, se propone una vía de inactivación reversible dando

lugar al compuesto III [12]. Por otra parte, estudios anteriores de espectroscopía EPR proponen una ruptura homolítica del enlace peroxídico de peróxidos orgánicos y la presencia de radicales peroxilo e hidroxilo [13].

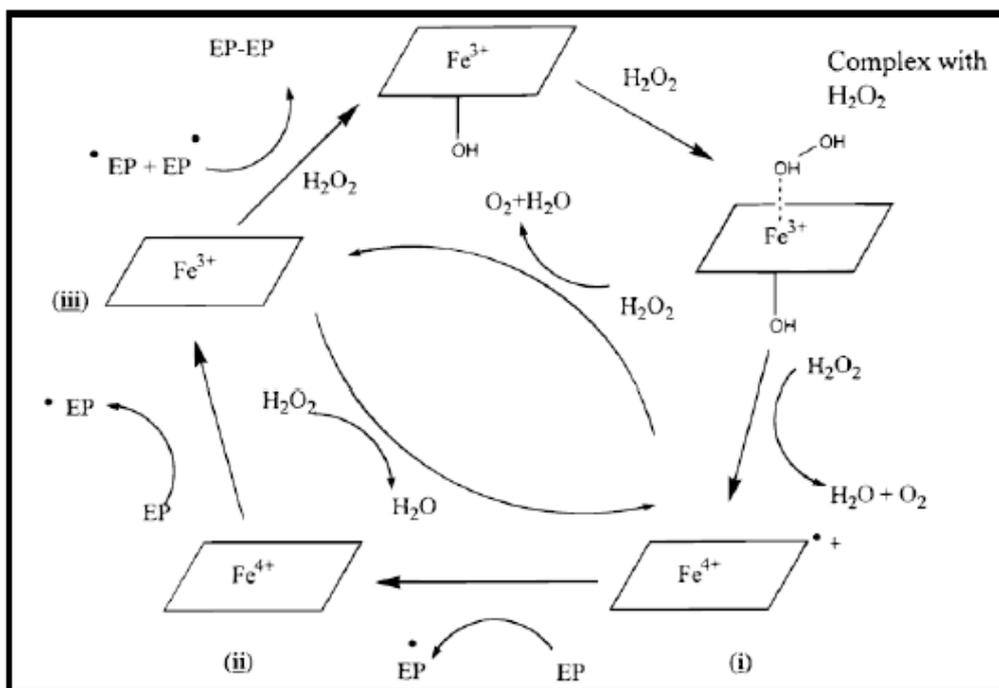


Figura 1.5. Mecanismo de polimerización de etilfenol (EP) propuesto por Joseph Akkara [12].

Dependiendo de las condiciones del medio, el hematógeno forma espontáneamente dímeros de tipo μ -oxo y π - π limitando su actividad y solubilidad en solventes. El comportamiento del hematógeno depende entonces del pH, fuerza iónica, concentración y polaridad del solvente.

1.2.2.1.2 Oxidación por reacción de Fenton

La reacción de Fenton, descubierta por H.J.H Fenton en 1894, se basa en una reacción de oxidación en medio ácido a presión y temperatura ambiente en la cual se forman radicales OH•, provenientes del H₂O₂ catalizado por sales de hierro (II). Esta reacción funciona mejor a un pH entre 3 y 4 debido a que el hierro se encuentra en solución y a pH superior precipita como hidróxidos [14].

En este proyecto se utiliza sulfato ferroso como catalizador para promover la oxidación del glicerol.

En las reacciones de Fenton el Fe⁺² cambia su estado de oxidación de +2 a +3, y el H₂O₂ sufre principalmente una ruptura homolítica, formando radicales hidroxilo (OH•) y peroxilo (OOH•) altamente oxidantes [15]. El mecanismo catalítico de Fenton se describe mediante cinco reacciones presentadas a continuación.



Durante la primera reacción el Fe^{+2} se oxida, mientras que el peróxido de hidrógeno se escinde formando un ion y un radical hidroxilo. La segunda reacción describe cómo el hierro se recupera al reaccionar con peróxido de hidrógeno, formando un radical peroxilo. En las siguientes reacciones se describe la producción de radicales orgánicos ($R\cdot$) y la reducción del Fe^{+3} mediante dicho radical formando así un compuesto orgánico oxidado ($R-OH$).

El rendimiento del proceso Fenton depende de diversos factores, entre ellos, la concentración del agente oxidante y catalítico, la temperatura, pH y tiempo de reacción. Así mismo la eficiencia de este proceso está relacionada con la naturaleza del compuesto a oxidar y la presencia de otros compuestos orgánicos e inorgánicos.

La efectividad de Fenton en la oxidación de glicerol ha sido estudiada previamente en efluentes de la industria vitivinícola [16]. Por ello en el presente trabajo se utilizan las condiciones óptimas determinadas en dicho estudio.

1.3 Inmovilización de catalizadores en soportes sólidos

La inmovilización de catalizadores es un procedimiento por el cual el compuesto con actividad catalítica, en este caso hematin, es unido a un soporte inerte [17]. Este proceso aporta los beneficios de facilitar la recuperación del catalizador del medio de reacción y de prevenir la agregación molecular evitando así la disminución de la actividad catalítica. A través de la inmovilización del catalizador el proceso catalítico resulta más atractivo desde el punto de vista ambiental y económico.

Como factor común, los soportes deben tener ciertas características particulares como son: alta estabilidad bajo las condiciones de reacción, ser insolubles en el medio, poseer una elevada área superficial, ser inertes frente a reactivos y productos y poseer moderada a alta resistencia mecánica. Los soportes pueden ser de naturaleza orgánica como inorgánica siendo estos últimos los más utilizados actualmente, como por ejemplo la sílice, zeolitas y la alúmina.

En búsqueda de favorecer la unión del catalizador al soporte se han investigado varios métodos, los cuales se han clasificado según diferentes

critérios, como por exemplo a natureza física o química de la inmovilización o su carácter reversible o irreversible. Algunos grupos funcionales pueden formar fuertes enlaces covalentes que los unen al soporte, o bien la inmovilización puede ocurrir por adsorción, siendo la unión más débil. Otra forma es que no se produzca enlace alguno, sino que el catalizador quede “atrapado”, es decir retenido físicamente por el soporte [18].

La inmovilización de tipo covalente posee la ventaja de ser estable frente a agentes externos, por lo cual no se produciría una pérdida de catalizador por liberación del mismo en el medio. Entre los posibles tipos de uniones covalentes, se destaca la generación de enlaces de bases de Schiff y su posterior reducción [18].

Cuando se desea lograr la inmovilización de una enzima sobre un soporte que contiene grupos amino, este proceso se realiza normalmente mediante dialdehídos como el 1,5-pentanodial (glutaraldehído o Gt, Figura 1.6). Se han inmovilizado con este compuesto numerosas enzimas como tirosinasa [19,20], peroxidasa [21], β-galactosidasa [22] o lipasa [23].

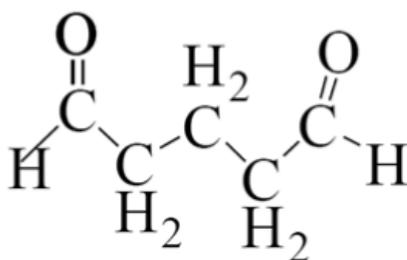


Figura 1.6. Glutaraldehído (Gt).

La unión del Gt y la enzima al soporte, a su vez puede estar mediada por un agente espaciador, el cual aporta movilidad a la enzima y reduce la posibilidad de impedimento estérico para el ingreso del sustrato al sitio activo.

El 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS, Figura 1.7) constituye un adecuado bloque espaciador al unirse al soporte mediante uno de sus grupos etoxi, dejando el grupo amino hacia el exterior para formar la base de Schiff con el Gt. Su capacidad para reducir el efecto del impedimento estérico, creando un ambiente similar al soluble ha sido demostrada por Agostina Córdoba en el año 2014, aplicando APTS como espaciador entre hematófina y hojuelas de quitosano [24].

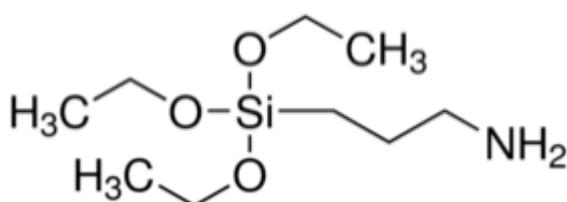


Figura 1.7. APTS.

Adicionalmente, puede realizarse una desactivación de grupos activos del soporte, logrando así un catalizador heterogéneo con un único sitio activo. En el caso del quitosano se desactivan los grupos carbonilos luego de inmovilizar hematóin evitando que estos grupos reaccionen y alteren la morfología y características del catalizador. Por otro lado, se aumenta la eficiencia del catalizador al quedar como único sitio activo el del hematóin.

1.4 Bioactividad

Existen ciertos compuestos, de origen natural y artificial, que poseen la capacidad de eliminar microorganismos o inhibir su crecimiento, tales como hongos, bacterias y parásitos. Tal característica se denomina actividad antimicrobiana y los principales métodos para su determinación se clasifican en métodos de difusión, dilución y bioautografía [25]. También existe el análisis conductimétrico, en el cual se determina el crecimiento de microorganismos como el cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo [26].

Dentro de los principales métodos se encuentra el método de difusión en disco y difusión del pozo en agar, en los cuales se realiza una determinación cualitativa del efecto de ciertos compuestos sobre bacterias de interés, expresando los resultados mediante el diámetro del halo de inhibición, producido por dichos compuestos [25]. El método de difusión posee ciertas limitaciones que derivarán en errores y falta de reproducibilidad, como es la densidad del inóculo mal estandarizada, la utilización de cultivos no puros, déficit en el control de la humedad del medio de cultivo que puede conducir a un crecimiento muy pobre o muy activo y el deterioro de los discos.

Por otro lado, los métodos de dilución son útiles para determinar cuantitativamente la actividad antimicrobiana. La técnica más utilizada es la llamada *concentración mínima inhibitoria* (MIC), con la cual se define la concentración mínima del compuesto capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo y la *concentración mínima bactericida* (MBC), con la cual se define la concentración mínima del compuesto capaz de evitar el crecimiento del microorganismo. Estas técnicas se mejoran con la ayuda de indicadores Redox, utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/ viabilidad microbiana.

El método de bioautografía consiste en realizar un cromatograma mediante cromatografía en capa delgada (TLC). Este ensayo representa una herramienta útil para la purificación de sustancias bioactivas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar o un fraccionamiento bioguiado [25]. Es importante tener en cuenta que solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en

la placa de TLC, aún después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano.

El método conductimétrico resulta útil para detectar la concentración microbiana y su metabolismo cuando la turbidez del medio es alta, como así también para matrices complejas como alimentos y materiales insolubles como polvos cerámicos antimicrobianos [26].

En el presente PI se determina la actividad antimicrobiana del glicerol y sus compuestos oxidados mediante el método de microdilución en placa utilizando un indicador Redox para la determinación de la MIC.

1.5 Impregnación con CO₂ supercrítico

1.5.1 Envases de alimentos. Envases activos.

Los envases alimentarios son los destinados a contener alimentos acondicionados en ellos desde el momento de la fabricación, con la finalidad de protegerlos hasta el momento de su uso por el consumidor de agentes externos de alteración y contaminación así como de la adulteración (Código Alimentario Argentino, 1986).

Al buscar asegurar la inocuidad en los alimentos, los envases y su constante evolución, conllevan un significativo ahorro en lo que respecta a las pérdidas económicas generadas por el deterioro de alimentos perecederos. De esta forma, las tecnologías de Envasado Activo o “Active Packaging” (AP) se están desarrollando hace varios años debido a esta creciente demanda. Este concepto implica interacciones químicas entre el envase y la comida empaquetada o la atmósfera del espacio de cabeza mediante la incorporación de ciertos aditivos en la película de envasado o dentro de los envases [27]. Algunos ejemplos de envases activos incluyen oxígeno y eliminadores de etileno, películas antimicrobianas y antioxidantes [28,29]. En los últimos años, los envases antimicrobianos han atraído mucha atención de la industria alimentaria debido al aumento de la demanda de productos mínimamente procesados y/o sin conservantes por parte de los consumidores [30].

Los principios detrás del envasado activo se basan ya sea en las propiedades intrínsecas del polímero utilizado como material de embalaje o en la introducción (por inclusión, atrapamiento, recubrimiento, etc.) de sustancias específicas en el polímero [31]. Las propiedades intrínsecas del polímero pueden dar lugar a la función activa junto al añadido intencional de un grupo activo. Un principio activo puede ser incorporado en el interior del material de embalaje o en su superficie, en estructuras multicapa o en elementos particulares asociados con el embalaje tales como sobres, etiquetas o tapas.

La naturaleza de los agentes activos que pueden añadirse es muy diversa (enzimas, bactericidas, fungicidas, extractos naturales, iones, etanol,

antioxidantes, etc.), así como la naturaleza de los materiales en los que se incluyen, como papeles, plásticos, metales o combinaciones de estos materiales. Los sistemas activos se pueden colocar fuera del envase primario, entre sus diferentes partes o en el interior. En este último caso, el sistema puede estar en contacto sólo con la atmósfera que rodea el alimento, en contacto con la superficie del alimento o colocado dentro del propio alimento.

Los materiales de envase antimicrobianos surgieron recientemente como un medio potencial para cooperar en la preservación de alimentos perecederos [32] y extender su vida útil.

Para aplicaciones de envases antimicrobianos o antioxidantes, los agentes deben ser incorporados a la capa envoltoria, de manera que se mantengan estables allí por un tiempo y se liberen del envase en forma controlada. Algunos ejemplos de este tipo de envases se ven reflejados en el envasado de carnes rojas con agregado de aditivos antioxidantes como eugenol [33] o tocoferol en la matriz del envoltorio, o el envasado de alimentos tipo snack, leche en polvo [34] y aceite de soja, con agregado de antioxidantes fenólicos.

1.5.2 Materiales involucrados en envases activos

En las investigaciones de esta tecnología de envase, se han utilizado diversos materiales y polímeros con el fin de encontrar los materiales más adecuados como barrera física, y que además conformen una matriz apta para portar principios activos. Entre los polímeros más utilizados, se encuentran: Polipropileno (PP), Polietileno de Baja Densidad (PEBD), Polietileno de Alta Densidad (PEAD), Etilen Vinil Alcohol (EVOH), Policloruro de Vinilo (PVC), Tereftalato de Polietileno (PET), Poliestireno (PS), Etilvinil Acetato (EVA), Surlyn; otros compuestos como la Metilcelulosa, Carboximetilcelulosa, y biopolímeros que están encontrando su inserción en el mercado como el Ácido Poliláctico (PLA). En el presente trabajo se busca impregnar nuestro compuesto activo (GA) en este último material.

Las propiedades mecánicas de los materiales poliméricos están fuertemente relacionadas con la estructura química de las macromoléculas y su ordenamiento en la fase sólida. La estructura química específica, determina la movilidad molecular de las cadenas poliméricas y el desarrollo de interacciones intra e intermoleculares que pueden afectar fuertemente las propiedades mecánicas, en términos de rigidez y resistencia a la rotura. El grado de cristalinidad, la estructura de los cristales en materiales semicristalinos y las orientaciones moleculares son otros parámetros importantes que influyen en las propiedades mecánicas finales de un polímero.

Además, los valores de la temperatura de transición vítrea (T_g) y de fusión, como así también la densidad, se relacionan tanto con la estructura molecular como con el grado de movilidad y ordenamiento de las cadenas. Cualquier efecto

sobre la Tg, temperatura de fusión, densidad, y el grado de cristalinidad como una consecuencia de tratamientos de alta presión de los materiales utilizados para envase pueden resultar también en una modificación de las propiedades mecánicas del polímero.

1.5.2.1 Ácido poliláctico

El uso de polímeros a base de petróleo implica preocupaciones ambientales relacionadas con su sustentabilidad y su disponibilidad, por ello existen desafíos tecnológicos para encontrar materiales más ecológicos a partir de fuentes renovables. Entre los plásticos biodegradables de origen renovable, el ácido poliláctico (PLA) es uno de los materiales más prometedores debido a su carácter termoplástico, biodegradable y biocompatible, así como su buena procesabilidad [35,36].

La aplicación de PLA se ha extendido a otras áreas de productos básicos tales como ingeniería de tejidos, embalaje, textiles y materiales compuestos [37,38]. Actualmente, el PLA está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) para ser utilizado en contacto con alimentos [39,40]. En el campo del envasado de alimentos, uno de los principales impulsores de la innovación ha sido la creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros, de alta calidad, mínimamente procesados y de larga duración [41].

La molécula precursora del PLA es el ácido láctico. La estructura química básica de este polímero se muestra en la Figura 1.8. Las numerosas aplicaciones del PLA se deben a que presenta un amplio rango inusual de propiedades, desde el estado amorfo hasta el estado cristalino; propiedades que pueden ajustarse manipulando las mezclas entre los isómeros *D* (-) y *L* (+), los pesos moleculares y la copolimerización [42].

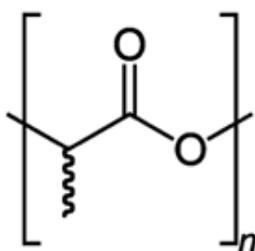


Figura 1.8. Ácido poliláctico.

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico) es el ácido carboxílico más simple con un átomo de carbono asimétrico. Puede producirse por fermentación anaeróbica de substratos orgánicos, con microorganismos como hongos y bacterias. El ácido láctico obtenido en la fermentación es ópticamente activo, por lo que la producción específica de los isómeros *L* (+) o *D* (-) puede determinarse utilizando un lactobacilo apropiado (Figura 1.9) [43].

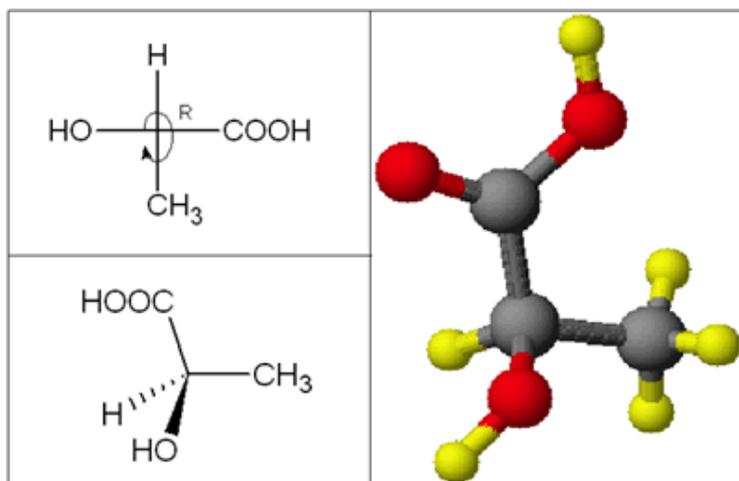


Figura 1.9. Ácido láctico con sus isómeros D (figura superior izquierda) y L (figura inferior izquierda).

Las propiedades físicas y mecánicas dependen de la composición del polímero, de su peso molecular y de su cristalinidad. La cristalinidad puede ajustarse desde un valor de 0% a 40% aproximadamente en forma de homopolímeros lineales o ramificados, y como copolímeros al azar o de bloque [50].

La temperatura de procesamiento está entre 60 y 125°C y depende de la proporción de isómeros D y L en el polímero. Sin embargo, el PLA puede ser plastificado con su monómero o alternativamente con ácido láctico oligomérico y esto permite disminuir dicha temperatura [44].

El PLA tiene propiedades mecánicas en el mismo rango de los polímeros de origen petroquímico, a excepción de una baja elongación. Sin embargo, esta propiedad puede ser afinada durante la polimerización (por copolimerización) o por modificaciones post-polimerización (por ejemplo, mediante el agregado de plastificantes) [45].

El PLA puede ser tan duro como el acrílico o tan blando como el polietileno, rígido como el poliestireno o flexible como un elastómero. Puede además ser formulado para dar una variedad de resistencias. Las resinas de PLA pueden ser sometidas a esterilización con rayos gama y son estables cuando se exponen a los rayos ultravioleta. Al PLA se le atribuyen también propiedades de interés como la suavidad, resistencia al rayado y al desgaste [45].

1.5.3 Incorporación de compuestos en envases activos

Los principios activos son incorporados dentro de este tipo de materiales de envase mediante distintas técnicas. Un método muy utilizado es el recubrimiento activo. Este permite incorporar el agente en una capa fina superficial próxima al alimento, mediante la utilización de barnices, o emulsiones acuosas de polímeros vinílicos y acrílicos. El recubrimiento se obtiene por evaporación

posterior del disolvente. Este método ofrece la ventaja de no producir graves degradaciones térmicas, pero se puede experimentar una pérdida importante de los componentes volátiles [46]. Otra técnica consiste en el mezclado por extrusión. El agente se agrega al polímero fundido y se realiza un mezclado con el agente directamente, o indirectamente mediante la incorporación de una nanopartícula que contenga el principio activo y sea compatible con el polímero. Para esta técnica, se requieren grandes cantidades de compuesto activo, y se pueden generar pérdidas significativas por evaporación y/o degradación térmica.

Frente a estas limitaciones, la impregnación con solventes supercríticos aparece como una alternativa interesante y merecedora de atención, ya que se opera con temperaturas bajas (preservando compuestos volátiles o termolábiles) y se pueden lograr mayores profundidades de penetración del compuesto activo.

1.5.3.1 Fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos son sustancias que se encuentran en condiciones de presión y temperatura por encima del punto crítico (Figura 1.10), descubiertos en 1822 por Baron Charles Cagniard de la Tour mientras realizaba experimentos con diversos fluidos calientes y una bala de cañón en un barril cerrado.

Los fluidos supercríticos presentan viscosidades y difusividades similares a las de un gas, a la vez que su densidad y poder de solvatación son semejantes a las de un líquido. Esta combinación de propiedades los convierte en excelentes disolventes para numerosas aplicaciones [47].

Las principales sustancias utilizadas como disolventes supercríticos son gases en condiciones ambientales: CO₂, etano, propano, etileno, etc. En ese sentido, la principal ventaja que presentan es la posibilidad de separar y realizar el secado del producto con una simple expansión, mientras que el gas puede ser recuperado, y reciclado a través de una mínima purificación, dado que en el tratamiento puede quedar levemente contaminado, para su posterior reutilización.

La utilización de este tipo de tecnologías en los procesos industriales tiene numerosos beneficios ambientales, al ser un proceso que consume poca energía durante la operación, y además tiene el potencial para reemplazar los disolventes orgánicos convencionales (usualmente derivados del petróleo, y en muchos casos contaminantes), es por ello que algunas veces se los denomina “solventes verdes para el futuro”. Otra ventaja importante se refiere a la posibilidad de ajustar las propiedades termofísicas de los fluidos supercríticos, como los son la difusividad, viscosidad, densidad o constante dieléctrica, simplemente variando las condiciones operativas como la presión y/o temperatura.

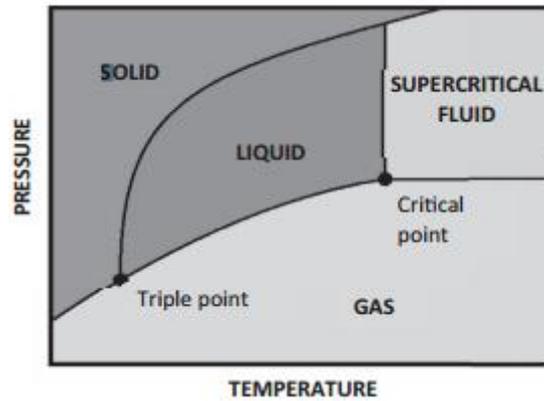


Figura 1.10. Diagrama de fases Presión-Temperatura.

