

Capítulo I

Introducción

Capítulo I

Introducción

En este capítulo se realiza una detallada introducción con el objetivo de brindar al lector el marco propicio para interpretar esta tesis. Además se plantean los objetivos del trabajo mediante una descripción general y específica.



Figura I.1. *Ciclo que cumplen los materiales biodegradables formados a partir de fuentes de origen natural*

I.1. Introducción general:

Los plásticos derivados del petróleo como material de gran versatilidad

En los últimos 50 años, la demanda de los productos plásticos convencionales derivados del petróleo ha crecido exponencialmente debido a que los mismos proporcionan el balance necesario de propiedades que no pueden lograrse con otros materiales. Por ejemplo, cuando se habla de envases, algunas de las características principales que los materiales plásticos brindan pueden resumirse así:

Son químicamente inertes: Los plásticos sirven para envasar con absoluta seguridad alimentos (lácteos, hortalizas, frutas, fiambres, carnes, pescados, productos de conserva, etc.) y bebidas (agua, gaseosas, etc.). En el campo de la salud, son aptos para envasar medicamentos, muestras biológicas, etc.

Peso: El envase plástico es hoy más liviano que años atrás, conservando la misma capacidad de peso y volumen, gracias al desarrollo de nuevos diseños. Eso significa que hoy en día se utilizan menos recursos para fabricar un envase plástico. En comparación con otros materiales, el envase plástico es de más fácil manipulación y transporte por parte del consumidor.

Maleabilidad a baja temperatura: Sin necesidad de recurrir a grandes fuentes de calor (ahorro de energía), el material plástico puede ser moldeado para obtener diferentes formas que se adapten a la necesidad del producto y del consumidor.

Resistencia a roturas: Los envases plásticos son prácticamente irrompibles en condiciones adecuadas de uso y manipulación, lo cual evita derrames o daños de los productos que contienen (alimentos, líquidos limpiadores, tintas, cosméticos, medicamentos, detergentes, pinturas, productos para el agro, para la industria, para el automotor, para la construcción, etc.). Esta cualidad también es esencial para el envasado de bebidas carbonatadas (gaseosas).

Versatilidad: Los envases plásticos pueden ser rígidos o flexibles según las necesidades del productor. Se adaptan fácilmente a la forma del producto a envasar, ofreciendo máxima protección con la mínima cantidad de material. Los envases plásticos pueden ser transparentes, de manera de posibilitar al consumidor ver el contenido del envase, o bien pueden ser presentados en atractivos colores.

Higiene: Los envases plásticos permiten que el consumidor pueda observar el producto, su color, frescura, composición, sin necesidad de tocar el contenido, lo cual evita deteriorar la mercadería cumpliendo con las reglas de higiene y presentación.

Propiedades de barrera: Utilizando diferentes plásticos y aditivos se logran diferentes tipos y grados de barrera a distintos gases. También puede obtenerse un envase que sea absolutamente hermético, como el embalaje de la carne que, al adherirse a ésta, impide la entrada de oxígeno y humedad, lo cual evita su degradación y la preserva por más tiempo. Además, envases con propiedades de barrera a la luz, son utilizados para el embalaje de productos fotosensibles.

Estas propiedades han hecho de los plásticos, materiales extremadamente versátiles cuyas aplicaciones se han diversificado a lo largo de los años. En particular, la industria de envases y empaques en Argentina representa el 40% de la producción total de plásticos en la actualidad. Dentro de este segmento, el 47% es empleado para envases de alimentos. La Figura I.1.1 muestra las distintas finalidades que se les dan a los materiales plásticos en la Argentina (“Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires,” 2010).

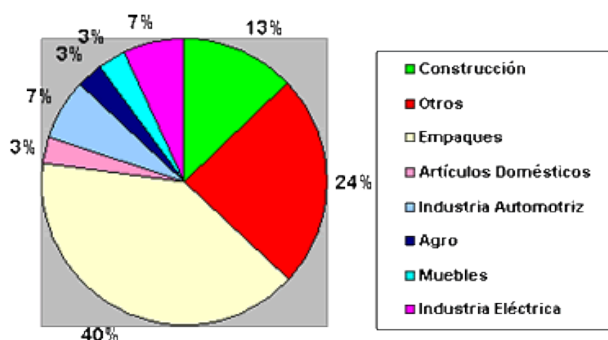


Figura I.1.1. Destino de la producción de plásticos en la Argentina

Estos componentes son utilizados en diversas combinaciones, para preparar materiales con propiedades que aseguren eficazmente la seguridad y la calidad de los productos alimenticios a través de la fabricación, el procesamiento, la manipulación, el almacenamiento y finalmente, el uso del consumidor.

Contaminación por acumulación de plásticos, un problema global de la actualidad

Los materiales plásticos se aplican en tres amplias categorías de embalaje:

- Embalaje primario, que normalmente está en contacto con los productos por lo que son transportados por los mismos consumidores.

- Embalaje secundario, que cubre el envase del alimento, como por ejemplo cajas, utilizados para transportar grandes cantidades de productos con embalajes primarios.

- Envasado terciario, que se refiere a los envases que se utiliza para ayudar al transporte de grandes cantidades de mercaderías, tales como “pallets” de madera y envoltorios de plástico.

Los materiales de embalaje secundario y terciario están presentes normalmente en grandes cantidades y sufren pocas alteraciones, por lo tanto son relativamente fáciles de recoger y clasificar por parte de los comerciantes mayoristas o minoristas para su reciclaje o reutilización. Los materiales de embalaje primario no sólo se encuentran más dispersos en los hogares, sino que también son en gran medida materiales mixtos que se encuentran contaminados y a menudo dañados, por lo que presentan mayores inconvenientes al momento de su reciclado o reutilización (Davis y J. H. Song, 2006). Ya que estos materiales convencionales no son biodegradables, su acumulación permanente produce serios efectos contaminantes en la actualidad.

En la Unión Europea, anualmente se generan más de 67 millones de toneladas de residuos de envases, que comprende alrededor de un tercio de todos los residuos sólidos urbanos (Klingbeil, 2000). Según datos del Container Recycling Institute (www.container-recycling.org), cada año se gastan 100 millones de barriles de petróleo en todo el planeta sólo para producir botellas plásticas. La Figura I.1.2 muestra la cantidad de botellas de poli(etilentereftalato) (PET) vendidas y desechadas en Estados Unidos en los últimos 20 años.

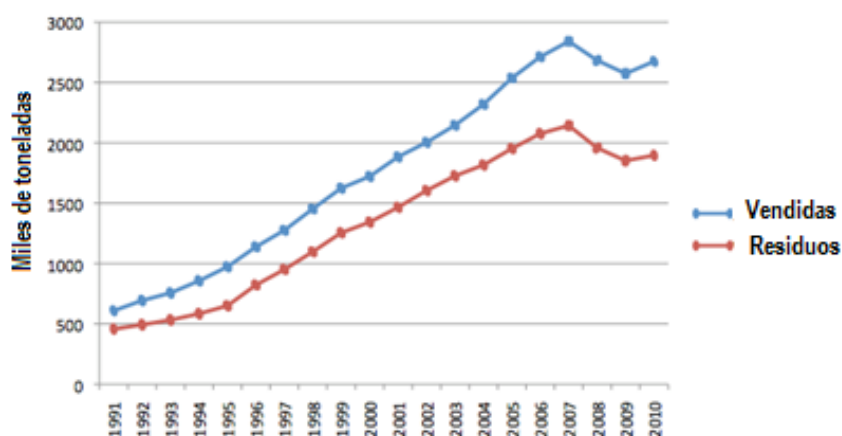


Figura I.1.2. Cantidad de botellas de PET vendidas y desechadas en Estados Unidos en los últimos 20 años

Si bien nuestro país está rezagado en la producción de plásticos, no lo está en lo que respecta al consumo. Según datos publicados por la Cámara Argentina de la Industria Plástica (CAIP) (www.caip.org.ar), la Argentina es el mayor consumidor de plásticos de América Latina y ocupa el lugar número 11 a escala mundial. En 2002 (último dato registrado en el anuario 2003 de la CAIP), el consumo anual de plásticos por habitante fue de 21,2 kilogramos.

Las posibles soluciones a este problema son: el reciclado, la acumulación en lugares adecuados o la incineración de los materiales plásticos (Condés, 2012). El reciclado, a pesar de ser la opción más adecuada

ambientalmente, plantea la reutilización de los materiales mediante métodos mecánicos, físicos o químicos. Esta estrategia tiene como contraparte la gran cantidad de trabajo y energía requerida, lo que hace que no sea la opción más rentable (Sinha Ray y Bousmina, 2005). La acumulación de dichos materiales en lugares determinados es una solución poco promisorio debido al gran crecimiento de las poblaciones y al gran consumo de plásticos alrededor de las mismas, mientras que, la incineración genera, al igual que la producción de plásticos, gran cantidad de gases que generan efecto invernadero produciendo mayor contaminación ambiental (F. Song et al., 2011).

Debido a esta situación, es que en la actualidad y desde hace unos años, la sociedad, la industria y la comunidad científica se encuentran propiciando investigaciones capaces de desarrollar materiales biodegradables que sean capaces de reemplazar en forma total o parcial a los plásticos convencionales para usos en recubrimientos, envoltorios (empaques) (Kolybaba et al., 2003; S. K. Park et al., 2000; Singh et al., 2007; Sorrentino et al., 2007; R.N Tharanathan, 2003; Villada et al., 2007), agricultura (para recubrimiento de granos y semillas) (Peltonen y Saarikko, 2007), medicina (Chien y Shah, 2012; Croisier y Jérôme, 2013; I.-Y. Kim et al., 2008; Santos et al., 2010) y otras áreas.

Polímeros biodegradables: concepto y clasificación

La “American Society of Testing and Materials” (ASTM) define un material biodegradable como “aquel capaz de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua, componentes inorgánicos o biomasa, mediante la acción enzimática de microorganismos que puede ser medida por tests estandarizados en un período específico, en condiciones normalizadas de depósito” (ASTM Standard D5988, 2012). Las velocidades de biodegradabilidad dependen enormemente del espesor y geometría de los artículos fabricados. Las velocidades altas de degradación se dan para *films* de bajo espesor, mientras que los artículos más gruesos: platos, bandejas,

etc., pueden necesitar mayores períodos de tiempo para degradarse biológicamente. Por otro lado, los plásticos biodegradables **compostables** son aquellos que pueden ser biodegradados y desintegrados durante un proceso de compostaje (típicamente alrededor de 12 semanas a temperaturas superiores a 50 °C). Este compost debe cumplir determinados criterios de calidad tales como: bajo contenido en metales pesados, baja ecotoxicidad y la no-generación de residuos visibles. Los polímeros hidro-biodegradables y foto-biodegradables son aquellos polímeros degradados por un proceso de dos etapas, que supone una etapa inicial de hidrólisis o fotodegradación, respectivamente, seguida por una segunda etapa que involucra una biodegradación.

De acuerdo a su origen, los polímeros biodegradables se pueden clasificar en las siguientes categorías (Weber, 2000):

- **Polímeros extraídos directamente de fuentes naturales.** Son polímeros naturales, fácilmente disponibles, extraídos de animales marinos o vegetales.
- **Polímeros producidos por síntesis química clásica a partir de monómeros biológicos renovables.** El mejor ejemplo es el poli (ácido láctico), un biopolímero obtenido a partir de monómeros de ácido láctico.
- **Polímeros producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente.** Los principales polímeros de este grupo son los polihidroxialcanoatos (PHA).
- **Polímeros sintéticos a partir de derivados del petróleo:** el ejemplo más claro es la poli (caprolactona) (PCL).
- **Otros polímeros degradables:** plásticos fotobiodegradables, poli (vinil alcohol) (PVA), poli (etilen vinil alcohol) (PEVA), etc.

Los polímeros categorizados en el primer grupo, presentan importantes ventajas frente a los restantes. Al ser extraídos de fuentes renovables (y por ende inagotables), presentan por lo general bajo costo, ya que además de ser muy abundantes pueden ser extraídos de desechos

generados por algunas industrias. Además minimizan la necesidad de producir polímeros sintéticos, reduciendo de esta forma la polución y el gasto generado en tales procesos, produciendo de esta forma efectos positivos sobre el medio ambiente.

Algunos materiales extraídos de estas fuentes son mostrados en la Tabla I.1.

Fuente Renovable	Polímero Natural	Origen
Fuente vegetal (lípidos, proteínas y polisacáridos)	Almidón, celulosa, alginato, agarosa, gluten, proteínas de soja y sorgo, ácidos grasos, cera de abeja	Papa, trigo, maíz, madera, soja, sorgo
Fuente marina	Quitina, quitosano	Caparazones de crustáceos
Fuente animal	Colágeno, albúmina, queratina	Proteínas presentes en tejidos animales
Fuente microbiana	Poli(hidroxialcanoatos), poli(ácido láctico)	Originados por reacciones naturales que ocurren en ciertas bacterias

Tabla I.1.1. Tipos de materiales extraídos de fuentes naturales.

Películas proteicas

En sus estados nativos, las proteínas generalmente existen en estado fibroso, siendo insolubles en agua y cuya función es estructural en los tejidos animales, o en estado globular, las cuales son solubles en agua o en soluciones acuosas ácidas, básicas o salinas y de variadas funciones en los sistemas vivos. Las proteínas fibrosas se encuentran completamente extendidas y asociadas estrechamente entre sí en estructuras paralelas, generalmente a través de enlaces puente hidrógeno para formar fibras, mientras que las proteínas globulares se pliegan en estructuras esféricas complejas manteniéndose unidas por una combinación de enlaces puente hidrógeno, iónicos, hidrófobos y covalente (disulfuro). Las propiedades

químicas y físicas de estas proteínas dependen de las cantidades relativas de residuos de aminoácidos presentes y de su posición a lo largo de la cadena proteica. Un gran número de proteínas de distinto origen han sido estudiadas por su capacidad de formar películas comestibles y/o biodegradables (Davis y J. H. Song, 2006; Kolybaba et al., 2003; Siracusa y Dalla, 2008; Fei Song et al., 2011; R.N Tharanathan, 2003). Las proteínas de origen animal más estudiadas son las caseínas, las proteínas de suero de leche, las albúminas de huevo, el colágeno, la gelatina y la queratina (Cao et al., 2007; Deiber et al., 2011; G. A. Denavi et al., 2009; Harper et al., 2013; Lacroix y Cooksey, 2005; Pei et al., 2013; L. Wang et al., 2010); mientras que las de origen vegetal son el gluten de trigo, las zeinas de maíz y las proteínas de soja y girasol (Arcan y Yemenicioğlu, 2011; Beck et al., 1996; S. Y. Cho et al., 2010; Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008; González et al., 2011; Irissin-Mangata et al., 2001; Ki Myong Kim et al., 2002; Koehler et al., 2010; Lens et al., 2003; Roy et al., 2000; Salgado et al., 2013, 2010).

Las películas proteicas, se forman generalmente a partir de la metodología de “*casting*” donde soluciones o dispersiones de proteínas son evaporadas formándose la película en el fondo del envase (Guerrero et al., 2010). El solvente por lo general se encuentra limitado a agua, etanol o mezclas de etanol-agua.

Generalmente, las proteínas deben ser desnaturalizadas por calor, ácidos, bases, y/o disolventes, con el fin de formar estructuras más extendidas, las cuales son requeridas para favorecer la formación de la película y facilitar su futura modificación. Una vez extendidas, las cadenas proteicas pueden asociarse a través de puentes hidrógeno, enlaces iónicos, hidrófobos y covalentes.

La distribución uniforme de grupos polares, hidrofóbicos, y/o grupos tiol a lo largo de las cadenas, aumentan la probabilidad de la existencia de las respectivas interacciones favoreciendo así las relaciones cadena-cadena. El aumento de este tipo de interacciones da como resultado películas que son más fuertes pero poco flexibles y poco permeables a los gases, vapores y líquidos (Kester y Fennema, 1986). Los polímeros que contienen grupos que

se pueden asociar a través de interacciones puente hidrógeno o iónicas, forman películas que son excelentes barreras al oxígeno, pero son susceptibles a la humedad (Bourtoom, 2008), es por esto que se espera que las películas proteicas sean buenas barreras de oxígeno a bajas humedades relativas.

Proteínas de soja

Las proteínas vegetales se encuentran disponibles en gran cantidad, siendo los residuos de la industria de soja, especialmente los generados en la producción de aceite, los de mayor volumen. La extracción con solvente es el proceso industrial actualmente utilizado para la obtención de aceite de soja, en el que la soja se divide en dos fracciones: un aceite crudo, que puede transformarse en aceite de cocina, y una fracción proteica (harina de soja), que se puede usar para producir lo que se denomina aislado y concentrado de proteína de soja. En particular, este aislado se utiliza ampliamente en la industria alimenticia en sopas, sustituto de la carne picada, bebidas en polvo, quesos, cremas no lácteas, postres congelados, panes y pasta. Además, se utiliza en preparados nutricionales especializados como fórmulas infantiles, módulos de proteína de origen vegetal y también como uno de los componentes de alimento para mascotas. A su vez, es empleado industrialmente para emulsionar y dar textura a diversos alimentos. Entre las aplicaciones específicas fuera del ámbito alimenticio, se pueden encontrar formando parte de adhesivos, asfaltos, resinas, materiales de limpieza, cosméticos, tintas, cueros sintéticos, pinturas, recubrimientos de papel, pesticidas y fungicidas, plásticos, poliésteres y fibras textiles.

El contenido de proteína presente en la soja (38-44%) es mucho más alto que el contenido de proteínas que se pueden encontrar en los cereales más utilizados (8-15%). La mayor parte de estas proteínas son solubles en agua por lo que se dice que las proteínas mayoritarias de la soja son globulinas en su naturaleza. De acuerdo a su velocidad de sedimentación, presentan cuatro fracciones: 2S (15%), 7S (34%), 11S (41,9%) y 15S (9,1%)

(Koshiyama, 1969). La fracción 11S está compuesta por sub-unidades de glicinina, mientras que la 15S está formada por polímeros de glicinina. La fracción 7S, más homogénea, está constituida mayoritariamente por la sub-unidad β -conglucina, pero también por γ -conglucina, lipoxigenasas, α -amilasas y hemaglutininas, éstas últimas denominadas lectinas. La fracción 2S está compuesta por los inhibidores de tripsina Bowman-Birk y Kunitz, citocromo C y α -conglucina (Puppo et al., 2007).

Películas de proteínas de soja

El uso de proteínas de soja en la formación de películas o recubrimientos se encuentra extensamente investigado (Denavi et al., 2009; González y Alvarez Igarzabal, 2013; González et al., 2011; Guerrero et al., 2011a, 2010; Tang et al., 2005) debido a que la utilización de proteína de soja ha mostrado ventajas frente a los materiales extraídos de otras fuentes renovables debido a su excelente habilidad para formar *films*, bajo costo (por la amplia producción que posee nuestra región y porque además, puede aislarse del desecho que producen las industrias aceiteras), buenas propiedades de barrera al oxígeno, lípidos y aromas bajo condiciones de baja o intermedia humedad ambiente (A. Gennadios et al., 1993). Además, este tipo de proteínas produce películas más suaves, transparentes y flexibles (S. Guilbert et al., 1995). También, es sabido que estas presentan, en general, mejores propiedades mecánicas que películas basadas en polisacáridos y lípidos (B. Cuq et al., 1995).

Por otro lado, las proteínas de soja contienen 58% de aminoácidos de características polares que le dan el carácter hidrofílico a la matriz (Choi et al., 2003). Esta propiedad le confiere fragilidad en estado húmedo, pobres propiedades de barrera al vapor de agua y propiedades mecánicas insuficientes para ciertas aplicaciones de las películas formadas en base a esta matriz. Estas desventajas en el material son las que imposibilita al mismo de ser utilizado en diversas aplicaciones como por ejemplo, como material de recubrimiento. Estos inconvenientes están siendo extensamente

estudiados por la comunidad científica. Diversas metodologías sintéticas, de preparación o modificación de estos recursos naturales son desarrolladas en estos tiempos, en busca de materiales con propiedades macroscópicas optimizadas capaces de reemplazar a los plásticos convencionales derivados del petróleo. Entre ellas, se pueden enumerar los tratamientos físicos, químicos o enzimáticos, como mezclas con aditivos hidrofóbicos (como lípidos neutros, ácidos grasos o ceras) (J. W. Rhim, 2004), mezclas con otros polímeros (Calabria et al., 2009; Guerrero et al., 2011b), modificación de las condiciones de secado (G. Denavi et al., 2009), tratamiento enzimático (Stuchell y Krochta., 1994; C. Tang et al., 2005), curado térmico (Ki Myong Kim et al., 2002), entrecruzamiento con radiación UV (A. Gennadios et al., 1998) y modificaciones químicas, como por ejemplo entrecruzamientos (González et al., 2011; S. K. Park et al., 2000; J W Rhim et al., 1998), injertos con monómeros vinílicos (El-Tahlawy et al., 2006; Harish Prashanth et al., 2005; Prashanth y R. N. Tharanathan, 2003), utilización de nanorefuerzos (Chen et al., 2012; Kristo y Biliaderis, 2007), etc.

En este trabajo de Tesis Doctoral, han sido aplicadas y desarrolladas algunas de estas estrategias para conseguir mejorar las propiedades finales de las películas.

1.2. Objetivo general:

Como objetivo general de esta Tesis, se planteará la utilización de diversas estrategias sintéticas de preparación de materiales biodegradables a partir de la modificación de materiales de origen natural. Se utilizarán metodologías de modificación química de los materiales de partida así como también la incorporación de componentes adicionales a los mismos.

Por otro lado, se ensayarán variadas aplicaciones para los materiales desarrollados en diversos campos, dependiendo de las propiedades finales de cada material.

1.3. Objetivos específicos:

Para cumplimentar con el objetivo general a alcanzar en esta Tesis, se seguirán los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de las condiciones experimentales para la preparación de materiales biodegradables a partir de distintas estrategias sintéticas o de modificación de los materiales de origen natural de partida. Las distintas estrategias a utilizar serán:
 - * Utilización de agentes entrecruzantes químicos y/o iónicos;
 - * Modificación por reacciones de injerto o “*grafting*” de polímeros sintéticos sobre la superficie de las películas biodegradables;
 - * Incorporación de otros materiales biodegradables para formar materiales compuestos;
 - * Utilización de nanorefuerzos biodegradables.

- Caracterización de los materiales desde el punto de vista químico (corroborando que la modificación se haya realizado y determinando

el grado de modificación logrado), físico, térmico y mecánico (determinando si hubo o no mejora u optimización de algunas propiedades como consecuencia de la modificación realizada).

- Determinación del tiempo de biodegradación por enterramiento en suelo de algunos de los materiales desarrollados.
- Ensayos de posibles aplicaciones de los materiales desarrollados, de acuerdo a sus propiedades finales. Los ensayos se desarrollarán en dos campos principalmente:
 - * como material de recubrimiento activo de alimentos;
 - * como sistema de liberación controlada de fármacos.

I.4. Bibliografía

- Arcan, I., Yemenicioğlu, A., 2011. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Research International* 44, 550–556.
- ASTM Standard D5988, 2012. ASTM Standard D5988 - 12 “Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in soil”. ASTM International. West Conshohocken, PA, 2012. DOI: 10.1520/D5988-12. www.astm.org.
- Beck, M.I., Tomka, I., Waysek, E., 1996. Physico-chemical characterization of zein as a film coating polymer: A direct comparison with ethyl cellulose. *International Journal of Pharmaceutics* 141, 137–150.
- Bourtoom, T., 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15.
- Calabria, L., Bandeira, A.L., Giacomelli, C., Schmidt, V., 2009. Morfologia e propriedades térmicas de blendas biodegradáveis a base de spi e pla, in: *Proceedings of 10º Congresso Brasileiro De Polímeros*, Foz Do Iguaçu, PR, Brazil.
- Cao, N., Fu, Y., He, J., 2007. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids* 21, 1153–1162.
- Chen, D., Lawton, D., Thompson, M.R., Liu, Q., 2012. Biocomposites reinforced with cellulose nanocrystals derived from potato peel waste. *Carbohydrate Polymers* 90, 709–716.
- Chien, K.B., Shah, R.N., 2012. Novel soy protein scaffolds for tissue regeneration: Material characterization and interaction with human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* 8, 694–703.
- Cho, S.Y., Lee, S.Y., Rhee, C., 2010. Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. *LWT - Food Science and Technology* 43, 1234–1239.
- Choi, S.G., Kim, K. M., Hanna, M. A., Weller, C. L., Kerr, W.L., 2003. Molecular dynamics of soy-protein isolate films plasticized by water and glycerol. *Journal of Food Science* 68, 2516–2522.
- Condés, M.C., 2012. Tesis de Doctorado: Películas compuestas y nanocompuestas, biodegradables y/o comestibles, en base a proteínas de amaranto y almidones de distinto origen botánico.

- Croisier, F., Jérôme, C., 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 49, 780–792.
- Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J., Guilbert, S.J., 1995. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science* 60, 1369–1374.
- Davis, G., Song, J.H., 2006. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Industrial Crops & Products* 23, 147–161.
- Deiber, J.A., Peirotti, M.B., Ottone, M.L., 2011. Rheological characterization of edible films made from collagen colloidal particle suspensions. *Food Hydrocolloids* 25, 1382–1392.
- Denavi, G., Tapia-Blácido, D. R., Añón, M. C., Sobral, P.J.A., Mauri, A. N., Menegalli, F.C., 2009. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering* 90, 341–349.
- Denavi, G.A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, Adriana N, Gómez-Guillén, M.C., 2009. Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids* 23, 2094–2101.
- El-Tahlawy, K.F., El-Rafie, S.M., Aly, A.S., 2006. Preparation and application of chitosan / poly (methacrylic acid) graft copolymer. *Carbohydrate Polymers* 66, 176–183.
- Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires <http://agro.faua.info/node/146>.
- Gennadios, A., Weller, C. L., Testin, R. F., 1993. Temperature effect on oxygen permeability of edible protein-based films. *Journal of Food Science* 58, 212–214.
- Gennadios, A., Rhim, J. W., Handa, A., Weller, C. L., Hanna., M.A., 1998. Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. *Journal of Food Science* 63, 225–228.
- Ghanbarzadeh, B., Oromiehi, A.R., 2008. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 209–215.
- González, A., Alvarez Igarzabal, C.I., 2013. Soy protein - poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids* 33, 289–296.

- González, A., Strumia, M.C., Alvarez Igarzabal, C.I., 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering* 106, 331–338.
- Guerrero, P., Hanani, Z.A.N., Kerry, J P, Caba, K. De, 2011a. Characterization of soy protein-based films prepared with acids and oils by compression. *Journal of Food Engineering* 107, 41–49.
- Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., De la Caba, K., 2010. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering* 100, 145–151.
- Guerrero, P., Stefani, P.M., Ruseckaite, R. A., De la Caba, K., 2011b. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering* 105, 65–72.
- Guilbert, S., Gontard, N, Cuq, B., 1995. Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science* 8, 339–346.
- Harish Prashanth, K.V., Lakshman, K., Shamala, T.R., Tharanathan, R. N., 2005. Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56, 115–120.
- Harper, B.A., Barbut, S., Lim, L.-T., Marcone, M.F., 2013. Characterization of “wet” alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. *Food Research International* 52, 452–459.
- Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B., Gontard, N., 2001. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal* 37, 1533–1541.
- Kester, J.J., Fennema, O.R., 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology* 40, 47–59.
- Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C., Cho, C.-S., 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 26, 1–21.
- Kim, K. M., W., Curtis L, H., Milford A, Gennadios, 2002. Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *Water* 145, 140–145.
- Klingbeil, M., 2000. Working document of biodegradable waste management. European Commission, Brussels.

- Koehler, P., Kieffer, R., Wieser, H., 2010. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten III. Studies on gluten films. *Journal of Cereal Science* 51, 140–145.
- Kolybaba, M., Tabil, L.G., Panigrahi, S., Crerar, W.J., Powell, T., Wang, B., Inn, Q., North, A., Dakota, N., 2003. Biodegradable polymers: past , present , and future, in: ASAE Meeting Presentation. 1–15.
- Koshiyama, I., 1969. Distribution of the 7S proteins in soybean globulins by gel filtration with Sephadex G-200. *Agricultural and Biological Chemistry* 33, 281–284.
- Kristo, E., Biliaderis, C.G., 2007. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers* 68, 146–158.
- Lacroix, M., Cooksey, K., 2005. Edible films and coatings from animal origin proteins. Academic Press, London.
- Lens, J.-P., De Graaf, L.A., Stevels, W.M., Dietz, C.H.J.T., Verhelst, K.C.S., Vereijken, J.M., Kolster, P., 2003. Influence of processing and storage conditions on the mechanical and barrier properties of films cast from aqueous wheat gluten dispersions. *Industrial Crops and Products* 17, 119–130.
- Puppo, M. C., Gualarte, M. A, Pérez, G., Ribotta, P. D., Añón, M. C., 2007. De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Capítulo: Soja. Hugo Baez Editor
- Park, S.K., Bae, D.H., Rhee, K.C., 2000. Soy protein biopolymers cross-linked with glutaraldehyde. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77, 879–884.
- Pei, Y., Yang, J., Liu, P., Xu, M., Zhang, X., Zhang, L., 2013. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. *Carbohydrate Polymers* 92, 1752–1760.
- Peltonen, J., Saarikko, E., 2007. Patente: Semilla recubierta y procedimiento para recubrir una semilla.
- Prashanth, K.V.H., Tharanathan, R N, 2003. Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers. *Carbohydrate Polymers* 54, 343–351.
- Rhim, J W, Gennadios, A, Weller, C L, Cezeirat, C., Hanna, M A, 1998. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Ind. Crops Prod.* 8, 195–203.

- Rhim, J. W., 2004. Increase in water vapor barrier properties of biopolymer-based edible films and coatings by compositing lipid materials. *Food Science Biotechnology* 13, 528–535.
- Roy, S., Gennadios, A., Weller, C. L., Testin, R.F., 2000. Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. *Industrial Crops and Products* 11, 43–50.
- Salgado, P.R., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Mauri, A. N., Montero, M.P., 2013. Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids* 33, 74–84.
- Salgado, P.R., Molina Ortiz, S.E., Petrucci, S., Mauri, A. N., 2010. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids* 24, 525–533.
- Santos, T.C., Marques, A.P., Höring, B., Martins, A.R., Tuzlakoglu, K., Castro, A. G., Van Griensven, M., Reis, R.L., 2010. In vivo short-term and long-term host reaction to starch-based scaffolds. *Acta Biomaterialia* 6, 4314–26.
- Singh, J., Kaur, L., McCarthy, O.J., 2007. Factors influencing the physico-chemical , morphological , thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications — A review. *Food Hydrocolloids* 21, 1–22.
- Sinha Ray, S., Bousmina, M., 2005. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites. *Greening the 21st Century Materials World. Progress in Materials Science*, 50, 962–1080.
- Siracusa, V., Dalla, M., 2008. Biodegradable polymers for food packaging : a review. *Trends in Food Science & Technology* 19, 634–643.
- Song, F., Tang, D., Wang, X., Wang, Y., 2011. Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules* 12, 3369–3380.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G., Vittoria, V., 2007. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology* 18, 84–89.
- Stuchell, Y.M., Krochta., J.M., 1994. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science* 59, 1332–1337.
- Tang, C., Jiang, Y., Wen, Q., Yang, X., 2005. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology* 120, 296–307.

- Tharanathan, R.N, 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology* 14, 71–78.
- Villada, H.S., Acosta, H.A., Velasco, R.J., 2007. Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios* 12, 5–13.
- Wang, L., Auty, M.A.E., Kerry, Joe P, 2010. Physical assessment of composite biodegradable films manufactured using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. *Journal of Food Engineering* 96, 199–207.
- Weber, C.J., 2000. Biobased packaging materials for the food industry. status and perspectives. Frederiksberg , Denmark.

Capítulo II

Sección experimental

Capítulo II

Sección experimental

En este capítulo se enumeran los materiales utilizados y se realiza una detallada descripción de los equipos y las metodologías experimentales utilizadas.



Figura II.1. *Fotografía de granos de soja y caparazones de langostinos. Fuentes de materia prima para la preparación de los materiales desarrollados en esta tesis.*

II.1. Materiales

- ***Materiales base***

Aislado de proteínas de soja (SPI) Supro 500E con un 90% de proteína en peso libre de grasa, seca fue proporcionado amablemente por The Solae Company, Argentina

Quitosano (Ch) de bajo peso molecular – Aldrich (EE.UU.)

Glicerol (Gli) Grado analítico – Taurus (Argentina)

- ***Materiales utilizados en modificaciones de los materiales base***

Genipina (Gen) 98%- Wako (Japón)

Poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) - Todo Droga (Argentina)

Metacrilato de metilo (MMA) - Merck (Alemania)

Almidón de maíz – Sigma (EE.UU.)

Poli (ácido láctico) (PLA) – Cargill (EEUU)

Natamicina - Proquiga SA (Argentina)

Timol – Anedra (Argentina)

β-Ciclodextrina (β-CD) – Roquette Freres (Francia)

- ***Fármacos empleados en ensayos de liberación controlada***

Clorhidrato de propranolol (PH) 99% - (Aldrich)

Timolol maleato 99% - Parafarm (India)

- ***Reactivos utilizados durante la caracterización de los materiales***

Cloruro de calcio - Cicarelli (Argentina)

Hidróxido de sodio – Cicarelli (Argentina)
2-iminotiolano - Sigma-Aldrich (EE.UU.)
Ditiotreitol - Sigma-Aldrich (EE.UU.)
Ácido 5,50-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) - Sigma-Aldrich (EE.UU.)
Ácido amino-acético 98% - Anedra (Argentina)
Ninhidrina – Anedra (Argentina)
Fosfato de sodio dibásico anhidro – Cicarelli (Argentina)
Fosfato sódico monobásico monohidrato – Cicarelli (Argentina)
Ácido acético glacial – Anedra (Argentina)
Bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (provistas por CEQUIMAP)
Moho: *Aspergillus sp.* (provisto por CEQUIMAP)
Levadura: *Saccharomyces cerevisiae* (provista por CEQUIMAP)
Agar moho y levadura y cerebro-corazón
Colesterol 99% - Sigma (EE.UU.)