1.5.3.2 Dióxido de carbono supercrítico

El dióxido de carbono se encuentra como fluido supercrítico en condiciones por encima de 73,8 bar y 31,1°C. En estas condiciones, el CO₂ posee una combinación de propiedades única: tiene la densidad de un líquido, dándole características de solvatación similares a disolventes líquidos, sin embargo, tiene la viscosidad de un gas, impartiendo en él propiedades de transferencia de masa favorables. La densidad del CO₂ supercrítico puede ser fácilmente modificada aplicando pequeños cambios en la presión o la temperatura que se ven reflejados en alteraciones del poder disolvente.

El CO₂ supercrítico posee un bajo grado de polaridad, por lo que es capaz de disolver fácilmente sustancias volátiles de bajo peso molecular, apolares o ligeramente polares, mientras que sustancias de mayor peso molecular como polímeros pueden ser plastificados y procesados a temperaturas muy por debajo de su punto de fusión.

El CO₂ supercrítico tiene un interés adicional, ya que no es inflamable, no es tóxico, es reciclable y relativamente inerte [48]. Además, no presenta las dificultades clásicas de presencia de solvente residual ya que este compuesto es gaseoso en condiciones ambientales y por lo tanto puede separarse completamente del producto, evitando posteriores etapas de secado o desolventizado [49].

1.5.3.3 Impregnación supercrítica

La técnica de impregnación supercrítica utiliza medios no tóxicos e inertes, comúnmente CO₂, que actúa como solvente para incorporar un aditivo o compuesto activo en una matriz polimérica. Así, el CO₂ supercrítico representa un buen medio para la impregnación de compuestos orgánicos en polímeros, ya que muestra una alta capacidad solvente para este tipo de sustancias y altos valores de coeficiente de difusión en diferentes tipos de matrices poliméricas a relativamente baja temperatura, debido a su temperatura crítica cercana a la ambiente.

En un proceso de impregnación el CO₂ cumple una doble función. Por un lado, disuelve el compuesto activo, y simultáneamente penetra en la red polimérica, produciendo su hinchamiento, como un solvente convencional. De este modo, el compuesto activo penetra más fácilmente en el polímero, hasta lograr su saturación. Luego, al despresurizar el sistema, el CO₂ abandona rápidamente el polímero, que recupera su forma original, mientras que el compuesto activo queda retenido en la red.

La cantidad de compuesto activo que puede incorporarse al polímero depende de varios aspectos, tales como: las propiedades del polímero; las interacciones químicas entre el polímero y la sustancia activa; la capacidad de hinchamiento y plastificación del solvente, el tiempo de contacto, la presión, la temperatura y la velocidad de despresurización [50, 51]. Éste último suele ser un parámetro muy importante y debe ser optimizado en cada sistema polímero-compuesto activo.

Los procesos de impregnación se pueden clasificar en dos grandes tipos: “Rapid Expansion of Supercritical Solutions” (RESS) y “Supercritical Solvent Impregnation” (SSI).

El proceso de Expansión Rápida de Soluciones Supercríticas (RESS) aprovecha las grandes variaciones del poder disolvente del fluido supercrítico con cambios en la presión. Implica la deposición de una sustancia soluble en el fluido supercrítico dentro de la matriz del polímero luego de la despresurización. En este caso, incluso un soluto que tiene poca afinidad por la matriz polimérica puede quedar atrapado dentro de ella [52].

El proceso de Impregnación con Solventes Supercríticos (SSI) es un mecanismo diferente en donde se satura el fluido con el compuesto deseado y que aprovecha el alto coeficiente de partición del soluto entre el polímero y la fase fluida debido a una alta afinidad del soluto por la matriz. También es posible disolver otra sustancia en el fluido para mejorar la solubilidad del compuesto (codisolvente) o para mejorar su dispersión en el polímero (surfactante) [52,53].

Debe mencionarse que tanto el proceso de RESS como el proceso de SSI pueden verse limitados por la baja solubilidad del compuesto de interés en el fluido.

Actualmente existen distintas aplicaciones a nivel industrial de la impregnación supercrítica, como la impregnación de madera con agentes antifúngicos [54] y teñido de telas water-free [55]. A nivel experimental podemos mencionar la impregnación de polímeros para envases activos [29, 30] e impregnación de materiales biomédicos para liberación controlada de drogas [49], entre otras.

El proyecto integrador en cuestión se desarrolla dentro del segundo de los

tipos nombrados anteriormente (SSI). Se han encontrado en la literatura científica estudios recientes de impregnación de películas de PLA con compuestos activos de origen natural (como timol), pero el estudio de la impregnación con derivados oxidados del glicerol no ha sido reportado.

En este marco, este PI presenta un estudio preliminar de la impregnación de dichos compuestos en películas de PLA utilizando CO₂ supercrítico como fluido y se evaluará cómo dos variables de operación (presión y velocidad de despresurización) afectan la incorporación del compuesto activo.

1.6 Objetivo general

Evaluación preliminar de una ruta de valorización de la molécula de glicerol a través de la producción de derivados oxidados con presunta actividad antimicrobiana y posterior impregnación en un film polimérico comercial.

1.6.1 Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima bactericida de estándares puros de la oxidación primaria de glicerol: gliceraldehído y dihidroxicetona.
- Evaluar la eficiencia de generación de derivados oxidados del glicerol catalizada por hematin tanto en solución como inmovilizado en un soporte sólido.
- Comparar la eficiencia de técnicas alternativas simples de oxidación de glicerol tales como la reacción de Fenton.
- Impregnar los productos de reacción ricos en derivados oxidados, así como estándares puros, en un film de PLA utilizando CO₂ supercrítico.

Capítulo 2: Bioactividad

2.1 Introducción

En el presente capítulo se detalla la metodología utilizada para llevar a cabo el ensayo de bioactividad y los resultados obtenidos.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utiliza el método de microdilución en placa de 96 pocillos, en el cual se utiliza resazurina como indicador redox.

Los microorganismos indicadores utilizados son *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus* y *Pseudomona Aeruginosa*.

El ensayo de bioactividad se realiza para glicerol, con la finalidad de confirmar que no presenta esta propiedad, y para DHA y GA, con el objetivo de estudiar si alguno de ellos puede ser utilizado como biocida. En la bibliografía actual, aún no se ha estudiado ninguno de ellos.

2.1.1 Método de dilución

El método de dilución en agar o caldo es utilizado para determinar cuantitativamente la actividad antimicrobiana de un determinado compuesto sobre ciertos microorganismos.

En el método de dilución se determina la MIC, concentración mínima a la cual un compuesto inhibe el crecimiento de un microorganismo luego de su incubación durante 24 horas. Posteriormente se determina la MBC, concentración mínima a la cual un compuesto antimicrobiano mata el 99% del inóculo inicial luego de su incubación durante 24 horas en condiciones estandarizadas.

La técnica de dilución en caldo consiste en tubos o microplacas (microdilución) en las cuales la concentración del compuesto es creciente. El microorganismo analizado se inocula en los distintos pozos o tubos y se determina la MIC luego de su incubación durante 24 horas [56].

En la técnica de dilución en agar las cajas se siembran en profundidad, con una determinada concentración del compuesto, luego se inoculan con el microorganismo analizado y se incuba durante 24 horas. Posteriormente se examina cada placa determinando si hubo o no crecimiento del microorganismo [57].

La principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra. En contraposición, la principal ventaja radica en una mayor sensibilidad para pequeñas cantidades de compuesto bioactivo, además de diferenciar entre un efecto bacteriostático y bactericida.

2.1.2 Determinación de la MIC

La cuantificación de la MIC se puede realizar en microdilución, para lo cual se utilizan placas con 96 pocillos (12 mm x 8 mm) en la que se estudia en cada una de ellas 10 diluciones, un control positivo y uno negativo y hasta 8 compuestos antimicrobianos para un determinado microorganismo u 8 microorganismos diferentes para un determinado compuesto antimicrobiano.

Se debe tener especial cuidado en el mantenimiento de las condiciones del inóculo, por lo cual las placas poseen una tapa y se sellan antes de incubar. Posteriormente se observa la turbidez o mediante el empleo de indicadores Redox se observa el cambio de color.

2.1.2.1 Indicadores redox

Un indicador redox es una sustancia que cambia de color al momento en que se llega al punto de equivalencia en una valoración redox. Es utilizado en reacciones no coloreadas y se emplean en pequeñas cantidades, debido a que su coloración es intensa.

Entre los indicadores redox utilizados en determinaciones de viabilidad celular se encuentra la resazurina.

La resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) es un colorante azul, débilmente fluorescente utilizado como indicador redox en determinaciones de viabilidad celular para la respiración celular, tanto aeróbica como anaeróbica [58]. En la Figura 2.1 se puede observar su estructura química. En su forma oxidada es de color azul, mientras que en su forma reducida se convierte irreversiblemente a resorufin fluorescente de color rosa o rojo intenso. La conversión de resazurina a resorufin es proporcional a la respiración celular aeróbica [59].

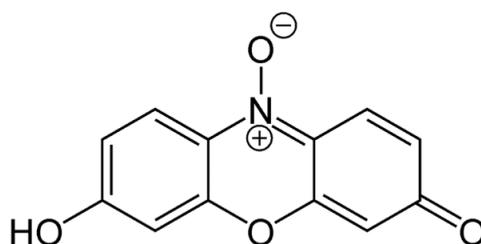


Figura 2.1. Estructura de la resazurina.

La resazurina fue utilizada por primera vez por Pesch y Simmert en 1929 para determinar la carga bacteriana de la leche [66]. Los ensayos realizados con resazurina muestran una excelente correlación con los ensayos de viabilidad celular basados en MTT y las técnicas basadas en timidina triatiada.

Este ensayo es seguro y fácil de utilizar, permite estudios más largos y funciona para células adherentes y bacterias/ hongos.

La resazurina se reduce en las mitocondrias, por lo que resulta útil para medir la actividad metabólica mitocondrial. En presencia de NADPH deshidrogenasa o NADH deshidrogenasa como enzima se convierte a resorufin, como se muestra en la Figura 2.2. Por lo tanto, el sistema resazurina/diaforasa/NADPH puede utilizarse para determinar niveles de NADH, NADPH o diaforasa y cualquier actividad bioquímica o enzimática involucrada [60].

En este PI, se utiliza la resazurina como indicador redox.

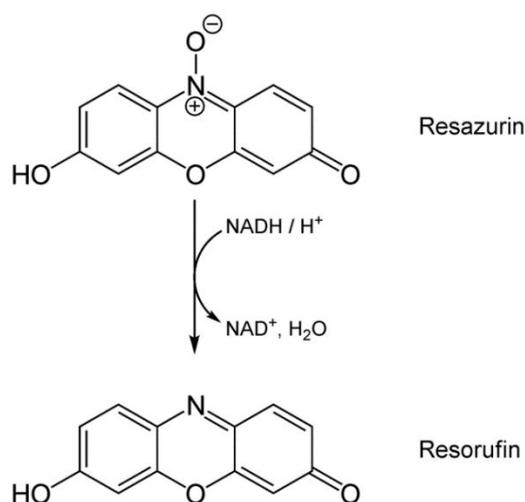


Figura 2.2. Reducción de resazurina en células vivas [60].

2.1.3 Microorganismos de análisis

Para realizar la prueba de bioactividad se seleccionaron las siguientes cepas de microorganismos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Cepas de microorganismos analizados.

| Microorganismo | Cepa |
|------------------------------|------------|
| <i>Escherichia Coli</i> | ATCC 25922 |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> | ATCC 25923 |
| <i>Pseudomona Aeruginosa</i> | ATCC 27853 |

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de animales y seres humanos, la mayoría de sus cepas son inofensivas, pero existen algunas cepas que resultan patógenas. Es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia de las enterobacterias, no produce esporas y es aeróbica facultativa con movilidad mediante flagelos (Figura 2.3) [61].

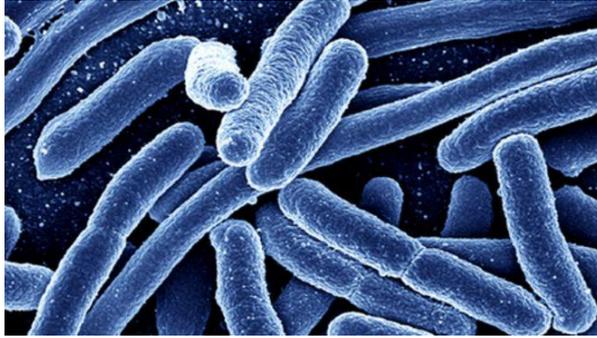


Figura 2.3. Escherichia coli.

Las cepas patógenas se clasifican en seis grupos según los síntomas que producen, entre las cuales se encuentra la *E. coli shigatoxigénica (STEC)* que puede producir una diarrea de distinta consideración hasta provocar una enfermedad grave como el síndrome urémico hemolítico (SHU). Las *E. Coli enterohemorrágicas (EHEC)* pertenecen al subconjunto de las STEC asociadas generalmente al SHU. La cepa de *E. coli (O157:H7)* es la más importante ligada a las enfermedades transmitidas por alimentos y utilizada como indicador de contaminación fecal y parámetro de inocuidad alimenticia.

Staphylococcus aureus es una bacteria anaeróbica facultativa gram positiva, inmóvil y no esporulada (Figura 2.4). Forma parte de la flora natural del ser humano, pero cuando se interrumpe la defensa de la piel puede causar enfermedades, especialmente en grupos de riesgo [62].

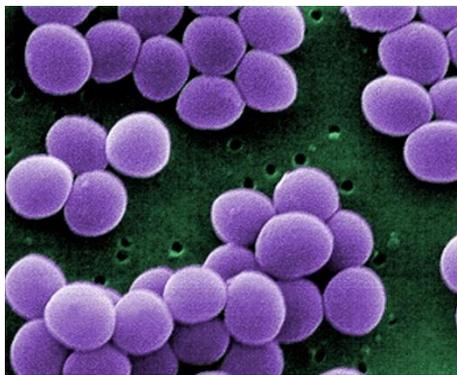


Figura 2.4. Staphylococcus aureus.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, desde infecciones cutáneas y de la mucosa, de baja gravedad, hasta enfermedades de riesgo vital como abscesos, meningitis, endocarditis o neumonía entre otras. Además, puede afectar el tracto intestinal por la ingesta de la bacteria o la enterotoxina que ésta secreta.

Pseudomona aeruginosa es una bacteria gram positiva, aeróbica y con movilidad unipolar (Figura 2.5). Es una bacteria patógena tanto para plantas como animales.

Secreta una variedad de pigmentos como piocianina color azul verdoso, fluoresceína color amarillo verdoso fluorescente y piorrubina color rojo pardo. Es identificada, de modo preliminar por su olor a uvas y apariencia perlada *in vitro*.

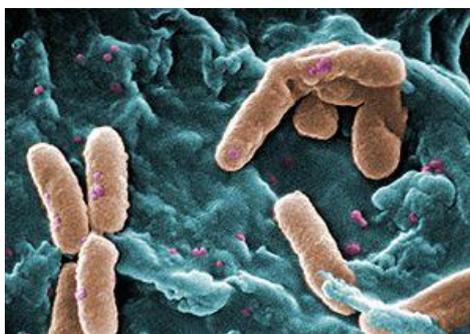


Figura 2.5. *Pseudomonas aeruginosa*.

Produce infecciones en las vías respiratorias y los pulmones, en vías urinarias y heridas causando sepsis especialmente en personas inmunodeprimidas [63].

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Determinación de la densidad del inóculo mínima capaz de reducir la resazurina

Luego de establecer las cepas de microorganismos a utilizar, se procede a preparar el medio de cultivo, en este caso el Mueller Hinton (MHB), para lo cual se pesan 1,76 gramos, se calienta con un alícuota de agua y se lleva a volumen final de 80 mL. Se esteriliza el agua, caldo MHB y tips en autoclave.

En primer lugar se determinó para cada cepa la concentración del inóculo mínima capaz de reducir la resazurina. Para ello se realizaron cuatro diluciones seriadas (desde 10^{-1} a 10^{-4}) del inóculo bacteriano madre (10^6 UFC/mL) en tubos falcon utilizando el medio de cultivo antes preparado y esterilizado como diluyente. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 170 uL de cada dilución del inóculo bacteriano, 20 uL del medio de cultivo y 10 uL de resazurina. Posteriormente se incubó a 37°C por 2 horas. Se seleccionó para cada cepa bacteriana, la concentración mínima capaz de reducir la resazurina como la menor concentración del inóculo que provoca el cambio de color azul a rosa en la resazurina.

2.2.2 Determinación de MIC y MBC

Se prepararon soluciones de GA, DHA y glicerol en agua de tal modo que sus concentraciones fueron de 100 mg/mL. Esta operación se realizó por duplicado obteniendo 6 soluciones de compuestos.

Se realizaron 10 microdiluciones 1:2 de las soluciones de GA, DHA y glicerol antes preparadas en tubos endorff utilizando el caldo como diluyente para lograr un rango de entre 25 mg/mL y 0,048 mg/mL.

En cada placa se trabajó con un solo compuesto. En cada pocillo de la placa se colocaron 170 μ L del inóculo a la concentración antes determinada, con 20 μ L de solución con GA, DHA o glicerol. Para el control positivo se colocaron 170 μ L del inóculo con 20 μ L de caldo y para el control negativo se colocó 10 μ L resazurina con 20 μ L de caldo.

Se incubó la placa a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se agrega a cada pocillo 10 μ L de resazurina.

Finalmente se realiza una última incubación a 37°C durante 2 horas y se observan los resultados.

Una vez determinada la MIC para cada compuesto y microorganismo se procedió a determinar la MBC en agar. Para el agar utilizado se pesaron 5,5 gramos, se disolvió en una alícuota de agua y se llevó a 250 mL finales. Posteriormente se esterilizaron las placas de Petri utilizadas y el agar en autoclave.

Se colocaron en cada placa de Petri el agar, las distintas diluciones de GA y se deja solidificar. Luego se inoculó cada placa con los microorganismos y se deja incubar a 37°C durante 24 horas. Finalmente se observa el crecimiento o no del microorganismo en cada placa.

El ensayo de bioactividad se realizó trabajando bajo campana UV para mantener las condiciones de esterilidad controladas.

2.3 Resultados y discusión

La concentración mínima de cada cepa capaz de reducir la resazurina se observa en la Figura 2.6.

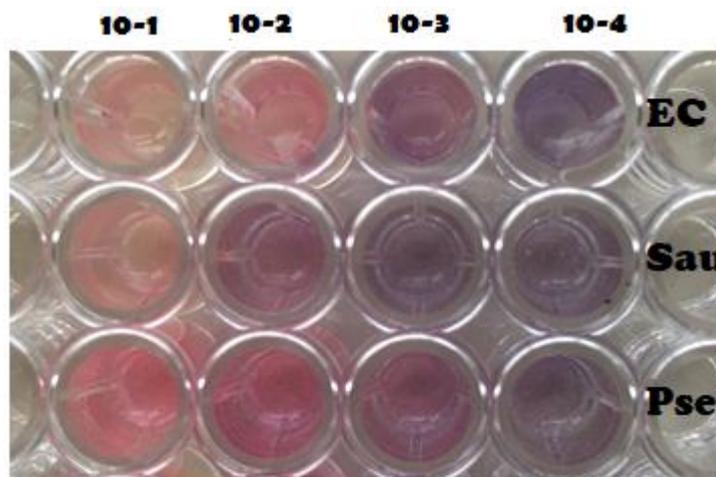


Figura 2.6. Determinación de la densidad del inóculo mínima capaz de reducir rezasurina. EC (*Escherichia coli*), Sau (*Staphylococcus aureus*), Pse (*Peudomona aeruginosa*)

Las diluciones realizadas a partir del inóculo madre (10⁶ UFC/mL) de izquierda a derecha son: 10,6 UFC/mL (10⁻¹), 1,06 UFC/mL (10⁻²), 0,106 UFC/mL (10⁻³), 0,0106 UFC/mL (10⁻⁴). Como se puede observar en la Figura 2.6, la concentración mínima para *E. coli* es de 0,106 UFC/mL, para *S. aureus* 1,06 UFC/mL y para *P. aeruginosa* 0,106 UFC/mL. Una vez determinada esta concentración para cada cepa se procedió a determinar la MIC.

Durante la determinación de la MIC se utilizó una placa de microdilución por compuesto y se sembró cada carril por duplicado. A la derecha se sembró un control positivo (C+) y negativo (C-).

Al utilizar como compuesto de análisis DHA y glicerol se obtuvieron cambios de color de la resazurina (de azul a rosado) bajo todas las concentraciones analizadas, lo cual representa que para las concentraciones estudiadas no arrojan un valor de MIC. Es decir, se observó un cambio en la actividad metabólica mitocondrial, por lo cual estas sustancias no actúan como inhibidores del crecimiento.

Por otro lado, al utilizar GA como compuesto de análisis no se obtuvieron cambios de color de la resazurina con algunas concentraciones, evidenciando un valor de MIC particular para cada microorganismo.

Luego de establecer un valor de MIC para cada microorganismo se sembró, a partir de esta concentración y superiores, en placas para determinar la MBC y se observó a partir de que concentración no hay crecimiento de las bacterias indicadoras (Figura 2.7).

Los resultados finales se expresan en la Tabla 2.2.

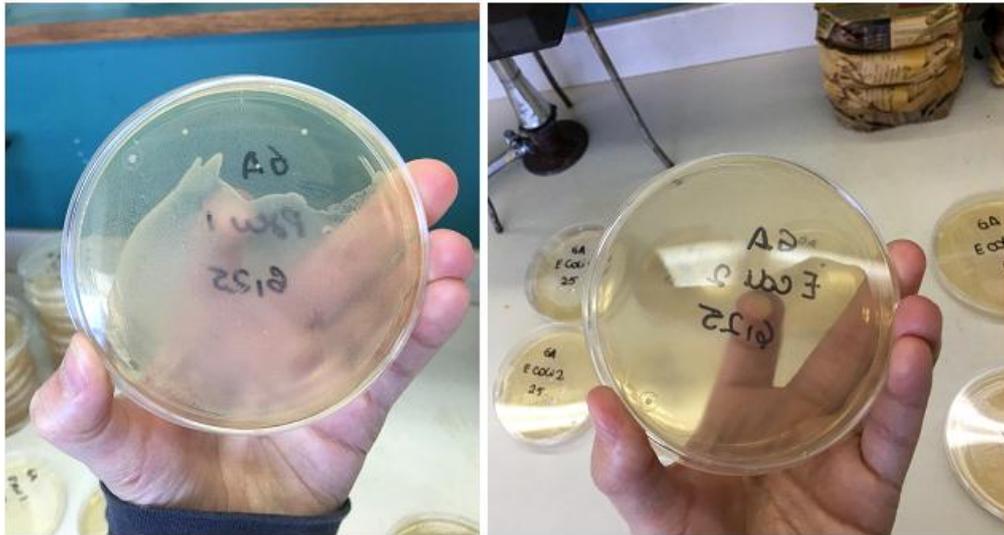


Figura 2.7. Izquierda – Crecimiento de *P. Aeruginosa* a 6,25 mg/mL de GA; derecha – Inhibición de *E. Coli* a 6,25 mg/mL de GA.