- ***Solventes***

Alcohol etílico absoluto – Anedra (Argentina)
Acetona - Taurus (Argentina)
Cloroformo - Anedra (Argentina)
Hexano - Sintorgan (Argentina)
Agua milli-Q

II.2. Metodologías experimentales

II.2.1. Preparación de las películas

Preparación de las películas de SPI

Las películas se prepararon mediante la metodología de “*casting*”. Para ello, se formó una solución al 0,83% p/v de SPI en agua y se agitó por 20 min. Luego, se llevó a pH 9 con NaOH 0,5 M y se agregó el plastificante (glicerol) (Gli) en una proporción del 50 % de la masa de SPI. Esta solución filmogénica se agitó por 20 min más. Para lograr la desnaturalización de las proteínas, se procedió a calentar las soluciones a 70 °C por 1 hora y media con la ayuda de un baño de agua. Las soluciones se dejaron enfriar y se trasvasaron a cápsulas de Petri u otros envases de fondo plano de polipropileno (dependiendo de las dimensiones del *film* a preparar) y se llevaron a una estufa de secado a 55 °C por 12 h. Una vez enfriadas se procedió a extraer las películas de las cápsulas despegándolas suavemente mediante la ayuda de pinza y espátula. Una vez preparadas las películas, fueron almacenadas a 25 °C y 50 % HR para su posterior caracterización.

Preparación de las películas SPI-Gen

Las películas de SPI entrecruzadas con Gen, se prepararon utilizando la misma metodología que las películas de SPI con la excepción de que se agregó la cantidad de Gen necesaria (0; 0,1; 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 % de la masa de SPI) a partir de una solución acuosa 0,5 % p/v de la misma. La reacción ocurre con temperatura (70 °C) y se evidencia por la aparición de coloración azul-verdosa característica de los productos entrecruzados con Gen.

Preparación de las películas de Ch, Ch-Gen y Ch-Gen-PVP

Se prepararon películas de quitosano (Ch) entrecruzadas con diferentes proporciones de genipina (Gen). Las proporciones de Gen utilizadas fueron 0,10; 1,00 y 3,25% m/m respecto de Ch, mientras que se utilizó una proporción constante de 18% de poli(vinil pirrolidona) (PVP) m/m. Todas las películas de Ch se prepararon por el método de “*casting*” para lo cual se añadió alrededor de 1 g de Ch a 45 ml de ácido acético (1,5%, v/v) y se homogeneizó durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron los correspondientes volúmenes de una solución acuosa de Gen (0,5%, p/v) a las soluciones de Ch para lograr las proporciones de Gen antes mencionadas. En este caso la reacción ocurre a temperatura ambiente por lo que después de 2 h de agitación las soluciones comenzaron a tornarse de color azulado siendo la solución cada vez más viscosa. Las soluciones fueron volcadas en placas plásticas de Petri de 9 cm de diámetro y secadas hasta peso constante a temperatura ambiente. Después de 24 h, las películas de Ch entrecruzadas adquirieron la coloración azul oscura definitiva. Las películas se retiraron cuidadosamente de las cápsulas de Petri con la ayuda de una pinza.

Las películas entrecruzadas con Gen y PVP se prepararon siguiendo la metodología antes descrita, realizando la adición de 0,18 g de PVP después del agregado de la Gen.

Una vez preparadas todas las películas, fueron almacenadas a 25 °C y 50% HR para su posterior caracterización.

Preparación de las películas SPI-g-PMMA

La reacción de injerto de PMMA sobre SPI fue ensayada siguiendo diversas metodologías sintéticas. En una primera etapa, se intentó llevar a cabo la reacción sobre películas de SPI para lo cual, se procedió previamente a la formación de las mismas siguiendo la metodología de “*casting*”. Para realizar el injerto de las películas se procedió a sumergir la película en agua a 70 °C en un sistema saturado de nitrógeno (para eliminar el oxígeno) en

presencia de bisulfito de sodio y urea (agentes desplejantes de las proteínas). Luego, se le agregó la solución acuosa conteniendo el iniciador radicalario (APS) y el MMA lentamente y se dejó reaccionar por 4 horas.

Otra metodología utilizada consistió en realizar el mismo procedimiento con una película de SPI entrecruzada con 10% de Gen, ya que esta es una película más resistente y menos soluble en agua (Ver sección III.2.3).

Otra variante realizada, consistió en invertir la metodología sintética, realizando en una primera etapa los injertos de PMMA sobre la proteína de soja en polvo para luego formar la película. Para esto, se preparó 80 mL de una dispersión acuosa formada por 4 g de SPI y se adicionaron 31,2 g de urea y 0,5 g de bisulfito de sodio (agentes que favorecen el desplegamiento de las cadenas proteicas). Luego, el oxígeno del sistema fue evacuado mediante una corriente de nitrógeno y se agregó la solución acuosa con 0,75 g del iniciador radicalario (APS) y 7,5 mL del monómero (MMA) en forma de goteo muy lento dejando reaccionar por 4 h a 70 °C. Estas condiciones experimentales han sido previamente utilizadas por otros autores (Lu et al., 2010). Una vez que la reacción transcurrió por el tiempo especificado, se precipitó el producto con 100 mL de etanol por 24 h, lavándolo sucesivamente con etanol y acetona para eliminar el PMMA no unido, hasta verificar gravimétricamente la ausencia de PMMA en el solvente utilizado en el lavado. Luego, el producto obtenido fue secado y molido finamente para luego ser caracterizado mediante RMN-¹³C y FT-IR.

Una vez caracterizado el producto obtenido, se procedió a determinar el grado de *grafting* logrado (%G) y la eficiencia de la reacción de injerto (%E). El %G indica la cantidad de polímero injertado en la estructura principal (SPI), y %E indica la eficiencia de conversión del monómero vinílico inicial en el polímero injertado. Estos valores fueron calculados en base al incremento en la masa de la proteína después de la reacción de injerto como lo indican las siguientes fórmulas:

$$\%G = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\%E = \frac{W1-W0}{W2} \times 100 \quad (2)$$

donde W1, W0 y W2 representan la masa de SPI injertada, la masa de SPI original y la masa de monómero usada, respectivamente.

Una vez realizada la síntesis y la caracterización de este material, se procedió a la preparación de las películas siguiendo la metodología de **compresión con temperatura**.

Se utilizó una prensa hidráulica marca CARVER (Planta Piloto de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Sur - PLAPIQUI-CONICET-UNS-). Las condiciones experimentales que brindaron los mejores resultados fueron: temperatura inicial de 150 °C y presión de 150 Kg/cm² por 5 min para luego dejar enfriar hasta 80 °C manteniendo la presión. Una vez preparadas las películas, fueron almacenadas a 25 °C y 50% HR para su posterior caracterización. La Figura II.2.1.1 muestra la prensa utilizada.



Figura II.2.1.1. Prensa utilizada para la preparación de las películas SPI-g-PMMA

Preparación de las películas SPI-NCA

Como paso previo a la preparación de las películas SPI-NCA, se procedió a la síntesis de los NCA mediante una hidrólisis ácida de almidón

nativo de maíz. Para esto, se realizó una dispersión acuosa de 22 g de almidón en 150 mL de una solución 3,16 M de H₂SO₄. La reacción transcurrió durante 5 días a 40 °C y 100 rpm. Para la purificación de los nanocristales, se procedió al lavado exhaustivo de los mismos con 5 porciones de 500 mL de agua, separándolos mediante filtraciones, hasta obtener pH neutro. Luego, se los sonicó en 500 mL de agua y se los almacenó en heladera con unas gotas de cloroformo para evitar el crecimiento bacteriano. Para determinar la cantidad de NCA por volumen de agua se procedió a agitar enérgicamente la dispersión y realizar tres extracciones de 1 mL. Estos tres volúmenes fueron secados en estufa y determinada la masa de NCA obtenida en cada caso. La cantidad de NCA por mililitro de dispersión fue calculada como un promedio de las tres masas determinadas.

Una vez obtenida la dispersión acuosa de NCA, se procedió a la preparación de las películas SPI-NCA. Estas fueron obtenidas por el método de “*casting*”, para lo cual se dispersó 0,25 g de SPI en 30 mL de agua y se agregó 100 µL de Gli (plastificante) (50 % m/m respecto de SPI). Esta dispersión se agitó por 30 min y se agregó la cantidad necesaria de la dispersión de NCA en agua. Se prepararon películas con 0; 2; 5; 10; 20 y 40 % de NCA (masa de NCA con respecto a la masa de SPI). Antes de realizar el agregado, la dispersión de NCA se agitó por 30 min y se sonicó por 30 min más. Una vez agregado el nanorefuerzo, se agitó la dispersión por 30 min para luego volcarla en cápsulas plásticas de Petri de 9 cm de diámetro y puestas a secar en estufa a 50 °C por 8 h. Una vez secas, las películas fueron retiradas del fondo de las cápsulas y almacenadas a 25 °C y 50% HR para su posterior caracterización.

Preparación de las películas SPI-PLA

Las películas SPI-PLA fueron preparadas en forma de bicapa, siendo una de ellas la correspondiente a SPI plastificada con Gli y la otra correspondiente a PLA. Se utilizaron diferentes proporciones de PLA para dichas películas de dos componentes. Las mismas se prepararon utilizando

las siguientes proporciones: SPI 100, SPI/PLA 60/40 y 50/50. La película SPI 100 y las capas proteicas de SPI/PLA 60/40 y 50/50 se prepararon por el método de "casting" siguiendo la metodología antes descrita, con la excepción de que las soluciones de SPI fueron preparadas utilizando 0,6 g (0,75%) de SPI para las películas bicapa. A continuación del secado de la capa de SPI, la capa de PLA fue preparada por encima de la misma. Para esto, se disolvieron 0,4 o 0,6 g de PLA (para las películas 60/40 y 50/50, respectivamente) en 50 mL de cloroformo. La solución fue vertida en el recipiente que contenía la capa de SPI (en este caso se utilizó un recipiente plástico cuadrado de 14 cm de lado) y finalmente se secó durante 4 h a temperatura ambiente. Una vez secas, las películas fueron retiradas de los recipientes y almacenadas a 25 °C y 50 %HR para su posterior caracterización.

Incorporación de fármacos o agentes activos a las películas

Las fármacos incorporados a las diferentes películas en esta tesis fueron: timolol maleato (principio activo utilizado para ensayar su liberación desde las películas SPI-Gen) (Sección VIII.1), clorhidrato de propranolol (fármaco utilizado para ensayar su liberación desde las películas Ch-Gen y Ch-Gen-PVP) (Sección IV.2.4), natamicina y timol (drogas utilizadas para preparar recubrimientos activos de alimentos con las películas SPI-PLA) (Sección VIII.3) y β -ciclodextrina (utilizada para la preparación de recubrimientos activos secuestrantes de colesterol) (Sección VIII.2). Debido a que todas ellas son (en mayor o menor medida) solubles en agua, es que en todos los casos se decidió agregarlas directamente en estado sólido a las soluciones filmogénicas de SPI o Ch según correspondía. Los agregados de los mismos, fueron realizados posterior a cualquier incremento de temperatura de las soluciones con la precaución de que las mismas hayan alcanzado temperatura ambiente. Además, en todos los casos se tuvo la precaución, de que la temperatura de secado de las películas no influya en la estabilidad o actividad de los fármacos.

Preparación de las películas recubiertas con PLA

Algunas de las películas SPI-Gen preparadas que contenían timolol maleato fueron recubiertas con PLA con el fin de disminuir la tasa de liberación del principio activo en sistemas acuosos. Para esto, se procedió a cortar las películas en círculos de 4 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocado y a sumergirlas por 3 min en una solución de 0,8 g de PLA disuelto en 150 mL de cloroformo. Una vez transcurrido el tiempo se las dejó secar a temperatura ambiente. Luego se las secó en una cámara de vacío por 6 h con el fin de eliminar todo el cloroformo.

II.2.2. Caracterización física de las películas

Espesor de las películas

El espesor de las películas fue determinado como el promedio de 10 mediciones para cada muestra utilizando un micrómetro de mano (Schwyz modelo ESP1-0001PLA, Schwyz, Suiza). El espesor medio de cada película se utilizó para la evaluación de la opacidad, la permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas. La Figura II.2.2.1 muestra el micrómetro utilizado.



Figura II.2.2.1. Fotografía del micrómetro utilizado para la determinación de los espesores de las películas

Opacidad de las películas

La opacidad (O) permite evaluar el grado de transparencia de las películas. Para su determinación se realizó la curva espectral de cada película cortada (2,5 cm de largo por 1 cm de ancho) ubicada dentro de una cubeta de cuarzo. Se utilizó aire como referencia. El valor de opacidad se determinó calculando el área bajo la curva integrando el espectro de absorción obtenido en el rango visible (400-800 nm) (M). Al valor de las áreas se las normalizó dividiéndolas por el espesor de cada película. Luego, la opacidad se calculó según la ecuación (1):

$$O = \frac{A}{e} \left(\frac{UA \times nm}{\mu m} \right) \quad (1)$$

donde A es el área bajo la curva espectral y e es el espesor de la película.

EL valor de opacidad fue determinado por triplicado para todas las películas.

Contenido de humedad y materia soluble total

El contenido de humedad (MC) se determinó de acuerdo con un método descrito en literatura (Rhim et al., 1998). Porciones de las diferentes películas fueron pesadas (W_0) en placas de vidrio, secadas en un horno a 110 °C durante 24 h y pesadas nuevamente (W_i). El contenido de humedad de cada película se determinó por cuadruplicado según la ecuación (2).

$$MC = (W_0 - W_i) / W_0 \times 100 \quad (2)$$

La cantidad de materia soluble total (TSM) se determinó de acuerdo con un método descrito en literatura (Rhim et al., 1998). Cuatro muestras pesadas de cada película fueron sumergidas en vasos de precipitados conteniendo 30 mL de agua destilada. Los vasos de precipitados fueron

almacenados en una cámara a 25 ° C durante 24 h con agitación ocasional. La materia insoluble fue separada a continuación, secada en un horno a 110 °C durante 24 h y pesada (W_f). Los valores de TSM fueron determinados por cuadruplicado por medio de la ecuación (3). Las masas de materia seca inicial necesarias para los cálculos de TSM se obtuvieron a partir de las mediciones de MC para un trozo de película de igual masa (W_i). La razón para el uso de diferentes trozos de película para medir la materia seca inicial y soluble en cada película es evitar la formación de entrecruzamientos térmicos que pueden ser producidos por el calentamiento de las muestras en el paso de secado previo a la inmersión en agua ya que este efecto produciría una disminución de TSM de las películas a evaluar (Gennadios et al., 1996).

$$\text{TSM} = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100 \quad (3)$$

Índice de hinchamiento

El índice de hinchamiento (S) describe la capacidad de absorción de agua de las películas. Esta propiedad fue determinada mediante la inmersión de masas conocidas (aproximadamente 0,1 g) de cada película en 30 mL de agua destilada a temperatura ambiente durante 30 min. Se midió la variación de peso entre el estado hinchado y el estado seco. Las películas se secaron superficialmente con papel absorbente para eliminar el exceso de agua antes de cada pesada. Los valores de S fueron determinados por triplicado según la ecuación (4), donde m_h y m_i representan las masas del estado hinchado e inicial, respectivamente.

$$S = [(m_h - m_i) / m_i] \times 100 \quad (4)$$

Permeabilidad al vapor de agua

Se determinó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de cada película siguiendo el método del desecante descrito por la norma ASTM

E96-10 (ASTM Standard (E96-10), 2010). Para ello, se colocaron las películas en una cámara de humedad a 25 °C y 75 %HR por un período de 2 días hasta alcanzar el equilibrio. Luego, se determinó el espesor de las mismas. Posteriormente, estas películas fueron fijadas sobre cápsulas de aluminio de dimensiones fijadas por la norma, las cuales contenían CaCl₂ anhidro (secado a 180 °C por 24 h) en su interior y selladas con grasa siliconada. El desecante quedó separado del ambiente por la película fijada a 0,5 cm del mismo. Estas cápsulas fueron pesadas e introducidas en una cámara de humedad controlada a las mismas condiciones en las cuales fueron acondicionadas previamente las películas. Se registró la variación de la masa del sistema completo en función del tiempo cada una hora hasta alcanzar 9 mediciones. Estos valores se representaron como la variación de la masa en función del tiempo obteniéndose un gráfico de características lineales del cual se extrajo el valor de su pendiente. La transmisión del vapor de agua (WVT) se calculó según la ecuación (5):

$$WVT = \frac{f}{A} \quad (5)$$

donde f es el valor de la pendiente y A es el valor del área de la superficie expuesta de la película.

Luego se calcula la permeabilidad según la ecuación (6):

$$WVP = \frac{WVT \times e}{S \times (RH1 - RH2) \times 3600} \quad (6)$$

donde e es el espesor de la película, S es el valor de la presión de vapor del agua a 25 °C y $(RH1 - RH2)$ es la diferencia entre las humedades relativas entre el exterior e interior de la cápsula.

La Figura II.2.2.2 muestra las cápsulas utilizadas. Los valores de WVP fueron determinados por triplicado para todas las películas.



Figura II.2.2.2. Fotografía de las cápsulas utilizadas en la determinación de WVP.

Determinación del ángulo de contacto

El grado de hidrofiliicidad / hidrofobicidad de las superficies de las películas fue estimado mediante la determinación del ángulo de contacto de las mismas con una gota de agua.

De forma general, se define el ángulo de contacto como el ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido. La mojabilidad es la capacidad de los sólidos para formar interfases con los líquidos. La mojabilidad de un determinado sólido por un líquido viene determinada por el ángulo de contacto θ , como se muestra en la Figura II.2.2.3. La forma que adopta la gota es el resultado del balance entre las fuerzas de la superficie y de la interfase, que tienden a minimizar la energía superficial libre del sistema. El ángulo de contacto está relacionado con las tres tensiones γ_{SG} , γ_{SL} , γ_{LG} de las interfases sólido/gas, sólido/líquido y líquido/gas, respectivamente, a través de la ecuación de Young (7):

$$\gamma_{LG} \times \cos \theta = \gamma_{SG} - \gamma_{SL} \quad (7)$$

Cuando se utiliza agua como líquido para la determinación, se establece que cuando $\theta < 90^\circ$ la superficie del sólido es hidrofílica por lo que se dice que el líquido moja la superficie del sólido, mientras que cuando $\theta > 90^\circ$, la superficie es hidrofóbica, es decir que el líquido no moja la superficie del sólido (García-Cebadera Rodríguez, 2010).

En esta tesis, las mediciones de ángulo de contacto realizadas a las diferentes películas se llevaron a cabo utilizando un goniómetro fabricado durante el desarrollo de la Tesis Doctoral del Dr. Marcelo Romero (Romero, 2012). Los ángulos de contacto se midieron cuidadosamente como un promedio entre los ángulos del lado izquierdo y derecho de la gota. El líquido utilizado fue agua destilada y los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

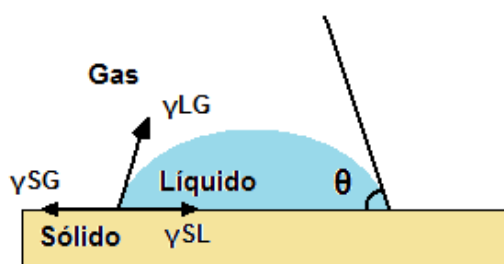


Figura II.2.2.3. Ángulo de contacto formado entre una gota de un líquido con la superficie de un sólido.

II.2.3. Caracterización térmica y mecánica de las películas

Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de las películas fueron determinadas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétricos (TGA). Antes de los ensayos, las muestras fueron secadas en una cámara de vacío. Los análisis de DSC de las películas se realizaron en un DSC Modulada 2920 (TA Instruments). Trozos de aproximadamente 2,5 mg de cada película fueron introducidos y sellados en recipientes de aluminio. Los mismos fueron calentados de 25 a 100 °C a una velocidad de

10 °C / min para luego ser enfriados hasta 25 °C antes de un segundo calentamiento hasta 200 °C a una velocidad de 10 °C/ min. Se mantuvo un flujo de nitrógeno constante de 60 mL / min durante todo el ensayo con el fin de preservar las muestras de procesos termo-oxidativos. Parámetros como temperaturas de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m) y entalpía de fusión (H_f) fueron determinados a partir del segundo calentamiento. Los TGA fueron realizados en un analizador termogravimétrico Hi-Res Modulada 2950 (TA Instruments) utilizando el mismo programa de temperatura que en el caso de los estudios de DSC, determinando las variaciones en la masa de las películas con la temperatura.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas fueron determinadas mediante ensayos de tracción. Para ello, las diferentes películas recortadas en rectángulos de 25 x 100 mm fueron sometidas a deformaciones controladas obteniendo el registro de las curvas tensión-deformación obtenidas para cada muestra. A partir de estas curvas, se determinaron la resistencia a la tracción (TS) (tensión máxima soportada por el material), la elongación a la rotura (EB) (elongación máxima soportada por el material previo a la rotura del mismo) y el módulo de Young (E) (resistencia inicial a la deformación) según una norma ASTM ([ASTM Standard \(D882-02\), 2002](#)). Estos ensayos fueron realizados en un instrumento de testeo universal Instron (modelo 3342, Norwood, MA, EE.UU.) equipado con una celda de 500 N de capacidad. Se utilizó una separación inicial de 100 mm y una velocidad de 1 mm/s. Estos ensayos se realizaron por cuadruplicado. La Figura II.2.3.1 muestra el instrumento utilizado y la Figura II.2.3.2 muestra una curva tensión-deformación clásica de películas delgadas donde se muestran los parámetros extraídos.



Figura II.2.3.1. Fotografía del instrumento de testeo universal utilizado.

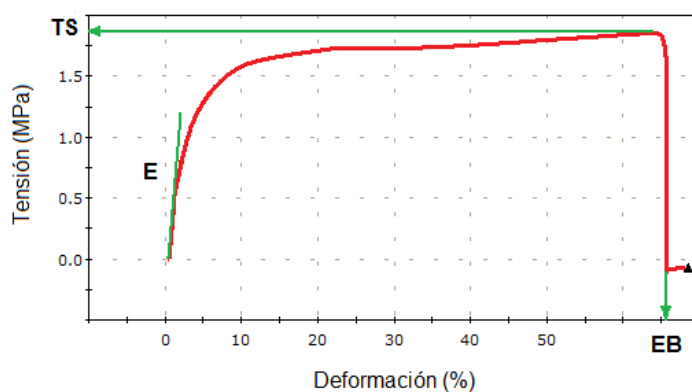


Figura II.2.3.2. Curva tensión-deformación clásica de películas delgadas y parámetros que se extraen de ella: TS (resistencia a la tracción), EB (elongación a la rotura) y E (módulo de Young).

II.2.4. Caracterización química de las películas

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (RMN - ^{13}C)

Para confirmar la naturaleza química de los componentes de las diferentes películas y evidenciar la efectividad de las reacciones producidas,

se utilizó un FT-IR Nicolet 5-SXC en los modos de transmitancia, reflectancia difusa y reflectancia total atenuada (ATR). Las muestras fueron soportadas directamente en un portamuestra para el caso de las películas o en pastillas de KBr para el caso de las muestras en polvo. En el caso de ATR (metodología que nos permite determinar el espectro IR de la superficie de las películas), se utilizó un cristal de ZnSe con un ángulo de incidencia de 45°. Diferentes áreas limpias de cada muestra fueron analizadas en cada caso. Todos los espectros representan un promedio de 42 scans registrados con una resolución de 4 cm⁻¹ en un rango de 4000 a 400 cm⁻¹.

Los espectros RMN - ¹³C fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Avance II 400 Ultra Shield 400,16 MHz, equipado con sonda tricanal de detección inversa (BBI), y fueron descriptos en partes por millón (ppm) relativos a tetrametilsilano usando CDCl₃ y D₂O como solventes.

Cuantificación de grupos amino mediante el test de la ninhidrina

Los ensayos basados en la ninhidrina se encuentran entre los más ampliamente utilizados para la determinación cuantitativa del contenido de aminoácidos de las proteínas. La ninhidrina reacciona con aminos primarios para formar un complejo coloreado conocido como Púrpura de Ruhemann. Esta reacción también se puede utilizar para medir la cantidad de grupos amino primarios libres unidos a un soporte polimérico insoluble (Lee et al., 2003). Para realizar esta determinación se preparó una solución de ninhidrina en etanol 0,02 M y se añadió 1 mL de la misma a un tubo de vidrio con 3 mL de agua y 0,002 g de cada película. Las mezclas se calentaron en agua hirviendo durante 10 minutos para permitir que la reacción se lleve a cabo. La absorbancia de cada solución fue determinada en un espectrofotómetro UV (Shimadzu AEU-210) a 570 nm. Una curva de calibración fue realizada previamente utilizando cantidades conocidas de glicina. La Figura II.2.4.1 muestra la reacción de formación del complejo coloreado a partir de ninhidrina y grupos amino presentes en proteínas.

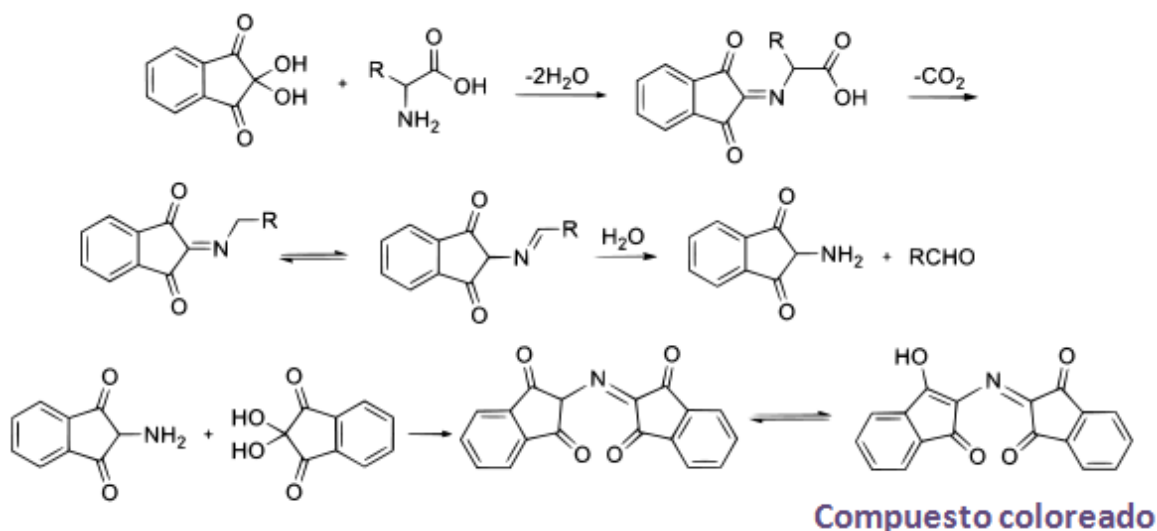


Figura II.2.4.1. Reacción esquemática entre ninhidrina y grupos amino presentes en soportes sólidos (R = matriz proteica).

Cuantificación de grupos amino mediante la utilización de los reactivos de Ellman y Taut

La cuantificación indirecta de los grupos amino libres para la determinación del grado de entrecruzamiento de las películas SPI-Gen se realizó mediante una metodología que utiliza los reactivos de Ellman y Taut para formar un compuesto coloreado el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente (Tyllianakis et al., 1993). Para esto, iguales masas (aproximadamente 0,1 g) de diferentes películas se lavan con agua destilada y se hacen reaccionar con 4 mL de una solución 40 mM de 2-iminotiolano (reactivo de Taut). Luego de varios lavados con agua destilada, las películas se hacen reaccionar con 4 mL de solución 0,5 mM de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman) con el objeto de cuantificar los grupos sulfhidrilo generados a partir de la reacción de grupos amino con el reactivo de Taut. La cuantificación se lleva a cabo espectrofotométricamente a través del coeficiente de extinción molar del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) a 412 nm ($14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), producido en la solución por el clivaje del DTNB. El blanco de la determinación se tomó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente sin el agregado de la

solución de Taut. La Figura II.2.4.2 muestra las reacciones que se desarrollan mediante esta determinación indirecta.

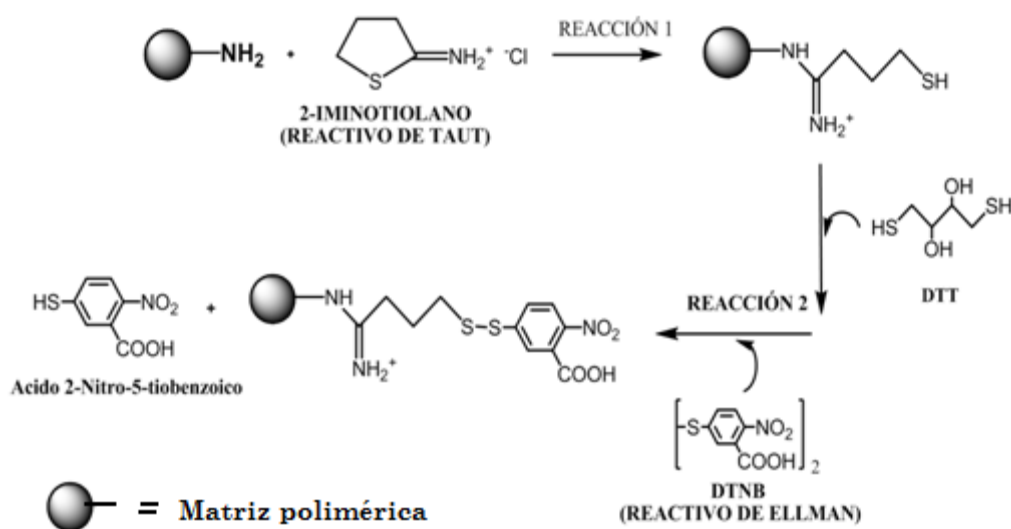


Figura II.2.4.2. Reacciones que se desarrollan durante la determinación indirecta de los grupos amino libre de la matriz proteica utilizando los reactivos de Ellman y Taut..

II.2.5. Caracterización morfológica y estructural de las películas

Microscopías

Las diferentes cámaras y microscopios que se han utilizado en este trabajo de tesis para estudiar las características superficiales de las películas son:

- Cámara digital Cannon 14 Megapíxeles.
- Microscopio óptico Zenok (Máxima magnificación: 200x).
- Microscopio óptico Shimadzu (Máxima magnificación: 1000x).

- Microscopio confocal Olympus Lext 3D Measuring Laser Microscope. Laser de 405 nm y 10 nm de resolución en Z (LAMARX-FAMAF).
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) LEO 1450VP en condiciones de bajo vacío (LABMEM, UNSL).
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) FE-SEM Sigma (LAMARX-FAMAF).

Difractometría de rayos X

Un espectro de difracción de rayos X de un material semicristalino, se caracteriza por la presencia de picos de absorción y una zona de contribución amorfa. Cualitativamente, se puede observar que mientras mayor es el área de los picos de absorción con respecto al área total del difractograma, mayor es el grado de cristalinidad de la muestra. Esta técnica permite obtener información sobre la estructura del material analizado ya que cada diagrama de difracción es característico de cada material cristalino o semi cristalino.

En este trabajo de tesis se utilizó un difractómetro Philips PW 1710/01 con radiación de Cu Kalfa (1,54 Å) (FAMAF-UNC).

Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica que permite determinar el tamaño de partículas dispuestas en una suspensión por incidencia de una luz laser, basándose en el fundamento de que la intensidad de la luz dispersada por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas. Los datos de dispersión obtenidos son analizados mediante un software, obteniendo finalmente la distribución de tamaños de las partículas. En nuestro caso se utilizó un equipo Beckman Coulter Dels Nano C (Departamento de Físico-química, FCQ-UNC).

II.2.6. Ensayos de biodegradación

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo mediante la utilización de un método descrito en literatura (Martucci and Ruseckaite, 2009). El tiempo de biodegradación de las películas fue determinado mediante el enterramiento en suelo de acuerdo a la variación de la masa de las mismas en función del tiempo. Para esto, diferentes películas de igual masa (aproximadamente 0,5 g) fueron enterradas en macetas conteniendo un suelo caracterizado (tipo mantillo) por un período determinado según una estimación previa.

Las características físico-químicas y microbiológicas del suelo utilizado analizado en los laboratorios de Suelo (Facultad de Agronomía-UNC) fueron las siguientes:

Materia orgánica	17,06 %
Carbono orgánico	9,90 %
Nitrógeno total	0,823 %
Relación C:N	12,0
N-NO ₃ ⁻	87,5 ppm
Fósforo	40,0 ppm
pH actual	6,60
Cationes intercambiables	
Ca ²⁺	40,0 meq/100g
Mg ²⁺	4,50 meq/100g
Na ⁺	0,13 meq/100g
K ⁺	1,76 meq/100g
Porcentaje de sodio intercambiable	0,3
Extracto se saturación Cond. Eléctr.	1,8 dS/m
Análisis microbiológico	
Microorganismos nitrificadores	360 bact/g
Microorganismos fijadores de N ₂	14 . 10 ⁵ bact/g
Microorganismos amonificadores	36 . 10 ⁶ bact/g
Producción de CO ₂	2,88 mg CO ₂ /g/8dias

Tabla II.2.6.1. Características físico-químicas y microbiológicas del suelo utilizado para la determinación de tiempo de biodegradación.