Tabla 2.2. MIC y MBC para gliceraldehído.

| Microorganismo | MIC GA [mg/mL] | MBC GA [mg/mL] |
|----------------------|----------------|----------------|
| <i>E. Coli</i> | 6,25 | 6,25 |
| <i>S. aureus</i> | 6,25 | 6,25 |
| <i>P. Aeruginosa</i> | 6,25 | 12,5 |

Luego de analizar los resultados y determinar que de los productos de la primera oxidación del glicerol sólo el gliceraldehído presenta bioactividad, se prosigue en este proyecto integrador con el objetivo de oxidar el glicerol selectivamente hacia este derivado. Por ello, en los siguientes capítulos las determinaciones se focalizan respecto a este producto.

Capítulo 3: Inmovilización de hematín en hojuelas de quitosano

3.1 Introducción

La oxidación del glicerol catalizada por hematóin en soluci3n utilizando per3xido de hidr3geno como oxidante ha sido estudiada anteriormente por Adrián Parodi [62]. Al evaluar la oxidaci3n como una vía de revalorizaci3n del glicerol es necesario tener presente que a escala piloto e industrial es necesario reutilizar el catalizador, disminuyendo así costos de materia prima y logrando productos libres de impurezas que simplifican el tratamiento de efluentes.

La reutilizaci3n del catalizador se logra inmovilizándolo sobre un soporte inerte. El soporte debe presentar disponibilidad de grupos funcionales reactivos para inmovilizar catalizadores y para modificaciones químicas, hidrofiliidad, estabilidad mecánica y rigidez, regenerabilidad, y facilidad de preparaci3n en diferentes configuraciones geométricas que proporcionen al sistema la permeabilidad y el área superficial adecuada para una biotransformaci3n dada [1].

Las hojuelas de quitosano presentan la mayoría de las características mencionadas y resultan efectivas para inmovilizar el hematóin debido a su estabilidad química, insolubilidad en el medio de reacci3n utilizado, y carácter inerte frente a reactivos y productos. Como inconvenientes se puede nombrar la baja resistencia mecánica y alteraciones en su morfología.

El quitosano es un copolímero amino polisacárido que resulta de la uni3n del β (1-4),2-amino-2-desoxi-D-glucano y el 2-acetamidodesoxi-D-glucano, obtenido por D-acetilaci3n alcalina de la quitina, que se extrae de las paredes de algunos hongos y del exoesqueleto de algunos artrópodos como insectos, crustáceos y escarabajos [1]. En la quitina los grupos amino C-2 son, en su estructura ideal, totalmente acetilados. La quitina y el quitosano son, consecuentemente, copolímeros de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. La estructura idealizada de la quitina, al igual que la estructura del quitosano, se muestra en la Figura 3.1.

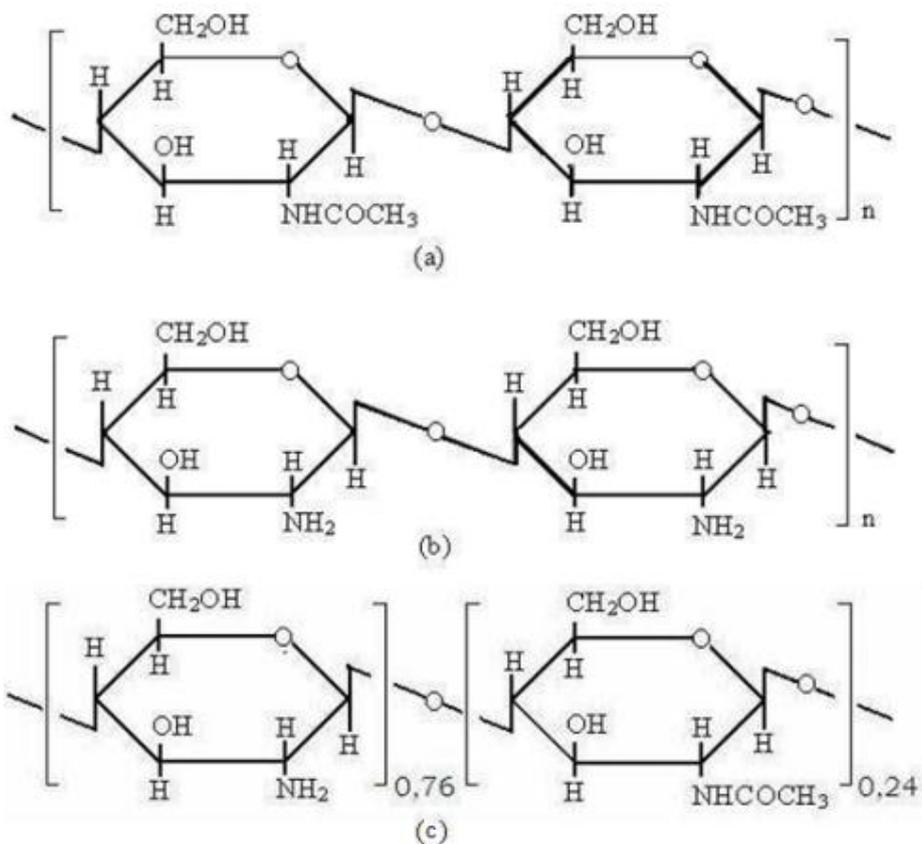


Figura 3.1. (a) Estructura idealizada de la quitina, (b) quitina 100% desacetilada, (c) quitosano copolímero intermedio entre a y b [1].

La principal característica del quitosano es el grado de desacetilación, dependiendo del mismo su solubilidad en soluciones acuosas ácidas, su capacidad de adsorción de agua y su resistencia a la biodegradabilidad [63]. Al aumentar el grado de desacetilación, aumenta la densidad de grupos NH_2 del polímero resultante (Figura 3.1).

La inmovilización covalente y efectiva del hematóxina sobre hojuelas de quitosano ha sido estudiada anteriormente en la tesis doctoral de la Ing. Agustina Córdoba [63].

En el presente capítulo se pretende inmovilizar hematóxina sobre hojuelas de quitosano para obtener 1 gramo de catalizador heterogéneo evaluando la eficiencia de inmovilización y su correspondiente actividad catalítica.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Inmovilización de hematóxina

A continuación, se describen las etapas del procedimiento mediante el cual se inmovilizó hematóxina sobre las hojuelas de quitosano para preparar 1 gramo de catalizador. El proceso consta de 4 etapas en las cuales se realiza una

modificación superficial con el agregado de APTS y glutaraldehído, la unión covalente del hematín y desactivación de los grupos carbonilos remanentes (Figura 3.2).

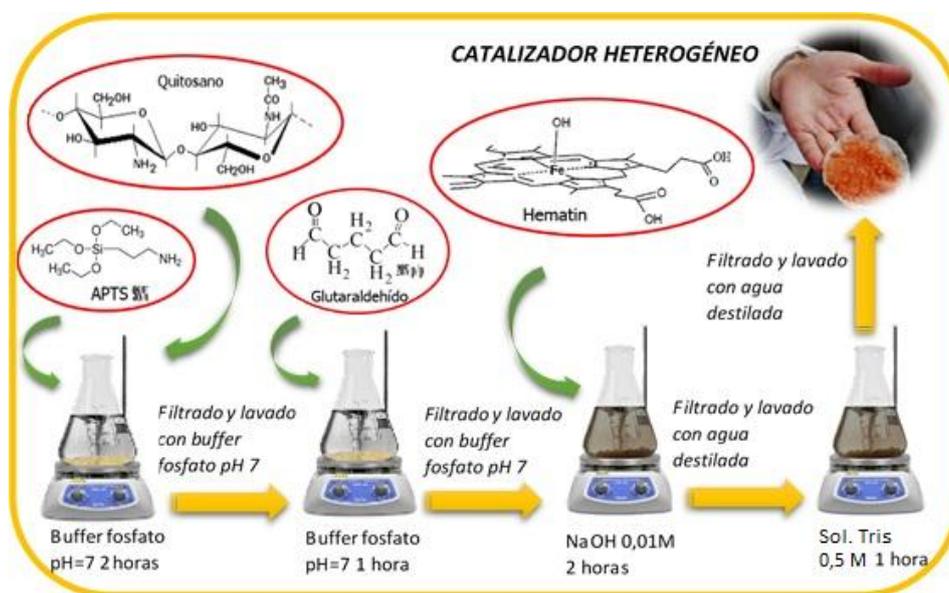


Figura 3.2. Proceso de inmovilización de hematina sobre hojuelas de quitosano.

3.2.1.1 Modificación superficial: incorporación de APTS

Se colocó 1 gramo de hojuelas de quitosano en un Erlenmeyer de 100 mL. Se añadieron 50 mL de buffer fosfato pH 7 y 776 μ L de solución APTS 98%. La mezcla se sometió a agitación magnética durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró al vacío (procurando no secar las hojuelas) y se descartaron los sobrenadantes. Las hojuelas húmedas se lavaron con 50 mL de solución buffer fosfato pH 7, repitiendo el mismo proceso de filtrado y descartando los sobrenadantes. El lavado se repitió tres veces.

3.2.1.2 Modificación superficial: glutaraldehído

Las hojuelas obtenidas de la etapa anterior se pusieron en contacto con 50 mL de buffer fosfato pH 7 y 130 μ L de solución de glutaraldehído 25% P/P con agitación magnética durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró al vacío (procurando no secar las hojuelas) y se descartaron los sobrenadantes. Las hojuelas húmedas se lavaron con 50 mL de solución buffer fosfato pH 7, repitiendo el mismo proceso de filtrado y descartando los sobrenadantes. El lavado se repitió tres veces.

3.2.1.3 Unión covalente del hematina

Las hojuelas obtenidas de la etapa anterior se pusieron en contacto con 48 mL de una solución de hematina de 1114 mg/L en NaOH 0,01N, de tal manera que la relación másica de hematina/hojuela seca fuera de 0,054 g/g, bajo agitación magnética y a temperatura ambiente.

Posteriormente se filtró al vacío y se trasvasó el sobrenadante a un matraz de 100 mL, llevando luego a volumen final con agua destilada. Las hojuelas se lavaron 3 veces con 45 mL de agua destilada. Se repitió la filtración en cada lavado, separando los sobrenadantes en matraces de 50 mL. Se determinó por espectroscopía UV-visible (a 387 nm) el hematóxido no soportado en los sobrenadantes y las aguas de lavado tomando muestras de 1 mL y utilizando para la cubeta de referencia NaOH 0,01M.

3.2.1.4 Inactivación de grupos carbonilo

El catalizador heterogéneo obtenido se sometió a una desactivación de los grupos C=O remanentes en la superficie, necesario para lograr una matriz químicamente inerte. Las hojuelas se pusieron en contacto con 50 mL de solución tris 0,5 M bajo agitación magnética durante una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se filtró al vacío y se separó el sobrenadante en un matraz de 100 mL llevando al volumen final con agua destilada. Las hojuelas obtenidas se lavaron tres veces con 45 mL de agua destilada. Se filtró nuevamente y se tomaron muestras de los sobrenadantes en matraces de 50 mL. Se midieron las absorbancias a 387 nm para determinar la cantidad de hematóxido unido no covalentemente que se separó durante esta etapa de desactivación tomando muestras de 1 mL y utilizando para la cubeta de referencia NaOH 0,01M.

La masa de hematóxido inmovilizada se determinó por balance de masa considerando la masa de hematóxido que se contactó con las partículas y la masa de hematóxido en aguas de lavado de las dos últimas etapas del proceso de inmovilización.

Se estimó la eficiencia del proceso de inmovilización (Y) como la masa de hematóxido soportado (mg) por masa inicial de hematóxido (mg):

$$Y = \frac{\text{masa de hematóxido soportado (mg)}}{\text{masa inicial de hematóxido (mg)}} \times 100$$

3.2.2 Calibrado para determinación de concentración de hematóxido

Se confeccionaron soluciones estándares de hematóxido de distintas concentraciones utilizando una solución acuosa madre de hematóxido de 1114 mg/L en NaOH 0,01M como diluyente (Tabla 3.1). Luego se colocaron 1 mL de cada solución en cubetas plásticas y se realizó la lectura espectrofotométrica por duplicado a 387 nm, longitud a la cual el hematóxido tiene su pico máximo de absorción. Para la cubeta de referencia se utilizó NaOH 0,01M.

El equipo utilizado fue el espectrofotómetro Perkin-Elmer mod. Lambda 35 (Massachusetts, E.E.U.U.) de planta piloto de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC).

Tabla 3.1. Soluciones para curva de calibración de hematín a 387 nm.

| Estándar | Volumen sol. Hematín [μL] | Volumen sol. NaOH [μL] | Concentración hematín [mg/L] |
|----------|--|-------------------------------------|------------------------------|
| E0 | 0 | 5000 | 0,00 |
| E1 | 10 | 4990 | 2,23 |
| E2 | 25 | 4975 | 5,57 |
| E3 | 38 | 4962 | 8,47 |
| E4 | 50 | 4950 | 11,14 |
| E5 | 75 | 4925 | 16,71 |
| E6 | 100 | 4900 | 22,28 |

La curva de calibración obtenida se observa en la Figura 3.3.

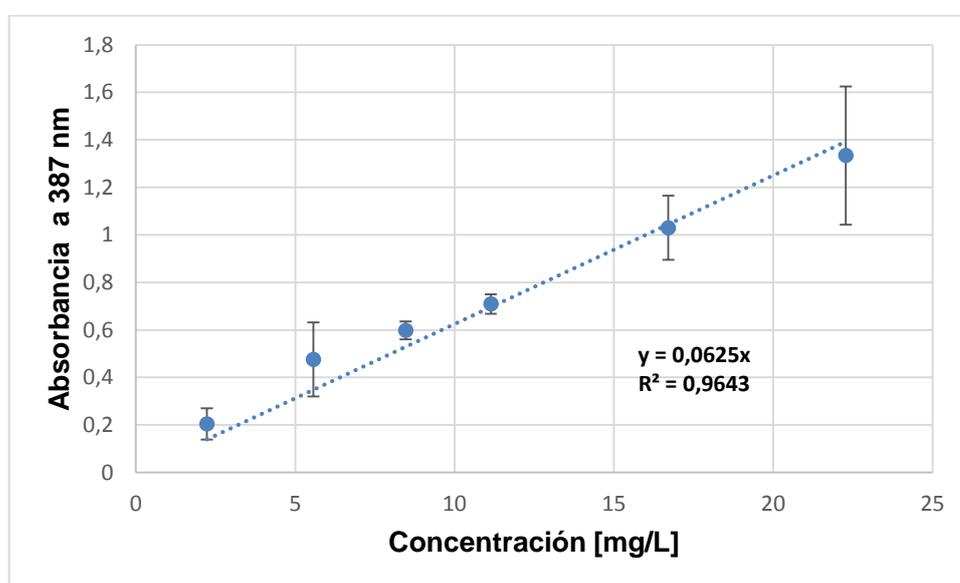


Figura 3.3. Curva de calibración de hematín a 387 nm.

3.2.3 Determinación de la actividad catalítica hacia el fenol

Para determinar la actividad catalítica de hematín inmovilizado se llevó a cabo una reacción de testeo rápida y sencilla de oxidación de fenol y 4-aminoantipirina (AAP) con H_2O_2 anteriormente estudiada por Carvalho, Metelitsa y Vojinovic [23]. En dicha reacción se forma una quinoniamina de color púrpura como resultado de una condensación entre el radical fenoxi con AAP. La concentración de dicho compuesto coloreado puede ser medida por espectrofotometría a 510 nm. Originalmente fue testada en 1943 por Emerson utilizando ferricianuro de potasio en medio alcalino como catalizador y en la actualidad se demostró que las metaloporfirinas sintéticas resultaron ser catalizadores activos para esta reacción [64].

En la Figura 3.4 se puede observar la reacción entre la AAP (a) y el fenol (b) con peróxido de hidrógeno, dando como resultado agua y una quinoniamina (c).

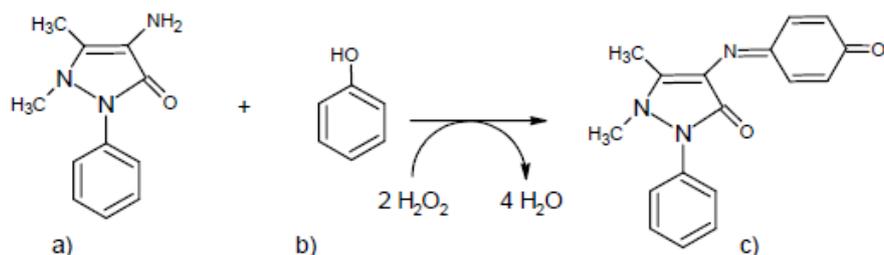


Figura 3.4 Reacción de determinación catalítica hacia fenol.

La determinación de la actividad catalítica hacia el fenol se realizó por triplicado y las condiciones de reacción se presentan en la Tabla 3.2. Para la confección de los medios de reacción se requirió de una solución de fenol 140 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH=7 como diluyente, una solución de AAP 3 mM en buffer fosfato 0,1 M a pH=7 como diluyente y una solución de H₂O₂ diluida 1:2 en buffer fosfato 0,1 M a pH=7.

Tabla 3.2. Condiciones de reacción del testeo de la actividad catalítica del hematín inmovilizado.

| Ensayo | Volumen final [mL] | Fenol [mM] | AAP [mM] | Cat [mg/L] | H ₂ O ₂ [mM] |
|--------|--------------------|------------|----------|------------|------------------------------------|
| CAT-1 | 11,40 | 8,35 | 0,11 | 19,5 | 12 |
| CAT-2 | 11,40 | 8,35 | 0,11 | 15,5 | 12 |

El medio de reacción constó de 0,22 g de catalizador para CAT-1 y 0,17 g de catalizador para CAT-2, 9,83 mL de buffer fosfato, 1,01 mL de solución de fenol, 408 µL de solución de APP y 150 µL de solución de H₂O₂. Los medios de reacción se prepararon en tubos falcon colocando en primer lugar el catalizador, luego el buffer, la solución de fenol y de AAP y finalmente la solución de peróxido de hidrógeno dando inicio a la reacción.

Se tomó una muestra a tiempo 0 que corresponde a 1 mL del medio de reacción antes del agregado del peróxido de hidrógeno y se midió la absorbancia a 510 nm en cubeta plástica. Luego del agregado del peróxido de hidrógeno se agitó el medio con vortex durante 1 minuto, se tomó una muestra de 1 mL y se midió la absorbancia a 510 nm en cubeta plástica.

Se calcula la actividad obtenida promedio y la desviación estándar correspondiente como µmol tinta producidos por mg_{hematín} por min (U'_{Fenol}) y como µmol tinta producidos por g catalizador por min (A^{cat}_{Fenol}).

$$U'_{fenol} = \frac{\mu mol \ tinta}{mg \ hematín \times min}$$

$$A_{\text{fenol}}^{\text{cat}} = \frac{\mu\text{mol tinta}}{\text{g catalizador} \times \text{min}}$$

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Inmovilización

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de la inmovilización del hematín sobre hojuelas de quitosano.

Tabla 3.3. Resultados inmovilización del hematín en hojuelas de quitosano.

| Masa inicial HEM [mg] | Masa HEM lavado [mg] | Masa HEM soportado [mg] | Eficiencia de proceso [%] | Qp [mg hematin / g hojuela húmeda] |
|-----------------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 54,59 | 48,07 | 6,51 | 11,93 | 1,00 |

La eficiencia del proceso de inmovilización según la masa soportada es de 11,93%, es decir, sólo 6,51 mg de hematín han sido inmovilizados de 54,59 mg disponibles. Dicho valor resulta ser bajo comparado con los valores de referencia, que son del 60% (Andali María Belén y Ottonello Esteban, 2015), [64].

Una posible causa de la baja eficiencia de inmovilización es que el glutaraldehído se encuentre polimerizado, estado en el cual no reacciona adecuadamente con el brazo espaciador.

El glutaraldehído en solución acuosa puede producir espontáneamente condensación aldólica intramolecular, dando lugar a la formación de dímeros, trímeros y polímeros [65] (Figura 3.5). La presencia de estos compuestos en solución afecta directamente la eficiencia alcanzada durante la inmovilización del catalizador.

Por otro lado, la relación másica entre hojuela húmeda y hojuela seca es de 6,51. Se determinó que por cada gramo de hojuela húmeda hay 1 mg de hematín, relación que es tenida en cuenta al realizar la determinación de la actividad catalítica hacia fenol y las reacciones de oxidación.

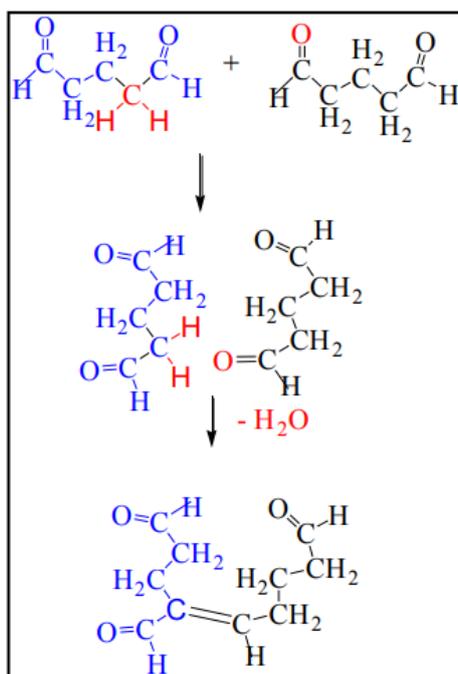


Figura 3.5. Condensación aldólica del glutaraldehído. [65]

3.3.2 Actividad catalítica hacia fenol

Los resultados de la actividad catalítica hacia fenol son:

Tabla 3.4. Resultados actividad oxidativa hacia fenol.

| unidades HEM ofrecidas (U) | unidades en soporte totales (U) | Eficiencia de proceso según actividad fenol (%) | $A_{\text{fenol}}^{\text{cat}}$ (U /g hojuela húmeda) | U'_{fenol} (U /mg hematín) |
|----------------------------|---------------------------------|---|---|-------------------------------------|
| 381,69 | 2,88 | 0,75 | 38,75 | 0,44 |

Hematín soportado es activo hacia la oxidación de fenol resultando en una actividad catalítica de 38,75 U por gramo de hojuela y una actividad catalítica intrínseca de 0.44 U por mg de hematín. La eficiencia del proceso según la actividad hacia fenol resulta ser de 0,75 y el error porcentual del método de medición de actividad fue del 10,1 %.

La pérdida de actividad a causa de la inmovilización es alta, las posibles causas son la aglomeración de las hojuelas durante el proceso de inmovilización, contaminación de las hojuelas durante el proceso o una posible oxidación de hematín durante su conservación en heladera sin un recipiente hermético.

Capítulo 4: Reacciones de oxidación del glicerol

4.1 Introducción

En el presente capítulo se detallan los resultados obtenidos de reacciones de oxidación del glicerol utilizando como catalizador hemató inmovilizado sobre hojuelas de quitosano, hemató en solución y sales de hierro (II) de tipo Fenton.

En todos los casos se siguió la reacción a través de la generación de aldehído y, en algunos casos, por cromatografía gaseosa. Se estudió el efecto de la concentración inicial de glicerol, de peróxido de hidrógeno, el pH, la concentración del catalizador (y en ausencia de estos) así como el dosaje en etapas del peróxido de hidrógeno. La finalidad es escoger el tipo de catalizador y las condiciones de reacción que maximicen la conversión de glicerol a gliceraldehído.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Determinación de gliceraldehído mediante el reactivo de Schiff

En la determinación de aldehídos en las muestras de reacción se utiliza el método del reactivo de Schiff.

El reactivo de Schiff, inventado por Hugo Schiff, es el producto entre la fucsina y bisulfito de sodio [66]. Es utilizado para la detección de aldehídos y tinción de tejidos biológicos. Durante su uso, el reactivo de Schiff se encuentra incoloro y al reaccionar con los grupos aldehídos de una muestra se desarrolla un color fucsia característico. En la Figura 4.1 se puede observar la reacción entre el reactivo de Schiff con aldehídos.

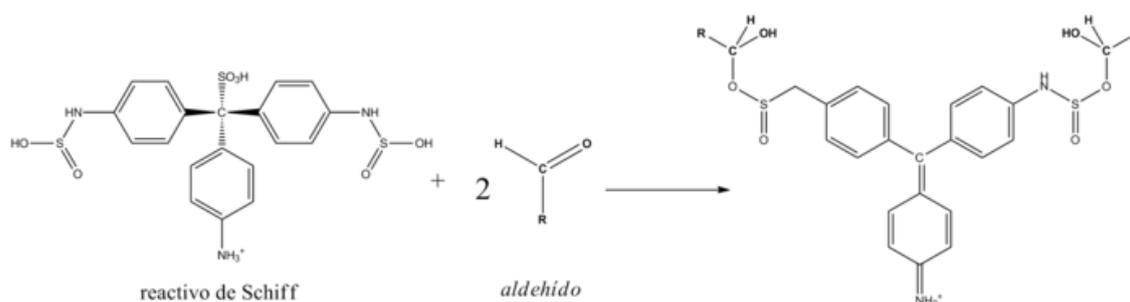


Figura 4.1. Reacción entre el reactivo de Schiff y el aldehído.

Para la elaboración del reactivo de Schiff se disolvió 0,10 gramos de fucsina básica en 60 mL de agua, posteriormente se adicionó 10 mL de sulfito de sodio anhidro a 10% P/V con agitación magnética. Lentamente se agregó 1,5 mL de ácido clorhídrico (36,5-38%, Cicarelli), se diluyó con agua destilada en 100 mL y se filtró. El reactivo de Schiff se deja reposar durante 1 hora refrigerado y al abrigo de la luz antes de ser utilizado. Una vez preparada esta solución no utilizar luego de 14 días.

Para realizar la curva de calibración del gliceraldehído se evaluó la influencia

de la solución matriz utilizada como blanco en la cubeta de referencia debido a una fuerte inestabilidad presentada por parte del reactivo de Schiff. Se confeccionaron, por duplicado, 200 μL de soluciones estándares de gliceraldehído de distintas concentraciones a partir de diluciones progresivas de una solución madre de gliceraldehído de 50 mg/L, utilizando agua como diluyente, en cubetas plásticas. Se agregó 800 μL de reactivo de Schiff a cada cubeta y se dejó reaccionar por 30 minutos. Para la cubeta de referencia se utilizó reactivo de Schiff o agua destilada. Se realizó la medición a 560 nm, longitud a la cual el complejo que se forma entre el reactivo de Schiff y el aldehído tiene un pico máximo de absorción.

Las curvas de calibración obtenidas se presentan en la figura 4.2.

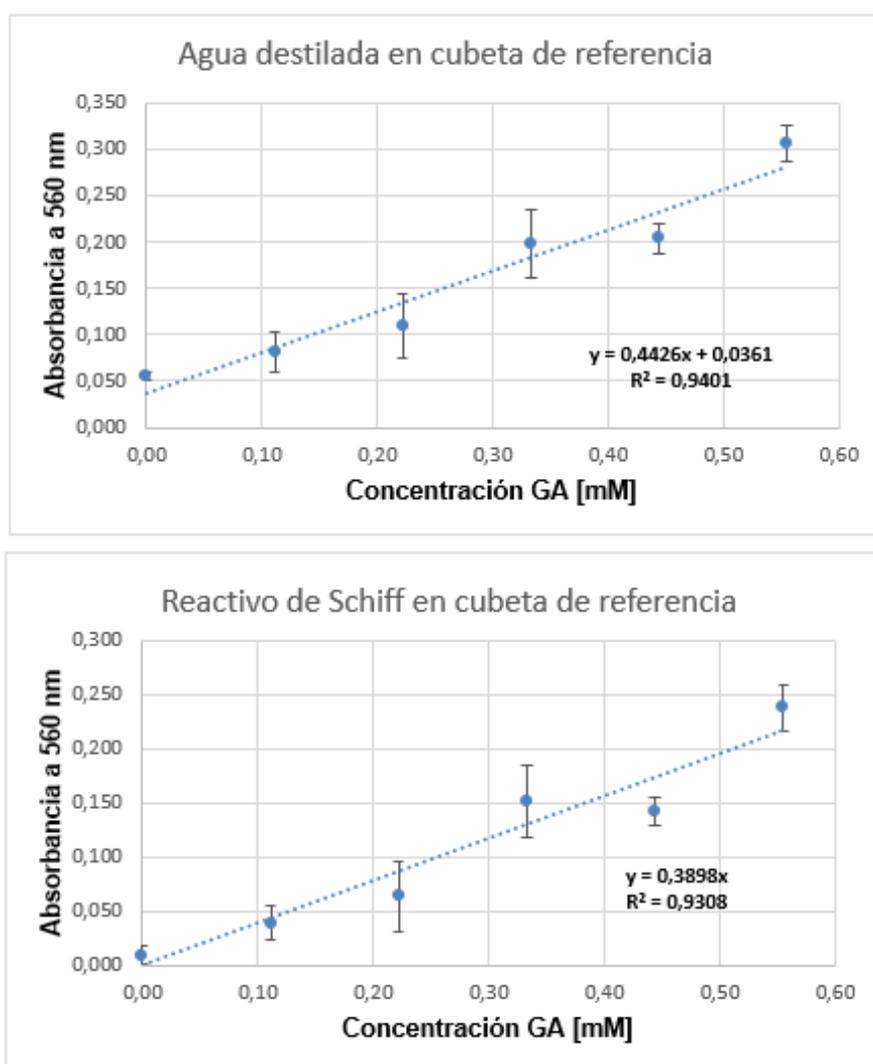


Figura 4.2. Curvas de calibración del gliceraldehído.

En la Figura 4.2 se aprecia que el ajuste lineal es similar en ambos casos; no obstante, utilizando agua destilada en la cubeta de referencia se aprecia que el standard de 0 mM de GA acusa una absorbancia residual distinta de cero debido a que el reactivo de Schiff presenta coloración a 560 nm. Por lo expuesto,

no es conveniente obligar a pasar por cero la intersección de la curva de regresión con el eje y. Debido a que se detectó que el reactivo de Schiff es inestable a la luz coloreándose con el tiempo de exposición, se decidió continuar utilizando agua destilada en la cubeta de referencia y emplear la curva respectiva para cuantificar el contenido de gliceraldehído en las muestras de reacción.

Durante la determinación de GA se toman 200 μL de muestra y se deja reaccionar durante 30 min con 800 μL de reactivo de Schiff, de la misma manera como se procedió con la curva de calibración

4.2.2 Cromatografía gaseosa

El método para determinaciones por cromatografía gaseosa con detección por ionización de llama (FID) de glicerol, DHA y GA fue diseñado por Adrián Parodi en el año 2016, utilizando piridina como solvente, n- hexanol como estándar interno y N-Methyl-N-(trimethylsilyl) como derivatizante.

El equipo utilizado es el espectrofotómetro Perkin- Elmer mod. Lambda 35 (Massachusetts, EE.UU.) de planta piloto de la Facultad de Ciencias Exactas. Física y Naturales (UNC).

Se confeccionaron soluciones acuosas de concentraciones conocidas para cada estándar y se secaron durante aproximadamente 3,5 horas en estufa de vacío a temperatura ambiente para eliminar el agua debido a que la misma inactiva el derivatizante. Posteriormente se redisolvió cada muestra en 100 μL de piridina para confeccionar las muestras a derivatizar.

Se determinó que el tiempo de retención del derivatizante es de 4,9 min, del estándar interno de 5,9 minutos, del GA de 7,3 minutos, del DHA de 8,1 minutos y del glicerol de 8,7 minutos.

Por otro lado, se confeccionaron muestras con los 3 estándares buscando que la suma de las concentraciones de GA, DHA y glicerol se sitúe entre 4,1 y 4,4 mM (ver Figura 4.3).

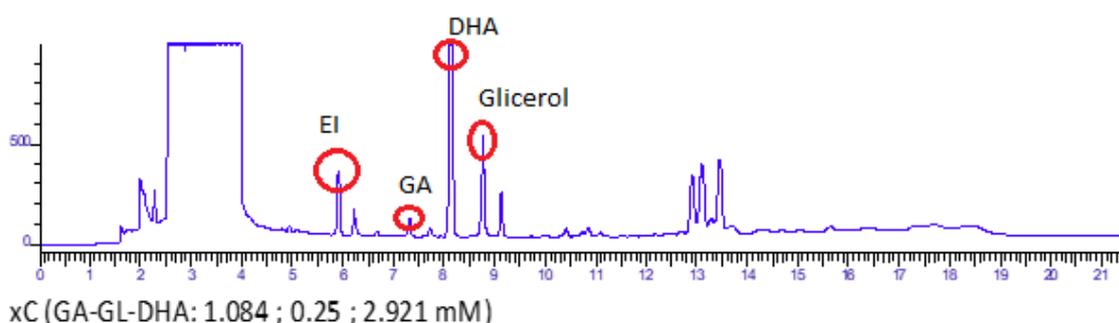


Figura 4.3. Cromatogramas de muestras patrón.

Para la determinación de productos de reacción se colocaron 50 μL de

muestra de los medios de reacción en un tubo eppendorf y se secaron en estufa de vacío a temperatura ambiente.

Tabla 4.1. Confección de medio de reacción para cromatografía gaseosa.

| Volumen piridina [μL] | Volumen sol. N-hexanol [μL] | Volumen derivatizante [μL] | Volumen final [μL] |
|------------------------------------|--|---|---------------------------------|
| 26,70 | 3,30 | 10 | 40 |

Luego, las muestras fueron re-suspendidas en piridina y se agregó el estándar interno y el derivatizante según los volúmenes que indica la tabla 4.1. Finalmente fueron temperados durante 30 minutos a 70°C en un baño termostático de aceite con agitación magnética. Posteriormente, se inyectó en el cromatógrafo gaseoso 1 μL de muestra derivatizada. En el caso de ser necesaria una dilución de la muestra, ésta se realizó antes del agregado del derivatizante, utilizando piridina como diluyente y tomando 26,70 μL finales de muestra para confeccionar el medio de reacción según la tabla 4.1.

4.2.3 Actividad catalítica hacia el fenol

Se realizó una determinación de la actividad catalítica hacia fenol para hematín libre. El medio de reacción se preparó por duplicado en cubetas plásticas y las condiciones de reacción se pueden observar en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Condiciones de reacción del testeo de la actividad catalítica del hematín libre.

| Ensayo | Volumen final [μL] | Fenol [mM] | AAP [mM] | Cat [mg/L] | H ₂ O ₂ [mM] |
|---------------|---------------------------------|------------|----------|------------|------------------------------------|
| Hematín libre | 1140 | 8,33 | 0,11 | 5,8 | 12 |

El medio de reacción constó de 6 μL de solución de hematín (la misma que se utilizó en la inmovilización, sección 3.2.1.3), 977 μL de buffer fosfato, 101 μL de solución de fenol, 41 μL de solución de APP y 15 μL de solución de H₂O₂. Los medios de reacción se prepararon en cubetas plásticas colocando en primer lugar el catalizador, luego el buffer, la solución de fenol y de AAP y finalmente la solución de peróxido de hidrógeno dando inicio a la reacción.

Antes del agregado del peróxido de hidrógeno se mezcló el medio y se midió la absorbancia a 510 nm obteniendo el valor a tiempo cero. Luego del agregado del peróxido de hidrógeno se agitó el medio y se midió la absorbancia en línea a 510 nm durante 2 minutos.

Se calculó la actividad obtenida promedio y la desviación estándar correspondiente como $\mu\text{mol tinta}$ producidos por $\text{mg}_{\text{hematin}}$ por min (U'_{Fenol}).

$$U'_{\text{fenol}} = \frac{\mu\text{mol tinta}}{\text{mg hematin} \times \text{min}}$$

4.2.4 Estudio de optimización

Se aplica el diseño experimental Doehlert para dos variables: concentración de glicerol y concentración de peróxido de hidrógeno. Los resultados de la experiencia de optimización se expresan mediante superficies de respuesta.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio del software Statgraphics Centurión, versión XV.1, realizado por Ivana Magario. Se analizaron los efectos sobre las respuestas estudiadas y se ajustaron mediante modelos de regresión múltiple expresando los resultados como la relación porcentual de gliceraldehído a glicerol inicial.

$$x = \frac{GA \text{ (mM)}}{\text{Glicerol inicial (mM)}} \times 100$$

Los modelos se analizaron por medio de coeficientes de regresión R^2 . La significancia estadística de los factores y sus efectos de interacción se determinaron mediante el Test de ANOVA, descartando los valores que no afectan las variables dependientes ($p > 0,05$).

4.3 Oxidación con hematín inmovilizado

4.3.1 Condiciones de reacción

Las condiciones de reacción con hematín inmovilizado se pueden observar en la Tabla 4.3.

Los medios de reacción son temperados a 35°C en un baño termostatzado y con agitación magnética. El pH de todos los ensayos es de 5. El agregado del peróxido se realiza en una etapa para el ensayo número 1 (283 μL) y en 5 etapas para el ensayo 2 (11,32 μL cada 1 hora).

Para cada ensayo se evalúa además el aporte no catalítico del peróxido de hidrógeno, manteniendo las condiciones de reacción y exceptuando el agregado del catalizador heterogéneo.

Tabla 4.3. Condiciones de reacción con hematín inmovilizado.

| Ensayo | Glicerol [mM] | H2O2 [mM] | M Catalizador [gr] | Volumen final [mL] |
|--------|---------------|-----------|--------------------|--------------------|
| 1 | 100 | 100 | 0,4500 | 25 |
| | 100 | 100 | - | 25 |

| | | | | |
|---|----|----|--------|----|
| 2 | 25 | 30 | 1,8000 | 10 |
| | 25 | 30 | - | 10 |

4.3.2 Resultados y discusión

La concentración de gliceraldehído obtenida mediante el método de Schiff, medida por espectrofotómetro a 560 nm, a 24 horas de reacción se puede observar en la Figura 4.4.

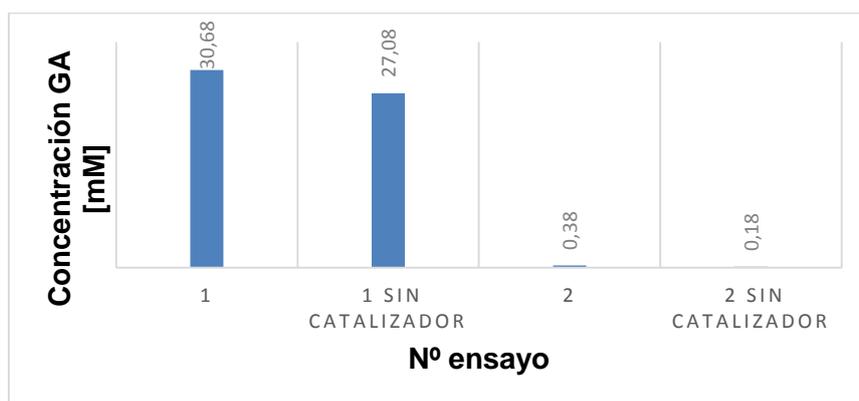


Figura 4.4. Resultados ensayos 1 y 2 medidos por método del reactivo de Schiff.

Teniendo en cuenta que para el ensayo 1 la concentración de glicerol es de 100 mM el rendimiento de la reacción resulta de 30,68%. Para el ensayo 2, la concentración inicial de glicerol es de 25 mM y el rendimiento de la reacción es de 0,15%.

Como se puede observar, el aporte no catalítico para ambos ensayos resulta ser elevado, sin embargo, la producción de gliceraldehído es considerablemente mayor para el ensayo 1.

Para el ensayo 1 se realizó un seguimiento del avance de la reacción mediante CG (Anexo 1), que puede observarse en la Figura 4.5. Se aclara que las muestras de este ensayo (con hematin inmovilizado) no fueron sometidas a secado. Se realizó una dilución de 1:200 con piridina de la muestra acuosa de reacción centrifugada y se sometió directamente a derivatización.

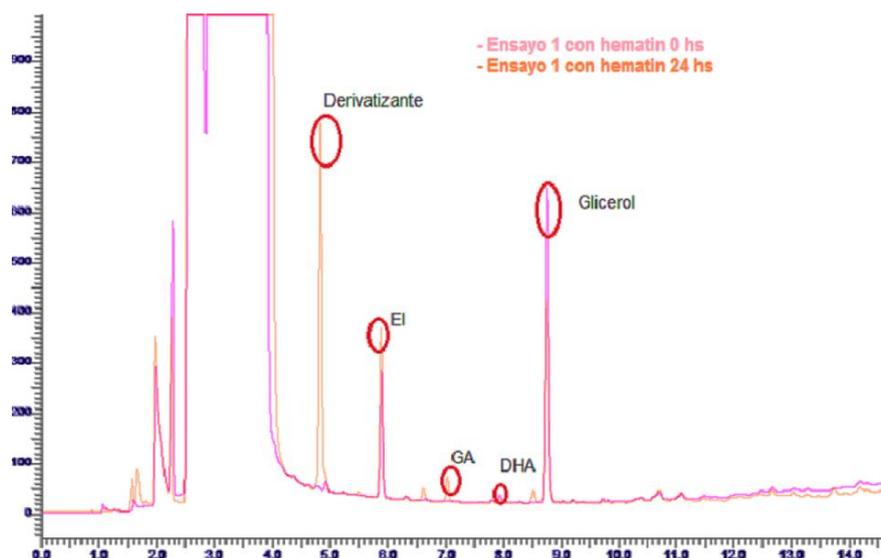


Figura 4.5. Ensayo 1 hematín inmobilizado aporte catalítico 0 y 24 horas.

A 24 horas de reacción se observa una disminución del área del pico correspondiente a glicerol de un 12,49 % lo que indica que hubo reacción. Se observan picos emergentes a los 6.6, 8.6, 7.1 y 8.0 minutos que podrían relacionarse a productos de reacción ya que están ausentes a tiempo cero. En contraposición en ausencia de hematin no se observa una disminución del área del pico correspondiente a glicerol aunque se observan un pico emergente a los 8.0 minutos (Figura 4.6).

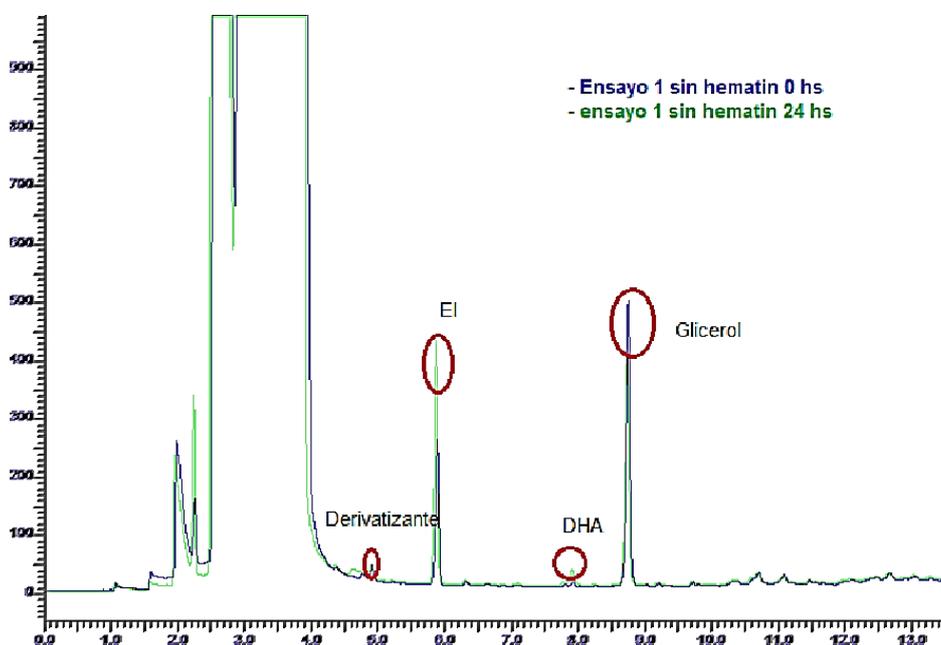


Figura 4.6. Ensayo 1 hematín inmobilizado aporte no catalítico 0 y 24 hs.

Luego de las 3 horas de reacción las hojuelas se observaron más delgadas y de un color más claro (Figura 4.7), condición que indica alteración en la morfología del quitosano y una desactivación del catalizador.

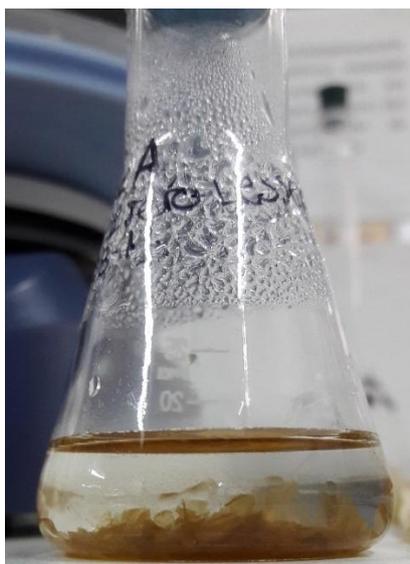


Figura 4.7. Morfología y color de las hojuelas ensayo 1 a 3 hs de reacción.

Dado que el agregado de peróxido de hidrógeno en el ensayo 2 fue en 5 etapas (cada 1 hora), se observó un efecto negativo en la producción de gliceraldehído en estas condiciones. Sin embargo, el tiempo en el cual el catalizador permaneció sin cambios en su coloración aumentó considerablemente de 3 horas para el ensayo 1 a 6 horas para el ensayo 2.

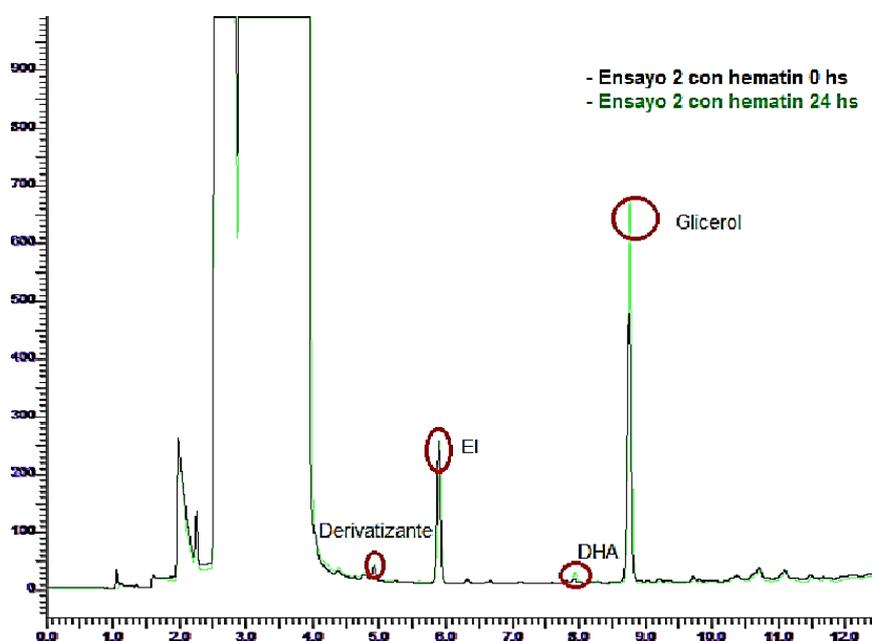


Figura 4.8. Ensayo 2 hematin inmovilizado aporte catalítico 0 y 24 hs.