Las muestras fueron cortadas previamente en pedazos rectangulares (2 cm de ancho por 3 cm de largo), secadas en un horno a 105 °C durante 12 h y pesadas (W_0). Las películas secas fueron recubiertas por una malla metálica (para permitir el acceso de los microorganismos y la humedad y para facilitar la extracción de las muestras degradadas) y enterradas en cajas de plástico (100x20x15 cm³) a una profundidad de 8 cm de la superficie del suelo con el fin de garantizar condiciones aeróbicas de degradación. El ensayo se realizó a temperatura y humedad de suelo controlada mediante la adición de agua periódicamente en forma manual. Las fluctuaciones de humedad del suelo fueron determinadas gravimétricamente utilizando el método de secado en estufa. Las películas fueron extraídas de la tierra a diferentes tiempos y limpiadas cuidadosamente con la ayuda de un pincel. Posteriormente, fueron secadas en un horno a 105 °C durante 12 h y pesadas (W_t) nuevamente con el fin de determinar la pérdida de peso promedio (%WL). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La ecuación (8) muestra el cálculo para la determinación de %WL.

$$\%WL = [(W_0 - W_t) / W_0] \times 100 \quad (8)$$

En la Figura II.2.6.1 se retrata el momento del enterramiento de las muestras.

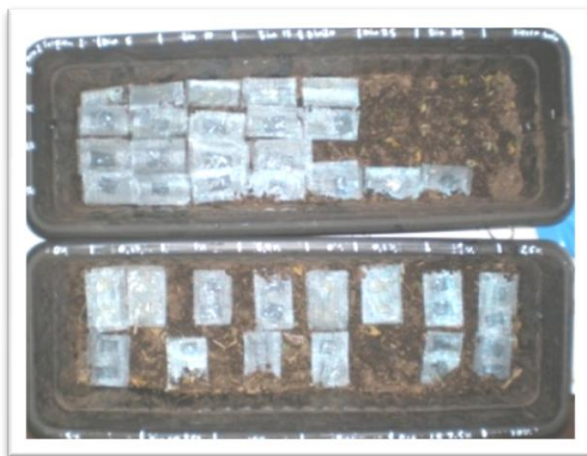


Figura II.2.6.1. Fotografía de las diferentes películas previo a ser enterradas para determinar el tiempo de degradación en suelo.

II.2.7. Metodologías utilizadas en los ensayos de aplicabilidad de las películas

Ensayos de liberación de fármacos en sistemas acuosos

Para realizar los ensayos de liberación de drogas se utilizó un equipo como el que se muestra en la Figura II.2.7.1, el cual consiste de vasos de vidrio que contienen 50 mL de buffer fosfato de pH 7 (para el caso de las liberaciones de clorhidrato de propranolol) o de solución salina de Ringer (1 L de agua destilada; 8,6 g NaCl; 0,3 g de KCl y 0,3 g de CaCl₂) (para el caso de las liberaciones de timolol maleato). Las películas cargadas con la droga a liberar se colocaron en tubos de vidrio abierto en los dos extremos. En uno de ellos se colocó una membrana de diálisis y se sumergió parcialmente en la solución con agitación constante. Se tomaron muestras de 1 mL de la solución a diferentes tiempos, manteniendo siempre el volumen constante, es decir, que luego de cada extracción se hace un agregado de solución de Ringer de igual volumen.

Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría UV-Visible midiendo las absorbancias a 289 nm para clorhidrato de propranolol y a 295 nm para timolol maleato, siendo estas longitudes de onda de mayor absorbancia determinadas con anterioridad mediante las respectivas curvas espectrales. La cuantificación de las diferentes drogas se realizó mediante la determinación de los coeficientes de absorptividad molar de las curvas de calibración. Para estas determinaciones se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

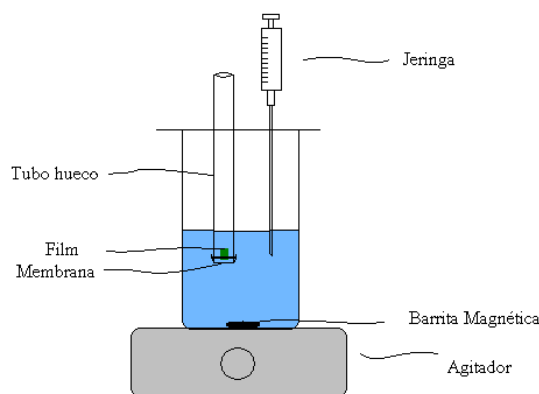


Figura II.2.7.1. Esquema del equipamiento utilizado en los ensayos de liberación de drogas.

Ensayos de eficacia hipotensora como medida indirecta de la liberación del fármaco

Se realizaron ensayos de liberación *in-vivo* de timolol maleato contenido en películas SPI-Gen en ojos de conejos albinos New Zeland normotensos. La liberación se realizó en forma oftálmica, es decir que las películas fueron introducidas en el fondo del saco (debajo de los párpados) de los animales para la liberación de la droga en la zona ocular. La Figura II.2.7.2 muestra el sitio de acción de las películas. Para esto, se determinó previamente el grado de adhesión e irritabilidad de las películas a la mucosa del ojo. Todos los ensayos fueron realizados utilizando grupos de 6 conejos, es decir utilizando películas en 12 ojos, por lo cual cada determinación en cada tiempo representa un promedio de 12 mediciones. Pequeñas porciones circulares de 4 mm de diámetro de cada película conteniendo el equivalente a 6 dosis de droga (1,5 mg) fueron utilizadas como sistema de liberación de fármaco, tomando como una dosis la cantidad de droga presente en una gota de solución de timolol comercial (Zopirol DM de Laboratorios ELEA). Todas las películas así como los elementos utilizados en su preparación fueron esterilizadas rociándolas con una solución etanólica.

Las películas fueron colocadas en el lugar de acción para determinar la adhesión e irritabilidad durante un período de 9 h realizando las

mediciones cada 2 h. En los ensayos de adhesión se determinó el comportamiento bioadhesivo de las películas en el fondo del saco del ojo y se clasificó de acuerdo a una escala numérica desarrollada en el trabajo de Tesis Doctoral del Dr. Ignacio Tártara dirigida por el Dr. Santiago D. Palma (FCQ-UNC) (Tártara, 2012). Simultáneamente al transcurso de los ensayos de adhesión se realizó una determinación visual empleando una lupa de aumento y marcadores como la fluoresceína, evaluando la presencia o ausencia de factores que indiquen irritabilidad como enrojecimiento y microlesiones corneales y conjuntivales.

Una vez realizadas estas determinaciones se procedió a analizar la liberación de la droga. Debido a que la droga a ser liberada cumple funciones reductoras de la presión intraocular (PIO), es que se determinó la eficacia hipotensora del sistema como medida indirecta de la liberación del fármaco. Para esto, se procedió a determinar la PIO normal de los conejos sin la acción del principio activo (curva basal). Luego, se procedió a colocar los dispositivos de liberación en el fondo del saco del ojo (por debajo de los párpados) para luego determinar la PIO de los mismos cada 2 h durante un período de 24 h. Dichas presiones fueron determinadas utilizando un tonómetro Icare Vet TonoVet J1000 (Departamento de Farmacia, FCQ-UNC) y cada determinación correspondió a un promedio de 5 mediciones. Todos los estudios se llevaron a cabo en la misma franja horaria del día.

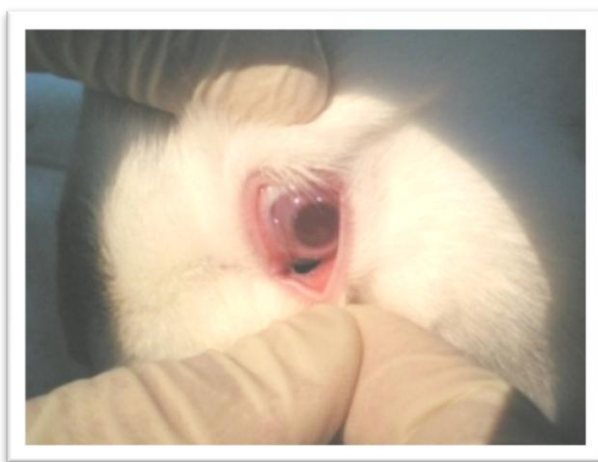


Figura II.2.7.2. Fotografía del lugar de colocación de las películas que contienen timolol maleato.

Ensayos de retención de colesterol de leche

Con el fin de disminuir la cantidad de colesterol de muestras de leche entera, se propuso poner en contacto 50 mL de leche con películas SPI-NCA que contenían β -ciclodextrinas (β -CD). En literatura existen referencias de sistemas similares de películas que contienen ciclodextrinas capaces de alojar en el interior de sus cavidades moléculas de colesterol y de esta forma producir la retención del mismo, disminuyendo la cantidad en el seno del alimento (Astray et al., 2009; López-de-dicastillo et al., 2011). Para esto, se procedió a la inmersión de las películas en agua destilada por 6 h con el objeto de retirar las CD que puedan no estar sujetas a la misma. Luego, las películas fueron secadas en estufa a 40 °C por 4 h y esterilizadas bajo lámpara UV por 20 min. Una vez realizado esto, se introdujo las películas de 32 cm² de superficie en un frasco de vidrio junto con 50 mL de leche entera “La Serenísima” con la precaución de que las mismas permanezcan completamente sumergidas en la leche. Estos ensayos fueron realizados con películas SPI-NCA conteniendo 5 y 20% de NCA. A su vez las cantidades de β -CD ensayadas fueron 0 g (película control); 0,05 g (14% m/m respecto a SPI); 0,25 g (72% m/m respecto a SPI) y 0,5 g (143% m/m respecto a SPI). Todas las películas fueron analizadas por duplicado. Los frascos fueron cerrados herméticamente, envueltos en papel aluminio para protegerlos de la luz y almacenados en heladera a 10 °C por 10 días. Este tiempo representa el mínimo período de interacción entre el envasado de la leche y su consumo. La Figura II.2.7.3 muestra los frascos utilizados en momentos previos al almacenaje. Luego de transcurrido este tiempo, se procedió a cuantificar las cantidades de colesterol de todas las muestras.



Figura II.2.7.3. Fotografía de las algunas muestras de leche en contacto con las películas SPI-NCA conteniendo β -CD.

Ensayos de cuantificación de cantidad de colesterol en leche

La cuantificación de colesterol en leche se realizó siguiendo un procedimiento descrito en bibliografía (Rendón Marín y Pineda Orozco, 2010). Para esto, se realizó la saponificación de colesterol, una extracción y la posterior cuantificación por cromatografía gaseosa. Se pesaron 0,5 g de leche en un frasco de vidrio, posteriormente se adicionaron 14 mL de solución de KOH metanólica 1 M, se agitó durante 15 seg y se calentó a 60 °C por 15 min con agitación constante para favorecer la reacción de saponificación. Para la extracción, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se adicionaron 3 mL de agua y 14 mL de hexano. Se agitó nuevamente y se dejó reposar para posibilitar la separación de las fases. Se tomó la fase de interés en un vial para su inyección en el cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3900 CG con detector de ionización de llama con sistema autosampler. La columna utilizada fue una Varian Factor 4 VF-5 ms de 30 m de longitud por 0,32 mm de diámetro y 0,25 μ m de espesor de *film*. La composición de la columna fue de 95/5 de metilsiloxano y fenil metil siloxano, respectivamente. El programa de temperatura utilizado partió de 150 °C, aumentando con una rampa de 8 °C / min hasta 280 °C por 5 min. Con este programa, el pico de colesterol se registra a los 20 min aproximadamente. La cuantificación se llevó a cabo por el método del estándar externo. Para esto, se realizó una curva de calibración con

concentraciones conocidas de colesterol (0; 1,12; 2,24; 5,6; 16,8; 22,4; 33,6; 44,8 y 56 ppm) y se graficó el área correspondiente a los picos obtenidos en función de las concentraciones de las mismas.

Luego, a partir de la inyección de las muestras problema, se determinó el área del pico correspondiente al colesterol y se calculó su concentración a través de los datos obtenidos de la curva de calibración.

Ensayos de inhibición del crecimiento de mohos en alimentos

Para determinar la eficacia de las películas SPI-PLA que contenían el agente antifúngico natamicina, primero se llevó a cabo una determinación visual cualitativa de inhibición del crecimiento de mohos sobre la superficie de distintos alimentos. Los alimentos seleccionados fueron manzana y tomate (ambos alimentos contienen una gran cantidad de humedad). Se cortaron 4 trozos de $3 \times 3 \times 1 \text{ cm}^3$ de cada alimento y cada uno fue envasado en tres tipos de envoltorios distintos como recubrimiento: una bolsa de polipropileno comercial (marca Ziploc), la película SPI - PLA 60/40 sin agente activo (control) y la película SPI-PLA 60/40 conteniendo natamicina como agente antifúngico (0,33% m/m respecto de SPI). Se estudió el comportamiento y se tomaron fotografías a distintos tiempos de los productos alimenticios recubiertos y almacenados en heladera (10 °C y 25% HR) durante un período máximo de 55 días.

Por otro lado, una rebanada de queso de pasta blanda tipo “cremoso” se recubrió parcialmente con la película SPI-PLA 60/40 que contenía natamicina (0,33% m/m respecto de SPI). Este alimento fue almacenado por 6 días en heladera (10 °C y 25 %HR). Transcurrido este tiempo se realizó una comparación cualitativa del crecimiento de mohos en la zona recubierta con respecto a la zona sin recubrir.

Ensayos microbiológicos de inhibición *in-vitro*

Se realizaron ensayos microbiológicos de inhibición del crecimiento de moho (*Aspergillus sp.*), levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y dos tipos de bacterias (*S. aureus ATCC 25923* y *E. coli ATCC 25922*) utilizando el método de difusión en disco de agar en placas de Petri de 9 cm de diámetro utilizando agar mohos y levaduras o cerebro corazón, según correspondía (Ramos et al., 2012). Las películas estudiadas fueron SPI-PLA 60/40 con diferentes cantidades de agentes antibacterianos y antifúngicos (2,5; 5; 10; 15; 20; 25 y 50% m/m respecto de SPI para timol y 0,33 y 0,52% m/m respecto de SPI para natamicina) aunque los mejores resultados se obtuvieron para las formulaciones con 0,33 y 25% m/m respecto de SPI para natamicina y timol respectivamente, por lo que los resultados descritos en esta tesis se obtuvieron utilizando estas cantidades.

Se procedió a cortar dichas películas en discos de 16 mm de diámetro y se las estudió siguiendo dos metodologías distintas. En un primer intento, se procedió realizando el sembrado de las distintas cepas sobre una capa de agar y colocando las películas correspondientes con la cara activa hacia abajo. Debido a que esta metodología no posibilitaba observar correctamente el crecimiento microbiológico, es que se procedió a modificar el arreglo experimental procediendo a colocar las películas en forma “embutida”, es decir entre 2 capas de agar, donde la capa superior es la que contenía el inóculo. Para este arreglo, las películas se colocaron con la cara activa hacia arriba. A su vez, también se utilizaron películas control (sin agente activo) para descartar un efecto inhibitorio en los demás componentes de las películas. Este segundo procedimiento posibilitó una correcta observación de los resultados, por lo que fue finalmente el utilizado en los resultados descritos en el Capítulo VIII.

II.2.8. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos para cada ensayo fueron analizados estadísticamente. Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar la significancia de la diferencia entre promedios utilizando el test de Tukey. Las diferencias entre los promedios se consideraron significativas cuando $P \geq 0,05$.

II.3. Bibliografía

ASTM Standard (D882-02), 2002. "Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting". ASTM International West Conshohocken, PA.

ASTM Standard (E96-10), 2010. ASTM Standard. (2010). "Standard test methods for water vapor transmission of materials" (E96M-10). West Conshohocken, PA: ASTM International.

Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* 23, 1631–1640.

García-Cebadera Rodríguez, Á., 2010. Estudio del ángulo de contacto y de la mojabilidad a alta temperatura de fases líquidas en la sinterización de metales. Universidad Carlos III de Madrid. Escuela Politécnica Superior.

Gennadios, A., Ghorpade, V.M., Weller, C. L., Hanna, M.A., 1996. Heat curing of soy protein films. *American Society of Agricultural Engineers* 39, 575–579.

López-de-dicastillo, C., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., 2011. Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering* 104, 380–386.

Lee, S., Lim, J., Bhoo, S., Paik, Y., Hahn, 2003. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Analytica Chimica Acta* 480, 267-274.

Lu, Y., Luo, X., Lin, X., He, P., 2010. Preparation and characterization of thermoplastic soy protein isolate. *Materials Science Forum* 658, 125-128.

Martucci, J.F., Ruseckaite, R.A., 2009. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability* 94, 1307–1313.

Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., Garrigós, M.C., 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering* 109, 513–519.

- Rendón Marín, J.M., Pineda Orozco, L.M., 2010. Estandarización y verificación de la determinación de colesterol en leche y sus derivados por cromatografía de gases-FID. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C L, Cezeirat, C., Hanna, M.A., 1998. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Ind. Crops Prod.* 8, 195–203.
- Romero, M.R., 2012. Estudio químico y electroquímico de interacciones entre biomoléculas y sus aplicaciones en biosensores. Munich: GRIN Verlag GMBH.
- Tártara, I., 2012. Efecto del sistema portador sobre la biodisponibilidad intraocular de fármacos. Facultad de Ciencias Médicas, UNC.
- Tyllianakis, P.E., Karabakos, S.E., Evangelatos, G.P., Ithakissios, D.S., 1993. Colorimetric determination of reactive primary amino groups of macro and micro solid supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38, 15–25.

Capítulo III

Entrecruzamientos químicos:

Obtención y caracterización de películas SPI- Gen

Capítulo III

Entrecruzamientos químicos:

Obtención y caracterización de películas SPI-Gen

En este capítulo se describe la obtención de películas de proteínas de soja plastificadas con glicerol y entrecruzadas químicamente con genipina (entrecruzante biodegradable y biocompatible). Se evaluará el efecto de distintos agregados de este agente sobre propiedades físico-químicas de las películas con el objetivo de lograr formulaciones finales con propiedades optimizadas con respecto al material de origen.

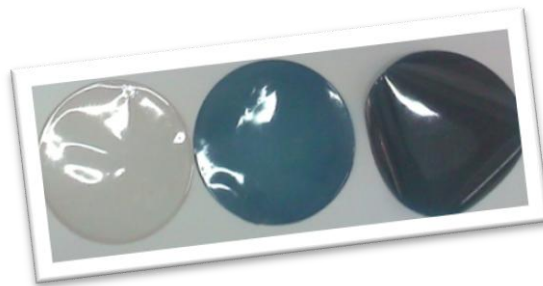


Figura III.1. Fotografía de películas SPI-Gen obtenidas con distinto grado de entrecruzamiento

III.1. Introducción

Entrecruzamientos químicos como estrategia de optimización de propiedades finales de las películas

Los polímeros obtenidos a partir de fuentes de origen natural se encuentran ampliamente investigados en la actualidad para el reemplazo parcial o total de los polímeros tradicionales derivados del petróleo. Sin embargo, poseen pobres propiedades que los hacen inadecuados al momento de su utilización. Entre las propiedades deficientes más importantes podemos enumerar su alta solubilidad e hinchamiento en agua, pobres propiedades mecánicas y alta permeabilidad al vapor de agua. Es por esto que diversas metodologías sintéticas que optimicen o mejoren estas propiedades deficientes, se encuentran bajo estudio en la actualidad. Una de estas metodologías sintéticas es la utilización de agentes de entrecruzamiento. Estos agentes químicos poseen dos o más “puntos de anclaje” o sitios de reacción que se unen a diferentes partes de la matriz polimérica mediante la formación de enlaces químicos. De esta forma, se logra una estructura tridimensional entrecruzada más resistente que las estructuras de origen. En particular, el grupo ϵ -amino de la lisina es considerado como el sitio reactivo primario entre las proteínas y los agentes entrecruzantes (Y. Nayudamma et al., 1961).

Los agentes entrecruzantes más ampliamente utilizados para proteínas son compuestos aldehídicos como glutaraldehído (Bigi et al., 2001; Marquié, 2001; S. K. Park et al., 2000), formaldehído (Marquié, 2001), glioxal (Vaz, 2005), compuestos epoxi (Patil, et al., 2000) y compuestos fenólicos (Strauss y Gibson, 2004). Sin embargo, la citotoxicidad de estos compuestos es un factor restrictivo para su uso. Esta característica, ha hecho que se promovieran investigaciones en torno a descubrir y desarrollar nuevos entrecruzantes naturales inocuos para los seres vivos.

Nueva alternativa: la genipina

En los últimos tiempos, diversos agentes entrecruzantes naturales están siendo utilizados, entre los cuales se encuentra la Genipina (Gen). La estructura de este compuesto fue descubierta en la década de los sesenta utilizando datos espectroscópicos de RMN y experimentos de degradación química. La estructura molecular de la Gen puede observarse en la Figura III.1.1. Su estructura contiene un anillo de dihidropirano y su fórmula molecular es $C_{11}H_{14}O_5$. (Djerassi et al., 1960) La obtención de este agente natural es a partir de la hidrólisis enzimática de Genipa con β -glucosidasa (Fujikawa et al., 1987). La Genipa, que se extrae del fruto de un tipo de jazmín llamada *Gardenia jasminoides* Ellis (Figura III.1.2), es un extracto ampliamente utilizado en la medicina tradicional china para tratar casos de diabetes de tipo 2 ya que este componente bloquea el funcionamiento de una enzima llamada proteína desacoplante 2 (UCP2). Tanto en animales como en humanos, las altas concentraciones de UCP2 parecen inhibir la secreción de insulina del páncreas y aumenta el riesgo de diabetes tipo 2 (Lee et al., 2003).

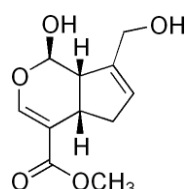


Figura III.1.1. Estructura de Gen.



Figura III.1.2. Fotografía de *Gardenia jasminoides* Ellis

Según estudios descriptos en bibliografía, este agente es cerca de 10.000 veces menos citotóxico que el glutaraldehído (Song y Zhang, 2009;

Yuan et al., 2007). Ensayos de formación de colonias mostraron que la capacidad proliferativa de las células después de ser expuesto a Gen es aproximadamente 5000 veces mayor que la de las células expuestas a glutaraldehído (Song y Zhang, 2009; Sung et al., 1999).

Gen es un compuesto incoloro aún en solución, sin embargo, los materiales entrecruzados con Gen, tienen la particularidad de adquirir una coloración verde azulada oscura característica de la reacción espontánea de este agente con aminoácidos o proteínas. Por esta particularidad es que estos pigmentos han sido aplicados en el desarrollo de colorantes de alimentos (Touyama et al., 1994).

El mecanismo de la reacción de entrecruzamiento entre Gen y polisacáridos que contienen grupos amino (tales como el quitosano) (Muzzarelli, 2009) o proteínas (tales como SPI) es dependiente del pH. El mecanismo completo de reacción no se encuentra completamente descrito aún, sin embargo, en bibliografía se ha propuesto un mecanismo para condiciones ácidas y neutras. En este, se produce un ataque nucleofílico por parte de los grupos amino de la matriz sobre el átomo de carbono olefínico de Gen, seguido de la apertura del anillo de dihidropirano y el ataque del grupo amino secundario sobre el grupo aldehído recién formado (Yao et al., 2004). La Figura III.1.3 muestra en forma esquemática la reacción de entrecruzamiento de Gen con proteínas para formar redes tridimensionales y la Figura III.1.4. muestra un mecanismo propuesto para la reacción en medio ácido o neutro entre Gen y metilamina (Touyama et al., 1994).

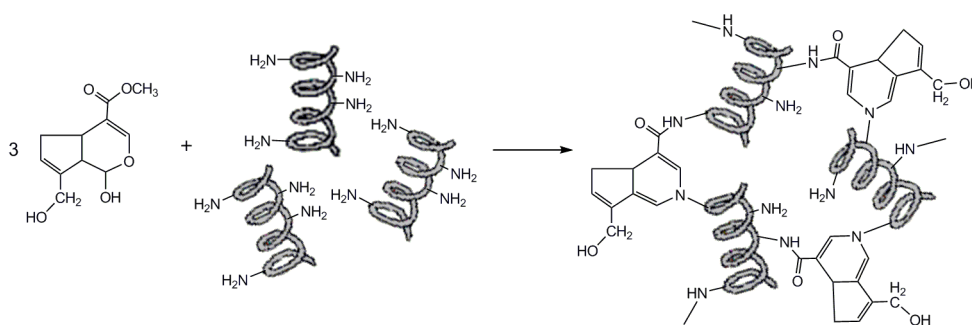


Figura III.1.3. Reacción esquemática de la reacción de entrecruzamiento químico entre Gen y proteínas

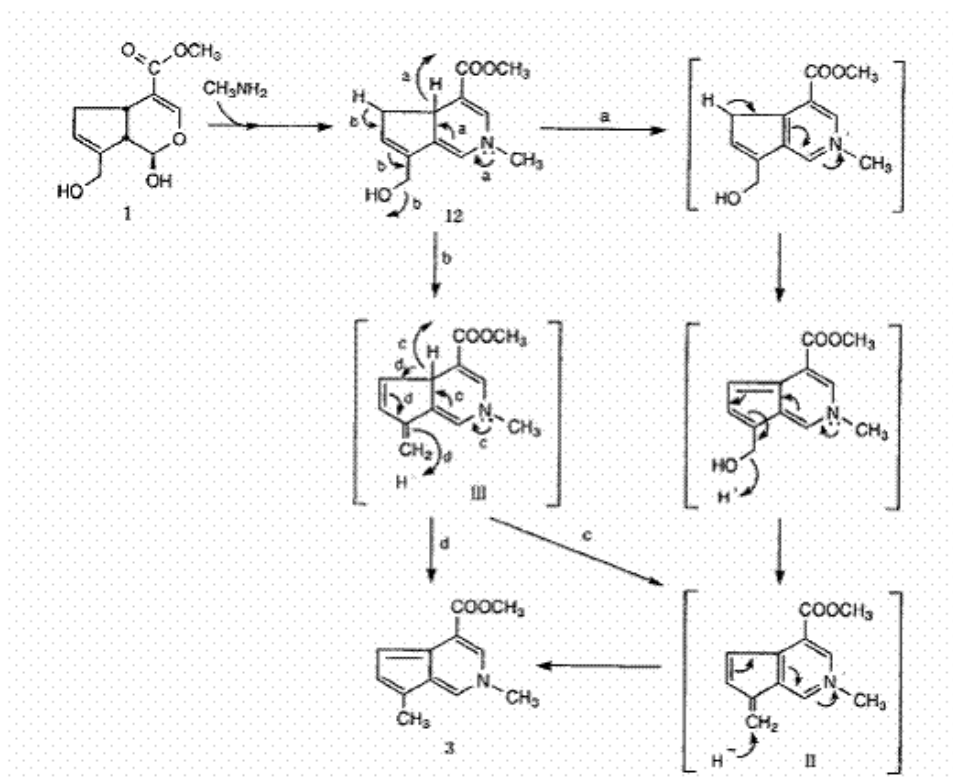


Figura III.1.4. Mecanismo propuesto para reacciones en medio ácido o neutro entre Gen y metilamina.

Se cree que el paso final en la formación del material entrecruzado es la dimerización producida por reacciones radicalarias. Esto indica que Gen se puede utilizar para formar enlaces intramoleculares e intermoleculares con materiales que contienen un grupo amina primario (Chang et al., 2003). Entre las aplicaciones que se le ha dado a este entrecruzante se puede citar por ejemplo que ha sido empleado para estabilizar quitosano formando geles (Muzzarelli, 2009; Yao et al., 2004) para el uso en liberación controlada de fármacos. Mejoras en las propiedades mecánicas y de estabilidad térmica, así como disminución del hinchamiento en agua, son algunos de los efectos obtenidos por la formación de redes tridimensionales producidas. También ha sido estudiado el entrecruzamiento de matrices de gelatina con diferentes concentraciones de Gen para formar películas, concluyendo que el entrecruzamiento alcanzado reduce significativamente el hinchamiento de las películas en solución fisiológica y mejora la estabilidad térmica de las mismas (Bigi et al., 2002).

Por otro lado, también existen ejemplos de sistemas de liberación controlada de fármacos desde micro-esferas de quitosano entrecruzadas con Gen. Yuan y colaboradores han descrito un sistema de estas características donde el agente de interés liberado es una proteína (albúmina). En este trabajo se determinó la capacidad de modificar la liberación, haciéndola más sostenida en el tiempo de acuerdo al grado de entrecruzamiento logrado por modificación de su capacidad de hinchamiento (Yuan et al., 2007).

Utilización de Gen como entrecruzante de proteínas de soja (SPI)

En literatura, se encuentran descritos diversos ejemplos de utilización de Gen como agente entrecruzante de SPI para la formación de geles. Entre algunos ejemplos se logró la gelificación de dispersiones acuosas de SPI en presencia de Gen y el uso de los geles resultantes para la liberación controlada de albúmina de suero bovino como droga modelo (Song y Zhang, 2009). Por otro lado, también existen reportes de materiales compuestos en forma de geles formados a partir de SPI y quitosano entrecruzados con Gen con el fin de evaluar la capacidad de liberación controlada de teofilina en fluidos gástricos e intestinales simulados (Duan et al., 2012).

Si bien, como se menciona anteriormente, se encuentran descritos ejemplos de matrices de SPI entrecruzadas con Gen para la formación de geles pero no se han encontrado desarrollos de matrices en forma de películas.

III.2. Resultados

III.2.1. Preparación de las películas SPI-Gen

La preparación de las películas de SPI se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de Gen (0%; 0,1%; 1%; 2,5%; 5%; 7,5% y 10% de masa de Gen respecto de la masa de SPI) y glicerol (Gli) (50 % m/m) como plastificante. La denominación SPI-Gli-Gen X% se utilizará para referirnos a películas de proteína de soja entrecruzadas con X% de genipina y plastificadas con glicerol.

La preparación se llevó a cabo en todos estos casos aplicando la metodología de “*casting*”. Para este caso, una dispersión de SPI en agua se hizo reaccionar con una solución acuosa de Gen en medio básico (pH 10) a 90 °C para favorecer la desnaturalización completa de la proteína y la reacción con Gen. A medida que la reacción se lleva a cabo, se comienza a observar la formación del producto de coloración verde azulada (característica de la reacción de Gen con los grupos amino de la proteína en intensidades variables de acuerdo a la cantidad del agente entrecruzante agregado) (Song y Zhang, 2009). La Figura III.2.1.1 muestra la coloración para los productos de las reacciones a partir de distintas cantidades de Gen.

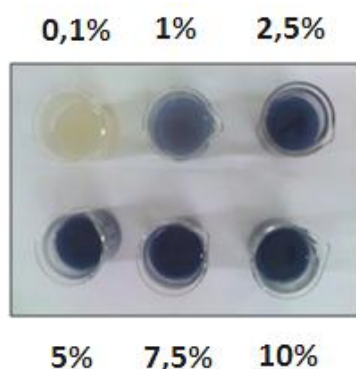


Figura III.2.1.1. Coloración de las soluciones de SPI luego de la reacción con distintas cantidades de Gen.

Las soluciones fueron vertidas sobre cápsulas plásticas de polipropileno y llevadas a estufa a 60 °C para evaporación total del solvente.

Luego de transcurrido el tiempo necesario, se observó la formación de las películas en el fondo de las cápsulas las cuales fueron retiradas con la ayuda de una pinza.

Las películas preparadas tuvieron espesores de entre 55 a 65 μm , fueron flexibles, resistentes al tacto y al igual que las soluciones que les dieron origen, su coloración varió de amarillento (película sin Gen) a azul oscuro (películas con Gen) y tanto la intensidad del color como la opacidad a la luz aumentaron linealmente con el incremento de la cantidad de Gen agregada. La Figura III.2.1.2 muestra el aspecto visual de las películas preparadas. Se determinó la opacidad de las películas tomando la absorbancia de las mismas en el rango visible (de 400 a 800 nm) y dividiéndola por el espesor de cada una. En la Tabla III.2.1.1 se puede observar el orden creciente de los valores de opacidad obtenidos para las distintas películas y en la Figura III.2.1.3 se puede observar los gráficos de absorbancia en el rango visible (400 a 800 nm) de cada película y la relación lineal existente entre la cantidad de Gen agregada en cada caso con respecto a la opacidad a la luz de las películas obtenidas.

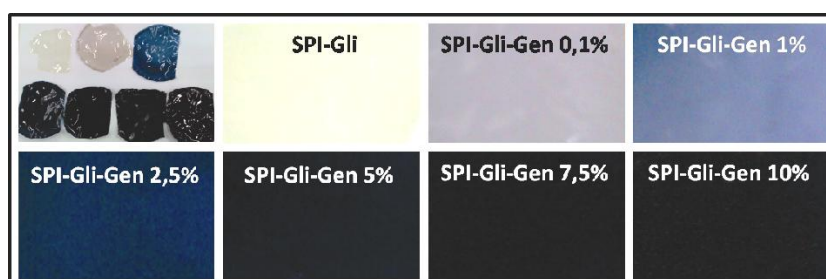


Figura III.2.1.2. Aspecto visual de las películas preparadas

Películas	OPACIDAD (UA) (Área / espesor)
SPI-Gli	1,02
SPI-Gli-Gen 0,1%	1,31
SPI-Gli-Gen 1%	3,48
SPI-Gli-Gen 2,5%	8,34
SPI-Gli-Gen 5%	10,82
SPI-Gli-Gen 7,5%	17,53
SPI-Gli-Gen 10%	18,63

Tabla III.2.1.1. Valores de opacidad obtenidos para las distintas películas

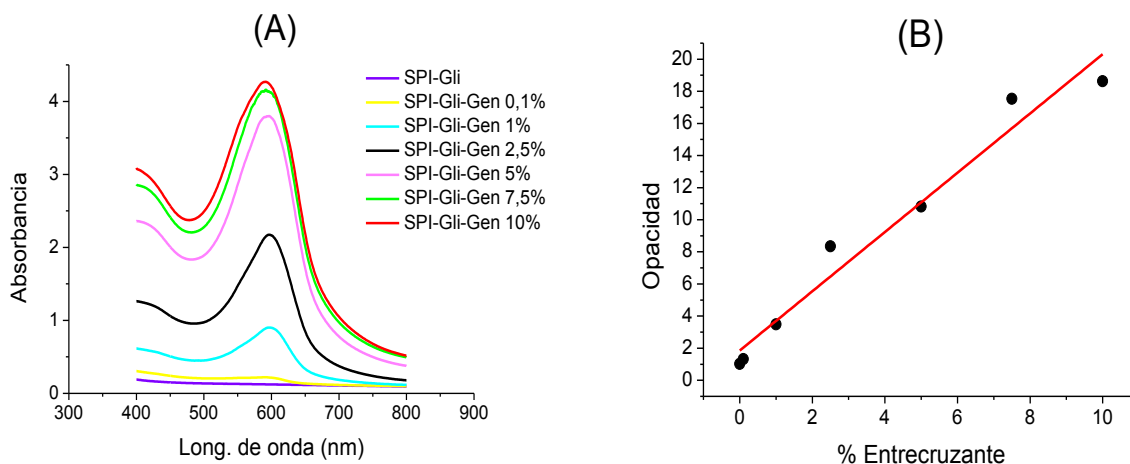


Figura III.2.1.3. (A) Gráficos de absorbancia en el rango visible de las distintas películas y (B) Relación lineal existente entre la cantidad de Gen agregada con respecto a la opacidad de las películas obtenidas.

III.2.2. Caracterización química de las películas SPI-Gen

Para confirmar la reacción de entrecruzamiento, se llevó a cabo un análisis de espectrofotometría infrarroja (FT-IR). Para ello se realizaron los espectros IR de las distintas películas. En el espectro de la película sin agente entrecruzante, se observaron las bandas características de absorción de SPI en 3000-3500 (estiramiento O-H, estiramiento N-H), 2925 (estiramiento C-H), 1668 (estiramiento C=O), 1548 (deformación N-H y estiramiento simétrico N-C=O), y 1238 cm^{-1} (estiramiento C-N).

Por otro lado, en los espectros obtenidos de las películas entrecruzadas, se pudo observar que la absorción de la banda que aparece alrededor de 1668 cm^{-1} , mostró un aumento relativo debido a la formación de nuevos enlaces amida entre SPI y Gen, confirmando la reacción de entrecruzamiento. Además, también se observó la aparición de las bandas de estiramiento C-O a 1048 cm^{-1} , estiramiento C-N a 1238 cm^{-1} y la deformación fuera del plano C-H de C=C a 854 cm^{-1} provocadas por la presencia de la genipina. En la Figura III.2.2.1 se pueden observar los espectros FT-IR de las películas de SPI con 0%; 5% y 10% de Gen. Vale remarcar que los aumentos relativos de las bandas antes mencionadas fueron determinados por integración de las bandas.

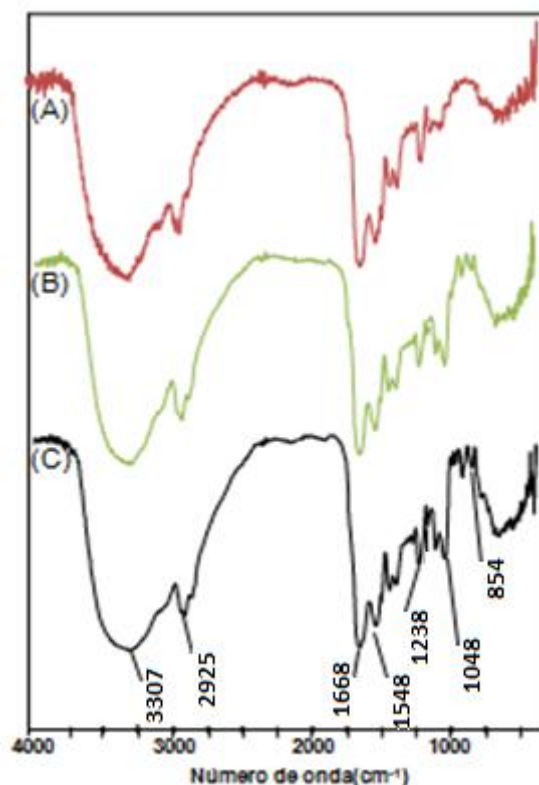


Figura III.2.2.1. Espectros FT-IR de las películas de SPI con (A) 0%; (B) 5% y (C) 10% de Gen.

Por otro lado, se realizaron espectros de RMN de ^{13}C de todas las películas esperando poder visualizar el aumento relativo en el pico correspondiente al carbonilo de la amida ya que este tipo de enlace es el formado en la reacción de entrecruzamiento. Este cambio no fue observado debido posiblemente a la presencia de gran cantidad de este tipo de enlaces presentes en la matriz proteica. Por otro lado, se observó la aparición de la señal correspondiente a un carbono carbinólico a 62 ppm debido a la presencia del alcohol primario presente en la genipina.

Otro estudio indicativo de que la reacción de entrecruzamiento ocurrió fue proporcionado por la cuantificación de los grupos amino libres. Es sabido que el agente entrecruzante reacciona con la matriz proteica a través de grupos amino, por lo que la cantidad total de estos grupos en forma libre debe ser menor luego de que la reacción haya sido completada. Este análisis representa una determinación indirecta del grado o porcentaje de entrecruzamiento logrado (CL%) de acuerdo a la cantidad de agente

entrecruzante agregado. Para esto, se ha considerado como 0% de entrecruzamiento a la cantidad de grupos amino libre presentes en la película a la que no se le agregó la Gen. La cantidad de aminos disponibles presentes en cada película fue restada de la cantidad de aminos de la película 0% para calcular la cantidad de aminos que ya no se encuentran disponibles por haber reaccionado. Este valor fue referido a la cantidad de aminos determinada para la película 0% para definir el porcentaje de entrecruzamiento logrado para cada película. De esta forma, el porcentaje de entrecruzamiento de cada película fue calculado como:

$$CL\% = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100 \quad (1)$$

donde m_0 es la cantidad de grupos amino libres antes y m_1 después de la reacción de entrecruzamiento.

La determinación de la cantidad de grupos amino libre de cada matriz fue determinada indirectamente utilizando los reactivos de Ellman y de Taut para formar un compuesto que puede ser cuantificado mediante espectrofotometría UV-Visible. Esta técnica se encuentra descrita en bibliografía y se la utiliza para determinar grupos amino libres en soportes poliméricos insolubles (Tyllianakis et al., 1993).

Mediante estos ensayos se pudo determinar que los porcentajes de entrecruzamiento logrados en cada película aumentaron de acuerdo a la cantidad de entrecruzante agregado llegando a porcentajes altos. La Tabla III.2.2.1 muestra estos resultados.

Película	Entrecruzamiento (%)
SPI-Gli	0
SPI-Gli-Gen 0,1%	(0,67 ± 1,85)
SPI-Gli-Gen 1%	(19,31 ± 2,01)
SPI-Gli-Gen 2,5%	(24,14 ± 1,64)
SPI-Gli-Gen 5%	(57,24 ± 4,44)
SPI-Gli-Gen 7,5%	(68,96 ± 2,50)
SPI-Gli-Gen 10%	(92,76 ± 3,23)

Tabla III.2.2.1. Porcentajes de entrecruzamiento logrados para cada película.

A partir de estos resultados, se pudo concluir que a mayor cantidad de Gen agregada, se produce un mayor porcentaje de entrecruzamiento, manteniendo una relación lineal, tal como lo muestra la Figura III.2.2.2.

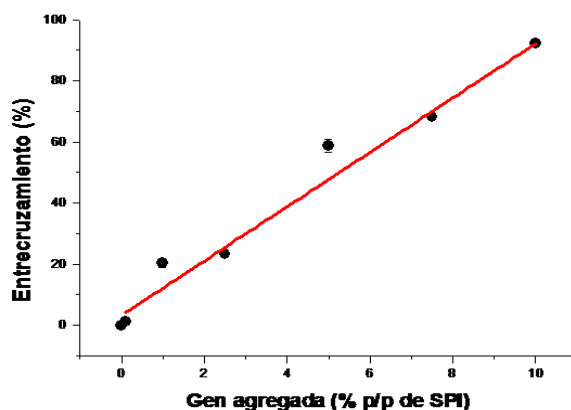


Figura III.2.2.2. Relación lineal existente entre la cantidad de entrecruzante agregado y el porcentaje de entrecruzamiento logrado en las películas.

III.2.3. Caracterización física y superficial de las películas SPI-Gen

Para analizar el efecto del entrecruzamiento, fueron evaluadas diferentes propiedades físicas de las películas tales como contenido de humedad, cantidad de materia soluble total en agua y permeabilidad al vapor de agua. La Tabla III.2.3.1 muestra los resultados obtenidos.

Se observó que los valores de MC no variaron significativamente ($P \geq 0.05$). Sin embargo, los valores de TSM mostraron una marcada variación observándose una disminución considerable en la película con 0,1% de Gen y luego con 1% de Gen. En este último caso se observó una disminución de TSM de aproximadamente 45% con respecto a la película de control (sin agente entrecruzante). Este efecto es particularmente importante, ya que estos materiales, logran ser más resistentes en estado húmedo con pequeños agregados del entrecruzante. Esta variación representa una mejora muy relevante por ejemplo, al momento de utilizar el

material para recubrimiento. Para las películas con agregados de Gen mayores al 1%, se observaron valores de TSM prácticamente invariables.

<i>Película</i>	<i>Espesor (μm)</i>	<i>MC (%)</i>	<i>TSM (%)</i>	<i>WVP ($\times 10^{10} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)</i>
SPI-Gli	58,33 \pm 7,13 ^a	27,07 \pm 4,19 ^a	64,66 \pm 3,47 ^c	2,41 \pm 0,04 ^b
SPI-Gli-Gen 0.1%	62,25 \pm 4,43 ^a	28,37 \pm 2,29 ^a	51,58 \pm 2,36 ^b	2,22 \pm 0,09 ^{ab}
SPI-Gli-Gen 1%	60,54 \pm 6,53 ^a	26,03 \pm 2,79 ^a	35,14 \pm 4,42 ^a	1,88 \pm 0,10 ^{ab}
SPI-Gli-Gen 2.5%	59,23 \pm 7,25 ^a	24,74 \pm 3,41 ^a	33,94 \pm 3,81 ^a	1,72 \pm 0,11 ^a
SPI-Gli-Gen 5%	61,17 \pm 3,38 ^a	25,60 \pm 3,22 ^a	34,08 \pm 3,12 ^a	1,81 \pm 0,16 ^{ab}
SPI-Gli-Gen 7.5%	65,34 \pm 4,22 ^a	25,43 \pm 2,28 ^a	35,20 \pm 2,16 ^a	1,80 \pm 0,20 ^{ab}
SPI-Gli-Gen 10%	61,42 \pm 3,15 ^a	26,14 \pm 3,17 ^a	34,19 \pm 3,43 ^a	1,89 \pm 0,21 ^{ab}

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla III.2.3.1. Resultados de espesor, contenido de humedad (MC), materia soluble total (TSM) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las diferentes películas.

Por otro lado, se realizaron ensayos de hinchamiento (S) de las películas manteniéndolas en contacto con agua por un período determinado. En un primer momento, las mismas mostraron ablandamiento y posteriormente comenzaron a hincharse. Además, se observó que en todos los casos el hinchamiento aumentó significativamente en los primeros cinco minutos para luego comenzar a disminuir lentamente, ya que parte de la masa probablemente se pierde por solubilización durante el ensayo. Un mayor grado de entrecruzamiento permite la formación de estructuras rígidas de tres dimensiones, menos expansibles y con menor capacidad de ablandamiento y de hinchamiento. Este comportamiento fue evidenciado por los perfiles de hinchamiento de las distintas películas en función del tiempo como lo muestra la Figura III.2.3.1. Una tendencia similar se encuentra descrita en bibliografía para películas de gelatina entrecruzadas con Gen (Bigi et al., 2002).

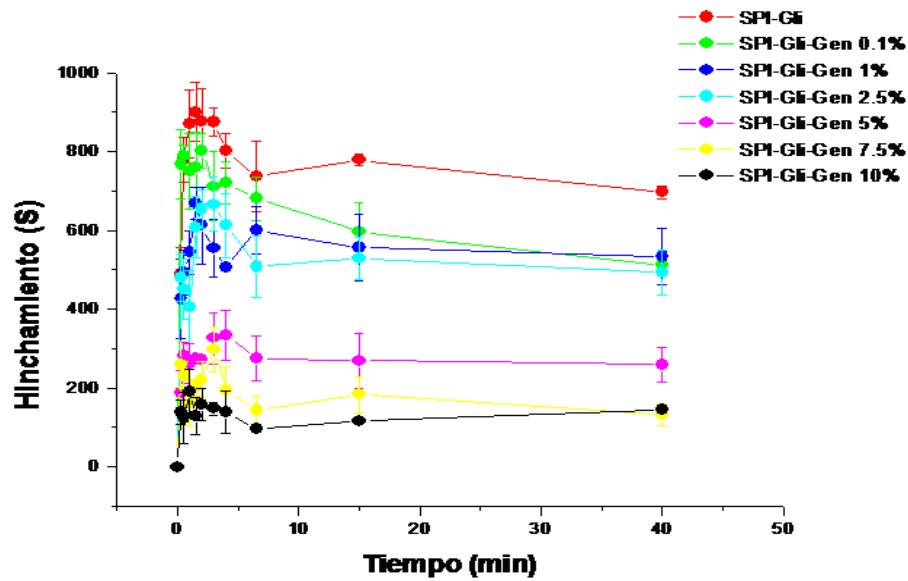


Figura III.2.3.1. Variación del hinchamiento en agua de cada película en función del tiempo.

La disminución en los valores de hinchamiento de las películas SPI en función del aumento de la cantidad de Gen agregada, se consideró una prueba indirecta de que la reacción de SPI con Gen ha ocurrido.

Siguiendo con la caracterización física, se evaluó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de cada película, mostrando valores relativamente bajos en todos los casos. Se determinó además que el efecto que produce la cantidad de Gen agregada es inversamente proporcional a la WVP cuando la cantidad de Gen es menor al 1%, permaneciendo prácticamente constante para agregados mayores de Gen.

La morfología superficial de las películas se pudo visualizar por Microscopía electrónica de barrido (SEM). Las micrografías se pueden observar en la Figura III.2.3.2. Se pudo observar la presencia de agregados, probablemente correspondientes a la presencia de zonas de mayor densidad de entrecruzamiento. Mayor cantidad de Gen agregada resultó en mayor cantidad de agregados.

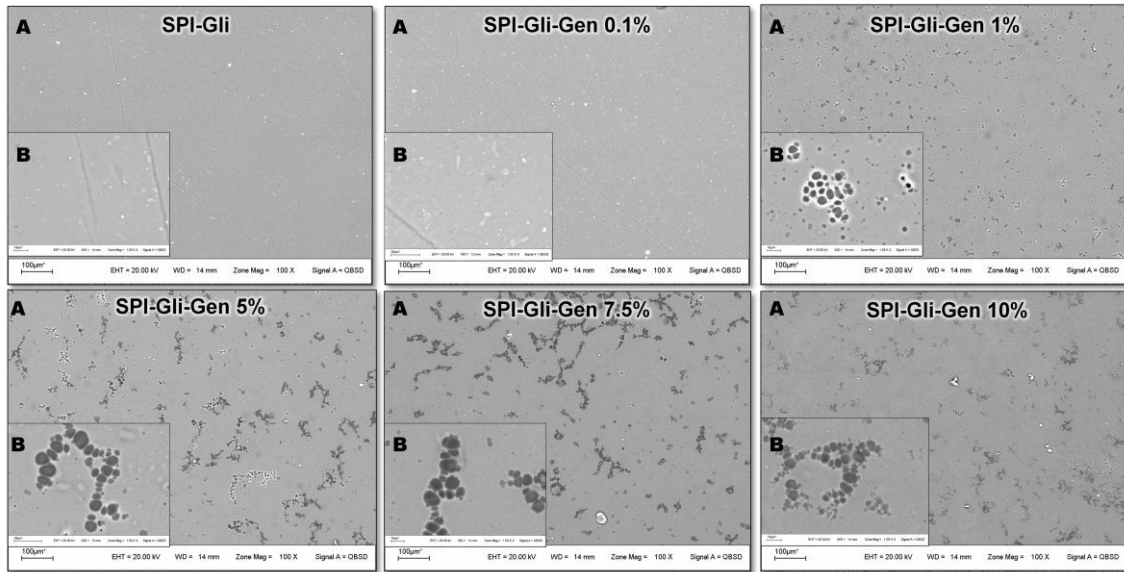


Figura III.2.3.2. Micrografías SEM de las superficies de las películas SPI-Gli con distinta cantidad de entrecruzante agregado. Amplificación: (A) 100x, (B) 1000x.

III.2.4. Caracterización mecánica de las películas SPI-Gen

Las propiedades mecánicas fueron evaluadas mediante la determinación de la resistencia a la tracción (TS) y la elongación a la rotura (EB) a partir de las curvas tensión-deformación de cada película.

Como se observa en la Tabla III.2.4.1, los valores de TS aumentaron hasta alcanzar el valor límite en el 1% de agregado de Gen. Para adiciones mayores, esta propiedad no varía significativamente ($P \geq 0,05$). En las películas entrecruzadas, los valores de EB muestran un aumento cuando las adiciones de Gen son menores o igual a 1%. Un aumento en la concentración de Gen conduce a una disminución en los valores de EB convirtiéndose en un material menos deformable.

Películas	TS (MPa)	EB (%)
SPI-Gli	3,22 ± 0,10 ^a	22,53 ± 5,02 ^{bc}
SPI-Gli-Gen 0,1%	3,28 ± 0,16 ^a	26,71 ± 4,77 ^{cd}
SPI-Gli-Gen 1%	4,16 ± 0,38 ^b	45,84 ± 0,25 ^e
SPI-Gli-Gen 2,5%	4,46 ± 0,04 ^b	36,86 ± 0,46 ^{de}
SPI-Gli-Gen 5%	4,60 ± 0,11 ^b	12,14 ± 4,46 ^{ab}
SPI-Gli-Gen 7,5%	4,52 ± 0,13 ^b	3,22 ± 0,89 ^a
SPI-Gli-Gen 10%	4,58 ± 0,09 ^b	2,79 ± 1,48 ^a

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla III.2.4.1. Resistencia a la tracción (TS) y elongación a la rotura (EB) de las diferentes películas.

III.2.5. Ensayos de biodegradación de las películas SPI-Gen

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo por enterramiento de las películas en suelo, en condiciones bajo techo durante 33 días. Las muestras fueron retiradas del suelo a diferentes tiempos, limpiadas y secadas en estufa. Las muestras secas fueron pesadas con el fin de determinar la pérdida de masa promedio (WL%) (Figura III.2.5.1). Las fotografías de las muestras recuperadas pueden ser observadas en la Figura III.2.5.2. El examen macroscópico reveló que la degradación de las diferentes películas en el suelo depende en gran medida del grado de entrecruzamiento. Por ejemplo, las películas sin entrecruzamiento son casi completamente degradadas en 14 días, mientras que la película con mayor porcentaje de entrecruzamiento permaneció inalterada después de 33 días. Esta dependencia se puede atribuir al efecto de obstaculización por parte de las redes formadas sobre la degradación enzimática (Martucci y Ruseckaite, 2009). Como se demuestra en los ensayos de hinchamiento, la absorción de agua de las películas más entrecruzadas es menor respecto a las menos entrecruzadas. Este efecto produce una disminución de la bio-disponibilidad de agua en el interior de las matrices y podría explicar el hecho de que en la

mayoría de las películas entrecruzadas el ataque microbiano, la acción de las enzimas proteolítica y las hidrólisis podrían ser producidas en menor medida.

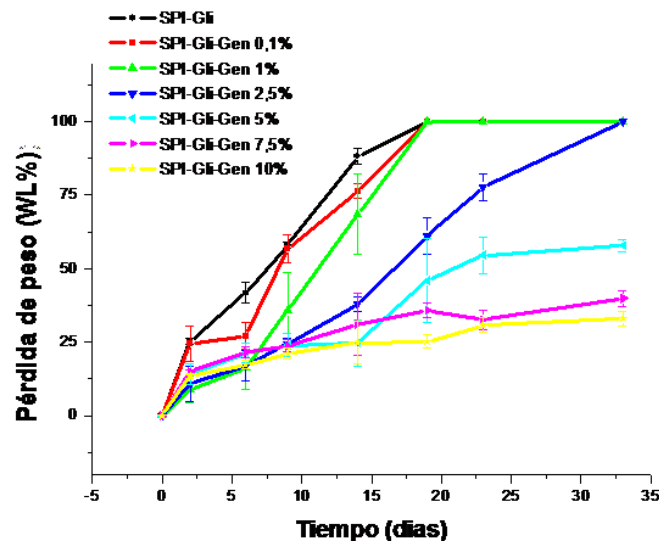


Figura III.2.5.1. Pérdida de peso (%WL) de las películas enterradas en suelo en función del tiempo.

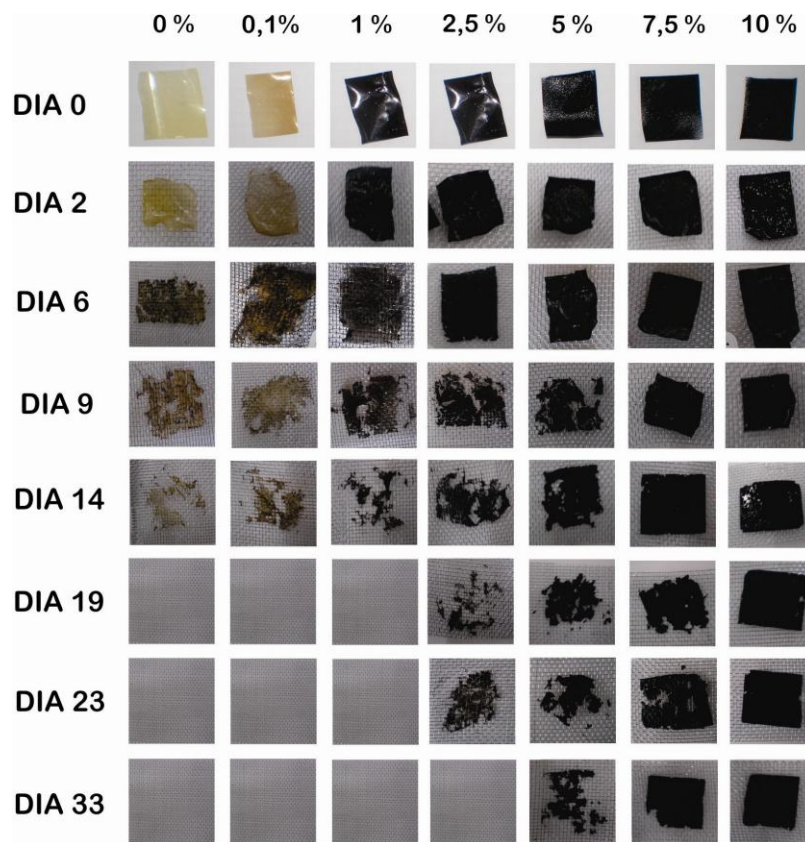


Figura III.2.5.2. Aspecto visual de las películas con 0%; 0,1%; 1%; 2,5%; 5%; 7,5% y 10% de Gen enterradas en suelo y extraídas a distintos tiempos.

Se observó además, que todas las películas absorben agua (en mayor o menor grado), perdiendo inicialmente su forma y la integridad estructural después. Después del período de enterramiento de 23 días, pudo ser apreciado olor característico a descomposición. Vale la pena aclarar también, que la humedad del suelo se mantuvo por debajo de la humedad de saturación (57 ± 5) % para reducir al mínimo la posibilidad de solubilización de las matrices.

III.3. Discusión

En los materiales obtenidos variando las cantidades de Gen agregada, se observó un aumento creciente de CL%. Respecto a las propiedades determinadas de dichos materiales tales como S, TS, EB, TSM y WVP, se pueden diferenciar dos grupos de materiales: primero, las películas con 0; 0,1 y 1% de Gen y un segundo grupo con las películas que contienen 2,5; 5; 7,5 y 10% de Gen. Para las películas del primer grupo, se encontró una variación considerable en estas propiedades aún cuando los agregados de Gen fueron pequeños, ya que se determinaron aumentos en E y TS y disminución de S y WVP.

Las películas correspondientes al segundo grupo mostraron que la adición del agente entrecruzante en cantidades iguales o mayores a 2,5% produjeron disminución considerable en S y E, sin embargo, algunas de sus propiedades, incluyendo TS, TSM y WVP, se mantuvieron constantes. El hecho de que algunas propiedades no varíen con grandes adiciones de Gen puede explicarse por el diferente tipo de entrecruzamientos que se forma cuando pequeñas y grandes cantidades de Gen son incorporadas a las películas. La reacción de entrecruzamiento de proteínas puede tener lugar de forma intermolecular (entre las estructuras de proteínas) y/o intramolecular (dentro de las estructuras proteicas) (S. K. Park et al., 2000). Pequeñas adiciones de Gen podrían producir entrecruzamientos intermoleculares ya que los grupos amino reactivos periféricos son los que están más disponibles, mientras que grandes adiciones podrían formar entrecruzamientos intramoleculares ya que el entrecruzante ingresa dentro de las estructuras de proteínas porque los grupos amino de la periferia se encuentran probablemente ocupados (ya han reaccionado). Por lo tanto, se puede concluir que las concentraciones de hasta 1% de Gen aumentan el grado de entrecruzamiento intermolecular, mientras que mayores cantidades aumentarían el grado de entrecruzamiento intramolecular.

La reducción de TSM con adiciones de hasta un 1% de Gen ha sido producida probablemente debido a que las estructuras de proteínas (por

ejemplo, globulinas que pertenecen a las fracciones 7S y 11S) se encuentran unidas formando redes tridimensionales por el entrecruzamiento intermolecular. Esto puede ser considerado también como una evidencia de que la reacción SPI-Gen ocurrió. Con esta cantidad de Gen incorporada, los materiales conducen a un valor límite de TSM, donde el único componente que probablemente se solubiliza es una parte del plastificante, el cual es soluble en agua. Adiciones mayores de agente entrecruzante no cambia significativamente ($P \geq 0,05$) la TSM, debido al hecho de que las estructuras proteicas se encuentran unidas previamente unas a otras por el entrecruzamiento intermolecular. Vale remarcar que la formación de entrecruzamientos intramoleculares no impide la disolución del glicerol.

En las determinaciones de TS, también se observaron dos comportamientos diferentes, ya que el entrecruzamiento intermolecular afecta esta magnitud incrementándola cuando pequeñas cantidades de Gen fueron incorporadas y permaneciendo constante con mayores cantidades. Del mismo modo, los valores de EB muestran la misma tendencia debido probablemente al hecho de que pequeñas adiciones de Gen rompen algunas interacciones intrínsecas de las proteínas formando redes más expansibles. Sin embargo, un aumento en la concentración de Gen conduce a una disminución en EB debido a la formación de nuevos entrecruzamientos que producen una matriz más rígida en la que el movimiento entre las cadenas se ve restringido. Estas determinaciones sugieren que las propiedades mecánicas de las películas pueden ser mejoradas con pequeñas adiciones de Gen. Por lo tanto, se puede concluir que la película con 1% de Gen presenta las mejores propiedades mecánicas de toda la serie analizada.

Analizando el efecto del entrecruzamiento producido por Gen sobre WVP, se observó que los valores disminuyeron. Por ejemplo, una disminución del 29,5% en WVP fue observada para la película con 2,5% de Gen (m/m de SPI) con respecto a la película que no tiene Gen incorporado. Esta disminución, puede atribuirse a un aumento en la densidad de la película generada por el mayor grado de entrecruzamiento intermolecular en las matrices. Los valores de WVP de las películas entre 2,5 y 10 de Gen %

(m/m de SPI) no variaron significativamente ($P \geq 0,05$), debido al hecho de que el entrecruzamiento intramolecular generado con esta cantidad de Gen probablemente no evita la permeación de vapor de agua ya que el mismo penetra a través de la matriz por los espacios existentes entre las estructuras proteicas.

En la determinación de los valores de WVP se obtuvieron valores sustancialmente inferiores a los reportados en la literatura (Cho et al., 2007; Kim et al., 2002; Rhim et al., 1998). Esta disminución probablemente deriva del tratamiento térmico sufrido en la preparación de las películas durante el secado. Este efecto causa la ruptura de la estructura cuaternaria de las proteínas y desnaturalización parcial de la misma (Mauri y Añón, 2006). La desnaturalización de las proteínas de soja promueve los entrecruzamientos intra- e intermoleculares de residuos de aminoácidos, así como la formación de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Kim et al., 2002), lo que resulta en la disminución en los valores WVP (Denavi et al., 2009).

En conclusión, se puede afirmar que las mejores propiedades para las películas SPI-Gli se obtuvieron con el agregado de 1% de Gen ya que se obtuvieron valores de TS y EB máximos, mientras que los valores de WVP y TSM fueron mínimos.

Las películas SPI-Gen fueron evaluadas como sistema de liberación controlada de fármacos en sistemas oftalmológicos utilizando timolol maleato como droga a liberar. Estos resultados son mostrados en el capítulo VIII.

III.4. Conclusiones parciales

Durante esta parte del trabajo, se utilizó una estrategia sintética de modificación de películas de proteína de soja como lo es la formación de entrecruzamientos químicos para formar redes tridimensionales poliméricas. Si bien esta metodología se viene desarrollando hace años, los agentes entrecruzantes que se utilizan generalmente presentan alta toxicidad, por lo cual la utilización del material final se ve acotada a sistemas donde esta particularidad no sea un inconveniente. Por el contrario, en este trabajo, se desarrolló un nuevo material donde tanto el agente entrecruzante utilizado en la modificación como el resto de los componentes son completamente inocuos para la salud de las personas y/o para el medio ambiente y que además cumple con la condición de ser biodegradable.

En este estudio, se llevó a cabo la preparación de nuevos materiales biodegradables a través de la metodología “*casting*” de SPI entrecruzada con diferentes cantidades de un agente de entrecruzante no tóxico (Gen). Estos materiales adquirieron una coloración azul oscuro volviéndose más opacos con el aumento del entrecruzamiento. La eficiencia de la reacción fue evidenciada por FT-IR y por la determinación de los grupos amino libres en las matrices. Diversos ensayos se llevaron a cabo para demostrar el potencial de Gen para mejorar las propiedades de la película de SPI. Se describieron mejoras importantes en propiedades fundamentales de las películas, entre las que se puede enumerar la marcada disminución de la solubilidad y del hinchamiento en agua y la disminución en la permeabilidad al vapor de agua. Además, se han logrado mejoras en las propiedades mecánicas con pequeñas cantidades de Gen adicionada (aumento de los valores de TS y E), mientras que grandes cantidades de Gen produjeron disminución en los valores de E, aunque sin cambios significativos en TS. Otros estudios realizados revelaron que el tiempo de biodegradación de las películas puede ser controlado o modificado desde 14

hasta al menos 33 días. Todas las optimizaciones de estas propiedades logran aumentar la aplicabilidad de estos materiales ya sea como películas en envases o recubrimientos biodegradables, dispositivos de liberación controlada de fármacos u otras aplicaciones industriales. El uso de materiales naturales y biodegradables con propiedades mejoradas tales como proteína de soja entrecruzada, proporciona una valiosa oportunidad para reemplazar los plásticos convencionales derivados del petróleo, adicionándole a su vez, mayor valor agregado a este abundante residuo agrícola.

III.5. Bibliografía

- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., Rubini, K., 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 23, 4827–4832.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., Roveri, N., 2001. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* 22, 763–768.
- Chang, W.-H., Chang, Y., Lai, P.-H., Sung, H.-W., 2003. A genipin-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14, 481–495.
- Cho, S.Y., Park, J.W., Batt, P.H., Thomas, R.L., 2007. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. *LWT-Food Sci. Technol.* 40, 418–423.
- Denavi, G., Tapia-Blácido, D.R., Añón, M. C., Sobral, P.J.A., Mauri, A. N., Menegalli, F.C., 2009. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering* 90, 341–349.
- Djerassi, C., Nakano, T., James, A.N., Zalkow, L.H., Eisenbraun, E.J., Shoolery, J.N., 1960. Structure of Genipin. *The Journal of Organic Chemistry* 26, 1192–1206.
- Duan, L., Jin, B., Gao, L., 2012. Genipin-crosslinked soybean protein/chitosan hydrogels for controlled release. *CIESC Journal* 63, 969–969.
- Fujikawa, S., Yokota, T., Koga, K., Kumada, J., 1987. The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized β -glucosidase on calcium alginate gel. *Biotechnology Letters* 9, 697–702.
- Kim, K.M., W., Curtis L, H., Milford A, Gennadios, A., 2002. Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *Water* 145, 140–145.
- Lee, S., Lim, J., Bhoo, S., Paik, Y., Hahn, T., 2003. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Analytica Chimica Acta* 480, 267–274.