Al evaluar el aporte catalítico del ensayo 2 se puede observar que solo en presencia de catalizador se obtiene un pico a 8.0 minutos y no se evidencian picos de GA, coincidente con el valor obtenido mediante el método de Schiff (Figura 4.8). Para el cromatograma sin hematin a 24 horas de reacción no se observan picos pertenecientes a productos de oxidación (Figura 4.9).

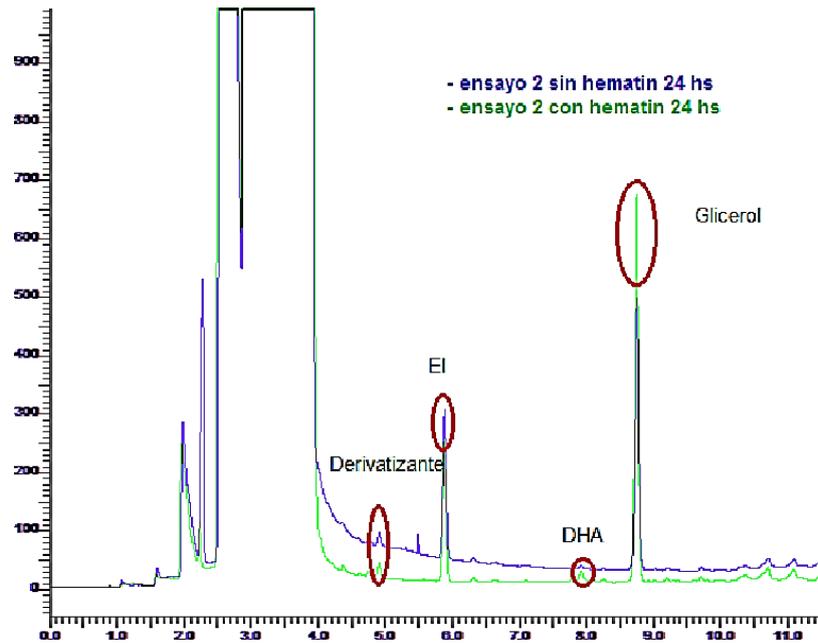


Figura 4.9. Ensayo 2 hematín inmovilizado aporte catalítico y no catalítico 24 hs.

4.4 Oxidación con hematín libre

4.4.1 Estudio de optimización

Con el fin de determinar la condición que maximiza el rendimiento del catalizador dentro de un rango específico de condiciones se selecciona un diseño experimental Doehlert, basado en la metodología de superficie de respuesta (RSM) [67]. Por lo tanto, a partir de datos experimentales se obtienen modelos polinomiales multivariados mediante estimaciones de mínimos cuadrados. Las respuestas experimentales se ajustan al siguiente modelo cuadrático:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{i=3} b_i x_i + \sum_{i=1}^{i=3} b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{i=3} \sum_{j=1}^{j=3} b_{ij} x_i x_j$$

Donde Y es la respuesta pronosticada, b_0 es el promedio de todas las respuestas experimentales, b_i es el coeficiente de efecto principal de la variable x_i , b_{ii} el coeficiente de segundo orden de la variable x_i y b_{ij} el coeficiente de interacción de efecto entre las variables x_i y x_j .

Este modelo empírico permite dar una respuesta al experimento mediante una representación tridimensional frente a dos factores, los efectos de la curvatura y las variables y sus efectos de interacción [67]. La respuesta obtenida de cada experimento representa un punto específico del octaedro formando superficies de respuesta.

Se aplica el diseño experimental Doehlert para dos variables: concentración de glicerol y concentración de peróxido de hidrógeno. Durante este experimento la concentración de hematín es de 700 mg/L, la temperatura de 35°C y el pH=5.

Las condiciones de reacción utilizadas se describen en la la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Condiciones de reacción del diseño Doehlert.

| Nº de experimento | Glicerol [mM] | H₂O₂ [mM] |
|--------------------------|----------------------|--|
| 1 | 550 | 115 |
| 2 | 550 | 115 |
| 3 | 550 | 115 |
| 4 | 1000 | 115 |
| 5 | 775 | 202 |
| 6 | 325 | 202 |
| 10 | 100 | 115 |
| 11 | 325 | 28 |
| 12 | 775 | 28 |

Cada experimento tuvo una duración de 5 horas. El agregado de peróxido de hidrógeno se realizó en 3 etapas, (cada 1 hora) y se tomaron 200 µL de muestras antes del primer agregado de peróxido correspondiente a tiempo 0 y luego de 5 horas de reacción.

La determinación del gliceraldehído se realizó mediante el método de Schiff tomando 200 µL de muestra.

4.4.2 Evaluación del efecto del pH

Se evaluó el efecto del pH sobre la reacción, teniendo en cuenta que el hematín forma dímeros μ -oxo y π - π espontáneamente dependiendo de las condiciones de reacción que limitan su actividad.

Por tal motivo se diseñaron dos reacciones en las cuales la concentración de glicerol, peróxido de hidrógeno, temperatura y concentración de catalizador se mantuvo constante y se varió solo el pH.

Las condiciones de reacción se pueden observar en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Condiciones de reacción con variación de pH.

| Glicerol [mM] | H₂O₂ [mM] | Hematín [mg/L] | T [°C] | pH |
|----------------------|--|-----------------------|---------------|-----------|
| 1000 | 115 | 100 | Ambiente | 4 |
| 1000 | 115 | 100 | Ambiente | 5 |

Los medios se prepararon en tubos falcon de 45 mL y las reacciones se

desarrollaron con agitación magnética a temperatura ambiente. El tiempo de reacción fue de 24 hs y se tomaron 200 μL muestras a tiempo 0 y cada 1 hora. Las determinaciones se realizaron mediante el método del reactivo de Schiff (800 μL de este último).

4.4.3 Evaluación del efecto de la concentración de hematín.

Se evaluó el efecto de la concentración de hematín sobre la formación de producto obtenido. Para lo cual se procedió a diseñar un experimento en el cual se asegura la ausencia de blanqueamiento del hematín (es decir, su inactivación) agregando sucesivamente solución básica de hematín y peróxido de hidrógeno en etapas.

Inicialmente se tuvo una solución de 1000 mM de glicerol en buffer acetato 0,1 M a pH 5. Se utilizó buffer acetato 0,1 M para que los sucesivos agregados de solución básica de hematín no modifiquen el pH del medio de reacción.

Las condiciones de reacción se detallan en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Condiciones de reacción prueba hematín concentrado.

| Tiempo reacción [hs] | V total [μL] | C_{HEM} [g/L] | $C_{\text{H}_2\text{O}_2}$ [mM] |
|----------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------------|
| 1 | 2225 | 1,0 | 20 |
| 2 | 2291 | 2,0 | 40 |
| 3 | 2377 | 3,0 | 60 |
| 4 | 2484 | 4,0 | 80 |
| 5 | 2622 | 5,0 | 100 |

La determinación de gliceraldehído se realizó mediante el método del reactivo de Schiff.

Teniendo en cuenta la alta concentración de hematín en el medio de reacción, se centrifugaron las muestras antes de contactarla con el reactivo de Schiff disminuyendo así su interferencia a 510 nm. Para cuantificar la interferencia de hematín en la concentración de gliceraldehído se midió tanto la absorbancia del hematín decantado como de la solución clarificada.

$$ABS_{\text{final}} = ABS_{\text{sobrenadante}} - ABS_{\text{muestra de hematín precipitado}}$$

4.4.4 Resultados

4.4.4.1 Optimización

Para todos los experimentos se observó la formación de burbujas hasta el tercer agregado de H_2O_2 (Figura 4.10), producto de la formación de oxígeno en la descomposición del peróxido de hidrogeno.

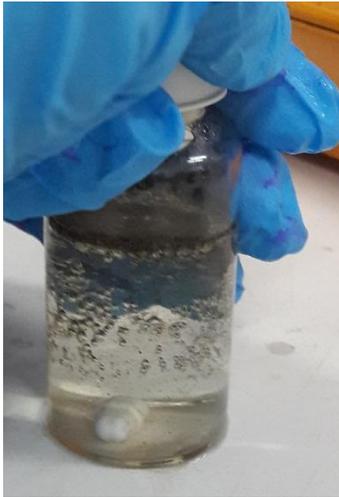


Figura 4.10. Formación de burbujas durante el tercer agregado de H_2O_2 .

Otro fenómeno visualizado durante el transcurso de la reacción fue la insolubilización de hematín (Figura 4.11), observado en las reacciones 1, 2 y 3 hasta el tercer agregado de peróxido, luego del cual se resolubiliza.



Figura 4.11. Visualización de hematín insoluble hasta las 3 hs de reacción.

Luego de las 5 horas de reacción todos los experimentos realizados aprecian blanqueamiento de hematín, el cual se puede observar en la Figura 4.12.



Figura 4.12. Blanqueamiento de hematín a 5 hs (imágenes a la derecha), coloración inicial (imagen izquierda).

Para la relación porcentual gliceraldehído a glicerol inicial el coeficiente de determinación fue de $R^2=97,5714\%$ y el $R^2_{ajustado}=96,1142\%$.

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Relación GA a glicerol inicial} = 6,30549 - 0,0151852 * [\text{Glicerol}] + 0,0091954 * [\text{Peróxido de hidrógeno}] + 0,00000888889 * [\text{Glicerol}]^2$$

En donde los valores de las variables están especificados en sus unidades naturales.

La Figura 4.13 representa la superficie de respuesta obtenida para la relación porcentual de GA a glicerol inicial luego de 5 horas de reacción.

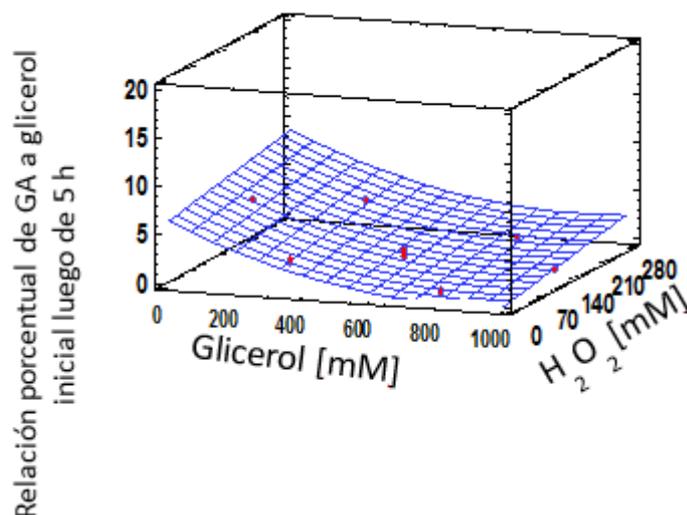


Figura 4.13. Superficie de respuesta ensayo de optimización.

Se puede observar un efecto positivo en la relación porcentual de GA a glicerol inicial con el aumento de peróxido de hidrógeno juntamente con la disminución del glicerol.

4.4.4.2 Efecto del pH

Para las reacciones desarrolladas evaluando el efecto del pH se obtienen los siguientes resultados:

Como puede verse de la Figura 4.14 (izquierda) la generación de GA fue mayor a pH 4 que a pH 5 tanto a las 3 horas como a las 19 horas de reacción y estos valores fueron a su vez significativamente mayores a los obtenidos en ausencia de hematin. En la figura 4.15 (derecha) se observa que la concentración de GA aumentó luego de 4 horas de reacción y cayó luego hasta agotarse luego de 24 horas de reacción. Esto indicaría que GA es un producto intermedio de oxidación que se consume con el avance de la oxidación posiblemente hacia ácidos carboxílicos de 3 o 2 átomos de carbonos.

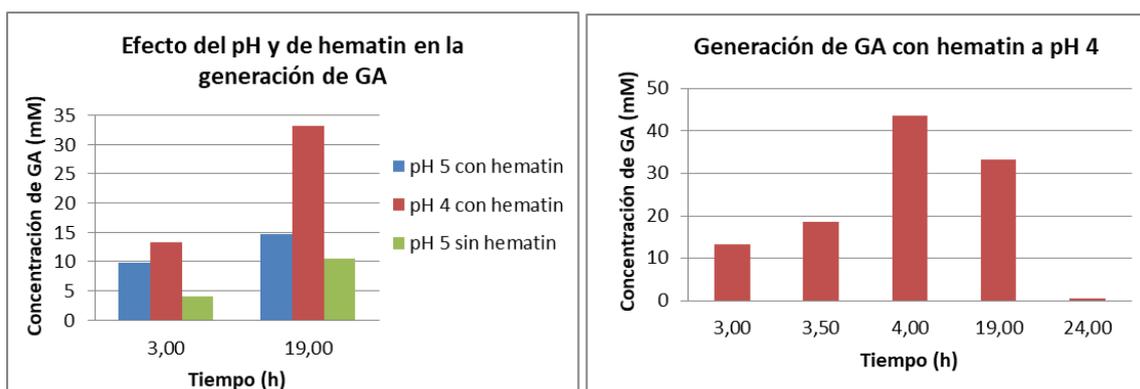


Figura 4.14. Efecto del pH y de hematin en la generación de GA (izquierda).

Figura 4.15. Generación de GA con hematin a pH 4 (derecha).

4.4.4.3 Evaluación del efecto de la concentración de hematin

Los resultados obtenidos del experimento con hematin concentrado se presentan en la figura 4.16.

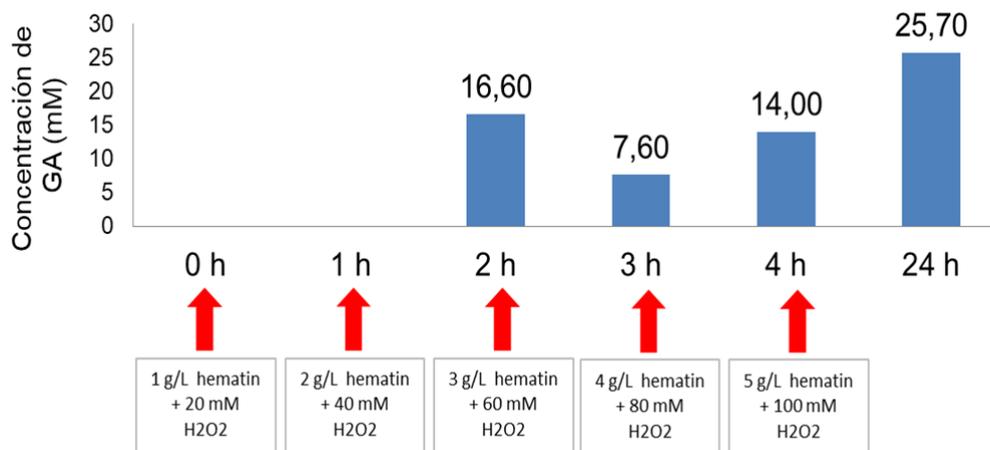


Figura 4.16. Concentración GA prueba hematín concentrado.

Como puede verse de la Figura 4.16 la concentración de GA aumentó con el tiempo de reacción progresivamente evidenciando su valor máximo a las 24 horas de reacción a valores algo superiores a los obtenidos empleando menos hematín (Figura 4.16 –izquierda). Es importante destacar que bajo estas condiciones no se evidenció blanqueamiento de hematín (Figura 4.17).

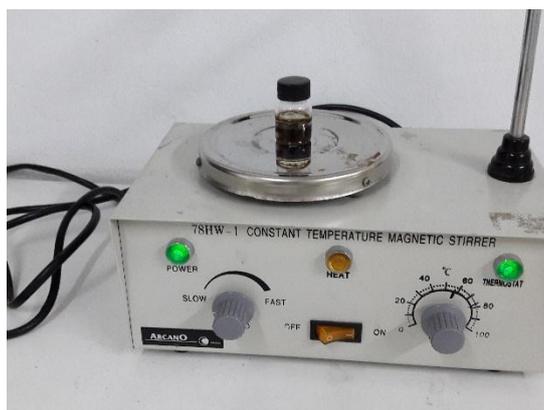


Figura 4.17. Sistema de reacción con hematín concentrado.

4.4.4.4 Actividad catalítica hacia fenol

Los resultados se pueden observar en la Figura 4.18.



Figura 4.18. Curvas concentración tinta hematógena libre vs tiempo.

Tabla 4.7. Actividad catalítica hacia fenol de hematógena libre.

| U'_{fenol} (U /mg hematógena) | Error porcentual de la medición |
|--|---------------------------------|
| 10,31 | 6,30 |

En la Figura 4.18 se puede observar que tanto hematógena como la solución de H_2O_2 están estables. Se observa saturación en la concentración de tinta a los 100 segundos.

Los resultados obtenidos también resultaron ser similares con los obtenidos en la tesis de grado Otonello – Andali en 2010 (Figura 4.18) [64].

4.5 Oxidación con método Fenton

4.5.1 Condiciones de reacción

Durante el estudio de la reacción catalizada por sulfato ferroso, se evaluó el efecto de la concentración de glicerol y peróxido de hidrógeno, como así también la masa de catalizador.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación magnética. El pH de todos los lotes es de 3,65 y el agregado del peróxido se realizó en una etapa para todos los lotes exceptuando el lote 4 que se realizó en 5 etapas (cada 1 hora). El volumen final de cada lote fue de 25 mL. Cada lote se confeccionó según la Tabla 4.8, con el fin de evaluar el aporte catalítico (presencia de sal de hierro) y no catalítico del peróxido de hidrógeno.

Las determinaciones se realizaron mediante el método del reactivo de Schiff

y se confirmó la presencia de productos mediante CG. Se tomaron muestras de 200 μL a tiempo cero y cada hora de reacción y se midió la absorbancia a 560 nm. Para la confirmación por CG se tomaron muestras de 50 μL durante la última hora de reacción.

Tabla 4.8. Condiciones de reacción por método Fenton.

| Nº Lote | Reacción | Glicerol [mM] | H ₂ O ₂ [mM] | FeSO ₄ [mg/L] | Volumen final [mL] |
|---------|----------------------|---------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1 | Aporte no catalítico | 76 | 8,83 | - | 25 |
| | Aporte catalítico | 76 | 8,83 | 100 | 25 |
| 2 | Aporte no catalítico | 76 | 8,83 | - | 25 |
| | Aporte catalítico | 76 | 8,83 | 100 | 25 |
| 3 | Aporte no catalítico | 76 | 35 | - | 25 |
| | Aporte catalítico | 76 | 35 | 44 | 25 |
| 4 | Aporte no catalítico | 76 | 69,54 | - | 25 |
| | Aporte catalítico | 76 | 69,54 | 100 | 25 |

Las condiciones de reacción del lote 1 corresponden a las optimizadas en efluentes de la industria vitivinícola [15], faltando el tiempo en el cual la conversión hacia el gliceraldehído es máxima, se utilizó dicho lote para determinarlo. Una vez encontrado el tiempo en donde la conversión es máxima, se repitió esta condición optimizada por duplicado, el que corresponde al lote 2.

Se preparó una solución acuosa de glicerol de 7 g/L (76 mM) a pH 3,65 acidulada con HCl 1 N. Luego se realizó la batería de reacciones según la tabla 4.18 para cada lote en 25 mL de volumen final alcanzados con agua destilada.

4.5.2 Resultados y discusión

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada lote como así también la comparación entre ellos.

El efecto del aporte catalítico para el lote 1 se presenta en la Figura 4.19.

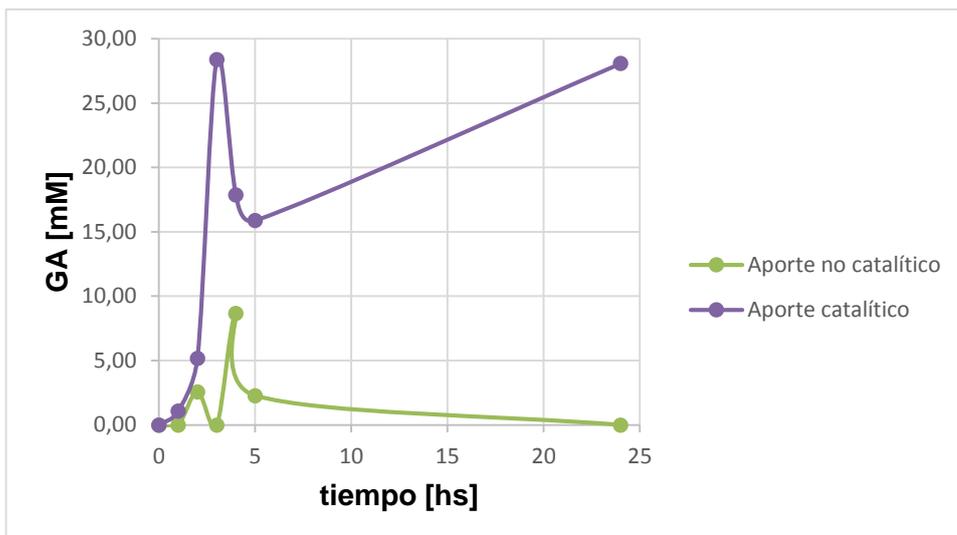


Figura 4.19. Resultados lote 1 Fenton.

Se observa que la conversión máxima se da a las 3 horas de reacción. Debido a que Fenton no es un método catalítico selectivo hacia el gliceraldehído, se elige este tiempo para finalizar las siguientes reacciones en donde su concentración es máxima.

Para la reacción con aporte no catalítico se observa un aumento en la concentración de gliceraldehído durante las primeras 2 horas de reacción con 2,58 mM, luego de la cual disminuye y vuelve a aumentar a las 4 horas de reacción con 8,68 mM para finalmente disminuir hasta 0 mM a las 24 horas de reacción, valor que denota la desaparición total del gliceraldehído. Este efecto puede deberse a que en las primeras horas de reacción existe mayor cantidad de peróxido disponible para oxidar el glicerol consumiéndose con el paso del tiempo. Sin presencia de peróxido en el medio de reacción no hay otra sustancia capaz de oxidar al glicerol. Por otro lado, el gliceraldehído cuantificado en las primeras horas pudo continuar oxidándose hacia otros productos que no detecta el reactivo de Schiff. Si bien se observa una fluctuación en el aporte no catalítico este resulta no es considerable respecto a la curva de reacción con catalizador. También se puede observar que el reactivo de Schiff cambia de color notablemente en la reacción con catalizador y no en ausencia del mismo (Figura 4.20) debido a su interacción con aldehídos presentes.



Figura 4.20. Comparación de reactivo de Schiff a 3 horas de reacción sin catalizador presente vs con catalizador presente respectivamente.

Para la reacción con aporte catalítico, la cual contiene glicerol, sulfato ferroso y peróxido de hidrógeno, se observa un aumento sostenido de la concentración de gliceraldehído hasta las 3 horas de reacción con 28,38 mM, luego disminuye hasta las 5 horas de reacción y finalmente aumenta a las 24 horas de reacción obteniendo 28,08 mM.