- Marquié, C., 2001. Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4676–4681.
- Martucci, J.F., Ruseckaite, R.A., 2009. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability* 94, 1307–1313.
- Mauri, A. N., Añón, M. C., 2006. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of Science of Food and Agriculture* 86, 1064–1072.
- Muzzarelli, R.A.A., 2009. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers* 77, 1–9.
- Park, S.K., Bae, D.H., Rhee, K.C., 2000. Soy protein biopolymers cross-linked with glutaraldehyde. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77, 879–884.
- Patil, R.D., Mark, J.E., Apostolov, A. Vassileva, E. Fakirov, S., 2000. Crystallization of water in some cross-linked gelatins. *Eur. Polym. J.* 36, 1700–1706.
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C. L., Cezeirat, C., Hanna, M. A., 1998. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Ind. Crops Prod.* 8, 195–203.
- Song, F., Zhang, L., 2009. Gelation modification of soy protein isolate by a naturally occurring cross-linking agent and its potential biomedical application. *Methods* 7077–7083.
- Strauss, G., Gibson, S.M., 2004. Plant phenolics as cross-linker of gelatin gels and gelatin based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids* 18, 81–89.
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. L. H., Tsai, C.C., 1999. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 10, 63–68.
- Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., 1994. Studies on the blue pigments produced from Genipin and methylamine. II. On the formation mechanisms of brownish-res dintermediates leading to the blue pigment formation. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 1571–1578.
- Tyllianakis, P.E., Karabakos, S.E., Evangelatos, G.P., Ithakissios, D.S., 1993. Colorimetric determination of reactive primary amino groups of macro and micro solid supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38, 15–25.

- Vaz, M.C., 2005. Processing and characterization of biodegradable soy plastics: effect of cross-linking with glyoxal and thermal treatment. *J. Appl. Polym. Sci.* 97, 604–610.
- Y. Nayudamma, Thomas Joseph, K., Bose, S.M., 1961. Studies on the interaction of collagen with dialdehyde starch. *American Leather Chemist Association* 56, 548-556.
- Yao, C., Liu, B., Chang, C., 2004. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Materials Chemistry and Physics* 83, 204–208.
- Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Utturkar, G., Haggard, W. O., Yang, Y., Ong, J. L., Bumgardner, J.D., 2007. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr. Polym.* 68, 561–567.

Capítulo IV

Entrecruzamientos covalentes y no covalentes:

Obtención y caracterización de películas Ch-Gen-PVP

Capítulo IV

Entrecruzamientos covalentes y no covalentes: Obtención y caracterización de películas Ch-Gen-PVP

En este capítulo se describe la obtención de películas de quitosano (Ch) entrecruzadas covalentemente con genipina (Gen) (entrecruzante biodegradable y biocompatible) y no covalentemente con poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP). Se evaluará el efecto causado por los dos agentes entrecruzantes sobre las películas buscando una optimización de las propiedades deficientes del material de partida. Además se ensayarán las propiedades de liberación controlada de fármacos que el material posee por su naturaleza entrecruzada.

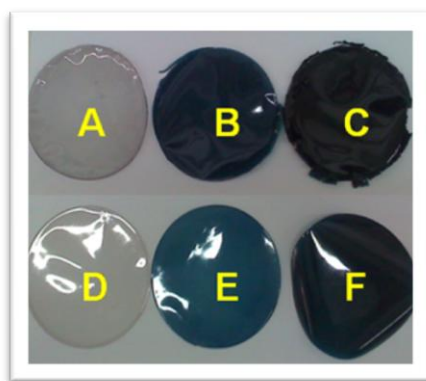


Figura IV.1. Fotografías de los films entrecruzados: Ch-Gen 0,1% (A); Ch-Gen 1% (B); Ch-Gen 3,25% (C) y Ch-Gen 0,1%-PVP (D); Ch-Gen 1%-PVP (E); Ch-Gen 3,25%-PVP (F).

IV.1. Introducción

Polisacáridos como fuente de biomateriales: el quitosano

Los polisacáridos son polímeros, cuyos monómeros constituyentes son monosacáridos, unidos mediante enlaces glicosídicos, que cumplen principalmente funciones estructurales y de reserva energética.

Entre los polisacáridos utilizados para la formación de películas o recubrimientos se incluyen la celulosa, derivados de almidón, derivados de pectina, extractos de algas y quitosano.

En particular, el quitosano (Ch) ha atraído recientemente mucha atención de los investigadores en todo el mundo (Adali y Yilmaz, 2009; Lin et al., 2009; Sagheer et al., 2009; Zhang et al., 2009).

El Ch se obtiene por desacetilación de la quitina en presencia de bases. La quitina es el segundo biopolímero más abundante de origen natural (después de la celulosa) y se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos y en las paredes celulares de los hongos y otros organismos. Se trata principalmente de poli $[\beta\text{-(1-4)-2-acetamida-D-glucosa}]$, que estructuralmente es idéntica a la celulosa excepto que el hidroxilo secundario en el segundo átomo de carbono de la unidad de hexosa es sustituido por un grupo acetamida. La estructura del Ch puede ser observada en la Figura IV.1.1. El Ch se describe en términos del grado de desacetilación y el peso molecular medio y su importancia reside en sus propiedades antimicrobianas en conjunto con su carácter catiónico y sus excelentes propiedades de formación de películas (Muzzarelli, 1996). El Ch forma películas claras, resistente, flexibles y de buenas propiedades de barrera al oxígeno (Kaplan et al., 1993).

Este material es soluble en medios ácidos acuosos debido a la presencia de grupos amino; sus soluciones viscosas se pueden utilizar para producir geles en diversas formas, por ejemplo, perlas, membranas, revestimientos y fibras. El Ch se ha utilizado en una amplia gama de aplicaciones en los campos de la alimentación, agricultura y tratamiento de

residuos, cosméticos, ciencia de los materiales, biotecnología, fármacos y productos biofarmacéuticos, y más recientemente en la terapia génica (Harish Prashanth y Tharanathan, 2007).

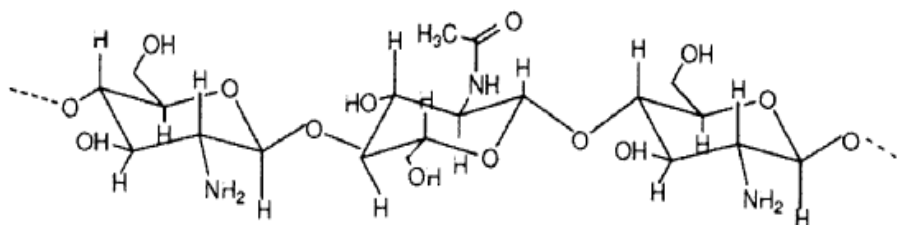


Figura IV.1.1. Estructura del Ch.

Películas de Ch y sus aplicaciones

El Ch es uno de los materiales más estudiados sobre todo para la administración de fármacos. Este material se ha utilizado para este fin por su biocompatibilidad, biodegradabilidad formando productos inofensivos, inercia fisiológica y alta hidrofiliidad (Ms et al., 2008; Qian y X. Yang, 2006; Q. Wang et al., 2007).

La biodegradabilidad, biocompatibilidad y bioadhesividad del Ch (generada por las cargas positivas presentes en condiciones fisiológicas) son propiedades útiles en formulaciones con fines de uso como sistemas de liberación de fármacos en sistemas bucales. Sin embargo, muchas veces, los perfiles de liberación alcanzados mediante la utilización de estos materiales hidrofílicos no son satisfactorios por liberar la totalidad del fármaco contenido en un tiempo demasiado corto. Por esto, a menudo se recurre a la modificación de estos materiales por reacciones de entrecruzamiento para intentar mejorar y optimizar la velocidad de liberación.

Reacciones de entrecruzamiento en películas de Ch

La formación de entrecruzamientos sobre películas hidrofílicas ayuda a optimizar los perfiles de liberación de fármacos hidrosolubles limitando la absorción de agua dentro de la red polimérica (y por ende limitando la

expansión de la misma), disminuyendo la tasa de difusión de los fármacos desde el interior de la matriz hasta el sitio donde será liberado. Además, frecuentemente es necesario entrecruzar al Ch para mejorar las propiedades mecánicas del material y de esta forma acceder a potenciales aplicaciones en la liberación controlada de fármacos (Lewandowska, 2011). Varios reactivos, incluidos el glutaraldehído y compuestos epoxi, han sido utilizado como agentes entrecruzantes de Ch (Beppu et al., 2007; Gupta y Jabrail, 2007; Lewandowska, 2011; Fwu-Long Mi et al., 2001, 2000). Sin embargo, la mayoría de estos agentes entrecruzantes se encuentran sujetos a problemas causados por su toxicidad fisiológica. Existen otros agentes entrecruzantes tales como la genipina (Gen), glioxal y polímeros tales como la poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) que están siendo investigados por sus posibles aplicaciones en el campo biomédico (A. González et al., 2011; Fwu-Long Mi et al., 2002; B.-L. Wang et al., 2012; Zerrouk et al., 2004).

En bibliografía se encuentran descriptos diversos casos donde el uso de Gen como agente entrecruzante dio lugar a mejoras en las propiedades mecánicas y en la estabilidad de las películas en agua en diversas matrices (A. González et al., 2011; Jin et al., 2004). Incluso, en este trabajo de tesis, se encuentran descriptas mejoras logradas en las propiedades de películas de proteína de soja utilizando Gen como agente entrecruzante (capítulo III) tales como reducción en la cantidad de materia soluble total, permeabilidad al vapor de agua e hinchamiento y optimización de las propiedades mecánicas.

Gen es un agente entrecruzante no-tóxico de origen natural que puede reaccionar espontáneamente con grupos amino primarios por ejemplo de aminoácidos o proteínas para formar pigmentos de color azul oscuro. La descripción y características de este agente entrecruzante se encuentra ampliamente desarrollada en la Sección III.1 de este trabajo de tesis.

Por lo general, las películas a las que se les han realizado entrecruzamientos covalentes, exhiben buenas propiedades generales, aunque no es la única estrategia disponible. Los hidrogeles de Ch entrecruzados iónicamente ofrecen más posibilidades como sistemas de

administración de fármacos en comparación con los hidrogeles entrecruzados covalentemente (Lewandowska, 2011; B. L. Wang et al., 2012; Zerrouk et al., 2004). PVP es un agente entrecruzante que forma enlaces puente hidrógeno con los grupos aminos e hidroxilos presentes en Ch. Películas formadas a partir de mezclas de PVP y Ch han sido descritas anteriormente, demostrando que pueden ser utilizadas como material para aplicaciones biomédicas (Demirci et al., 2009). Además, se ha demostrado que la adición de PVP es beneficiosa para la estabilidad térmica de Ch, sin embargo, una disminución en sus propiedades tensiles también ha sido descrita (Jen-Taut et al., 2006). Por esto, estas películas entrecruzadas de manera no covalente se encuentran limitadas en su uso y aplicación. En esta parte del trabajo, se combinarán estos dos tipos de entrecruzamientos (covalentes y no covalentes) con el objetivo de aprovechar las ventajas brindadas al material por cada tipo de entrecruzamiento, con el fin de superar las propiedades no deseables de cada metodología individual. De esta forma, las películas de Ch entrecruzado podrían ser aplicadas en el área biomédica, por ejemplo, como dispositivo de administración de fármacos en sistemas bucales. En estos sistemas, los dispositivos en forma de películas son generalmente preferidos por sus características en términos de flexibilidad y comodidad. Estos sistemas de liberación pueden superar ampliamente a los sistemas de dosificación utilizados en la actualidad. Por ejemplo, el sistema tópico de gotas es altamente ineficiente ya que el fármaco permanece escaso tiempo en contacto con el sitio a actuar, siendo en gran medida ingerido por el paciente. Además, este sistema requiere de varias aplicaciones al día con la incomodidad que esto implica. Por otro lado, los sistemas en forma de geles son también superados por las películas bioadhesivas ya que estas pueden permanecer por más tiempo respecto al tiempo de residencia relativamente corto de los geles bucales en la mucosa, a causa de que suelen ser fácilmente eliminados por la saliva y los movimientos de la boca. Por otra parte, las películas bioadhesivas son capaces de proteger la superficie del sitio donde debe actuar (por ejemplo en

heridas) y ayudar a reducir el dolor, actuando en el tratamiento de enfermedades bucales de forma más efectiva (Silva et al., 2008).

Los aspectos más destacados en este trabajo de investigación se relacionan con el hecho de que representa el primer informe donde se utiliza la combinación de dos agentes entrecruzantes, uno no covalente (iónico) y otro covalente, para la obtención de películas. Así, se estudió la preparación de películas de Ch entrecruzado con diferentes cantidades de los agentes de entrecruzamiento PVP y Gen. Además, se evaluaron los efectos de los distintos tipos de entrecruzamiento sobre las propiedades de las películas de Ch mediante el uso de hidrocloreuro de propranolol como fármaco modelo analizando el comportamiento de estas películas como dispositivo de liberación de fármacos.

Todos los resultados mostrados correspondientes a este Capítulo de la Tesis Doctoral, fueron obtenidos en colaboración con las Dras. Marisa Martinelli y Ana Agustina Aldana del departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

IV.2. Resultados

IV.2.1. Preparación y caracterización química de las películas Ch-Gen y Ch-Gen-PVP

Se prepararon películas entrecruzadas utilizando Ch como matriz y Gen y PVP como agentes entrecruzantes. Las películas se prepararon utilizando diferentes proporciones de Gen / Ch en ausencia de PVP (películas Ch-Gen 0,10%; Ch-Gen 1,00% y Ch-Gen 3,25%) y en presencia de PVP al 18% (masa de PVP respecto de la masa de Ch) (películas Ch-Gen 0,10%-PVP; Ch-Gen 1,00%-PVP y Ch-Gen 3,25%-PVP). Para la formación de la red entrecruzada, la Gen reacciona químicamente con los grupos amino de las cadenas de Ch mientras que las cadenas poliméricas del PVP se enredan interaccionando físicamente con la red de Ch. Los enlaces e interacciones presentes entre la matriz y los entrecruzantes puede observarse en la Figura IV.2.1.1. Las películas Ch-Gen adquirieron una coloración azulada, cuya intensidad dependió del grado de entrecruzamiento alcanzado. La apariencia de las películas preparadas puede ser observada en la Figura IV.2.1.2. Esta coloración fue anteriormente observada para películas de SPI y descrita en el capítulo III (A. González et al., 2011).

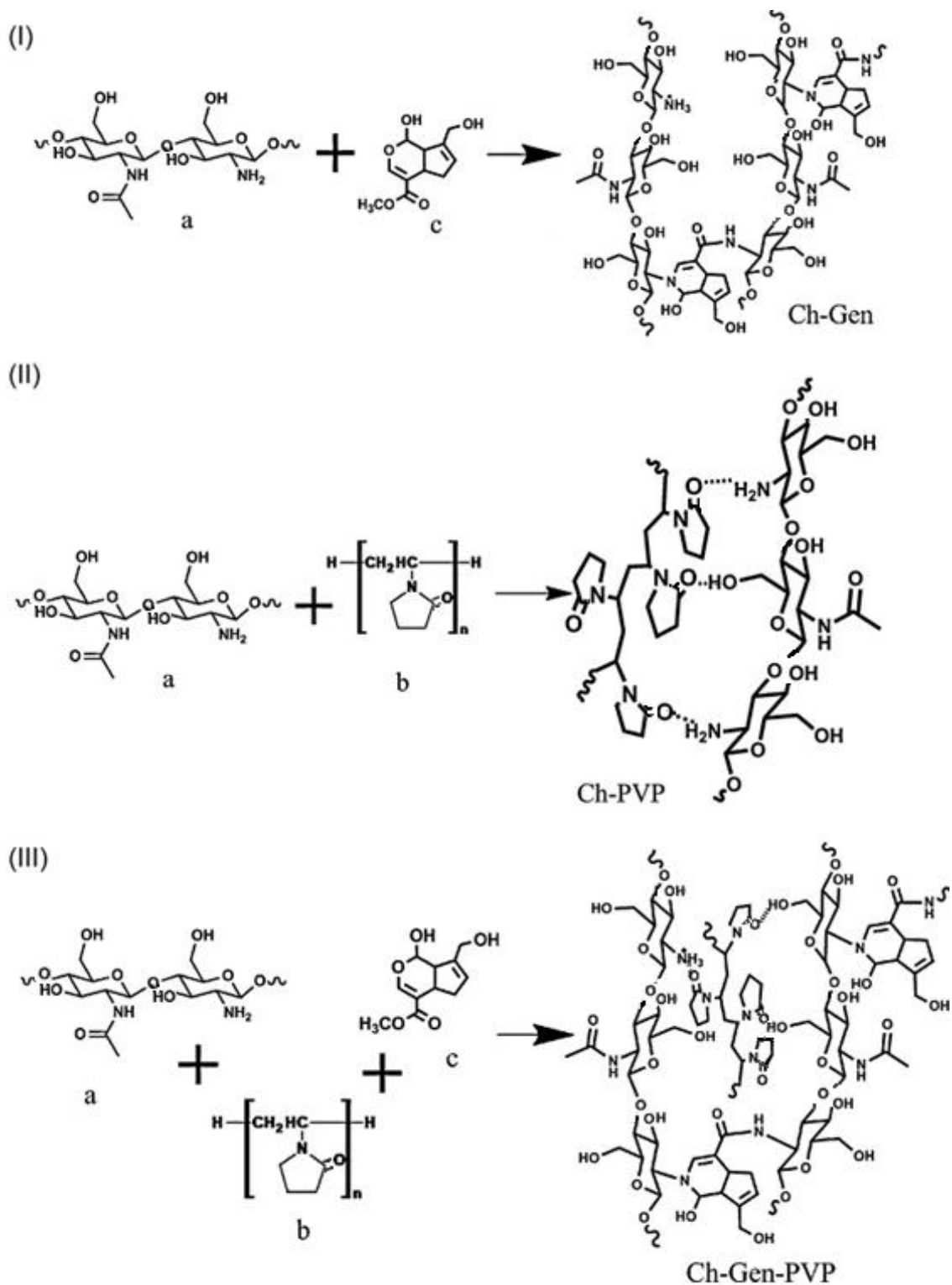


Figura IV.2.1.1. Esquema de reacción entre (I) Ch (a) y Gen (c); (II) Ch y PVP (b) y (III) Ch, Gen y PVP.

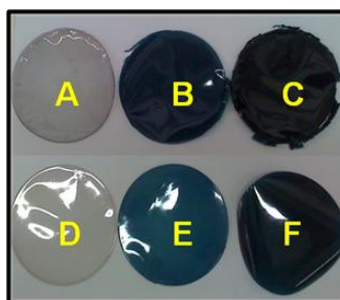


Figura IV.2.1.2. Aspecto macroscópico de las películas entrecruzadas: Ch-Gen 0,1% (A); Ch-Gen 1% (B); Ch-Gen 3,25% (C); Ch-Gen 0,1%-PVP (D); Ch-Gen 1%-PVP (E) y Ch-Gen 3,25%-PVP (F).

Se evaluó la variación del grado de entrecruzamiento logrado para cada película mediante la utilización de distintas proporciones de Gen en presencia y ausencia de PVP. Para esto, se determinó la concentración de grupos amino libres mediante el test de la ninhidrina. El Ch nativo (85% de grado de desacetilación) se empleó como blanco y el grado de entrecruzamiento (CL%) de las muestras se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$CL\% = \frac{[(NH_2 \text{ libres}) Ch - (NH_2 \text{ libres}) película]}{(NH_2 \text{ libres}) Ch} \times 100$$

donde $[(NH_2 \text{ libres}) Ch]$ es la fracción molar de aminos libres en la muestra en ausencia de entrecruzantes y $[(NH_2 \text{ libres}) película]$ es la fracción molar de aminos libres que quedan en las muestras luego del entrecruzamiento. Esta determinación fue realizada por triplicado. Los resultados pueden observarse en la Tabla IV.2.1.1.

Se puede observar que el CL% aumenta a medida que la concentración de Gen es mayor. El mismo comportamiento también fue descrito en el capítulo III de esta tesis para películas de SPI (A. González et al., 2011).

La adición de PVP produjo un aumento del grado de entrecruzamiento en relación a las películas de Ch con la misma cantidad de Gen, debido a la facilidad de formación de interacciones puente hidrógeno entre los dos polímeros. Este efecto hace que los grupos amino se encuentren menos

expuestos y por ende no puedan ser cuantificados mediante esta determinación. La misma razón es la que explica el gran CL% determinado para la película Ch-PVP. En este caso, las cadenas proteicas se encuentran más libres en sus movimientos por la ausencia de Gen, por lo que se disponen espacialmente de una forma que permite al PVP interactuar con la mayoría de los grupos amino de las proteínas.

Los grados de entrecruzamiento determinados mediante el test de la ninhidrina se correspondieron cualitativamente con la intensidad de la coloración de cada película.

Película	CL% (%)
Ch-PVP	93,17
Ch-Gen 0,1%	34,12
Ch-Gen 1%	58,36
Ch-Gen 3,25%	66,47
Ch-Gen 0,1%-PVP	44,33
Ch-Gen 1%-PVP	66,37
Ch-Gen 3,25%-PVP	78,95

Tabla IV.2.1.1. Grados de entrecruzamiento logrado (CL%) para las películas entrecruzadas covalentemente, no covalentemente y mediante la combinación de ambos entrecruzamientos.

Se realizaron estudios de espectroscopía infrarroja para lo cual se registraron espectros FT-IR de las películas entrecruzadas. Los mismos pueden ser observados en la Figura IV.2.1.3. Se pudo observar que después de la formación de los entrecruzamientos, no se observa la señal correspondiente al grupo éster de Gen, mientras que se puede apreciar la banda de amida a 1640 cm^{-1} , lo que sugiere que el grupo éster de Gen sufre transformaciones hasta formar una amida N-sustituida. Para las películas preparadas con mayores concentraciones de Gen (3,25%), se observó un aumento de la intensidad relativa a 1640 cm^{-1} , mientras que disminuyó la intensidad de la banda a 1567 cm^{-1} (F. L. Mi et al., 2002). Dos bandas anchas pueden ser observadas en el espectro IR de la película que contiene PVP: a

1653 cm^{-1} la vibración de estiramiento CO de PVP se solapa con la banda correspondiente a la vibración CO del grupo amida del producto; a 1560 cm^{-1} también hay una superposición entre la vibración HNH de Ch y la banda correspondiente a la vibración NH del grupo amida (Aldana et al., 2012).

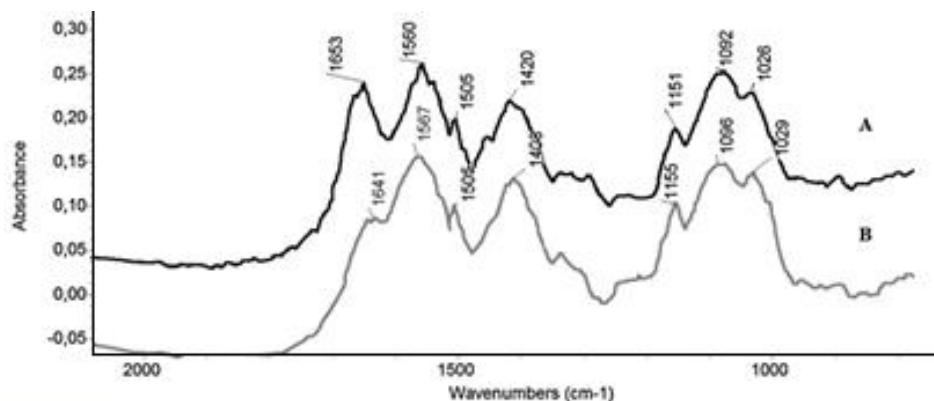


Figura IV.2.1.3. Espectros FT-IR de los films entrecruzados. Ch-Gen 3,25%-PVP (A) y Ch-Gen 3,25% (B).

Por otro lado, se realizaron estudios de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) para lo cual se registraron los correspondientes espectros. La Figura IV.2.1.4 muestra el espectro de RMN ^{13}C de la película Ch-Gen-0,10% hinchada en D_2O . Las señales de RMN ^{13}C propias del Ch son reportadas en la literatura (F-L Mi et al., 2000). La señal a 23,0 ppm correspondiente a los grupos alquílicos en la red de Ch puede ser atribuida a la presencia de Gen. Por otro lado, se observa la desaparición de la señal a 170,5 ppm correspondiente al carbono carbonílico del grupo éster de Gen, y la aparición de la resonancia a 181,3 ppm puede ser atribuida al carbono del carbonilo del grupo amida formado a partir de la reacción. El aumento del corrimiento químico del C-1 del Ch a 99,3 ppm puede ser resultado del enlace al anillo heterocíclico de la Gen (F-L Mi et al., 2000).

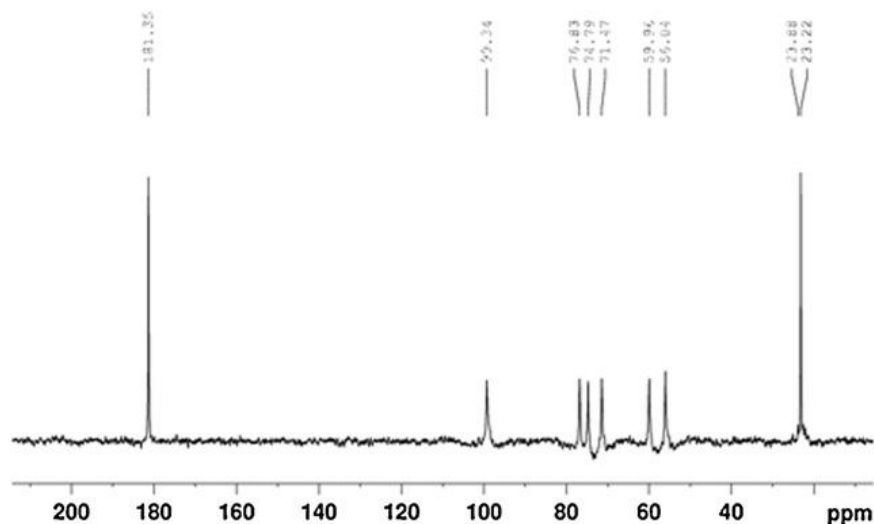


Figura IV.2.1.4. Espectro RMN ^{13}C de la película Ch-Gen-0,10% en D_2O .

IV.2.2. Caracterización física y térmica de las películas Ch-Gen y Ch-Gen-PVP

Se ensayaron las propiedades de hinchamiento de las películas entrecruzadas en buffer fosfato pH 7,0. Para esto, se sumergieron pequeñas porciones de cada película previamente pesadas en solución buffer por 7 h a temperatura ambiente. Se eligió este período ya que representa un tiempo aceptable de dosificación de fármacos. Las películas fueron retiradas a distintos tiempos, secadas en su superficie y pesadas. La figura IV.2.2.1 (A y B) representa el grado de hinchamiento de cada película en solución buffer pH 7,0.

De los resultados obtenidos se observó que el máximo hinchamiento se alcanzó con las formulaciones que contienen baja proporción de Gen. A su vez, la adición de PVP redujo ligeramente el grado hinchamiento de las películas. Este tipo de comportamiento para las películas de Ch que contienen PVP puede explicarse por el hecho de que las fuertes interacciones intermoleculares entre las moléculas de Ch y PVP producen distancias intermoleculares más cortas entre las cadenas, formando una red más compacta. El efecto producido por Gen pudo ser observado claramente ya que estos resultados fueron consistentes con los obtenidos para el grado de

entrecruzamiento. Esta disminución del hinchamiento a medida que aumenta el grado de entrecruzamiento se debe a que las redes entrecruzadas son más rígidas y menos expandibles. Por otro lado, también se pudo observar que la velocidad de hinchamiento fue mayor para películas Ch-Gen-PVP que para películas Ch-Gen. Por ejemplo, las películas Ch-Gen-PVP alcanzaron el máximo de hinchamiento (*plateau*) en aproximadamente 2 minutos, mientras que las películas Ch-Gen lo hicieron a los 10 minutos. El PVP se encuentra atrapado o enredado físicamente en la red de Ch, siendo su naturaleza más hidrofílica que la de Gen. Por esto, PVP le brinda mayores características hidrofílicas a la matriz por lo que el agua ingresa más rápidamente. El estado de hinchamiento de los polímeros es una característica crucial para su comportamiento bioadhesivo. La adhesión se produce poco después del comienzo del hinchamiento, pero se verá incrementado con el grado de hidratación, hasta un punto en el que la sobrehidratación conduce a un estado desenredado en la interface polímero / tejido. (Fujikawa et al., 1987). El empleo de una combinación de los agentes entrecruzantes utilizados en este trabajo podría ser un método adecuado para optimizar la bioadhesión ya que se aumenta la velocidad de absorción de agua pero se disminuye el hinchamiento total de las películas evitando de esta forma la sobrehidratación.

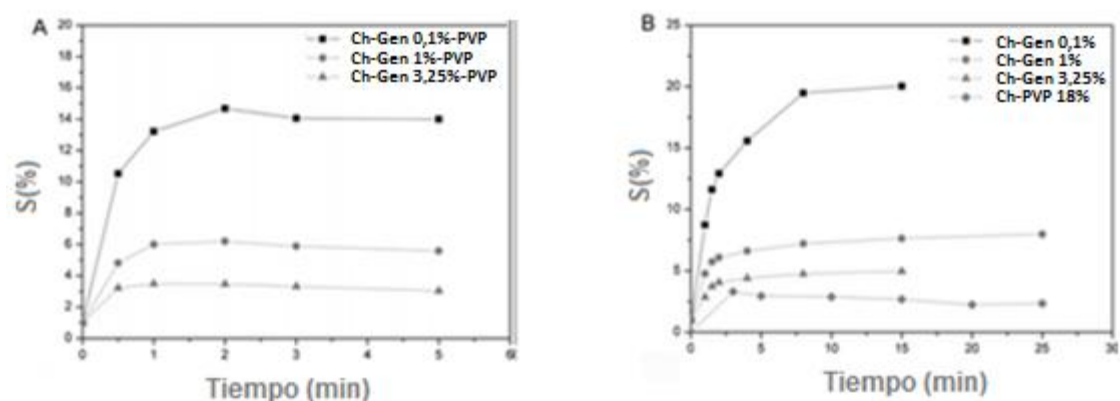


Figura IV.2.2.1. Estudios de hinchamiento en buffer fosfato pH 7,0 de las películas entrecruzadas Ch-Gen-PVP (A) y Ch-Gen y Ch-PVP (B).

El comportamiento térmico de las películas fue analizado por calorimetría diferencial de barrido (DSC). El Ch, Gen y PVP poseen grupos polares, por lo tanto el agua se absorbe en los polímeros, formando enlaces puente hidrógeno. Esto se observa mediante la aparición de un pico exotérmico débil a alrededor de 80 °C correspondiente al agua absorbida y a compuestos volátiles en las películas (Coelho et al., 2007). Además, se pudo observar un pico exotérmico alrededor de 160 °C que representa el acontecimiento térmico más importante dado por el agua absorbida en el material polimérico. La temperatura de comienzo de la degradación termo-oxidativa de las películas se observa próximo a los 300 °C. Estos picos se han reportado en bibliografía como degradación de los anillos del polisacárido, deshidratación, descomposición y despolimerización (Santos et al., 2008).

La Tabla IV.2.2.1 compara las temperaturas de descomposición.

En ella puede observarse que la modificación de Ch con Gen y PVP aumenta ligeramente la estabilidad de las películas en relación con Ch puro ya que las descomposiciones tienen lugar a mayores temperaturas.

Película	Temperatura de descomposición (°C)
Ch	289
Ch-Gen 0,1%	286
Ch-PVP 18%	290
Ch-Gen 0,1%-PVP	295

Tabla IV.2.2.1. Temperaturas de descomposición térmica de las películas determinadas por DSC.

IV.2.3. Caracterización mecánica de las películas Ch-Gen y Ch-Gen-PVP

Las propiedades mecánicas juegan un papel crucial en la integridad física y en la manipulación de los sistemas de dosificación bucal de fármacos. Varias propiedades pueden ser evaluadas a partir de una curva de tensión-

deformación obtenidas en ensayos de tracción, sin embargo, la resistencia a la tracción (TS) y la elongación a la rotura (EB) resultan ser las propiedades más relevantes para el estudio de las propiedades mecánicas en películas. Las propiedades mecánicas deseadas variarán dependiendo de los objetivos del trabajo o de la aplicación que se le dé a las películas. Una TS y una EB moderada son propiedades adecuadas para una película con aplicación en liberación de drogas en un sistema bucal.

Como puede ser observado en la Tabla IV.2.3.1, el rendimiento mecánico de las películas cambia con la presencia de los entrecruzamientos.

Película	Espesor (µm)	EB (%)	TS (MPa)
Ch	64,9	1,54 ± 0,2 ^c	50,2 ± 4,0 ^a
Ch-PVP	67,2	1,76 ± 0,15 ^{bc}	48,8 ± 2,4 ^a
Ch-Gen 0,10%	54,0	2,76 ± 0,12 ^a	69,4 ± 5,4 ^b
Ch-Gen 0,10%-PVP	60,5	2,46 ± 0,22 ^a	71,8 ± 2,2 ^b
Ch-Gen 1,00%	53,4	2,46 ± 0,32 ^a	79,9 ± 2,9 ^{bc}
Ch-Gen 1,00%-PVP	58,17	2,28 ± 0,11 ^{ab}	85,8 ± 3,7 ^c
Ch-Gen 3,25%	50,11	1,81 ± 0,32 ^{bc}	68,5 ± 6,7 ^b
Ch-Gen 3,25%-PVP	44,87	1,36 ± 0,2 ^c	49,4 ± 4,5 ^a

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla IV.2.3.1. Espesor, elongación a la rotura (EB) y resistencia a la tracción (TS) de las películas.

En un primer análisis, se observó que la película Ch-PVP muestra la misma TS y EB que la película control (Ch sin entrecruzante), sin embargo, las películas entrecruzadas con pequeñas cantidades de Gen (0,1% y 1%) son dúctiles al tacto y muestran valores de TS y EB mayores que los de la película control.

La adición de PVP a las películas que contienen Gen produjo una disminución de EB y un aumento de TS. Analizando las propiedades de

elongación, se observó que los valores obtenidos para las películas Ch-Gen con pequeñas cantidades de Gen agregada, son más altos que los de la película control. Estos valores aumentaron con el contenido de Gen, probablemente debido al hecho de que pequeñas adiciones de este entrecruzante rompen algunas interacciones intrínsecas de la matriz formando redes más elongables. Cuando la cantidad de Gen añadida a las películas entrecruzadas aumentó a 3,25%, se observó una tendencia diferente. TS y EB de estas películas disminuyeron drásticamente. En altas densidades de entrecruzamiento (producidas por la gran cantidad de entrecruzante) existen restricciones en el movimiento entre las cadenas de Ch, por lo cual el material adopta propiedades mecánicas que lo hacen quebradizo y frágil. Macroscópicamente, este efecto podría ser considerado como opuesto a la acción de plastificantes. En los primeros momentos del ensayo de tracción, las cadenas posiblemente se organizan con el fin de proporcionar la mejor resistencia posible a la fuerza de tracción. Si estas cadenas no son capaces de organizarse mínimamente, la TS sería baja por lo que el material se rompería fácilmente. Probablemente, este efecto podría ser la razón por la cual en el momento del ensayo de tracción, la muestra se rompe rápidamente, obteniendo de esta forma valores bajos de TS y EB. El mismo comportamiento se describe para EB de películas de SPI en la sección III.2.4. (González et al., 2011).

Es importante señalar que, mediante la combinación de los dos agentes entrecruzantes (utilizando concentraciones medias de Gen), es posible obtener un material adecuado cuyas propiedades mecánicas son optimizadas (mayores valores de TS y EB) con respecto al material de partida.

IV.2.4. Ensayos de liberación *in-vitro* de fármacos

Debido a las propiedades biocompatibles y bioadhesivas y a la naturaleza hidrofílica y entrecruzada que poseen las películas preparadas,

es que se determinó el comportamiento de las mismas en ensayos de liberación controlada de fármacos.

Las películas fueron formadas conteniendo 37,5 mg de clorhidrato de propranolol (25 % m/m respecto de la masa de Ch) y cortadas en trozos de 0,1 g. El clorhidrato de propranolol (Figura IV.2.4.1.), es un fármaco ligeramente soluble en agua que fue utilizado como droga modelo.

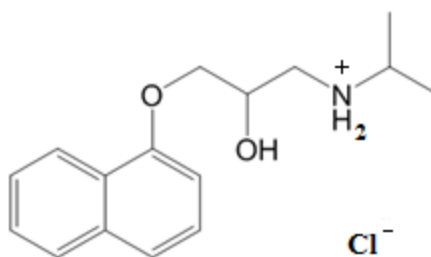


Figura IV.2.4.1. Estructura del clorhidrato de propranolol

Se ensayó la liberación de esta droga en sistemas acuosos (buffer fosfato pH 7,0), determinando la concentración de la misma en agua mediante espectrofotometría UV-Visible.

La Figura IV.2.4.1 muestra los perfiles de liberación obtenidos con cada película. Según los resultados obtenidos, la incorporación de PVP afecta el proceso de liberación del fármaco. En el estado de equilibrio, las películas Ch-Gen-PVP liberan mayores porcentajes de fármaco que las películas que no contienen PVP, comparando a iguales porcentajes de Gen. Durante el tiempo que duró el ensayo (7 h), el clorhidrato de propranolol fue liberado, en un 80%, 60,5% y 70% del total agregado en la preparación de las películas Ch-Gen 0,1%, Ch-Gen 1,0% y Ch-Gen 3,25%, respectivamente. La adición del PVP aumenta la liberación a 87,5%, 67,5 y 75% para las películas Ch-Gen 0,1%-PVP, Ch-Gen 1,0%-PVP y Ch-Gen 3,25%-PVP, respectivamente. Este comportamiento podría surgir del aumento de la hidrofiliidad de la matriz producido por la presencia de PVP. Debido al cierto carácter hidrofóbico del clorhidrato de propranolol, es que las posibles interacciones entre el fármaco y la red polimérica se ven debilitadas, lo que facilita su eliminación de la red. Además, las interacciones existentes entre el Ch y la PVP probablemente se ven disminuidas ya que la droga presente

se “interpone” entre las cadenas poliméricas, permitiendo una mayor expansión entre las cadenas, facilitando de esta forma la liberación de la misma.

Se puede observar claramente que en la película Ch-Gen 0.1%-PVP, el fármaco puede difundir fácilmente desde el interior de la matriz durante un período especialmente corto (aproximadamente 30 minutos). Esta película tiene suficientes grupos amino e hidroxilo libres (y por ende una gran hidrofiliidad) para formar una cantidad significativa de enlace puente hidrógeno con el solvente y bajo porcentaje de entrecruzamiento. Estos factores son los que le posibilitan alcanzar alto grado de hinchamiento lo que facilita la remoción del fármaco del interior de la matriz.

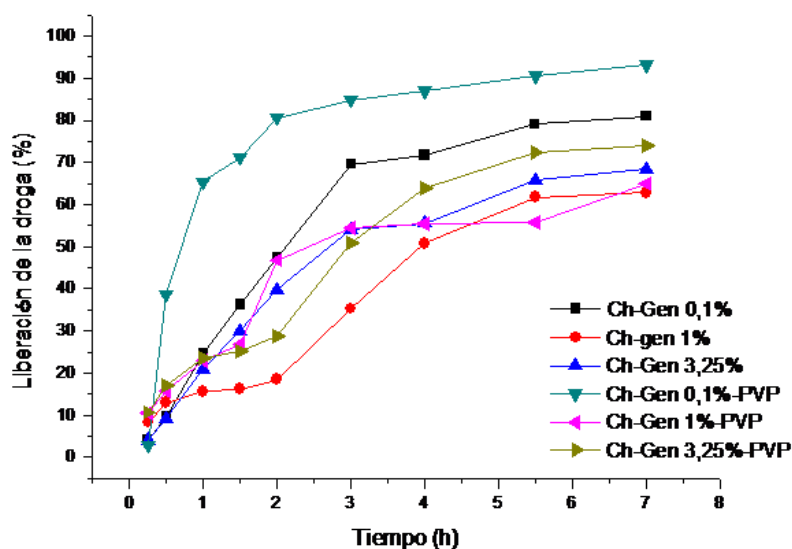


Figura IV.2.4.1. Ensayo de liberación *in-vitro* de clorhidrato de propranolol incorporado en las películas entrecruzadas, en buffer fosfato pH 7,0.

IV.3. Discusión

En la Figura IV.3.1 se puede observar la variación en el hinchamiento de las películas de acuerdo al porcentaje de Gen agregada. Es posible observar que este factor se ve altamente afectado por el grado de entrecruzamiento producido por Gen y por la incorporación de PVP en las redes. Esta modificación genera que la difusión de agua hacia la red polimérica se produzca en menor grado. La película Ch-PVP mostró una naturaleza rígida de acuerdo con las propiedades mecánicas, mostrando el menor hinchamiento. A su vez, se observa una modificación del comportamiento de liberación de cada película de acuerdo a la cantidad de Gen agregada y a la presencia o no de PVP (Figura IV.3.1). Realizando un análisis comparativo de los porcentajes de liberación y del índice de hinchamiento para las películas con 0,1 y 1,0% de Gen (Ch-Gen 0,1%, Ch-Gen 1,0% y Ch-Gen 0,1%-PVP, CH-Gen 1,0%-PVP) podemos observar que la velocidad de liberación de la droga y el hinchamiento disminuyen con el aumento del grado de entrecruzamiento, mostrando una relación muy marcada entre estas dos propiedades. En las películas con 1,0% de Gen, la difusión del fármaco desde la red se ve obstaculizada y su liberación se produce en menor grado. Al aumentar la cantidad de Gen hasta 3,25%, el grado de entrecruzamiento logrado es mayor, siendo Ch-Gen 3,25%-PVP una red particularmente rígida. Para estas películas se observa que el índice de hinchamiento disminuye pero el porcentaje de liberación de clorhidrato de propranolol aumenta. Esto puede ser explicado por el hecho de que Gen además de entrecruzar covalentemente las cadenas de Ch, podría reaccionar con sí misma para formar oligómeros. Estos oligómeros podrían reaccionar entonces con los grupos amino de la matriz formando redes entrecruzadas pero de mayor distancia entre las cadenas. Este cambio estructural favorecería la difusión de la droga desde el interior de la matriz.

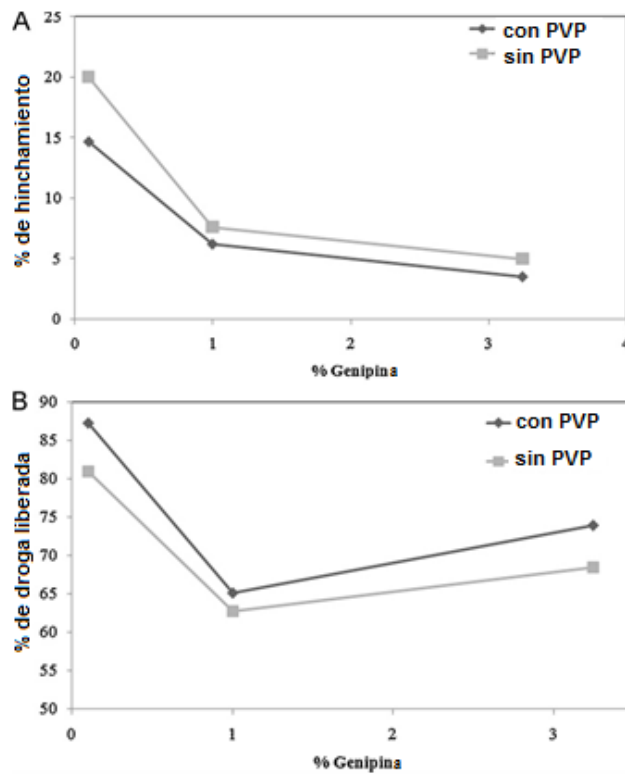


Figura IV.3.1. Variación del hinchamiento (A) y del porcentaje de droga liberada (B) de las películas entrecruzadas con diferente cantidad de Gen obtenidas en presencia y ausencia de PVP.

IV.4. Conclusiones parciales

En este capítulo se describió la síntesis de películas de Ch entrecruzadas con dos agentes distintos. Estos dos agentes entrecruzantes difieren entre sí en las interacciones que mantienen con la matriz del polisacárido. Gen entrecruza formando uniones químicas covalentes mientras que la PVP forma interacciones del tipo puente hidrógeno con Ch. Las películas preparadas fueron evaluadas como potenciales dispositivos de liberación de fármacos utilizando una droga modelo, determinando además los efectos y contribuciones brindadas por el entrecruzamiento físico y químico sobre propiedades tales como el hinchamiento en agua, propiedades mecánicas y térmicas. De acuerdo con los resultados obtenidos, las mejores propiedades se obtuvieron con las películas Ch-Gen 0,10% y Ch-Gen 0,10%-PVP debido a que la liberación del fármaco fue mayor al 80% en un plazo de 7 h, lo que representa un período de dosificación óptimo. Además, estas películas mostraron una mejora en sus propiedades térmicas y mecánicas en relación al material de partida (Ch). De acuerdo a las propiedades generales que han sido optimizadas en esta parte del trabajo, sumadas a las propiedades inherentes del material base como lo son la bioadhesividad y la biocompatibilidad, hacen de las películas de Ch entrecruzadas con Gen y PVP buenos candidatos para potenciales aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos en sistemas bucales (Aldana et al., 2012).

IV.5. Bibliografía

- Adali, T., Yilmaz, E., 2009. Synthesis, characterization and biocompatibility studies on chitosan-graft-poly(EGDMA). *Carbohydrate Polymers* 77, 136–141.
- Aldana, A.A., González, A., Strumia, M.C., Martinelli, M., 2012. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chemistry and Physics* 134, 317–324.
- Beppu, M.M., Vieira, R.S., Aimoli, C.G., Santana, C.C., 2007. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science* 301, 126–130.
- Coelho, T.C., Laus, R., Mangrich, A.S., De Fávère, V.T., Laranjeira, M.C.M., 2007. Effect of heparin coating on epichlorohydrin cross-linked chitosan microspheres on the adsorption of copper (II) ions. *Reactive and Functional Polymers* 67, 468–475.
- Demirci, S., Alaslan, A., Caykara, T., 2009. Preparation, characterization and surface pKa values of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/chitosan blend films. *Applied Surface Science* 255, 5979–5983.
- Fujikawa, S., Yokota, T., Koga, K., Kumada, J., 1987. The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized β -glucosidase on calcium alginate gel. *Biotechnology Letters* 9, 697–702.
- Gallagher, K.M., Corrigan, O.I., 2000. Mechanistic aspects of the release of levamisole hydrochloride from biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release* 69, 261–272.
- González, A., Strumia, M. C., Alvarez Igarzabal, C.I., 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering* 106, 331–338.
- Gupta, K.C., Jabrail, F.H., 2007. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled release of centchroman. *Carbohydrate Research* 342, 2244–2252.
- Harish Prashanth, K. V, Tharanathan, R.N., 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology* 18, 117–131.
- Jacek Balcerzak, M.M., 2010. Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives, vol. XV, Polish Chitin Society, Lodz, Poland.

- Jen-Taut, Y., Chen, C.-L., Huang, K.S., Nien, Y.H., Chen, J.L., Huang, P.Z., 2006. Synthesis, characterization, and application of PVP/chitosan blended polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 101, 885–891.
- Jin, J., Song, M., Hourston, D.J., 2004. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules* 5, 162–168.
- Kaplan, D.L., Mayer, J.M., Ball, D., McCassie, J., Allen, A.L., Stenhouse, P., 1993. *Fundamental of biodegradable polymer. Biodegradable Polymers and Packaging.*
- Lee, M.-W., Yang, T.-P., Peng, H.-H., Chen, J.-W., 2012. Preparation and characterization of polygalacturonic acid/rosmarinic acid membrane crosslinked by short chain hyaluronate for preventing postoperative abdominal adhesion. *Carbohydrate Polymers* 87, 1749–1755.
- Lewandowska, K., 2011. Miscibility and interactions in chitosan acetate/poly(N-vinylpyrrolidone) blends. *Thermochimica Acta* 517, 90–97.
- Lin, S.-B., Lin, Y.-C., Chen, H.-H., 2009. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity. *Food Chemistry* 116, 47–53.
- Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S., 2002. Drug release from chitosan – alginate complex beads reinforced by a naturally occurring crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers* 48, 61–72.
- Mi, F-L, Sung, H-W, Shyu, S-S, 2000. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 38, 2804–2814.
- Mi, Fwu-Long, Kuan, C.-Y., Shyu, Shin-Shing, Lee, S.-T., Chang, S.-F., 2000. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydrate Polymers* 41, 389–396.
- Mi, Fwu-Long, Shyu, Shin-Shing, Wu, Y.-B., Lee, S.-T., Shyong, J.-Y., Huang, R.-N., 2001. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* 22, 165–173.
- Mi, Fwu-Long, Tan, Y.-C., Liang, H.-F., Sung, Hsing-Wen, 2002. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* 23, 181–191.

- Muzzarelli, R.A.A., 1996. Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymer* 29, 309–316.
- Noel, S.P., Courtney, H., Bumgardner, J.D., Haggard, W.O., 2008. Chitosan films a potential local drug delivery system for antibiotics. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466, 1377–1382.
- Qian, L., Yang, X., 2006. Composite film of carbon nanotubes and chitosan for preparation of amperometric hydrogen peroxide biosensor. *Talanta* 68, 721–727.
- Sagheer, F.A. Al, Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., Elsabee, M.Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers* 77, 410–419.
- Santos, D.E.S., Neto, C.G.. T., Fonseca, J.L.C., Pereira, M.R., 2008. Chitosan macroporous asymmetric membranes—Preparation, characterization and transport of drugs. *Journal of Membrane Science* 325, 362–370.
- Siepmann, J., Peppas, N.A., 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 48, 139–157.
- Silva, C.L., Pereira, J.C., Ramalho, A., Pais, A. C., Sousa, J.J.S., 2008. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. *Journal of Membrane Science* 320, 268–279.
- Wang, B.L., Liu, X.S., Ji, Y., Ren, K.F., Ji, J., 2012. Fast and long-acting antibacterial properties of chitosan-Ag/polyvinylpyrrolidone nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers* 90, 8–15.
- Wang, Q., Dong, Z., Du, Y., Kennedy, J.F., 2007. Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan / polyethylene glycol blend Wlms. *Test* 69, 336–343.
- Yip, E.Y., Wang, J., Wang, C.H., 2003. Sustained release system for highly water-soluble radiosensitizer drug etanidazole: irradiation and degradation studies. *Biomaterials* 24, 1977–1987.
- Zerrouk, N., Mennini, N., Maestrelli, F., Chemtob, C., Mura, P., 2004. Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 93–99.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Yu, D., Wu, Y., 2009. Potential of amphiphilically modified low molecular weight chitosan as a novel carrier for hydrophobic anticancer drug: Synthesis, characterization,

micellization and cytotoxicity evaluation. *Carbohydrate Polymers* 77, 231–238.

Capítulo V

Co-polímeros de injerto con monómeros vinílicos

Obtención y caracterización de películas SPI-g-PMMA

Capítulo V

Co-polímeros de injerto con monómeros vinílicos: Obtención y caracterización de películas SPI-g-PMMA

En este capítulo, se resumen los resultados obtenidos en la optimización de las condiciones de reacción de modificación de SPI por reacciones de injerto en solución con metacrilato de metilo (MMA) utilizando persulfato de amonio (APS) como iniciador radicalario y la posterior evaluación de las propiedades más relevantes de las películas preparadas utilizando glicerol (Gli) como plastificante.



Figura V.1. Fotografía de una película SPI-g-PMMA obtenida por compresión.

V.1. Introducción

Utilización de materiales híbridos como alternativa para el reemplazo de los polímeros convencionales

Los materiales híbridos representan a la familia de compuestos formados por mezclas de materiales naturales y sintéticos. En la actualidad, el estudio de este campo se encuentra en gran auge debido a que su preparación representa una metodología válida para la optimización de las propiedades deficientes que presentan los materiales formados íntegramente a partir de fuentes de origen natural (Hou y H. Chen, 2010; Khor y Whey, 1995; Kopeček, 2007; Samuneva et al., 2008). La razón de esto, radica en el hecho de que en la formación de los materiales híbridos se produce generalmente un efecto sinérgico entre las propiedades ventajosas de ambos componentes, resolviendo de esta forma las deficiencias que presentan cada uno por separado, logrando ampliar el campo de aplicabilidad del material. Diversos sistemas híbridos se han utilizado para reforzar películas formadas a partir de polímeros naturales. Como ejemplo, se puede citar la utilización de nanofibras inorgánicas (Cevallos Espinosa y Tenesaca Bravo, 2012; Jayakumar et al., 2010; Orlova et al., 2011; Rajzer et al., 2012; Toskas et al., 2013; Y. Zhang et al., 2008), nanorefuerzos de arcillas (Akbari et al., 2007; Armentano et al., 2010; Bordes et al., 2009; Rodríguez et al., 2012; Silvestre et al., 2011; Xiang et al., 2009) y mezclas con polímeros sintéticos (Elsabee et al., 2008; Geetha y Ramesh, 2007; Morancho et al., 2006; Padaki et al., 2011; Sionkowska, 2011; Yu et al., 2006).

Particularmente, las reacciones de formación de co-polímeros de injerto a partir de materiales de origen natural con diferentes monómeros, es una estrategia de preparación de materiales híbridos muy utilizada en la actualidad (El-Tahlawy et al., 2006; Kaewtatip y Tanrattanakul, 2008; Kaur y Gautam, 2010; Lv et al., 2009; Singh y Ray, 1998).

Modificación de materiales de origen natural mediante la formación de co-polímeros de injerto

Un copolímero de injerto es una cadena macromolecular con una o más especies conectadas a la estructura principal en forma de cadenas laterales (Athawale y Rathi, 1999). En la Figura V.1.1 se puede observar un esquema de la reacción de formación de injertos donde el polímero principal de la cadena, poli (A) contendrá cadenas laterales del polímero poli (B) que se originarán en diferentes puntos a lo largo de la misma. En una primera etapa, se producen los llamados “puntos de anclaje” sobre la misma (macrorradicales) para luego producir el crecimiento del polímero B.

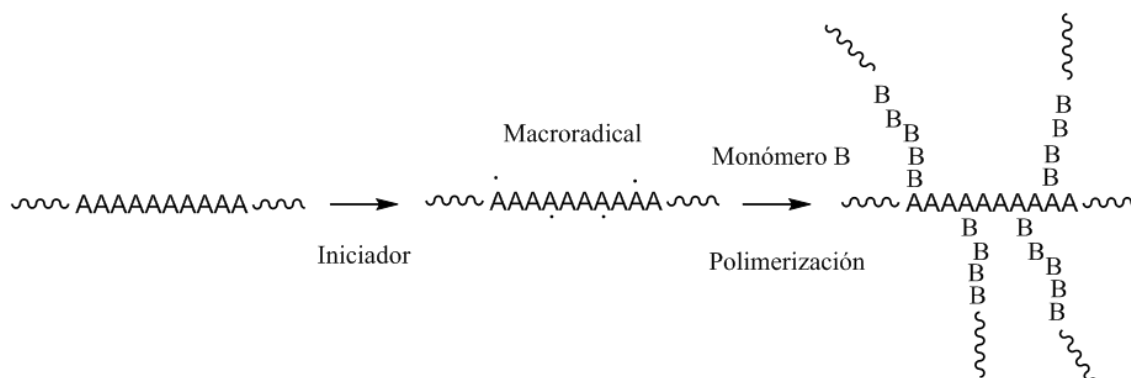


Figura V.1.1. Esquema de la reacción de formación de un copolímero de injerto (A-g-B).

El injerto de polímeros sintéticos es un método conveniente para añadir nuevas propiedades a un polímero natural con mínima pérdida de las propiedades beneficiosas iniciales del sustrato. De esta forma, las excelentes propiedades que algunos polímeros sintéticos poseen, son añadidas al material natural base, utilizando muy pequeñas cantidades relativas.

Las proteínas de soja presentan propiedades útiles antes mencionadas que hacen a este producto un interesante material de partida para la síntesis de co-polímeros de injerto. Numerosos co-polímeros se

preparan mediante polimerización por injerto de monómeros vinílicos sobre la cadena principal del biopolímero. La Figura V.1.2 muestra en forma esquemática el crecimiento de cadenas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) sobre una película de SPI, dando el producto SPI-g-PMMA

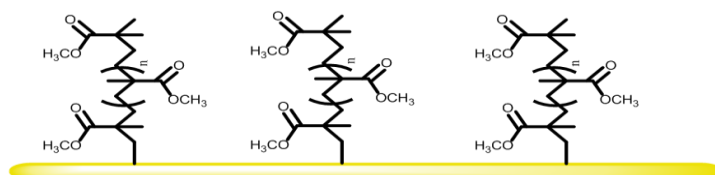


Figura V.1.2. Esquema de PMMA injertado sobre una película de SPI.

La copolimerización de injerto de materiales sintéticos polivinílicos sobre materiales de origen natural, se logra principalmente mediante polimerización radicalaria. Estos co-polímeros se preparan mediante la generación de radicales sobre la estructura principal del biopolímero, para luego permitir que estos radicales actúen como macroiniciadores para la polimerización del monómero vinílico. En general, los co-polímeros de injerto obtenidos en los cuales se ha utilizado una iniciación radicalaria, logran cadenas laterales de pesos moleculares medios a altos que se encuentran altamente espaciados a lo largo de la cadena principal (Hebeish y Guthrie, 1981). Las propiedades resultantes de los co-polímeros de injerto pueden ser controladas ampliamente de acuerdo a las características de las cadenas laterales.

Diversos sistemas iniciadores radicalarios pueden ser empleados en el injerto de diferentes monómeros vinílicos sobre polímeros naturales pero a grandes rasgos, estos pueden clasificarse en dos grandes grupos: **(a) iniciación química**, mediante la utilización de Ce^{+4} o persulfato de amonio (APS) o potasio y **(b) iniciación por radiación**, mediante la utilización de radiaciones de alta energía o con radiación de baja energía en presencia de un activador fotosensible como la benzofenona o azo-compuestos.

Formación de co-polímeros de injerto con poli (metacrilato de metilo) (PMMA)

El PMMA es un polímero vinílico, formado por polimerización radicalaria a partir del monómero metacrilato de metilo (MMA). Es un polímero termoplástico, duro, resistente, transparente, de excelentes propiedades ópticas con alto índice de refracción, buena resistencia al envejecimiento y a la intemperie. Su resistencia a la rotura es siete veces superior a la del cristal a igualdad de espesores, por lo que resulta más resistente a los golpes, siendo su principal desventaja el costo. En la Figura V.1.3 se puede observar la estructura del PMMA.

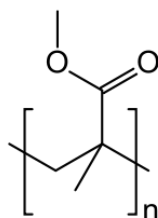


Figura V.1.3. Estructura del PMMA

En este trabajo, se planteó la utilización del metacrilato de metilo como monómero a ser injertado en SPI ya que el mismo forma polímeros con estructuras rígidas que presentan una temperatura de transición vítrea (T_g) relativamente baja. Además, por su estructura, este componente le aportaría hidrofobicidad a las matrices formadas optimizando propiedades donde el rol del agua es trascendental. Además, se encuentra reportado en bibliografía la formación de películas de un biopolímero natural (Ch) injertado con PMMA (Harish Prashanth et al., 2005) donde se describe que la biodegradación alcanza valores de 45% en 25 días en un cultivo aeróbico de una sepa fúngica, como lo es *Aspergillus flavus*.

En este capítulo de la presente tesis, se resumen los resultados obtenidos en la optimización de las condiciones de reacción de modificación de SPI por reacciones de injerto en solución con metacrilato de metilo (MMA) utilizando persulfato de amonio (APS) como iniciador radicalario y la

posterior evaluación de las propiedades más relevantes de películas preparadas.

Se encuentran descritos en bibliografía diversos mecanismos de reacción para la formación de co-polímeros de injerto con monómeros vinílicos mediante la utilización de APS. En particular, la reacción se presenta generalmente por medio de los grupos amino primarios y tioles presente en la SPI (Li et al., 2010). En la Figura V.1.4 se puede observar el mecanismo de reacción para el proceso de formación del copolímero de injerto SPI-g-PMMA utilizando APS como iniciador. En este caso, los grupos funcionales de la SPI que reaccionan son los tioles libres de la cisteína (Cy) y los formados por la reducción de los enlaces disulfuro.

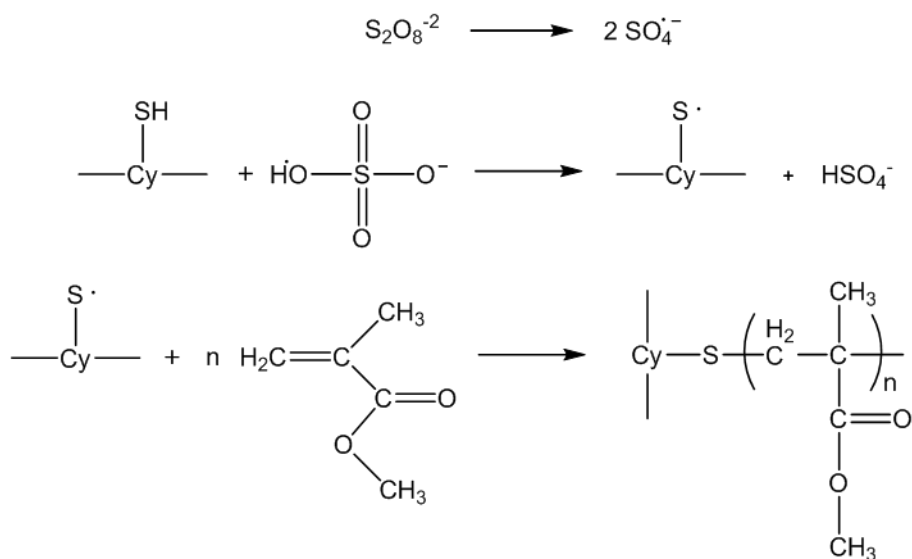


Figura V.1.4. Mecanismo de reacción de formación del copolímero de injerto SPI-g-PMMA utilizando APS como iniciador.

V.2. Resultados y discusión

V.2.1. Síntesis del copolímero de injerto SPI-g-PMMA y caracterización química

La reacción de injerto de PMMA sobre SPI fue ensayada siguiendo diversas metodologías sintéticas. En una primera etapa, se intentó llevar a cabo la reacción sobre películas de SPI para lo cual, se procedió previamente a la formación de las mismas siguiendo la metodología de “casting”. Para realizar el injerto de las películas se procedió a sumergir la película en agua en un sistema saturado de nitrógeno en presencia de agentes despleantes de proteínas, el iniciador radicalario (APS) y el monómero (MMA). Los resultados obtenidos no fueron buenos ya que la película de SPI es muy frágil en estado húmedo por lo cual se rompe y solubiliza parcialmente debido a las condiciones de reacción empleadas (agitación, temperatura, etc.). Luego, se procedió a realizar el mismo procedimiento con una película de SPI entrecruzada con 10% de Gen, ya que es una película más resistente y menos soluble en agua (Ver sección III.2.3). Si bien no se observó ruptura de la película como en el caso anterior, la misma se tornó quebradiza y no se observó presencia de injertos de PMMA por estudios de FT-IR. Debido a esto, se invirtió la metodología sintética, procediendo en una primera etapa a realizar los injertos de PMMA sobre la proteína de soja en polvo para luego formar la película. Para esto, se preparó una dispersión acuosa de la proteína y se adicionaron los dos agentes que favorecen el desplegamiento de las cadenas proteicas como lo son la urea y el bisulfito de sodio (agente reductor que rompe enlaces disulfuro). Luego, se evacuó todo el oxígeno del sistema y se agregó la solución acuosa con el iniciador radicalario (APS) y el monómero (MMA) bajo condiciones previamente probadas por otros autores (Lu et al., 2010). A medida que la reacción se fue llevando a cabo, se observó la aparición de un sólido blanco de consistencia esponjosa. Una vez que la reacción transcurrió por el tiempo especificado, se precipitó el producto en etanol por 24 horas, lavándolo sucesivamente con etanol y acetona para

eliminar el PMMA no unido hasta verificar que el solvente utilizado en el lavado no contenía más PMMA. El sólido obtenido fue de coloración blanca, y de consistencia esponjosa. Luego el mismo fue secado y molido finamente. Para esta primera etapa de la preparación, el injerto fue evidenciado por FT-IR y RMN-¹³C.

El espectro infrarrojo de la proteína injertada se muestra en la Figura V.2.1.1 En ella se puede observar la aparición de la banda a 1736,75 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento del enlace C=O del carbonilo del éster y a 1152,14 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento C-O del éster. Estas bandas se corresponden con la presencia de PMMA. Además, se pudo observar disminución relativa en la intensidad de la banda a 1534,44 cm⁻¹ correspondiente a la deformación N-H de amina primaria, lo cual indicaría que el PMMA se une a la proteína por medio de estos grupos principalmente. Además se observó un aumento relativo de la banda a 1460 cm⁻¹, correspondiente a la vibración de deformación de grupos metilos y metilenos, correspondientes también al PMMA.

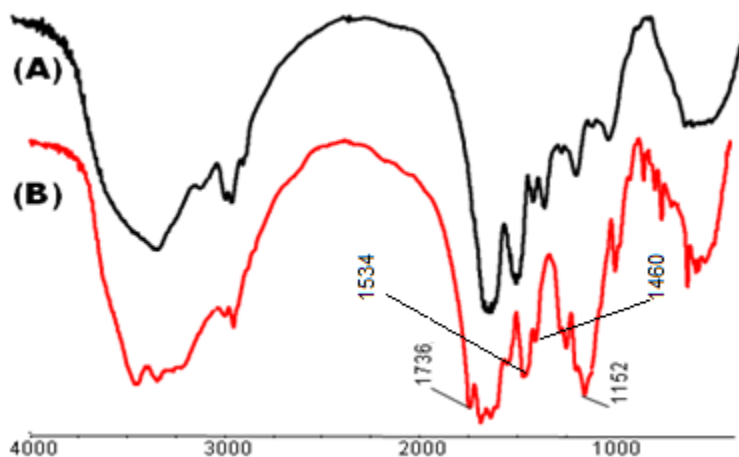


Figura V.2.1.1. Espectros FT-IR de SPI (A) y SPI-g-PMMA (B)

Por otra parte, analizando el espectro RMN-¹³C de SPI, se pudo observar un solo pico en la zona de carbonilos a 173,80 ppm correspondiente al carbonilo de las uniones amida. Por el contrario, en el espectro de la proteína injertada, se observan 2 picos los cuales corresponden a carbonilos

de amida (173,45 ppm) y de ésteres (179,02 ppm), correspondientes a la presencia de PMMA. Además, se observó la aparición del pico a 48 ppm correspondiente al carbono carbinólico (OCH₃) presente en el PMMA. Por otro lado, también pudo ser observado un pico a 52 ppm correspondiente a la presencia de etanol residual proveniente de la precipitación del polímero injertado. Los espectros RMN-¹³C de la proteína y la proteína injertada son mostrados en la Figura V.2.1.2. Mediante la verificación de la presencia de PMMA por las dos técnicas antes mencionadas en el material injertado y considerando que el mismo fue lavado exhaustivamente hasta no observar más extracción del PMMA no unido, es posible afirmar que la reacción de injerto fue exitosa (Harish Prashanth et al., 2005).