Al comparar la reacción con catalizador frente a la que no posee la sal de hierro, se concluye que el aumento de concentración de gliceraldehído en la primera se debe únicamente al aporte catalítico ya que la otra muestra no posee catalizador y su concentración se mantiene prácticamente constante.

Debido que a las 24 horas de reacción se obtiene un valor de concentración levemente menor que a 3 horas de reacción se decide terminar los siguientes ensayos a las 3 horas de reacción.

En la Figura 4.21 se expresan los resultados obtenidos para el lote 2 el cual se realizó por duplicado.

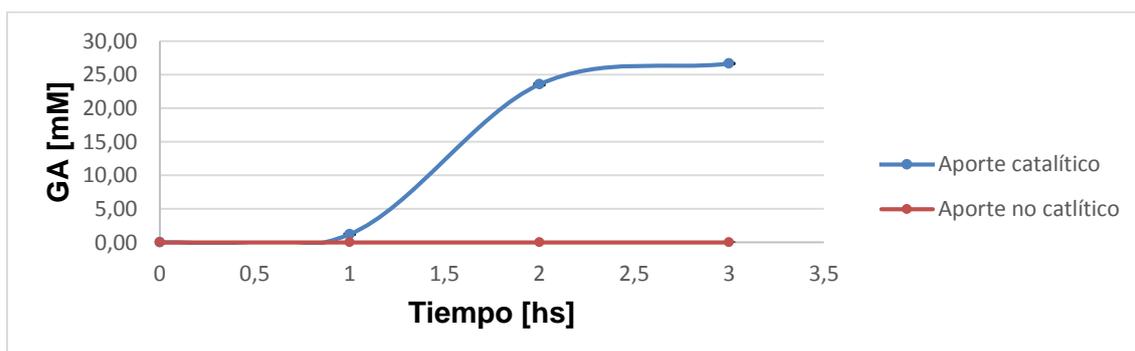


Figura 4.21. Resultados lote 2 Fenton.

Se puede observar un aumento sostenido en la concentración de gliceraldehído para la reacción con catalizador y no se observa variación considerable para la reacción en ausencia de hierro, lo cual indica que la concentración obtenida en la primera se debe únicamente al aporte catalítico. La concentración máxima obtenida a las 3 horas de reacción es de 26,68 mM.

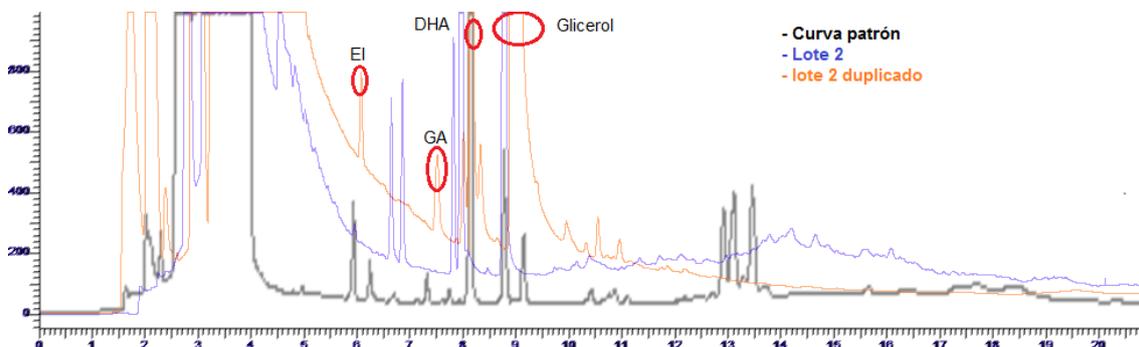


Figura 4.22. Cromatogramas lote 2 Fenton.

En el caso del lote 2 se pueden observar picos importantes a 6,6, 6,8 posiblemente pertenecientes a otros productos de oxidación. Los picos correspondientes al rango entre 7.9 – 8.0 minutos corresponden a una especie de glicerol parcialmente derivatizada. En el caso del duplicado del lote 2 se observan picos a 7,9 y 8,3 minutos posiblemente pertenecientes a otros productos de oxidación.

En la Figura 4.23 se detallan los resultados obtenidos para el lote 3.

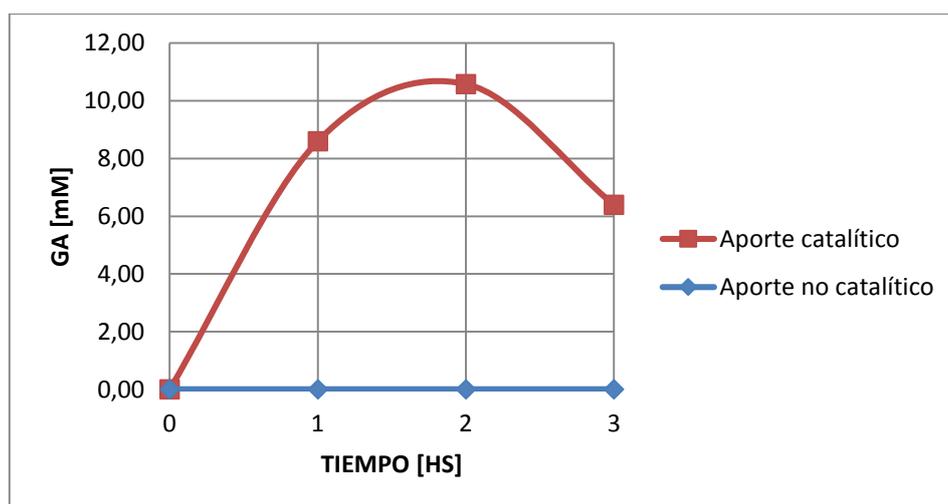


Figura 4.23. Resultados lote 3 Fenton.

Se puede observar que la concentración de gliceraldehído es máxima a las 2 horas de reacción con 10,58 mM para la reacción con catalizador y no se observa variación considerable en ausencia de este, lo cual indica que la

concentración obtenida en la primera se debe al aporte catalítico. Si bien la cantidad de peróxido de hidrógeno agregado en este lote es mayor a la de los anteriores, no se observan cambios significativos en el aporte no catalítico. Además, la relación peróxido/ catalizador utilizada en este caso es mayor a los anteriores.

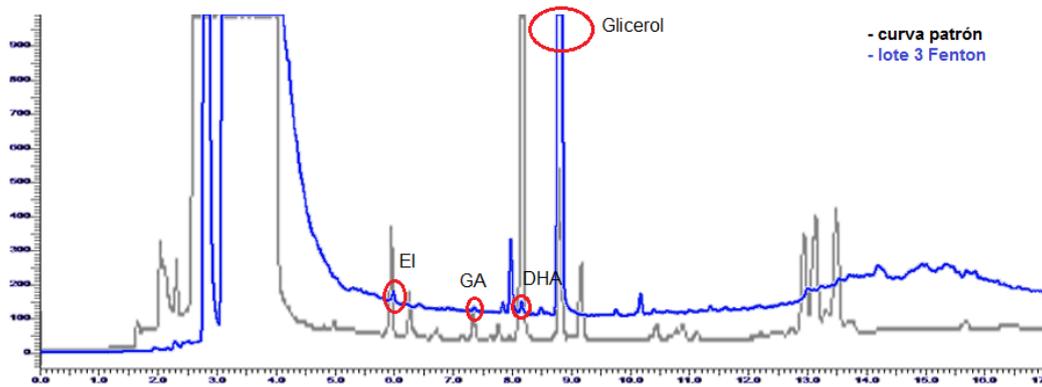


Figura 4.24. Cromatograma lote 3 Fenton.

Del cromatograma obtenido para el lote 3 a las 3 horas de reacción se puede observar la presencia de picos tanto para DHA y GA (Figura 4.24). Además, se detecta la presencia de estándar interno y glicerol y la línea de base se observa superior con respecto a la curva patrón. Entre 12,8 y 14,5 minutos no se observan los picos característicos de la curva patrón, posiblemente debido a un enmascaramiento por la elevada línea de base.

En la Figura 4.25 se expresan los resultados obtenidos para el lote 4.

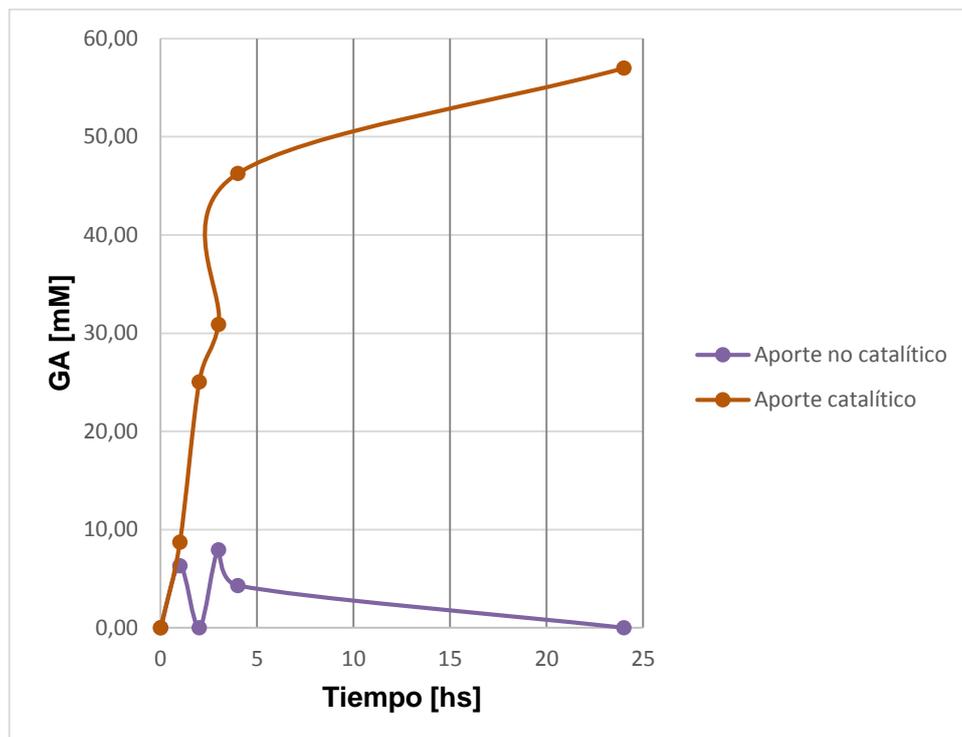


Figura 4.25. Resultados lote 4 Fenton.

Se observa un aumento sostenido de la concentración de gliceraldehído con el tiempo, dando una conversión máxima a las 24 horas de reacción. Con cada agregado de peróxido de hidrógeno el aporte no catalítico fluctúa, lo cual puede deberse a la reacción directa con glicerol hasta activarse el mecanismo catalítico.

A las 24 horas de reacción el aporte no catalítico es mínimo y despreciable comparado con el catalítico.

Luego del último agregado de peróxido de hidrógeno, a las 4 horas de reacción, la concentración de gliceraldehído aumenta el 50%, pasando de 30,92 mM a 46,38 mM y a su vez el aporte no catalítico se reduce más de la mitad. Esta condición denota la activación del sistema catalítico Fe (II)/ H₂O₂.

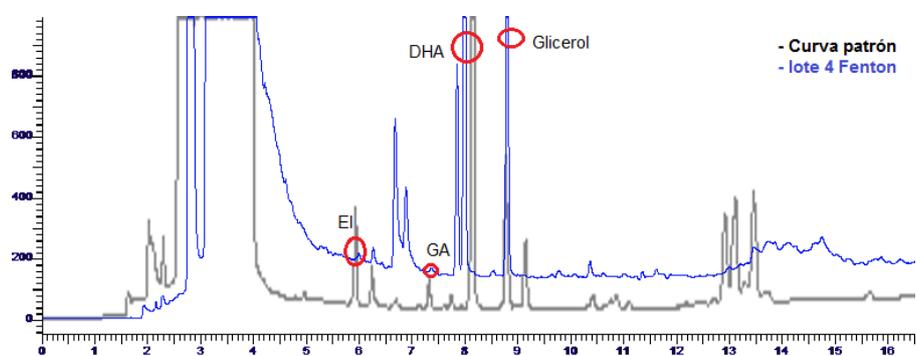


Figura 4.26. Cromatograma lote 4 Fenton.

Del cromatograma obtenido para el lote 4 a las 24 horas de reacción (Figura 4.28) se puede observar presencia de picos de GA y DHA como así también picos a 6,6, 6,8 y 7,9 posiblemente pertenecientes a otros productos de reacción. Además, se verifica la presencia de estándar interno y glicerol, y una línea de base superior a la de la curva patrón.

De la Figura 4.27 se puede observar que para el lote 4 la concentración de gliceraldehído a 3 horas de reacción es mayor que para los lotes 1, 2 y 3 en sus máximas conversiones.

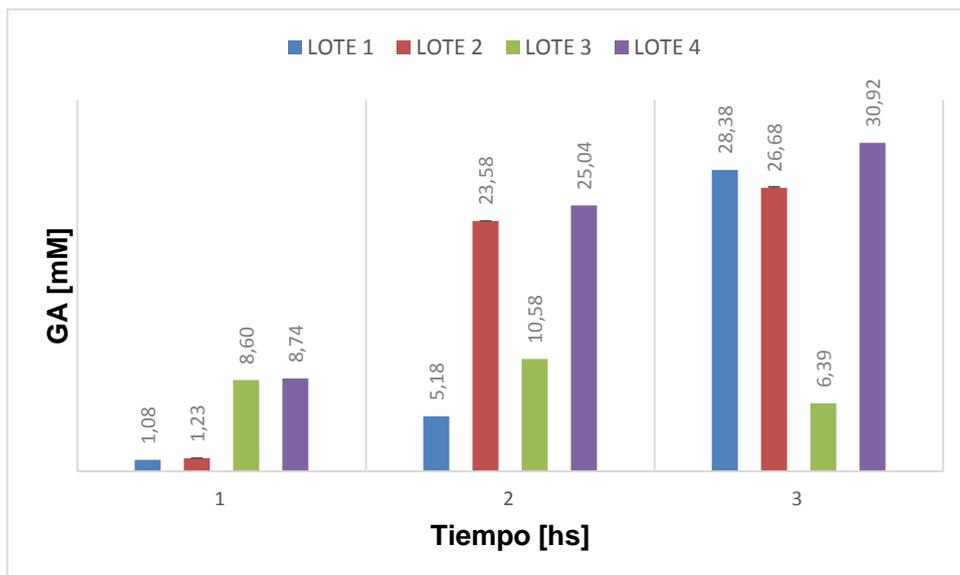


Figura 4.27. Comparación de todos los lotes Fenton.

Cada lote presenta una curva de conversión diferente, lo cual puede deberse a que el rendimiento de la reacción depende de la relación Fe (II)/ H₂O₂ utilizada.

Para el lote 4 se observa un aumento sostenido de la concentración de GA con el tiempo y su valor final es mayor que para los lotes anteriores, esto denota un efecto positivo en el agregado de peróxido de hidrógeno en varias etapas. Debido a esto, este lote es el que se elige para realizar la impregnación en la condición optimizada obtenida en el siguiente capítulo.

Como se observa en la Figura 4.28, el sistema que posee el catalizador tiene color amarillo debido a la presencia de hierro (II). Además, cabe destacar, que en ninguno de los lotes se vio la decoloración del catalizador como sucedió en varios con uso de hematín.



Figura 4.28. Sistema con catalizador activo Fenton (izquierda). Sistema sin catalizador (derecha).

Capítulo 5: Impregnación con CO₂ supercrítico

5.1 Introducción

En el presente capítulo se detallan los resultados obtenidos en la impregnación supercrítica de los compuestos oxidados del glicerol en films de PLA comercial.

Primero, se evalúa la impregnación bajo distintas condiciones usando un compuesto puro. Se elige la dihidroxiacetona (DHA) debido a la disponibilidad tanto física como económica. Es necesario resaltar, que los resultados obtenidos utilizando DHA son también válidos para GA, debido a que ambos compuestos son isómeros funcionales (Figura 5.1). Debido a su similitud, es esperable que su comportamiento en la impregnación con CO₂ supercrítico sea semejante.

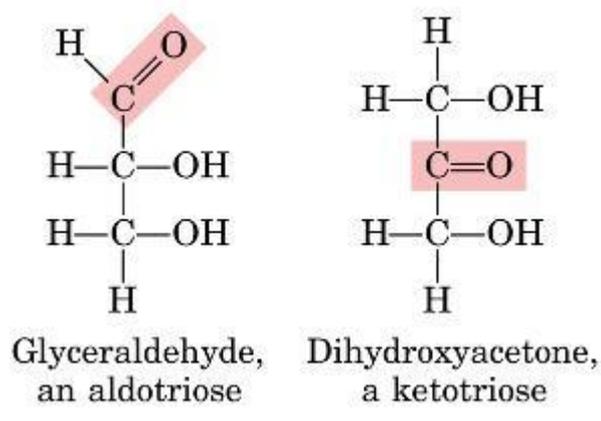


Figura 5.1. DHA y GA isómeros funcionales.

Una vez elegidas las condiciones de operación se procede a impregnar el producto de las reacciones catalíticas. Como se ha mencionado, se utiliza el lote de oxidación en el cual se obtiene mayor concentración de productos oxidados (lote 4 obtenido por método Fenton).

5.2 Materiales y métodos

Para llevar a cabo el proceso se utilizó una celda de alta presión instalada en la Planta Piloto del ICTA (FCEFYN-UNC), que cuenta con control de temperatura y presión y un sistema magnético de agitación interna.

El equipo se esquematiza en la Figura 5.2. Consiste en un tubo de CO₂ que se conecta mediante una línea y una válvula (V-2) al generador manual de presión (B-1). Esta línea toma forma de serpentín en un segmento, con el objetivo de ser sumergido en un baño refrigerante, para así asegurar que el CO₂ ingrese en estado líquido a la bomba. En un ramal en forma de T, se conecta la bomba manual al impregnador, ubicándose el manómetro (M-3) entre estos dos equipos.

Dentro de la celda de impregnación (C-1), se coloca un imán agitador teflonado y un soporte de malla metálica que permite ubicar los films de PLA a

una altura intermedia de la celda, además de separarlos entre sí para posibilitar una buena superficie de contacto y una impregnación homogénea. Una vez cargada la celda con el polímero, el compuesto activo y el agitador, se cierra y se presuriza con CO₂ hasta el nivel deseado. Una vez ajustada la temperatura y la presión, se deja el sistema en esas condiciones durante un determinado período de tiempo, durante el cual transcurre la impregnación. Finalmente, el sistema se despresuriza, liberándose el CO₂ a través de una válvula micrométrica (V-5), y se recupera el material impregnado.

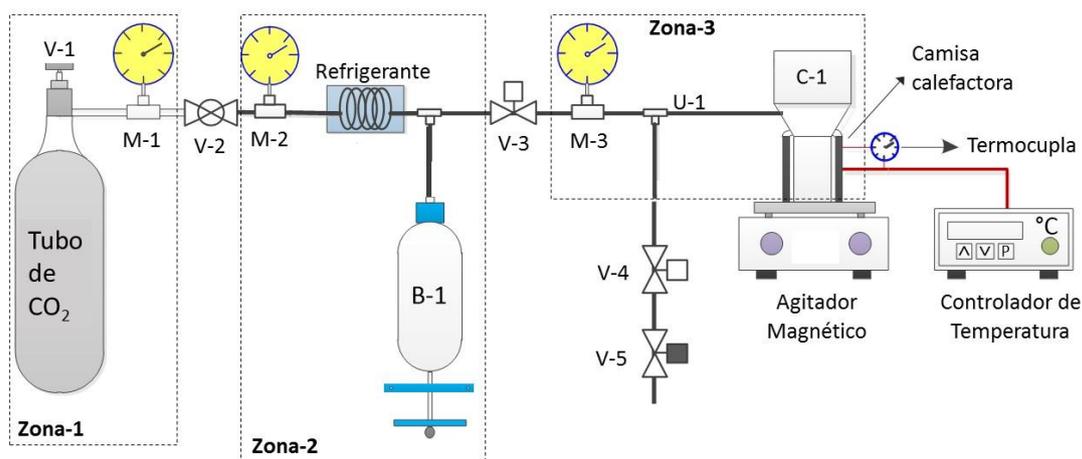


Figura 5.2. Esquema del sistema de impregnación. C-1: Celda de impregnación; V: Válvulas; M: Manómetros (medidores de presión); B-1: Bomba manual.

Se fijaron ciertos parámetros para limitar el número de ensayos a realizar y analizar cómo varía la eficiencia del método con respecto a las distintas variables implicadas en el proceso.

La temperatura de trabajo se mantuvo en 50°C y el tiempo de impregnación se fijó en 2 horas para todos los ensayos. Se trabajó a dos presiones diferentes (90 bar y 120 bar) y dos velocidades de despresurización: una lenta a 5 bar/min y una muy rápida a 50 bar/min. Siempre se mantuvo la misma relación másica de DHA/polímero.

En cada ensayo se utilizaron 4 films de aproximadamente 0,1 gramos cada uno, a modo de réplicas. Para la cuantificación de la cantidad de compuesto activo impregnado los films fueron pesados antes y después de la impregnación en una balanza analítica con una precisión de ± 0.0001 g, registrándose su aumento de peso.

Se definió el rendimiento de impregnación como:

$$R\% = \frac{m_f - m_0}{m_0} \times 100$$

En donde m_0 y m_f representan la masa de film antes y después de la impregnación.

Por otra parte, se definió la eficiencia del proceso como:

$$E\% = \frac{m_{impregnada}}{m_{cargada}} \times 100$$

En donde $m_{cargada}$ representa la masa de compuesto activo inicialmente cargada en la celda y $m_{impregnada}$ la masa incorporada en los films durante la impregnación.

Se utilizó espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) para la confirmación de la impregnación del compuesto deseado. Para ello se utilizó un microscopio infrarrojo Nicolet iN10 Mx (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) facilitado por la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ-UNC). Se adquirieron los espectros en modo transmisión, con una resolución de 4 cm^{-1} , en un rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} y 16 scans, a temperatura ambiente. Los espectros fueron procesados con el software Omnic 8.

5.3 Resultados y discusión

La Tabla 5.1 muestra los resultados de rendimiento y eficiencia de impregnación de DHA en films de PLA en las cuatro condiciones evaluadas.

Tabla 5.1. Rendimiento y eficiencia de impregnación de DHA.

| N° ensayo | Presión [bar] | Velocidad [bar/min] | Rendimiento [%] | Eficiencia [%] |
|-----------|---------------|---------------------|-----------------|----------------|
| 1 | 90 | 50 | $4,64 \pm 0,18$ | 6,36 |
| 2 | 90 | 5 | $2,64 \pm 0,39$ | 3,30 |
| 3 | 120 | 50 | $3,39 \pm 0,45$ | 4,16 |
| 4 | 120 | 5 | $4,24 \pm 0,50$ | 4,50 |

Como puede observarse, tanto desde el punto de vista del rendimiento como de la eficiencia, la mejor condición para la impregnación de DHA en el film de PLA a 50°C , es a 90 bar y con una velocidad de despresurización de 50 bar/min (ensayo 1).

Se observa que a distintas presiones los resultados son diferentes. Ya que a una presión menor (90 bar), la influencia de la velocidad de despresurización es notable, obteniendo una eficiencia de casi el doble cuando se despresuriza rápidamente. Por otro lado, a una presión mayor (120 bar), las eficiencias son prácticamente iguales, indicando que la velocidad de despresurización no tiene efecto significativo.