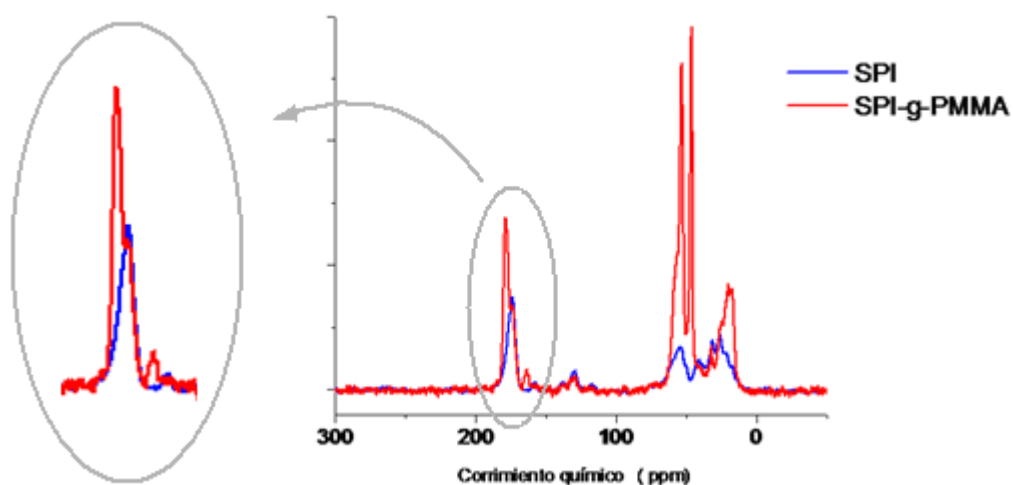


Figura V.2.1.2. Espectros RMN-¹³C de SPI y SPI-g-PMMA

Una vez evidenciada la reacción de injerto, se procedió a cuantificar el grado de injerto logrado (%G) y la eficiencia de la reacción de injerto (%E).

El %G designa la cantidad de polímero injertado en la estructura principal (SPI), y %E indica la eficiencia de conversión del monómero vinílico inicial en el polímero injertado. Estos valores fueron calculados en base al incremento en la masa de la proteína después de la reacción.

Utilizando las respectivas fórmulas, se determinó que el %G logrado fue de 27,04% y el %E fue de 15,34%. Analizando los resultados obtenidos, podemos afirmar que el porcentaje de injerto logrado fue relativamente bajo, sin embargo, esto representaría una ventaja ya que en un principio se

planteó intentar mejorar las propiedades generales del material de partida, por lo que mientras menor sea el grado de modificación que brinde un producto con optimización de las propiedades, más eficiente será el resultado. Además, para este caso en particular, una de las desventajas de la utilización de PMMA como material sintético es su costo, por lo que el hecho de poder utilizar pequeñas cantidades resultaría favorable. Por otro lado, el bajo %E indicaría que en futuras reacciones se debería utilizar menor cantidad de MMA para la reacción ya que reacciona solo una pequeña parte.

Una vez obtenido este material, se procedió a la preparación de las películas siguiendo la metodología de “*casting*” con y sin lavados intermedios para eliminar el PMMA no unido. Se intentó la preparación de las películas con y sin lavados del material ya que se presumía que los lavados con acetona producen un efecto negativo sobre las propiedades filmogénicas de las proteínas. Se observó que en ninguno de los casos se produjo la formación de las películas. Probablemente, el lavado del material no es el causante del resultado negativo en la preparación sino que la modificación realizada es la que interfiere con las propiedades filmogénicas que intrínsecamente posee la SPI. Debido a esto es que se cambió la estrategia de preparación por la metodología de **compresión con temperatura**. Siguiendo esta última metodología, se obtuvieron películas de SPI y SPI-g-PMMA de buen aspecto macroscópico.

Las condiciones empleadas en la prensa hidráulica que permitieron los mejores resultados fueron: temperatura inicial de 150 °C y presión de 150 Kg/cm² por 5 min para luego dejar enfriar hasta 80 °C manteniendo la presión. Se obtuvieron películas de coloración amarillenta de 10 cm x 10 cm, las cuales presentaron características homogéneas en el caso de las películas SPI y con heterogeneidades para las SPI-g-PMMA. En algunos casos, estas últimas presentaron grietas provocadas probablemente por mal funcionamiento de la prensa hidráulica. El aspecto macroscópico de las películas es mostrado en la Figura V.2.1.3.

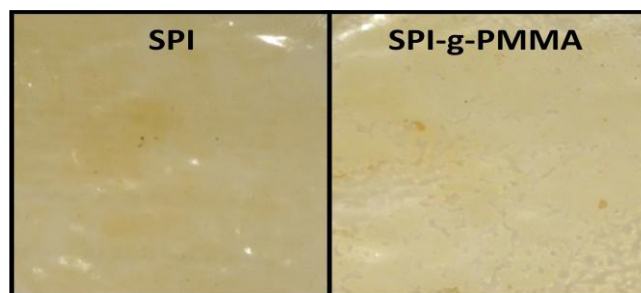


Figura V.2.1.3. Aspecto macroscópico de las películas obtenidas por compresión con temperatura.

Una vez preparadas las películas, se procedió a la caracterización, determinando propiedades relevantes donde la acción del agua cumple un papel fundamental.

V.2.2. Caracterización física de las películas SPI-g-PMMA

En una primera etapa, se procedió a la determinación del ángulo de contacto que forma el agua con la superficie de las películas. Esta magnitud nos da una idea del carácter hidrofílico/hidrofóbico que la superficie presenta. Debido a la incorporación de un componente hidrofóbico tal como lo es el PMMA sobre las películas, se esperaría que los valores de ángulo de contacto aumenten con respecto a la película SPI. La Tabla V.2.2.1 muestra los resultados obtenidos. Se puede observar que efectivamente se logra un aumento considerable del ángulo de contacto para la película modificada, la cual se hace más hidrofóbica con respecto a la película control. Como se ha dicho anteriormente, el mayor carácter hidrofóbico viene dado claramente por la presencia de PMMA, que ahora forma parte de la película.

Película	Espesor (μm)	θ ($^\circ$)
SPI	171,6	$37,29 \pm 1,38$
SPI-g-PMMA	168,4	$43,13 \pm 1,08$

Tabla V.2.2.1. Determinación del espesor y del ángulo de contacto (θ) de la película control e injertada.

Este aumento de la hidrofobicidad del material produce modificaciones en varias propiedades de la película tales como el contenido de humedad (MC) y la cantidad de materia soluble total en agua (TSM). De los resultados que se muestran en la tabla V.2.2.2 puede observarse que tanto MC como TSM disminuyen para la película de proteína injertada con PMMA. Sin dudas, este comportamiento viene dado por un aumento en la hidrofobicidad producido por la presencia de los injertos.

Película	MC (%)	TSM (%)
SPI	25,93 ± 2,37	29,24 ± 4,43
SPI-g-PMMA	19,09 ± 1,15	22,58 ± 3,76

Tabla V.2.2.2. Determinación de la cantidad de materia soluble total (TSM) y contenido de humedad (MC) de la película control e injertada.

Por otro lado, se determinó el hinchamiento en agua en función del tiempo, cuyos resultados pueden observarse en la Figura V.2.2.1. Se determinó que si bien el máximo en el porcentaje de hinchamiento se alcanzó en el mismo tiempo para las dos películas (6 min), los valores máximos alcanzados para una y la otra fueron muy distintos. El valor de hinchamiento máximo alcanzado para la película modificada es marcadamente menor (alrededor de 60%) que para la película sin modificar.

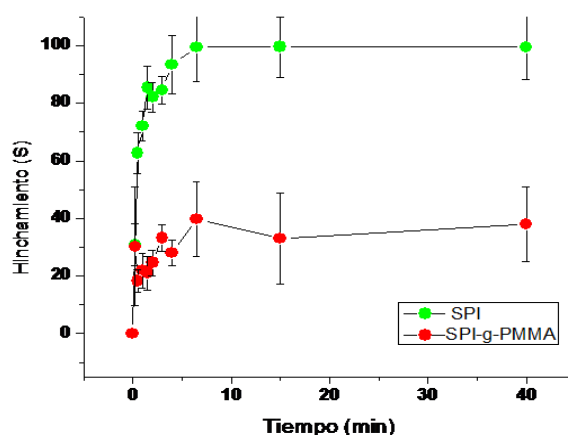


Figura V.2.2.1. Hinchamiento en agua de las películas SPI y SPI-g-PMMA en función del tiempo.

Estos efectos pueden ser explicados de acuerdo al aumento en la hidrofobicidad de la película, por lo que el agua resulta menos afín por la misma, evidenciando una menor tendencia a incorporarse en el interior de la matriz.

Otros estudios tales como propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua resultaron imposibles de realizar a causa de la presencia de pequeñas heterogeneidades y micro fisuras en las películas SPI-g-PMMA debido probablemente al mal funcionamiento de la prensa hidráulica al momento de preparación de las mismas.

V.3. Conclusiones parciales

En este capítulo, se describió la modificación de SPI por injerto con PMMA y la posterior preparación de películas. La utilización de esta metodología sintética no se encuentra extensamente descrita en bibliografía para estructuras proteicas. Sin embargo, en esta parte del trabajo se demostró que es una metodología válida para mejorar las propiedades deficientes de los materiales naturales, mediante el empleo de bajos porcentajes de modificación, y habiéndose utilizado mínimas cantidades del monómero. Las películas preparadas a partir de SPI-g-PMMA, mostraron mayor carácter hidrofóbico respecto de las películas de SPI, lo que produjo una variación en propiedades importantes donde el rol del agua tiene un papel fundamental. En estas determinaciones se observó mayor resistencia al agua ya que las mismas resultaron menos hinchables y solubles que las películas control (sin modificar). Estos resultados, si bien son preliminares, representan un interesante punto de partida para la preparación de materiales biocompuestos híbridos (mezcla de materiales naturales y sintéticos), resistentes a la acción del agua para potenciales aplicaciones en áreas donde esta característica sea necesaria.

V.4. Bibliografía

- Akbari, Z., Ghomashchi, T., Moghadam, S., 2007. Improvement in food packaging industry with biobased nanocomposites. *Packaging (Boston, Mass.)* 3, 1–26.
- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J.M., 2010. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability* 95, 2126–2146.
- Athawale, V.D., Rathi, S.C., 1999. Graft polymerization: starch as a model substrate. *J. Macromol. Sci.-Rev. Macromol. Chem. Phys.* 39, 445–480.
- Bordes, P., Pollet, E., Avérous, L., 2009. Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. *Progress in Polymer Science* 34, 125–155.
- Cevallos Espinosa, J.P., Tenesaca Bravo, J.G., 2012. Tesis: Obtención y caracterización de materiales compuestos híbridos de matriz polipropileno reforzadas con fibras de vidrio y abacá mediante moldeo por compresión. Escuela Politécnica Nacional (Ecuador).
- Elsabee, M.Z., Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., Eweis, M., 2008. Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydrate Polymers* 71, 187–195.
- El-Tahlawy, K.F., El-Rafie, S.M., Aly, A.S., 2006. Preparation and application of chitosan / poly (methacrylic acid) graft copolymer. *Carbohydrate Polymers* 66, 176–183.
- Geetha, D., Ramesh, P.S., 2007. Ultrasonic studies on polymer blend (natural/synthetic) in strong electrolyte solutions. *Journal of Molecular Liquids* 136, 50–53.
- Harish Prashanth, K.V., Lakshman, K., Shamala, T.R., Tharanathan, R.N., 2005. Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56, 115–120.
- Hebeish, A., Guthrie, J.T., 1981. *The chemistry and technology of cellulosic copolymers*. Springer, Berlin.
- Hou, A., Chen, H., 2010. Preparation and characterization of silk/silica hybrid biomaterials by sol–gel crosslinking process. *Materials Science and Engineering: B* 167, 124–128.

- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. V., Tamura, H., 2010. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances* 28, 142–150.
- Kaewtatip, K., Tanrattanakul, V., 2008. Preparation of cassava starch grafted with polystyrene by suspension polymerization. *Carbohydrate Polymers* 73, 647–655.
- Kaur, I., Gautam, N., 2010. Synthesis and characterization of soy protein grafted polyethylene: Effect of reaction parameters. *Malaysian Polymer Journal* 5, 39–54.
- Khor, E., Whey, J.L.H., 1995. Interaction of chitosan with polypyrrole in the formation of hybrid biomaterials. *Carbohydrate Polymers* 26, 183–187.
- Kopeček, J., 2007. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials* 28, 5185–5192.
- Li, H.P., Ma, B.G., Zhou, S.M., Zhang, L.M., Yi, J.Z., 2010. Thermally responsive graft copolymer of soy protein isolate and N-isopropylacrylamide: synthesis and self-assembly behavior in aqueous solution. *Colloid and Polymer Science* 288, 1419–1426.
- Lu, Y., Luo, X., Lin, X., He, P., 2010. Preparation and characterization of thermoplastic soy protein isolate. *Materials Science Forum* 658, 125–128.
- Lv, P., Bin, Y., Li, Y., Chen, R., Wang, X., Zhao, B., 2009. Studies on graft copolymerization of chitosan with acrylonitrile by the redox system. *Polymer* 50, 5675–5680.
- Morancho, J.M., Ramis, X., Fernández, X., Cadenato, A., Salla, J.M., Vallés, A., Contat, L., Ribes, A., 2006. Calorimetric and thermogravimetric studies of UV-irradiated polypropylene/starch-based materials aged in soil. *Polymer Degradation and Stability* 91, 44–51.
- Orlova, Y., Magome, N., Liu, L., Chen, Y., Agladze, K., 2011. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomaterials* 32, 5615–5624.
- Padaki, M., Isloor, A.M., Fernandes, J., Prabhu, K.N., 2011. New polypropylene supported chitosan NF-membrane for desalination application. *Desalination* 280, 419–423.
- Rajzer, I., Kwiatkowski, R., Piekarczyk, W., Biniś, W., Janicki, J., 2012. Carbon nanofibers produced from modified electrospun PAN / hydroxyapatite precursors as scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 32, 2562–2569.

- Rodríguez, F.J., Galotto, M.J., Guarda, A., Bruna, J.E., 2012. Modification of cellulose acetate films using nanofillers based on organoclays. *Journal of Food Engineering* 110, 262–268.
- Samuneva, B., Djambaski, P., Kashchieva, E., Chernev, G., Kabaivanova, L., Emanuilova, E., Salvado, I.M.M., Fernandes, M.H. V, Wu, A., 2008. Sol–gel synthesis and structure of silica hybrid biomaterials. *Journal of Non-Crystalline Solids* 354, 733–740.
- Silvestre, C., Duraccio, D., Cimmino, S., 2011. Progress in polymer science food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science* 36, 1766–1782.
- Singh, D.K., Ray, A.R., 1998. Characterization of grafted chitosan films. *Carbohydrate Polymers* 36, 251–255.
- Sionkowska, A., 2011. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science* 36, 1254–1276.
- Toskas, G., Cherif, C., Hund, R.-D., Laourine, E., Mahltig, B., Fahmi, A., Heinemann, C., Hanke, T., 2013. Chitosan(PEO)/silica hybrid nanofibers as a potential biomaterial for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers* 94, 713–722.
- Xiang, L., Tang, C., Cao, J., Wang, C., Wang, K., Zhang, Q., Fu, Q., 2009. Preparation and characterization of soy protein isolate SPI/montmorillonite (mmt) bionanocomposites. *Chinese Journal of Polymer Science* 27, 843–849.
- Yu, L., Dean, K., Li, L., 2006. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science* 31, 576–602.
- Zhang, Y., Venugopal, J.R., El-Turki, A., Ramakrishna, S., Su, B., Lim, C.T., 2008. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29, 4314–4322.

Capítulo VI

Nano-refuerzos naturales:

Obtención y caracterización de películas SPI-NCA

Capítulo VI

Nano-refuerzos naturales:

Obtención y caracterización de películas SPI-NCA

En este capítulo se describe la obtención de películas de proteínas de soja (SPI) nano-reforzadas con nano-cristales de almidón (NCA) previamente sintetizados a partir de almidón de maíz. Aquí se encuentra desarrollada la caracterización completa tanto de los nano-cristales obtenidos como de las películas nano-reforzadas con distintas cantidades del refuerzo natural.



Figura VII.1. Fotografía de película de SPI nano-reforzada con 10% de NCA

VI.1. Introducción

El campo de la nanotecnología es una de las áreas más investigadas y desarrolladas en la actualidad en prácticamente todas las disciplinas. Esto incluye, la ciencia y la tecnología de polímeros e incluso en este campo las investigaciones abarcan una amplia gama de temas. En particular, la nanotecnología aplicada a polímeros (nanocompuestos) representa una gran área multidisciplinaria donde, entre otros temas, se estudia el diseño, fabricación, elaboración y aplicación de materiales poliméricos modificados a partir de la incorporación de partículas y / o dispositivos que tengan una o más dimensiones en el orden de los 100 nm o menos (Paul and Robeson, 2008; Sinha Ray and Bousmina, 2008). El extraordinario potencial de esta nueva tecnología para proporcionar rutas propicias para el desarrollo de materiales de alto rendimiento ha atraído la atención de los investigadores, de la física, la química, la biología y la ingeniería.

En el desarrollo de películas de propiedades adecuadas para su utilización como material de recubrimiento, es muy recurrente encontrar ejemplos de materiales nanocompuestos.

La obtención de propiedades optimizadas en el material nanocompuesto que no tienen los materiales que lo componen individualmente y/o que no son alcanzables por la suma simple de sus propiedades, hace referencia al efecto sinérgico producto de la combinación de matriz y refuerzo. El factor clave para que se logren efectos sinérgicos por la combinación de dos materiales es la existencia de una interface matriz-refuerzo con propiedades físicas propias. Es por esto que debido a la muy alta relación superficie / volumen que los nanomateriales poseen (por ser de tamaño tan pequeño), su incorporación en matrices poliméricas conduce a materiales compuestos con excelentes propiedades en comparación con los micro-compuestos convencionales sin detrimentos en la densidad, transparencia y capacidad de procesamiento de las películas (Gao et al., 2011; J. S. Smith et al., 2003).

Existen reportados en literatura diversos ejemplos de nanomateriales empleados como refuerzo en matrices del tipo naturales donde son descritas mejoras respecto a propiedades mecánicas o disminución en la cantidad de materia soluble total en agua de películas preparadas a partir de fuentes de origen natural. Estas mejoras responden a las fuertes interacciones existentes entre las matrices y los nanorefuerzos agregados (Kristo and Biliaderis, 2007). Por otro lado, mejoras muy importantes en las propiedades de barrera a gases o vapor de agua, también han sido obtenidas en películas similares.

Por lo general, los nano-refuerzos que pueden ser empleados en películas de este tipo se clasifican según sus dimensiones en: laminares, fibrilares y particulados. La Figura VI.1.1 muestra la geometría de cada tipo.

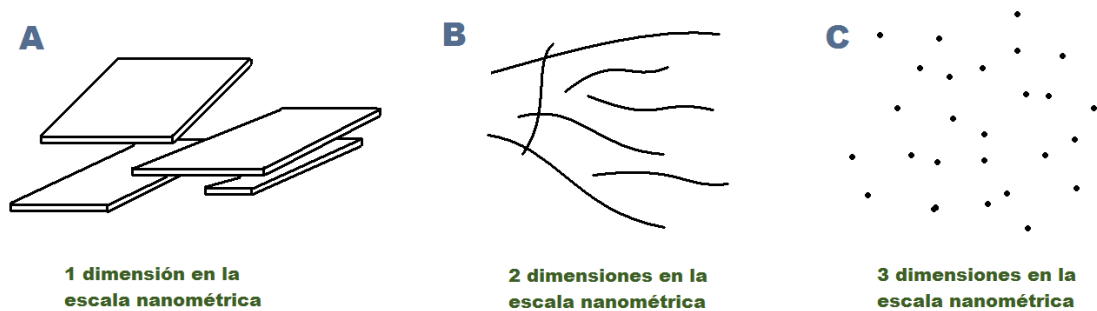


Figura VI.1.1. Geometría de cada tipo de nanorefuerzo: laminares (A), fibrilares (B) y particulados (C).

Dentro del segmento de los nanorefuerzos laminares, los materiales más utilizados son las denominadas nano-arcillas y en particular los filosilicatos como la montmorillonita. El empleo de estos minerales inorgánicos amigables con el medio ambiente se encuentra recibiendo mucha atención por parte del sector científico e industrial debido a la gran disponibilidad, bajo costo y mejoras que el nano-refuerzo ofrece a las películas, principalmente desde el punto de vista de permeabilidad a gases y vapor de agua y propiedades mecánicas (Chung et al., 2010). Las teorías más empleadas para explicar estas mejoras en las propiedades de barrera en

materiales nano-compuestos se basan en la formación de un camino tortuoso formado por la presencia del refuerzo, forzando al gas permeable a recorrer un camino más largo para difundir a través de la película (Nielsen, 1967). Este efecto puede ser observado en la Figura VI.1.2.

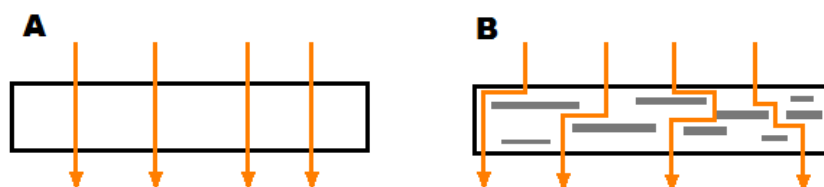


Figura VI.1.2. Esquema del camino libre que debe atravesar un gas al permear por una película sin refuerzos (A) y tortuoso en presencia de refuerzos (B)

Diversos reportes se pueden encontrar en bibliografía del empleo de estas arcillas como refuerzos de películas formadas a partir de fuentes naturales. En películas preparadas a partir de agro-proteínas como proteínas de soja, el empleo de montmorillonita exfoliada entre las cadenas proteicas produjo un aumento en la resistencia a la rotura, modulación de elasticidad, y disminución de la extensión, contenido de humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua (Echeverría et al., 2014), así como también un incremento de la estabilidad térmica de las películas (Kumar et al., 2010). Para películas formadas por polisacáridos, como por ejemplo almidón, también fueron reportados mejoras en la estabilidad térmica, disminución de la absorción de agua y aumento en el módulo de Young (Cyras et al., 2008; Schlemmer et al., 2010).

Todas estas optimizaciones de las propiedades finales de películas obtenidas a partir de fuentes naturales, hacen a estos materiales nano-compuestos útiles para potenciales aplicaciones como material de empaque rígido o flexible de alimentos.

Otro gran grupo de nano-refuerzos agrupa a los nano-refuerzos fibrilares entre los cuales se destacan las fibras naturales. En la actualidad, existe una tendencia creciente a utilizar biofibras como cargas y/o refuerzos

de películas naturales debido a su flexibilidad durante el procesamiento, la alta rigidez longitudinal, y el bajo costo que estos componentes poseen. Las nano-fibras naturales más utilizadas se pueden clasificar de la siguiente manera: las fibras de estopa (yute, lino), fibras de hojas (sisal y piña), fibras de semillas (coco, algodón), fibras de núcleo (yute), fibras de caña (trigo, maíz, arroz, caña de azúcar) y otros tipos (madera y raíces) (Faruk et al., 2012). Por lo general, mejoras en las propiedades mecánicas de las películas fueron obtenidas debido a la utilización de estas fibras debido a la gran resistencia a la tracción que presentan las mismas (Lodha and Netravali, 2005).

En la actualidad se observa un gran esfuerzo por parte de los investigadores en desarrollar materiales a partir de residuos orgánicos con el fin de agregarle valor a los mismos. De esta motivación se desprende la posibilidad de la preparación de nano-fibras de celulosa proveniente de residuos vegetales. Un ejemplo de esto, es la preparación de nano-fibras de celulosa a partir de vainas de soja (material descartado en la cosecha de este cereal) (Pires et al., 2013), a partir de hojas de la planta de ananá (Santos et al., 2013) o a partir de cáscaras de arroz (Johar et al., 2012).

Las nanofibras de celulosa se han utilizado para reforzar películas de almidón mostrando mejoras en las propiedades mecánicas, aumento de las propiedades de barrera al vapor de agua y aumento de la resistencia en ambientes de alta humedad (Müller et al., 2009a, 2009b; Savadekar and Mhaske, 2012).

Otros materiales fibrilares pero inorgánicos que son muy a menudo utilizados son los nanotubos de carbono. El refuerzo de compósitos formados por proteínas de soja y nanotubos de carbono mostró un aumento de la resistencia del material al agua y mejoras muy marcadas de las propiedades mecánicas dependientes de la cantidad y el tamaño de los nanotubos agregados (Zheng et al., 2007).

Por otro lado, los nanorefuerzos más estudiados y utilizados, representan los que integran el grupo de los particulados cuyos integrantes principales representan los nanocristales formados a partir de polisacáridos.

Es debido a la naturaleza semicristalina de estos materiales (celulosa, almidón, quitina), que se pueden obtener nanorefuerzos cristalinos a partir de ellos. En particular, las excelentes propiedades mecánicas, la capacidad de refuerzo, su abundancia, bajo peso, biodegradabilidad y el gran área de superficie (varios cientos de m^2 / g) hacen de los nanocristales de celulosa y almidón candidatos ideales para el procesamiento de polímeros nanocompuestos inclusive en bajas concentraciones (Chen et al., 2012; Dufresne, 2010; Lin et al., 2011; Pires et al., 2013).

Cuando nanocristales producidos a partir de fuentes de características polares como los polisacáridos se utilizan como nanorefuerzos en materiales a base de almidón o proteínas, las estructuras químicas de la matriz y el relleno son similares. Estas similitudes estructurales promueven la buena miscibilidad y la fuerte adhesión interfacial entre la carga de nanocristales y la matriz (Lin et al., 2011). Estas interacciones se traducen en las mejoras observadas en propiedades fundamentales de las películas como las descritas anteriormente. Este efecto es atribuido a la creación de fuertes interacciones no sólo entre los nanocristales, sino también entre la carga y la matriz.

Se pueden encontrar reportes en literatura del efecto de nanocristales de celulosa en películas biodegradables (Aila-Suárez et al., 2013), así como también de nanocristales de almidón (Y. Chen et al., 2008; N. L. García et al., 2011; Kristo and Biliaderis, 2007) donde se pueden observar todas las mejoras antes descritas.

VI.2. Resultados y discusión

VI.2.1. Síntesis y caracterización de los nanocristales de almidón (NCA)

Los gránulos de almidón nativo se encuentran constituidos por los componentes amilosa y amilopectina y poseen una estructura anular de capas cristalinas y semicristalinas alternantes. La amilosa se encuentra formada por largas cadenas lineales y tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo se encuentran situados en el exterior de la hélice. La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25% de amilosa. Por otra parte, la amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones, las cuales se encuentran unidas a la cadena principal (semejante a la amilosa) cada 15-25 unidades lineales de glucosa. La amilopectina constituye alrededor del 75% de los almidones más comunes (García et al., 2009). Debido a su arquitectura estructural, este componente presenta una gran cristalinidad, siendo el causante de las regiones cristalinas del gránulo de almidón.

Para la obtención de nanocristales a partir de almidón nativo, es necesario el aislamiento de esta región cristalina. Esto puede ser logrado mediante una hidrólisis ácida usando ácido clorhídrico o sulfúrico. Se cree que a temperaturas inferiores a la temperatura de gelatinización, las moléculas de ácido atacan preferentemente las regiones amorfas del gránulo (Jenkins y Donald, 1997), por lo que estas regiones son hidrolizadas más rápidamente que las regiones cristalinas (Wang et al., 2003). El producto obtenido después de la hidrólisis ácida contiene los nanocristales de almidón (NCA), los cuales poseen alto grado de cristalinidad y tamaño nanométrico.

Para poner a punto la preparación, se ensayaron diversas condiciones de hidrólisis llegando a la conclusión que los mejores resultados fueron

obtenidos utilizando las condiciones descritas en la Sección II.2.1. Una vez transcurrida la reacción, se observó la presencia de un particulado de color blanco en suspensión que decantó cuando se retiró la agitación. Estos NCA obtenidos fueron lavados exhaustivamente con agua destilada hasta obtener pH neutro y almacenados en heladera.

Una vez preparados los NCA, se procedió a caracterizarlos desde el punto de vista morfológico y estructural. Con el objetivo de determinar el tamaño de los NCA preparados, se procedió a realizar dispersión de luz dinámica (DLS) sobre una dispersión de NCA. Este ensayo nos permitió determinar que los NCA poseen alta polidispersidad de tamaño. Por otro lado se determinó que el tamaño promedio de los NCA fue de 35 nm. La proporción de partículas de cada tamaño puede ser observada en la Figura VI.2.1.1.

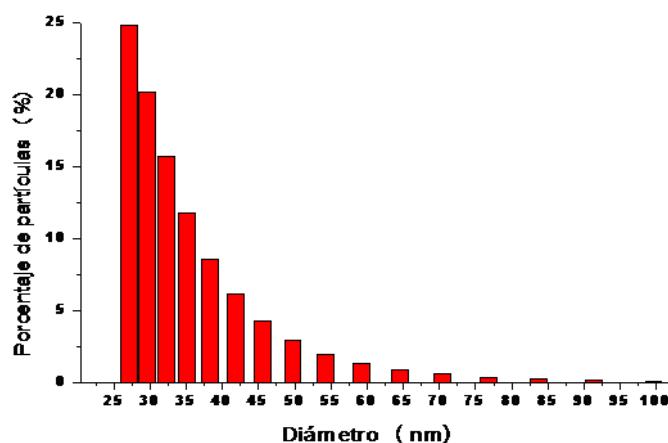


Figura VI.2.1.1. Distribución de tamaño de los NCA obtenidos por dispersión de luz dinámica.

Para observar los NCA y de esta forma verificar los tamaños determinados y analizar la morfología de los mismos, se procedió a la utilización de diferentes microscopios. Las imágenes obtenidas son mostradas en las Figuras VI.2.1.2 y VI.2.1.3.

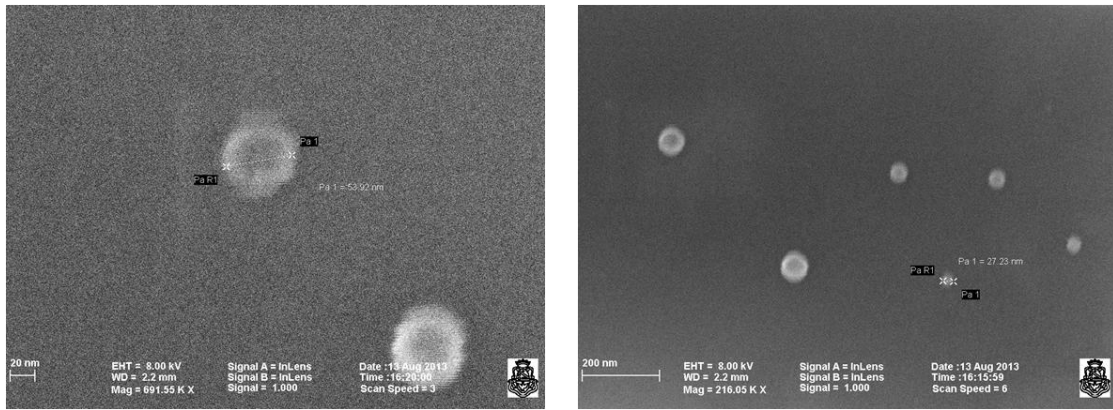


Figura VI.2.1.2. Micrografías SEM de los NCA preparados

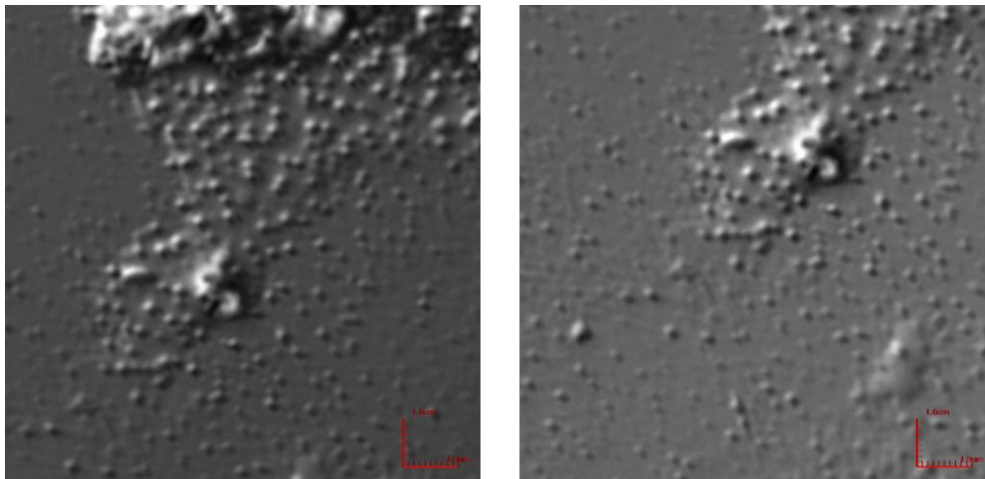


Figura VI.2.1.3. Fotografías de los NCA preparados tomadas con un microscopio confocal.