Esto puede deberse a que el compuesto posee más afinidad por el polímero que por el CO₂. Entonces a 90 bar y a una velocidad rápida de despresurización, el tiempo necesario para que el compuesto fluya con el CO₂ no es suficiente y precipita rápidamente en el polímero. Cabe destacar, que el PLA es un polímero con varios grupos polares por lo tanto tendrá afinidad con compuestos como el DHA en donde puede tener interacciones muy fuertes por puentes de hidrógenos. Lo contrario ocurre a una velocidad de despresurización lenta, en donde posee más tiempo. Por otro lado, la solubilidad del compuesto en CO₂ aumenta con la presión, por ello a 120 bar la eficiencia es independiente de la velocidad.

La presencia del compuesto en el polímero impregnado se confirmó mediante espectroscopía FTIR. A continuación, se presenta los espectros obtenidos:

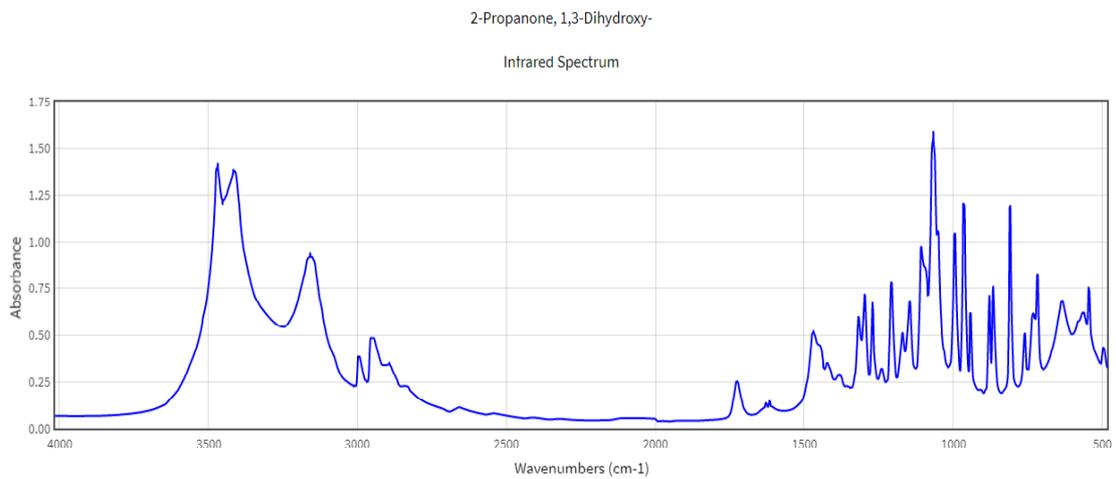


Figura 5.3. Espectro FTIR del compuesto DHA puro, obtenido de NIST (National Institute of Standards and Technology, <https://www.nist.gov/>).

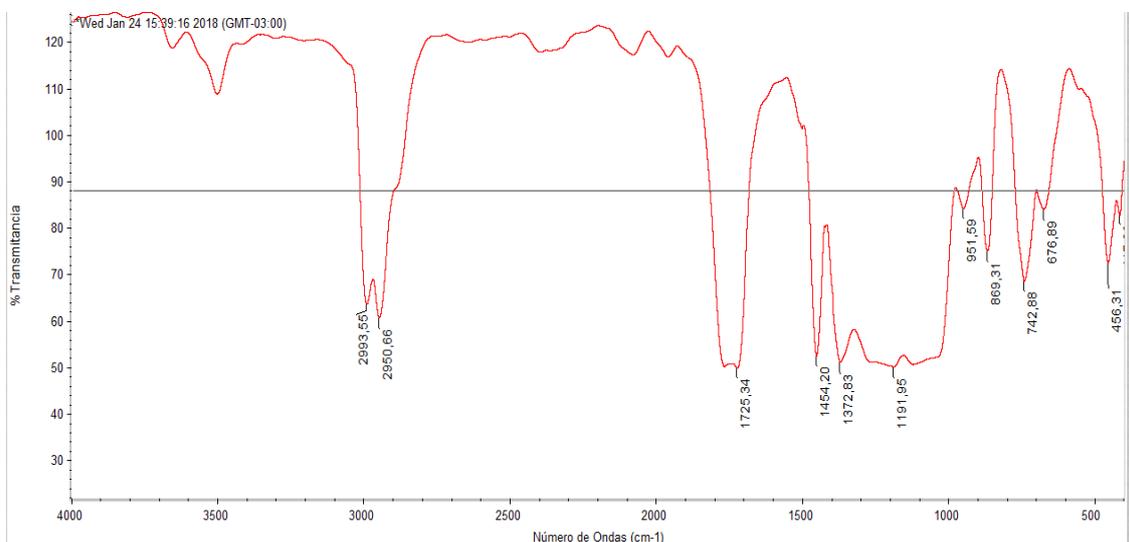


Figura 5.4. Espectro FTIR obtenido de PLA comercial.

Comparando los espectros de DHA y PLA, como se observa en las Figuras 5.3 y 5.4, existen picos característicos del polímero entre 2900 y 3000 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} distintos al DHA. En contraste, éste tiene un pico característico aproximadamente en 3400 cm^{-1} , correspondiente al enlace O-H. Los picos del polímero a $2993,55\text{ cm}^{-1}$ y $2950,66\text{ cm}^{-1}$ corresponden a vibraciones de los enlaces C-H a partir de CH_3 . El pico a $1725,34\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la del enlace C=O de éster alifático [69]. El polímero también presenta absorción a longitudes de onda cercanas a 3400 cm^{-1} , también debido a la presencia de grupos hidroxilos en los grupos terminales de las cadenas.

La Figura 5.5. Muestra el espectro obtenido del film impregnado superpuesto a los espectros de DHA y PLA puro.

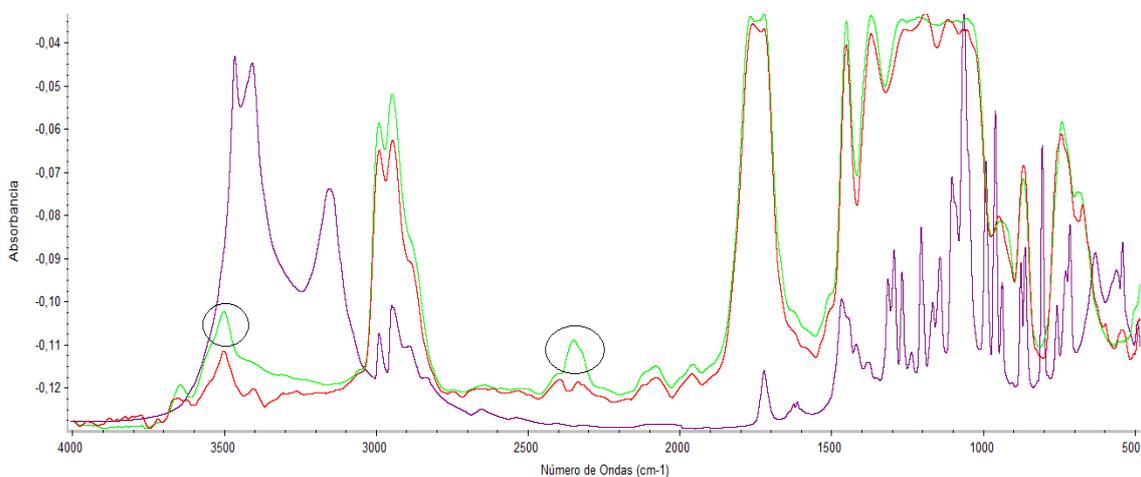


Figura 5.5. a-Espectro DHA (violeta); b-Espectro PLA impregnado con DHA (verde); c-Espectro PLA sin impregnar (rojo).

Se observa el pico característico del DHA a 3400 cm^{-1} (correspondiente a enlaces O-H) en el film impregnado, siendo este más pronunciado que en el polímero sin impregnar. Se observa también un incremento en el pico que aparece a aproximadamente 2300 cm^{-1} . El CO_2 absorbe típicamente en este rango, lo cual sugiere que puede tratarse de CO_2 residual que no se terminó de desorber del polímero después de la impregnación.

Luego de confirmar mediante IR y teniendo ya la condición optimizada de la impregnación para DHA en PLA, se impregnó el lote 4 obtenido por el método Fenton, en donde se obtuvo la mayor concentración de GA. Se tomó una muestra de $1,5\text{ mL}$ y se secó en estufa de vacío a temperatura ambiente durante 4 días para eliminar el agua y se disolvió la muestra seca en 2 mL de etanol 96%. Este procedimiento se llevó a cabo para evitar la presencia de agua en la celda de impregnación, lo cual puede ocasionar deterioro del polímero.

Los resultados de la impregnación supercrítica del lote 4 de Fenton se

presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Resultados impregnación supercrítica lote 5 Fenton.

| Ensayo | Rendimiento (%) | Eficiencia (%) |
|---------------|------------------------|-----------------------|
| Lote 4 | 2,28 ± 0,67 | 7,09 |

La eficiencia final del Lote 4, resulta ser mayor que la obtenida en los ensayos con estándar de DHA. Cabe destacar que esto se debe a que la masa de muestra era menor que en los otros ensayos, tratándose de 0,02 gramos frente a 0,1 gramos.

Capítulo 6: Conclusiones

6.1 Conclusiones

En el desarrollo del presente proyecto integrador fueron numerosas las etapas de investigación, diseño de actividades experimentales y las técnicas de determinación, experimentación y análisis de datos. Con la finalización de cada uno de estos ciclos se logró el diseño de la actividad posterior y el cumplimiento de metas con sus respectivas conclusiones de interés.

Respecto al primer objetivo específico planteado, se confirmó la actividad biocida de uno de los productos de oxidación del glicerol siendo éste el gliceraldehído, resultado que fue muy alentador y sentó un precedente ya que nunca antes se había estudiado. Dando una MBC con GA de 6,25 mg/mL para *E. coli* y *S. aureus* y 12,5 mg/mL para *P. aeruginosa*.

Continuando por el segundo objetivo específico, se inmovilizó el hematín sobre hojuelas de quitosano con una baja eficiencia de inmovilización (11,93% según la masa soportada) y la consecuente sospecha de la polimerización del glutaraldehído. A pesar de ello, se logró oxidar el glicerol al utilizar el catalizador heterogéneo con una mejor relación de reactivos/catalizador para el ensayo 1 obteniendo un rendimiento de reacción del 30,68%.

Se oxidó el glicerol con hematín libre, en el cual se obtuvo mayor rendimiento a pH 4 que a pH 5 (3,3% frente a 1,5% a las 19 horas de reacción) y un efecto positivo en la relación porcentual de GA a glicerol inicial con el aumento de peróxido de hidrógeno juntamente con la disminución del glicerol.

Para todos los ensayos realizados con hematín, tanto libre como inmovilizado, se puede concluir que el máximo rendimiento se dio a las 6 horas de reacción, tiempo después del cual las hojuelas presentan alteraciones morfológicas y blanqueamiento de hematín.

Luego, respecto al tercer objetivo específico, se oxidó glicerol mediante reacciones de Fenton, en las cuales se obtuvieron tanto DHA como GA y la sospecha de otros productos de reacción. El tiempo para el cual el rendimiento fue máximo fue de 3 horas de reacción, siendo la mitad del tiempo determinado para hematín. Se comprobó que mediante el agregado de peróxido de hidrógeno en varias etapas se logra un aumento sostenido en el tiempo de GA, dando un rendimiento del 75%, condición altamente buscada y satisfactoria,

Por último, se cumplió con el cuarto objetivo específico, en donde se logró impregnar el estándar con un buen rendimiento y eficiencia (4,64% y 6,36% respectivamente), corroborando la existencia de los compuestos en el film mediante espectrofotometría IR. Al impregnar el lote 4 de Fenton se logra una eficiencia de 7,09% mayor al obtenido con los estándares, mientras que el rendimiento es menor 2,28%. Cabe destacar que la eficiencia mayor se debe a que la masa de muestra era menor que en los otros ensayos, tratándose de 0,02

gramos frente a 0,1 gramos.

6.2 Perspectivas a futuro

Si bien los objetivos del proyecto integrador realizado han sido cumplidos, se han generado nuevos interrogantes y desafíos que pueden ser tomados como punto de partida para futuras investigaciones.

En cuanto a la oxidación con hematín se propone seguir estudiando el efecto de la concentración de hematín para el aumento de rendimiento de reacción. Tomando como base de la condición utilizada en la sección 4.4.3 (100 mM glicerol 5 g/L de hematin) e ir disminuyendo paulatinamente dichas concentraciones.

Por otro lado, para la oxidación con fenton se propone optimizar la relación de reactivos/catalizador con agregado de peróxido en etapas.

Respecto a la actividad biocida de los compuestos, se recomienda estudiar el DHA en concentraciones mayores a las estudiadas en este PI.

Finalmente estudiar las características del film impregnado, medir su bioactividad, la capacidad de liberación de los compuestos activos impregnados, toxicidad de los mismos, características físicas y mecánicas. Elegir un alimento para envasado, determinar su flora natural y realizar ensayos sobre este alimento.

Respecto al material propuesto, si bien propusimos el PLA ya que es un material biodegradable y va de la mano con el objetivo de dar un uso a un subproducto que es el glicerol sin generar otro tipo de contaminación. Se debería estudiar si el PLA es el material más apto para este tipo de aplicación o existieran otros posibles. Por otro lado, a qué tipo de envases se podría aplicar este y si es rentable para alguna aplicación en particular.

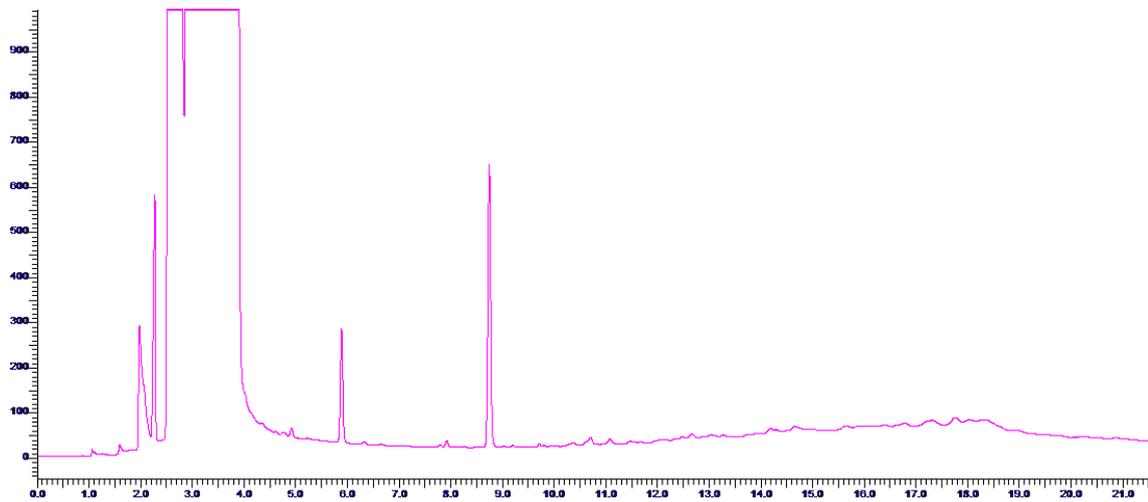
Capítulo 7: Anexos

7.1 Anexo 1

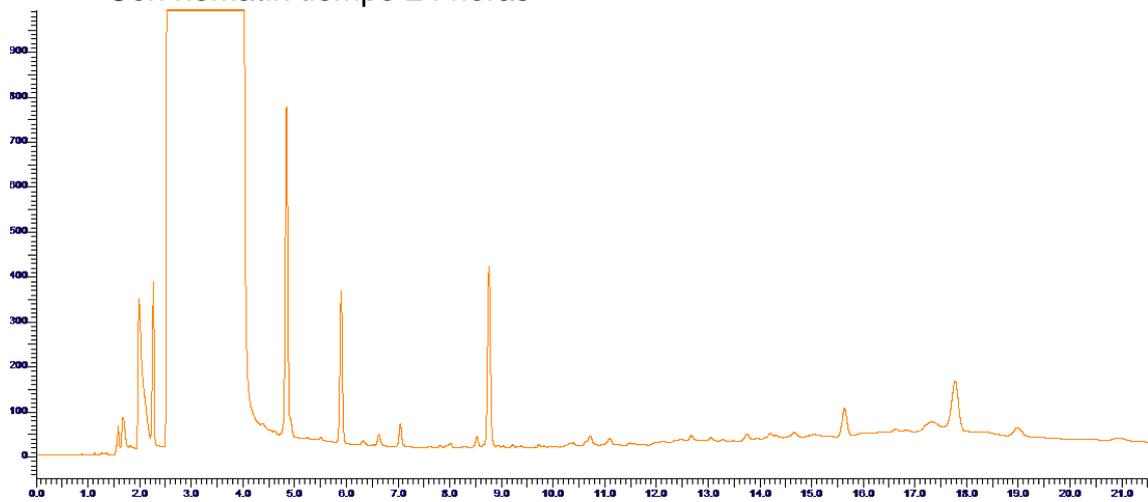
A continuación, se presentan los cromatogramas del ensayo nº1 y 2 de hematín inmovilizado

Cromatogramas del ensayo 1 de hematín inmovilizado:

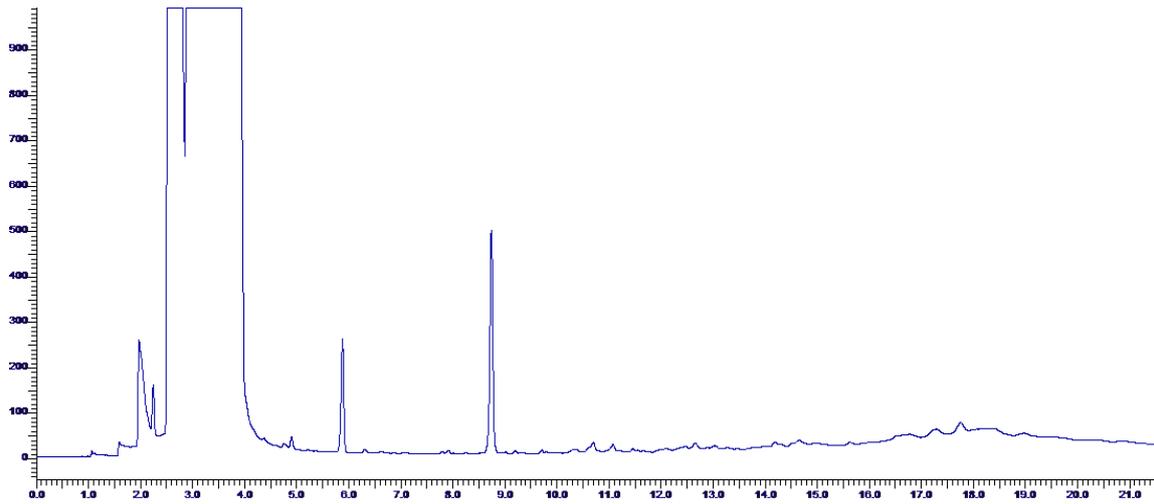
- Con hematín tiempo 0 horas



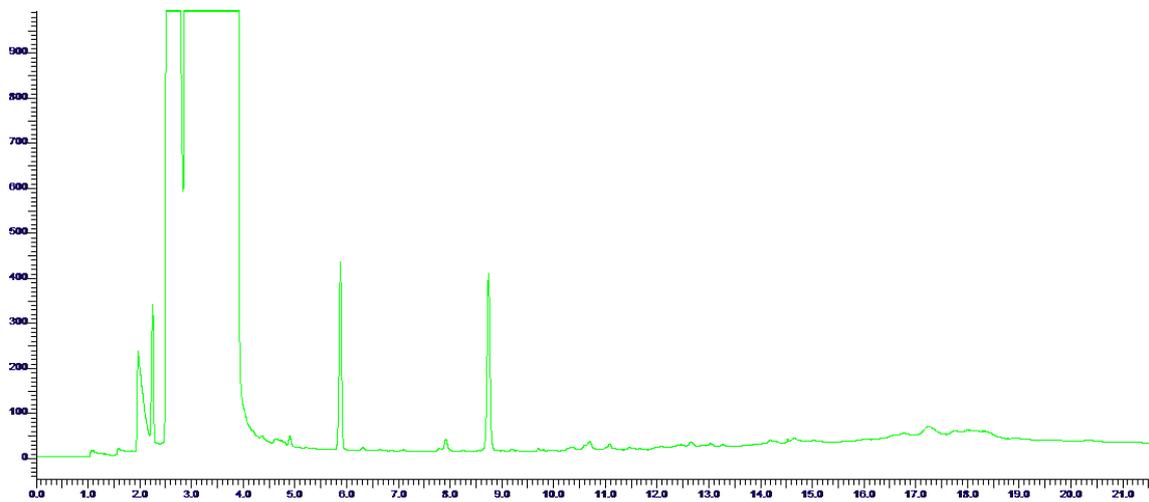
- Con hematín tiempo 24 horas



- Sin hematín tiempo 0 horas

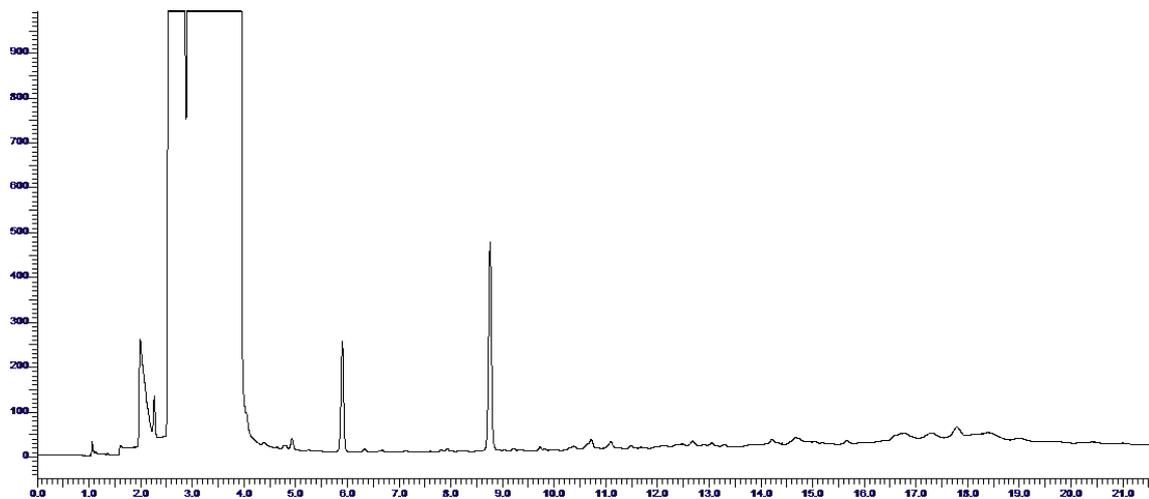


- Sin hematín tiempo 24 horas

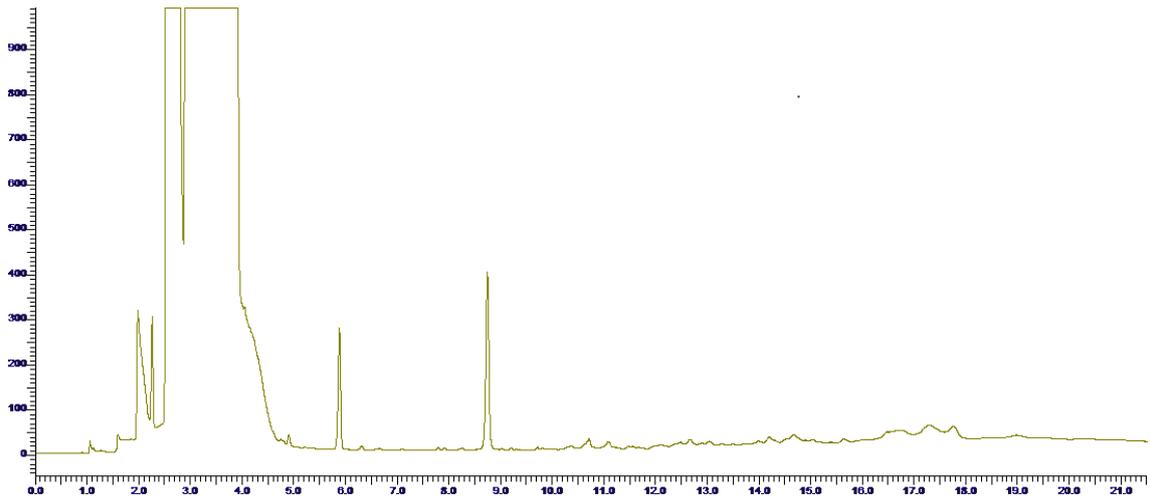


Cromatogramas del ensayo 2 de hematín inmovilizado:

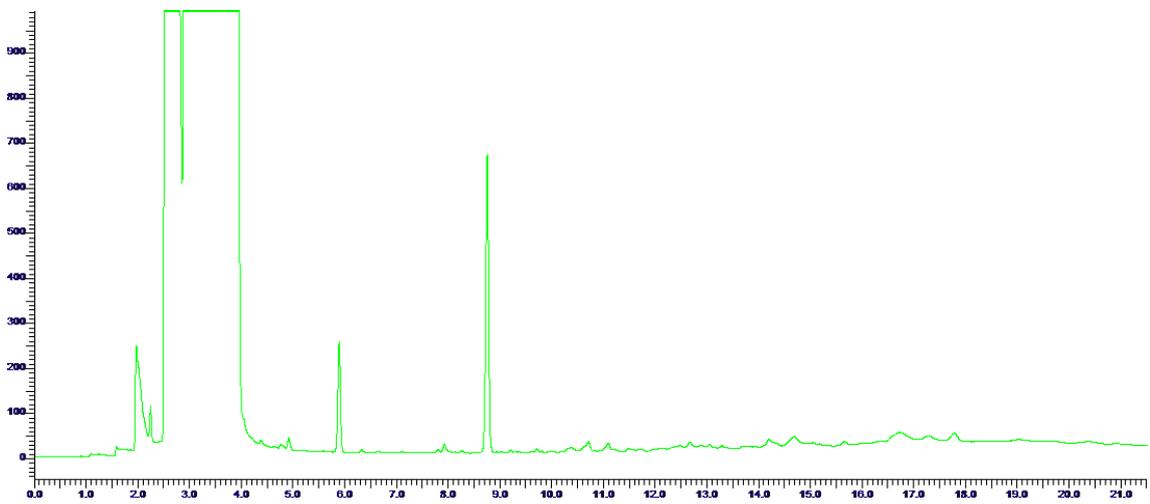
- Con hematín tiempo 0 horas



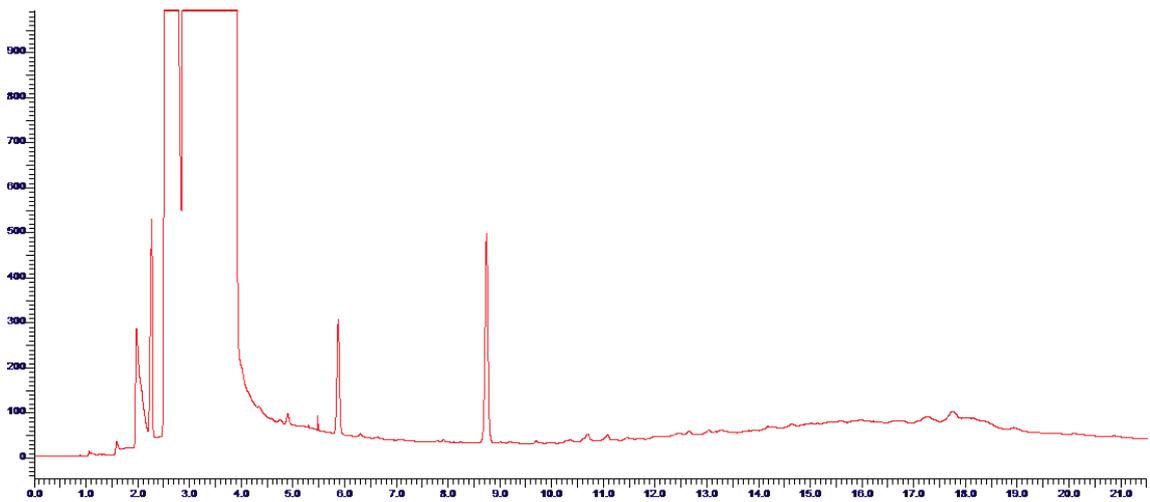
- Con hematín 6 horas



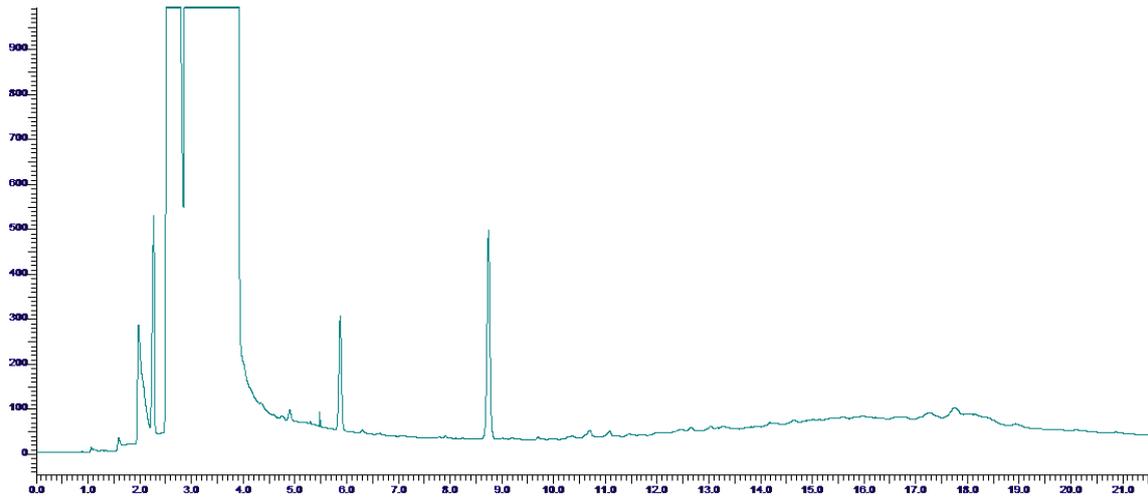
- Con hematín tiempo 24 horas



- Sin hematín tiempo 0 horas



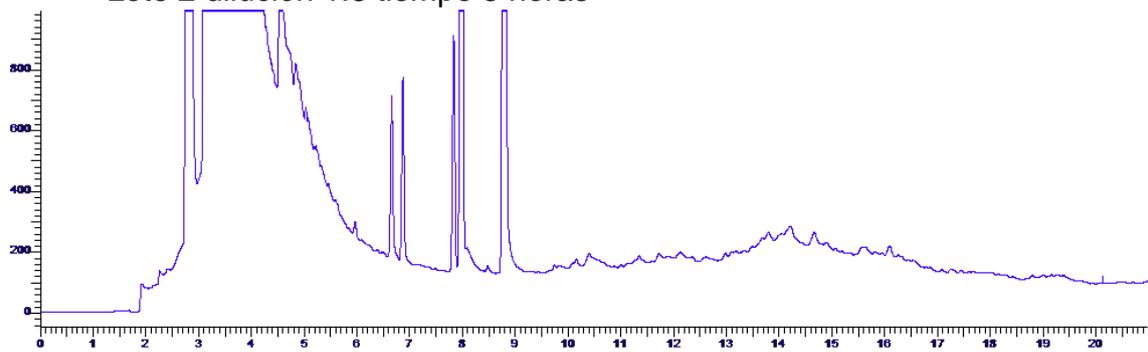
- Sin hematín tiempo 24 horas



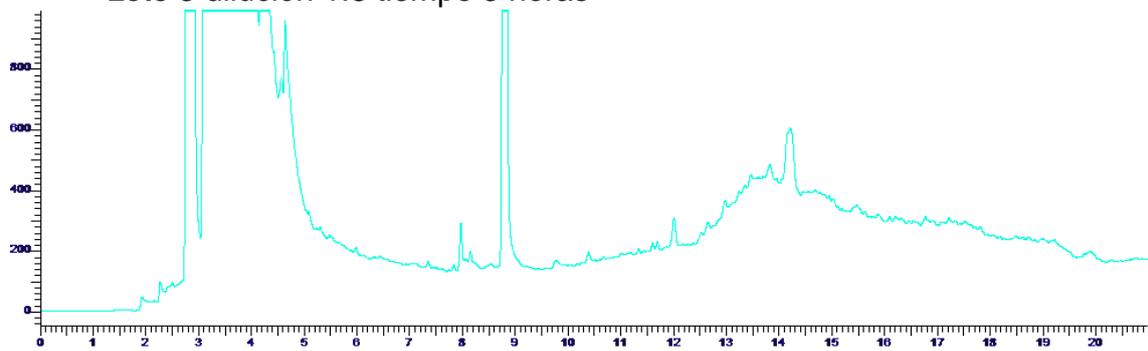
7.2 Anexo 2

Cromatogramas de las reacciones de Fenton:

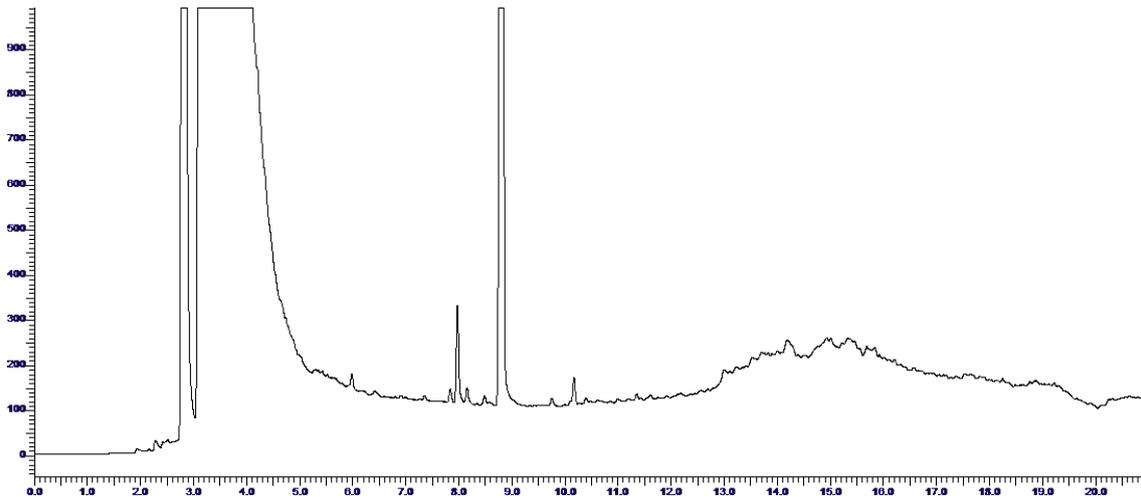
- Lote 2 dilución 1:8 tiempo 3 horas



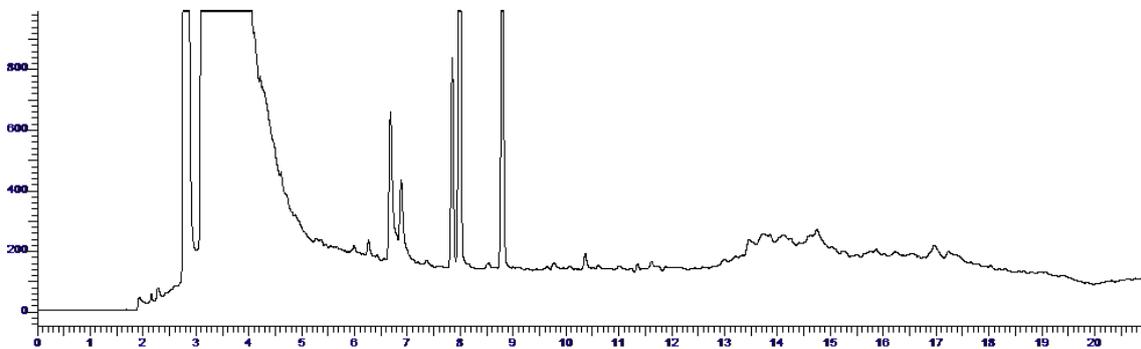
- Lote 3 dilución 1:8 tiempo 3 horas



- Lote 3 duplicado, dilución 1:8 tiempo 3 horas



- Lote 4 dilución 1:8 tiempo 24 horas



Capítulo 8: Bibliografía

- [1] Academia Sevillana de Ciencias,(1986-1989), "Memorias de la academia sevillana de ciencias".
- [2] Diana Medina, (2010), "Estudio de la glicerólisis de la trioleína para la producción de monoglicéridos vía enzimática con lipasas de *Cándida Rugosa* y de *Mucor Miehei*".
- [3] Naresh Pachauri, Brian He, (2006), "Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production: A Survey of Current Research Activities".
- [4] Thomas Willke and Klaus Vorlop, (2008), "Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol".
- [5] Vuane T. Johnson and Katherine A. Taconi,(2007), "The Glycerin Glut: Options for the Value-Added Conversion of Crude Glycerol Resulting from Biodiesel Production".
- [6] Thompson, J.C. and B. He, (2006), "Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks".
- [7] Zheng, Y., X. Chen, and Y. Shen, Chem. Rev, (2008), "Commodity Chemicals Derived from Glycerol, an Important Biorefinery Feedstock".
- [8] Benjamin Katryniok, Hiroshi Kimura, El'zbieta Skrzyńska, Jean-Sébastien Girardon, Pascal Fongarland, Mickael Capron, Rémy Ducoulombier, Naoki Mimura, Sébastien Paul and Franck Dumeignil, (2011), "*Selective catalytic oxidation of glycerol: perspectives for high value chemicals*".
- [9] C.Crotti, E. Farnetti, (2015), "Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 396".
- [10]W. Nam, Mi Hee, Sun Kyung, & Kim, (2000), Stephenson & Bell, 2007a, 2007b.
- [11]De Villiers, Kaschula, Egan, & Marques, (2007)
- [12]Akkara, Wang, Yang, & Gonsalves, (2000)
- [13]Kalyanaraman, Mottley, & Mason, (1983), Rafiquzzaman, Komagoe, & Tamagake, (1995).
- [14]Koppenol, W.H. (1993). "The centennial of the Fenton reaction".
- [15]Bautista, P; Mohedano, A F; Casas, J A; Zazo, J A; Rodriguez, J, (2008). "An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment".
- [16]V. Felipe Laurie and Andrew L. WATERHOUSE,(2006), "Oxidation of Glycerol in the Presence of Hydrogen Peroxide and Iron in Model Solutions and Wine. Potential Effects on Wine Color".
- [17]Colorado, A, Cátedra de Enzimología Universidad Nacional de Rosario, (2013), "*Inmovilización de Enzimas*".
- [18]Arroyo, M. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.(2008) "*Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*".
- [19]Arica et al. (2004), Obtenido en febrero de 2018 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117703003199>. "Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine-grafted and Cu (II) chelated poly(HEMA-co-GMA) reactive membranes".
- [20]Vidal et al, (2006) "A comparative study of immobilization of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide".
- [21]Arica, M. Y., Bayramoglu, G.(2008), "Arsoption of trypsin onto magnetic ion-exchange beads of poly(glycidylmethacrylate-co-ethyleneglycoldimethacrylate)".

- [22] Neri et al. (2009). “Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol”.
- [23] Dong-Geun et al. (2009). “Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles”.
- [24] A. Cordoba. (2014). “Catalizadores enzimáticos y biomiméticos soportados para la eliminación de colorantes modelo de soluciones acuosas”.
- [25] Scientia et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira. (2009), “Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal”.
- [26] Sawai.J., D. R., MaekawaY., Y. T., K. H, Journal of industrial Microbiology and Technology. 2002. "Indirect conductimetric assay of antibacterial activities.
- [27] Bastarrachea L, Sumeet D, and Sablani SS. 2011. “Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging.
- [28] Y. Byun, Y.T. Kim, S. Whiteside, J. 2010. “Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with a-tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder”.
- [29] M. Jamshidian, E.A. Tehrany, M. Imran, M.J. Akhtar, F. Cleymand, S. Desobry, J. 2012. “Structural, mechanical and barrier properties of active PLA–antioxidant films”.
- [30] P. Suppakul, K. Sonneveld, S.W. Bigger, J. Miltz, LWT Food Sci. Technol. 2011. “Diffusion of linalool and methylchavicol from polyethylene-based antimicrobial packaging films”.
- [31] S.Y. Sung, L.T. Sin, T.T. Tee, S.T. Bee, A.R. Rahmat, W.A.W.A. Rahman, A.C. Tan, M. Vikhraman, Trends Food Sci. Technol. 2013 “Antimicrobial agents for food packaging applications”.
- [32] Gontard, N., 2000. “Edible Coatings and Films to Improve Food Quality.”
- [33] Gómez-Estaca J, López-de-Dicastillo C, Hernández-Muñoz P, Catalá R, and Gavara R. 2014. “Advances in Antioxidant Active Food Packaging.”
- [34] Park HY, Kim SJ, Kim KM, You YS, Kim SY, and Han S. 2012. “Development of Antioxidant Packaging Material by Applying Corn-Zein to LLDPE Film in Combination with Phenolic Compounds.”
- [35] Lee DS. 2014. “Antioxidative Packaging System”.
- [36] R.E. Drumright, P.R. Gruber, D.E. Henton. 2000. “Polylactic acid technology”.
- [37] J.W. Rhim, S. Hong, C.S. Ha. 2009. “Water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films”
- [38] E. Castro-Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras. 2016. “ Poly(lactic acid): mass production, processing, industrial applications and end of life”.
- [39] D. Garlotta. 2001. “A literature review of poly(lactic acid)”
- [40] FDA – Inventory of Effective Food Contact Substance (FCS) Notifications No.178,2002.<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=fcsListing&id=178>>.
- [41] H. Ortiz-Vazquez, J. Shin, H. Soto-Valdez, R. Auras, Test. 2011. “Release of butylated hydroxytoluene (BHT) from poly (lactic acid) films, Polym”.
- [42] A. Guarda, J.F. Rubilar, J. Miltz, M.J. Galotto. 2011.” The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol, Int. J. Food Microbiol”.

- [43] CHABOT, F. VERT, M. CHAPELLE, S. GRANGER, P. 1983. "Configurational structure of Lactic acid stereocopolymers as determined by C-13-labeled (H-1)-NMR".
- [44] REN, J. Shangai, Springer. 2010. "Biodegradable Poly(Lactic Acid). Synthesis, modification, processing and applications".
- [45] AURAS R, LIM LT, SELKE S, TSUJI H. New Jersey. 2010. "Poly(lactic acid) Synthesis, structures, properties, processing and application".
- [46] KARST, D. YANG, Y. 2006. "Molecular modelling study of the resistance of PLA to hydrolysis based on the blending of PLLA and PDLA".
- [47] Han J and Gennadios A. 2005. "Edible Films and Coatings: A Review."
- [48] Knez Ž E, Leitgeb MM, Primožič M, Knez Hrnčič M, and Škerget M. 2013. "Industrial Applications of Supercritical Fluids: A Review."
- [49] Alejandra Torres, Evelyn Ilabaca, Adrián Rojas, Francisco Rodríguez, María José Galotto, Abel Guarda, Carolina Villegas, Julio Romero. 2017. "Effect of processing conditions on the physical, chemical and transport properties of polylactic acid films containing thymol incorporated by supercritical impregnation"
- [50] Labuschagne P. 2009. "Supercritical CO₂: A " Green " Route for the Encapsulation of Drugs".
- [51] M.L. Goñi, N.A. Gañán, M.C. Strumia, R.E. Martini. 2016. " Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation, J. Supercrit. Fluids",
- [52] M.E.M.Braga, M.T.V. Pato, H.S.R. Costa Silva, E.I. Ferreira, M.H. Gil, C.M.M. Duarte, H.C. de Sousa. 2008. "Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivativez".
- [53] María José Cocero, Ángel Martín, Facundo Mattea, Salima Varona, 2009. "Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications".
- [54] Kikic I, and Vecchione F. 2003. "Current Opinion in Solid State and Materials Science 7(4-5): 399–405. "Supercritical Impregnation of Polymers."
- [55] Majada, J., Vega, A.; Canga, E.; Sánchez, S.; Hevia, A.; Feito, I.; González, M.A.; Menendez-Miguel, M.; González-García, M.; Y Martínez, C. 2015. "Innovación de procesos y productos en el sector de la madera".
- [56] Elvira Casas, Miguel García, Daniel Rivera, Juan Montañés, Antonio Tornero. Departamento de Ingeniería y Procesos. 2012. "Aplicaciones de la tecnología de fluidos supercríticos en el sector textil".
- [57] Parodi Adrián, Zygadlo Julio, Ferreira María Luján, Magario Ivana. 2016. "Valorización de glicerol: oxidación catalítica empleando peróxido de hidrógeno y hematin".
- [58] Ryan KJ; Ray CG, 2004, (4th ed. edición). McGraw Hill "Sherris Medical Microbiology"
- [59] M. N. Gallucci, M. Oliva, C. Casero, J. Dambolena, A. Luna, J. Zygadlo and M. Demo. 2009. "Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus".
- [60] González-Pinzón, Ricardo; Haggerty, Roy; Myrold, David D. 2012. "Medición de la respiración aeróbica en ecosistemas de arroyos utilizando el sistema resazurin-resorufin". .
- [61] Shahangian, S; Ash, KO; Rollins. 1984. "Un método enzimático para el análisis de formiato en plasma humano".

- [62] FAO. (2009), "Prevención de la E. Coli en alimentos".
- [63] Gil de M, Mónica. (2012), "Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina".
- [64] Agostina Córdoba, Ivana Magario and María Luján Ferreira. (2014), "Modified chitosan as an economical support for hematin: application in the decolorization of anthraquinone and azo dyes".
- [65] Andali, María Belén y Ottonello, Esteban, (2015), "Estudio cinético de reacciones de eliminación de colorantes, útiles para el diseño de reactores para tratamiento de efluentes coloreados"
- [66] Alvaro José Resina Sierra. (2002). "Entrecruzamiento de proteínas utilizando la condensación aldólica del glutaraldehído: la influencia de compuestos aminados en el control de los productos de la reacción".
- [67] Bonner, William A.; Castro, Albert J. 1974. Madrid: Alhambra S.A. p. 291. "*Química orgánica básica* (3ª edición)".
- [68] Montgomery, (2001); Gutiérrez Pulido y De la Vara Salazar, (2008)
- [69] Ljubisa Nikolic, Ivan Ristic, Borivoj Adnadjevic, Vesna Nikolic, Jelena Jovanovic and Mihajlo Stankovic. (2010). "Novel Microwave-Assisted Synthesis of Poly(D,L-lactide): The Influence of Monomer/Initiator Molar Ratio on the Product Properties".