Mediante las imágenes obtenidas se confirmaron los tamaños determinados por DLS. Además se pudo observar que los nanocristales preparados poseen forma esférica.

El carácter cristalino de los NCA pudo ser determinado mediante difracción de rayos X. Se realizó la difracción sobre una muestra de almidón nativo de maíz y sobre los NCA preparados. Los difractogramas obtenidos se muestran en la Figura VI.2.1.4.

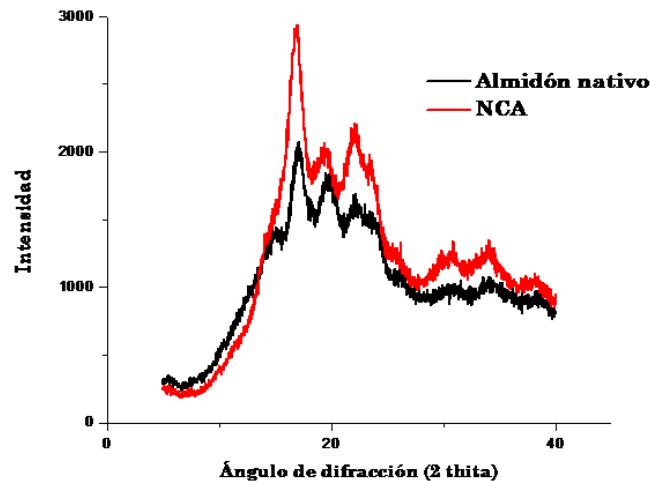


Figura VI.2.1.4. Diffractogramas de rayos X de almidón nativo y de NCA.

Observando los difractogramas obtenidos, se puede identificar para el almidón una estructura típica semicristalina polimórfica tipo A característica de almidones provenientes de cereales (Kristo et al., 2007). Por otro lado, los NCA muestran un patrón similar al del almidón pero con presencia de picos cristalinos más marcados e intensos evidenciando el mayor carácter cristalino de los mismos en comparación con el almidón nativo provenientes de la mayor proporción de amilopectina presente.

VI.2.2. Preparación de las películas SPI-NCA

Una vez preparados y caracterizados los NCA, se procedió a sintetizar las películas de SPI nanoreforzadas con NCA (SPI-NCA). Las películas fueron obtenidas por el método de “*casting*” utilizando glicerol como plastificante. Se prepararon películas con 0, 2, 5, 10, 20 y 40 % m/m (respecto a la masa de SPI) de NCA. Las películas obtenidas mostraron una superficie homogénea y coloración amarillenta siendo en general transparentes pero haciéndose más opacas a medida que se aumentó la cantidad de NCA agregado. Las películas fueron fotografiadas para mostrar el aspecto macroscópico de las mismas. Estas fotografías son mostradas en la Figura VI.2.2.1.



Figura VI.2.2.1. Apariencia de las películas SPI-NCA variando los agregados de NCA

VI.2.3. Caracterización estructural y superficial de las películas SPI-NCA

Desde el punto de vista estructural, la variación en la cantidad de NCA agregados a las diferentes películas se vio reflejada en un aumento en la cristalinidad de las mismas. Analizando los difractogramas de rayos X obtenidos para las distintas películas, pudieron ser observadas las características amorfas de la película proteica sin agregado de NCA (determinado por el aumento de la línea base a 20°). A su vez, también fue observado un aumento de la cristalinidad de las películas (determinada a partir de la aparición de picos correspondientes a fases cristalinas) causado por un aumento en la cantidad de NCA presentes. No se logró la cuantificación de las fases cristalinas de las películas debido a que las mismas contenían una componente amorfa demasiado importante, lo que derivaría en una cuantificación poco precisa. La Figura VI.2.3.1 muestra los difractogramas obtenidos para las películas.

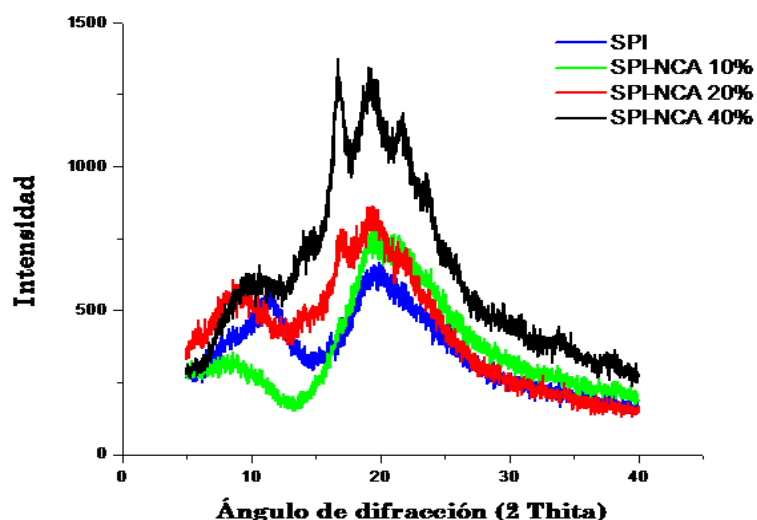


Figura VI.2.3.1. Difractogramas de rayos X de las películas SPI-NCA con 0, 10, 20 y 40% de NCA.

Con el fin de determinar la morfología estructural de la superficie de las películas, se las observó mediante la utilización de microscopios ópticos de distinta amplificación máxima, de un microscopio confocal y mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las figuras VI.2.3.2, VI.2.3.3, VI.2.3.4 y VI.2.3.5 muestran los resultados obtenidos.

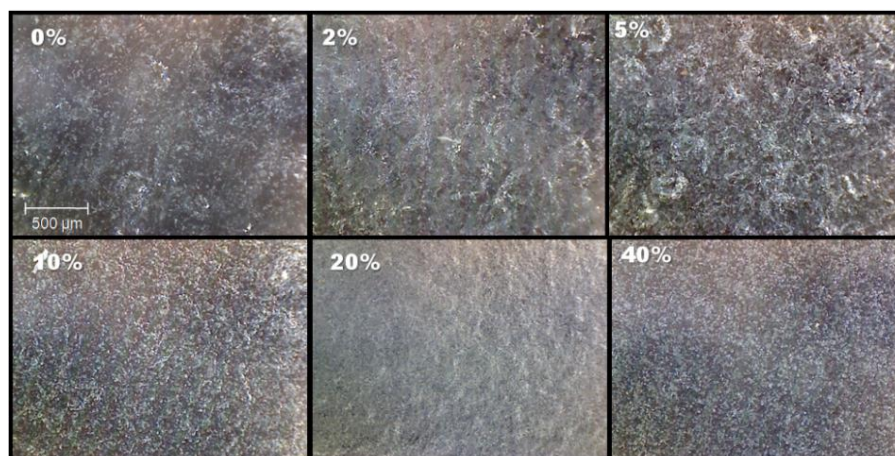


Figura VI.2.3.2. Imágenes de la superficie de las películas SPI-NCA con 0, 2, 5, 10, 20 y 40% de NCA tomadas con un microscopio óptico de 200x.

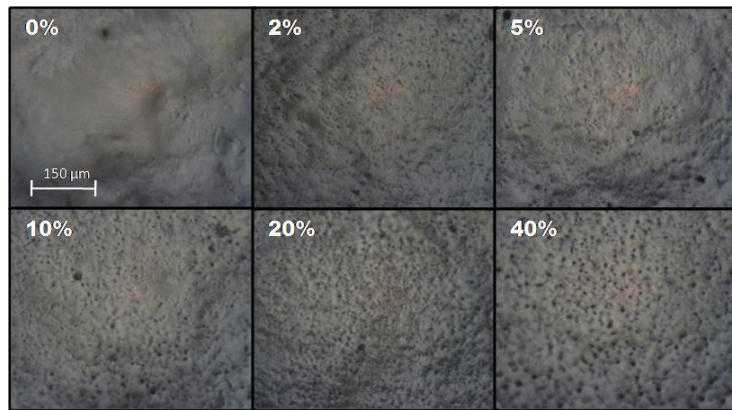


Figura VI.2.3.3. Imágenes de la superficie de las películas SPI-NCA con 0, 2, 5, 10, 20 y 40% de NCA tomadas con un microscopio óptico de 1000x.

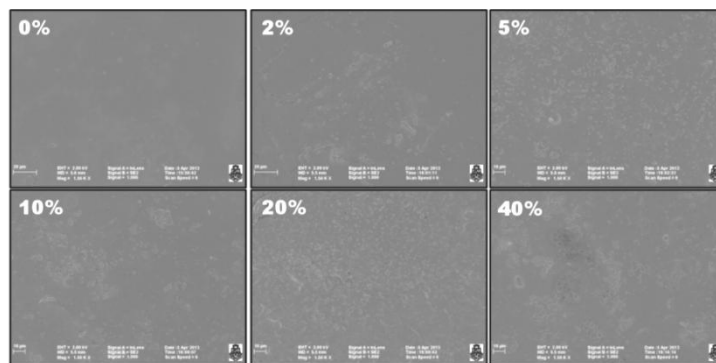


Figura VI.2.3.4. Imágenes de la superficie de las películas SPI-NCA con 0, 2, 5, 10, 20 y 40% de NCA tomadas mediante microscopía SEM.

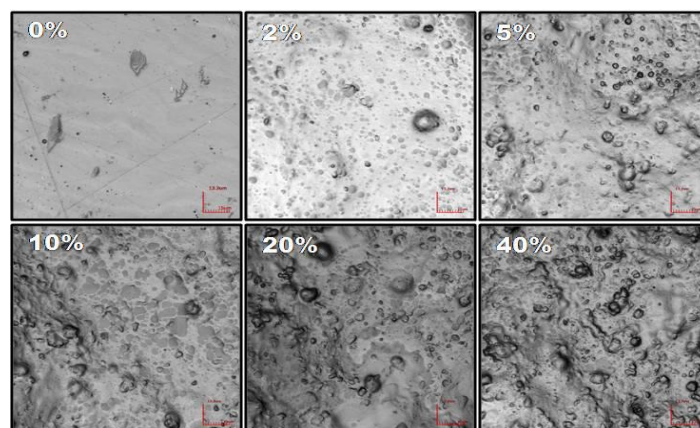


Figura VI.2.3.5. Imágenes de la superficie de las películas SPI-NCA con 0, 2, 5, 10, 20 y 40% de NCA tomadas con un microscopio confocal a 2132x.

En las figuras mostradas anteriormente, la magnificación va en aumento de acuerdo al orden de aparición de las mismas (Figura VI.2.3.2 a VI.2.3.5). En las imágenes obtenidas, se pudo observar el incremento de la

cantidad de estructuras sólidas presentes en las muestras, conforme a como fueron aumentando las cantidades agregadas en la etapa de preparación. Estas estructuras sólidas observadas poseen un tamaño que ronda en el orden de unas pocas micras. Como fue descripto anteriormente, el tamaño promedio de los NCA es de 35 nm por lo que concluimos que las estructuras observadas corresponden a un pequeño porcentaje de NCA de tamaño mucho mayor al promedio, o bien a la formación de agregados que pueden haberse formado en la etapa de preparación de las películas por una dispersión poco eficaz de los NCA. Vale aclarar que los nanocristales de menor tamaño no pueden ser observados, no por un impedimento en la amplificación de los microscopios utilizados, sino porque se encuentran posiblemente ocluidos en la matriz proteica, la cual impediría una buena observación de los mismos.

VI.2.4. Caracterización física de las películas SPI-NCA

Para la caracterización física de las películas, se procedió a determinar los valores de opacidad de las mismas. Para todos los casos se observó alta transparencia, siendo más opacas a medida que se aumenta la cantidad de NCA agregados. De acuerdo a esto, el mayor cambio significativo de opacidad se observó variando de 2 a 5% la cantidad de NCA agregados. Los valores de opacidad medidos se muestran en la Tabla VI.2.4.1.

Películas	OPACIDAD (UA/ μm)
SPI	$1,293 \pm 0,112^A$
SPI-NCA 2%	$1,021 \pm 0,142^A$
SPI-NCA 5%	$2,137 \pm 0,003^B$
SPI-NCA 10%	$2,293 \pm 0,155^B$
SPI-NCA 20%	$2,377 \pm 0,310^B$
SPI-NCA 40%	$2,680 \pm 0,125^B$

Datos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$) de acuerdo al test de Tukey

Tabla VI.2.4.1. Opacidad de las películas SPI-NCA

Luego, las películas fueron caracterizadas determinando propiedades donde el agua tiene un rol preponderante. Estas propiedades son el índice de hinchamiento en agua (S) en función del tiempo, el porcentaje de humedad (MC), la cantidad de materia soluble total (TSM) y la permeabilidad al vapor de agua (WVP). En la Figura VI.2.4.1 se muestran los resultados de S en función del tiempo.

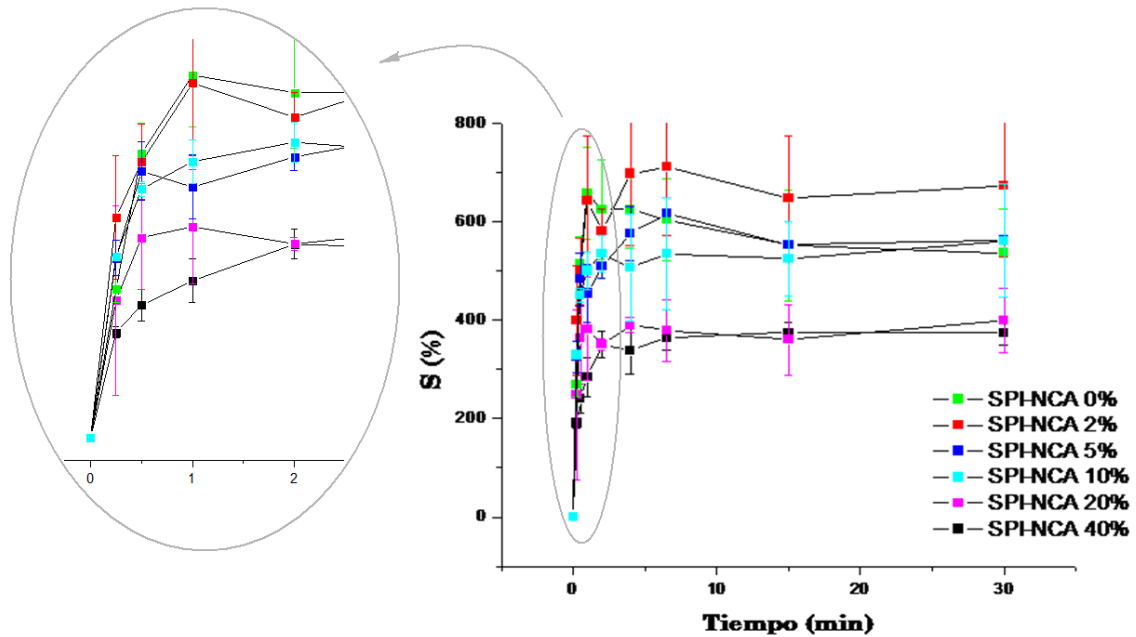


Figura VI.2.4.1. Índices de hinchamiento (S) en función del tiempo de las diferentes películas.

En el gráfico de S en función del tiempo se puede observar claramente que todas las películas se hinchan hasta su máxima capacidad en tiempos relativamente cortos (2 min como máximo) y una vez alcanzado este equilibrio, los hinchamientos en general se mantienen en el tiempo. Esta última afirmación se cumple para todas las películas con excepción de las películas con menor contenido de NCA (SPI con 0, 2 y 5% de NCA). Para estas películas se observó que superado los primeros minutos, los valores de hinchamiento comienzan a descender. Este efecto no es producido por una disminución del hinchamiento real de la película sino por la solubilización parcial de la misma en el agua al momento del ensayo. Esta solubilización produce una disminución en la masa determinada luego de la inmersión en

agua, lo que se ve reflejado en una disminución en el valor de S. Este efecto se da sólo en esta película ya que como se puede ver en la Tabla VI.2.4.2 es la más soluble en agua.

Comparando los hinchamientos máximos de las películas se pueden observar tres grupos de películas con comportamiento diferente. En este análisis se excluirá la película sin agregados de NCA (0%) por el motivo explicado anteriormente. Se observó que la película que más se hincha es la que posee menor cantidad de NCA agregados (2%). Siguiendo con la tendencia, el segundo grupo de películas en magnitud de hinchamiento máximo fueron las películas con 5 y 10% de NCA y por último las películas que menos se hincharon fueron las que poseían mayor cantidad de NCA agregados (20 y 40% de NCA). Este comportamiento refleja la disminución del hinchamiento a medida que aumenta la cantidad de nano-refuerzo agregado, logrando una disminución a la mitad aproximadamente para las películas con mayor agregado de NCA respecto a las demás. En la Tabla VI.2.4.2 se muestran los resultados obtenidos para MC y TSM.

Películas	MC (%)	TSM (%)
SPI	33,56 ± 0,39 ^A	37,84 ± 2,33 ^A
SPI-NCA 2%	35,24 ± 1,08 ^A	31,35 ± 2,09 ^B
SPI-NCA 5%	33,11 ± 1,69 ^A	21,63 ± 1,24 ^C
SPI-NCA 10%	28,28 ± 1,35 ^B	24,71 ± 3,72 ^C
SPI-NCA 20%	27,27 ± 0,67 ^B	22,84 ± 2,34 ^C
SPI-NCA 40%	24,02 ± 0,20 ^C	20,09 ± 0,54 ^C

Datos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$) de acuerdo al test de Tukey

Tabla VI.2.4.2. Contenido de humedad (MC) y materia soluble total (TSM) de las diferentes películas.

En la tabla VI.2.4.2, se puede observar que tanto MC como TSM disminuyen a medida que aumenta la cantidad del refuerzo agregado. Para el caso de MC, si bien la disminución obtenida es muy marcada, se observa

en las películas con grandes agregados de NCA (mayores al 10%), mientras que para el caso de TSM, una disminución muy importante (cerca al 43%) es alcanzada con el agregado de bajas cantidades de NCA (5% de NCA).

Para finalizar la caracterización física, se procedió a determinar la WVP utilizando el ensayo descrito por la norma ASTM ([ASTM Standard \(E96-10\), 2010](#)).

En la Tabla VI.2.4.3 se muestran los resultados obtenidos de WVP.

Películas	WVP (g / Pa s m)
SPI	4,30 .10 ⁻¹⁰
SPI-NCA 5%	4,78 .10 ⁻¹⁰
SPI-NCA 20%	3,93 .10 ⁻¹⁰
SPI-NCA 40%	3,57 .10 ⁻¹⁰

Tabla VI.2.4.3. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas con 0, 5, 20 y 40% de NCA.

En la determinación de WVP, se logró observar que al igual que las propiedades medidas anteriormente, la WVP también disminuye a medida que aumenta la cantidad de NCA, en especial cuando el agregado es de magnitud importante (20% de NCA).

El análisis en conjunto de todas estas propiedades físicas, cuya característica común y principal es que interviene el rol del agua, nos permitió concluir que la presencia de NCA minimiza la afinidad de la matriz proteica por el agua. La explicación de este efecto, viene dada de acuerdo a la compatibilidad existente en la interface matriz proteica / nano-refuerzo. El carácter polar similar de ambos componentes (materiales hidrofílicos) conduce probablemente a una fuerte adhesión entre la proteína y el almidón, debido a fuertes interacciones presentes en las interfaces (enlaces puente hidrógeno, entre otras) minimizando las interacciones de la matriz con el solvente acuoso. Este efecto es más marcado mientras mayor es la

cantidad de nano-refuerzo presente, es decir mientras mayor es el número de interacciones que ocurren entre la matriz y el nano-refuerzo.

Por otro lado, la gran magnitud de los cambios observados radica en el hecho de que la interface existente es extremadamente extensa, producto del pequeño tamaño del refuerzo agregado, por lo que las interacciones toman mayor protagonismo. El mismo efecto se encuentra descrito en bibliografía para películas de pululano (Kristo y Biliaderis, 2007).

Gracias a este efecto, la aplicación de esta metodología de modificación a partir de la adición de NCA a las matrices proteicas, nos permite lograr películas más resistentes al agua, menos hinchables y menos permeables al vapor de agua.

VI.2.5. Caracterización mecánica de las películas SPI-NCA

Luego de la caracterización física, las películas fueron caracterizadas mecánicamente mediante ensayos de tracción siguiendo la metodología descrita por la norma ASTM (ASTM Standard (D882-02), 2002). Para ello, las diferentes películas recortadas en rectángulos de 25 x 100 mm fueron sometidas a tracciones mediante la utilización de un Instrumento de Testeo Universal registrando la resistencia que ejerce la película y obteniendo finalmente el registro de las curvas tensión-deformación para cada muestra. A partir de estas curvas, se determinaron la resistencia a la tracción (TS), la elongación a la rotura (EB) y el módulo de Young (E). Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla VI.2.5.1. A partir de estos resultados, se puede concluir que a medida que se aumenta la cantidad de nano-refuerzo en las películas, el material toma características más rígidas ya que se observa aumento en TS y E. Este hecho se explica del mismo modo que en el caso anterior. Las grandes interacciones existentes entre la matriz proteica y el refuerzo, crean gran cohesión en la película, haciendo que presente mayor resistencia a la tracción, necesitando más energía para poder ser estiradas. De acuerdo a esto, es que en consecuencia se alcanza

también una disminución en los valores de EB, tornando el material menos elongable.

Películas	TS (MPa)	EB (%)	E (Mpa)
SPI	1,10 ± 0,20 ^A	65,95 ± 17,76 ^A	26,89 ± 11,21 ^A
SPI-NCA 2%	1,42 ± 0,22 ^A	53,79 ± 4,02 ^{AB}	55,31 ± 4,78 ^{AB}
SPI-NCA 5%	1,34 ± 0,07 ^A	58,67 ± 9,88 ^A	39,42 ± 9,93 ^{AB}
SPI-NCA 10%	1,79 ± 0,27 ^A	32,17 ± 8,00 ^{BC}	71,05 ± 13,01 ^{BC}
SPI-NCA 20%	2,61 ± 0,26 ^B	41,89 ± 8,61 ^{ABC}	102,23 ± 14,93 ^C
SPI-NCA 40%	5,08 ± 0,48 ^C	21,35 ± 10,54 ^C	310,34 ± 21,55 ^D

Datos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$) de acuerdo al test de Tukey

Tabla VI.2.5.1. Resistencia a la tracción (TS), elongación a la rotura (EB) y módulo de Young (E) de las películas.

VI.3. Conclusiones parciales

En este trabajo, se han sintetizado nanocristales a partir de la hidrólisis ácida de almidón de maíz. Los mismos fueron caracterizados y utilizados como material de refuerzo para películas de SPI. Se evaluaron propiedades físicas, estructurales y mecánicas de las películas de acuerdo a la cantidad del refuerzo agregado. Por otra parte, los distintos agregados de NCA fueron evidenciados mediante la caracterización superficial de las películas.

Respecto a la metodología empleada de optimización y mejoramiento de las propiedades deficientes de películas proteicas, parece brindar buenos resultados ya que las mejoras obtenidas mediante la utilización de NCA como nano-refuerzos de las películas de SPI en sus propiedades mecánicas (dadas por un incremento en la resistencia del material de un 462% en detrimento de una disminución de un 68% de la elongación), y físicas (dadas por una disminución del 50% en el hinchamiento y del 43% en la cantidad de materia soluble en agua), hacen posible la utilización de este material para variadas aplicaciones, las cuales resultan inviables a partir del material original (películas SPI). En particular, la utilización de estas películas como material de recubrimiento de alimentos parece ser la aplicación más apropiada ya que los requerimientos que se necesitan para la misma tales como ser inocuo, transparente, inodoro e insípido, resistente en estado húmedo, no hinchable, impermeable al vapor de agua y oxígeno, y resistente a la tracción, pueden ser satisfechos completamente por estas películas, sumado al hecho de presentar características amigables con el medio ambiente por poseer en su totalidad componentes biodegradables.

VI.4. Bibliografía

- Aila-Suárez, S., Palma-Rodríguez, H.M., Rodríguez-Hernández, A.I., Hernández-Uribe, J.P., Bello-Pérez, L.A., Vargas-Torres, A., 2013. Characterization of films made with chayote tuber and potato starches blending with cellulose nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 98, 102–107.
- ASTM Standard (D882-02), 2002. “Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting”. ASTM International West Conshohocken, PA.
- ASTM Standard (E96-10), 2010. ASTM Standard. (2010). “Standard test methods for water vapor transmission of materials” (E96M-10). West Conshohocken, PA
- Chen, D., Lawton, D., Thompson, M.R., Liu, Q., 2012. Biocomposites reinforced with cellulose nanocrystals derived from potato peel waste. *Carbohydrate Polymers* 90, 709–716.
- Chen, Y., Cao, X., Chang, Peter R, Huneault, M.A., 2008. Comparative study on the films of poly (vinyl alcohol)/ pea starch nanocrystals and poly (vinyl alcohol)/ native pea starch. *Carbohydrate Polymers* 73, 8–17.
- Chung, Y.L., Ansari, S., Estevez, L., Hayrapetyan, S., Giannelis, E.G., Lai, H.M., 2010. Preparation and properties of biodegradable starch–clay nanocomposites. *Carbohydrate Polymers* 79, 391–396.
- Cyras, V.P., Manfredi, L.B., Ton-That, M.-T., Vázquez, A., 2008. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers* 73, 55–63.
- Dufresne, A., 2010. Processing of polymer nanocomposites reinforced with polysaccharide nanocrystals. *Molecules* 15, 4111–4128.
- Echeverría, I., Eisenberg, P., Mauri, A.N., 2014. Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *Journal of Membrane Science* 449, 15–26.
- Faruk, O., Bledzki, A.K., Fink, H., Sain, M., 2012. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Progress in Polymer Science* 37, 1552–1596.
- Gao, W., Dong, H., Hou, H., Zhang, H., 2011. Effects of clays with various hydrophilicities on properties of starch–clay nanocomposites by film blowing. *Carbohydrate Polymers* 88, 321–328.

- García, N.L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M., Goyanes, S., 2011. Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers* 84, 203–210.
- García, N.L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M., Goyanes, S., 2009. Influencia del tipo de almidón empleado como matriz en las propiedades físico-químicas de biocompuestos biodegradables. *Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 3, 903–909.
- Jenkins, P.J., Donald, A.M., 1997. The effect of acid hydrolysis on native starch granule structure. *Starch* 8, 262–267.
- Johar, N., Ahmad, I., Dufresne, A., 2012. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products* 37, 93–99.
- Kristo, E., Biliaderis, C.G., 2007. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers* 68, 146–158.
- Kumar, P., Sandeep, K.P., Alavi, S., Truong, V.D., Gorga, R.E., 2010. Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. *Journal of Food Engineering* 100, 480–489.
- Lin, N., Huang, Jin, Chang, Peter R, Anderson, D.P., Yu, J., 2011. Preparation, modification, and application of starch nanocrystals in nanomaterials: A Review. *Journal of Nanomaterials* 2011.
- Lodha, P., Netravali, A.N., 2005. Characterization of stearic acid modified soy protein isolate resin and ramie fiber reinforced “green” composites. *Composites Science and Technology* 65, 1211–1225.
- Müller, C.M.O., Laurindo, J.B., Yamashita, F., 2009a. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. *Food Hydrocolloids* 23, 1328–1333.
- Müller, C.M.O., Laurindo, J.B., Yamashita, F., 2009b. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch-based films at different relative humidity values. *Carbohydrate Polymers* 77, 293–299.
- Nielsen, L.E., 1967. Models for the permeability of filled polymer systems. *Journal of Macromolecular Science Part A: Pure Appl. Chem.* 1, 929–942.
- Paul, D.R., Robeson, L.M., 2008. Polymer nanotechnology: nanocomposites. *Polymer* 49, 187–204.

- Pires, W., Neto, F., Alves, H., Oliveira, N., Pasquini, D., 2013. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. *Industrial Crops & Products* 42, 480–488.
- dos Santos, R.M., Flauzino Neto, W.P., Silvério, H.A., Martins, D.F., Dantas, N.O., Pasquini, D., 2013. Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. *Industrial Crops and Products* 50, 707–714.
- Savadekar, N.R., Mhaske, S.T., 2012. Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers* 89, 146–151.
- Schlemmer, D., Angélica, R.S., Sales, M.J.A., 2010. Morphological and thermomechanical characterization of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. *Composite Structures* 92, 2066–2070.
- Sinha Ray, S., Bousmina, M., 2008. *Polymer nanocomposites and their applications*. Valencia, CA (USA): American Scientific Publishers.
- Smith, J.S., Bedrov, D., Smith, G.D., 2003. A molecular dynamics simulation study of nanoparticle interactions in a model polymer-nanoparticle composite. *Composite Science and Technology* 63, 1599–1605.
- Wang, Y.-J., Truong, V.-D., Wang, L., 2003. Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers* 52, 327–333.
- Zheng, H., Ai, F., Wei, M., Huang, J., Chang, P. R., 2007. Thermoplastic soy protein nanocomposites reinforced by carbon nanotubes. *Macromolecular Materials and Engineering* 292, 780–788.

Capítulo VII

Mezclas de polímeros:

Obtención y caracterización de películas SPI-PLA

Capítulo VII

Mezclas de polímeros:

Obtención y caracterización de películas SPI-PLA

En este capítulo se describe la obtención de películas bicapa de proteína de soja (SPI) plastificadas con glicerol (Gli) y poli (ácido láctico) (PLA). Se evaluó el efecto de la utilización de distintas proporciones de poli (ácido láctico) sobre propiedades físico-químicas, térmicas y mecánicas de las películas, con el objetivo de lograr formulaciones finales con propiedades optimizadas con respecto al material de origen.



Figura VII.1. Fotografía de película SPI-PLA 60/40 termo-sellada en sus extremos para formar una bolsa.

VII.1. Introducción

Como se ha mencionado anteriormente, existe una gran variedad de plásticos biodegradables entre los que se puede enumerar los de origen natural, producidos por microorganismos como los polihidroxicanoatos (PHA) y sintéticos como los polilactatos. Por sus altas tasas de biodegradabilidad y sus excelentes propiedades físico-mecánicas, los PHA y los polilactatos han resultado ser los de más amplia aplicación en la actualidad. Dentro de los polilactatos, el poli (ácido láctico) es el material más utilizado (sobre todo en el envasado de alimentos), debido a que su producción se encuentra extensamente desarrollada en la actualidad.

El poli (ácido láctico), o ácido poliláctico (PLA) es un poliéster alifático (Figura VII.1.1), termoplástico, biodegradable y derivado de recursos renovables, de productos tales como almidón de maíz (en los Estados Unidos), mandioca (principalmente en Asia) o caña de azúcar (en el resto de mundo).

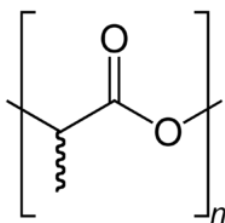


Figura VII.1.1. Estructura molecular del PLA

Este material ha mostrado propiedades físico-mecánicas excelentes, comparables con las que brindan los plásticos convencionales. Algunos estudios indican que es adecuado en una amplia gama de aplicaciones inclusive en comparación con el polietileno de baja densidad ampliamente utilizado. (Koide y Shi, 2007)

La temperatura de transición vítrea del PLA se encuentra en el rango de 50 a 80 °C mientras que la temperatura de fusión está en el rango de 130 a 180 °C. Además, puede ser procesado mediante la utilización de maquinaria utilizada para polímeros convencionales, con mínimos ajustes. Diferentes propiedades de PLA tales como el punto de fusión, la resistencia

mecánica y la cristalinidad, están determinadas por la arquitectura del polímero (contenido de isómeros D y L) y por el peso molecular.

A nivel industrial, la preparación del polímero PLA es generada a partir del ácido láctico o ácido 2-hidroxipropanoico. Este ácido fue descubierto en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele pero fue obtenido a escala industrial en 1880 en Estados Unidos por Charles Avery. Sus principales aplicaciones industriales se han centrado en sectores como: alimentario (acidulante, saborizante, emulsificante, y conservante), farmacéutico (formando parte de humectantes y pomadas de uso tópico), cosmético y plásticos (aditivo, agente de terminación). Existen dos procesos básicos para la obtención de ácido láctico que consisten en rutas químicas y biotecnológicas. Actualmente, la ruta biotecnológica produce más del 95 % del consumo mundial de ácido láctico y consiste en la fermentación de carbohidratos con bacterias y hongos, aunque industrialmente está más extendida la fermentación bacteriana (www.tecnologiadelosplasticos.blogspot.com.ar, 2011). El ácido láctico no puede ser directamente polimerizado ya que cada reacción de polimerización genera una molécula de agua, cuya presencia degrada la formación de la cadena polimérica, hasta el punto tal que se obtienen pesos moleculares muy bajos. Para resolver este inconveniente, el ácido láctico es sometido a una esterificación simple y luego ciclado catalíticamente para formar un éster de dilactato cíclico. A pesar de que la dimerización también genera agua, puede ser separada antes de la polimerización. El PLA de alto peso molecular se produce a partir del éster de dilactato (lactida) por polimerización por apertura de anillo usando catalizadores. Este mecanismo no genera agua, por lo tanto puede obtenerse una amplia gama de pesos moleculares. La polimerización de una mezcla racémica de ácidos L y D-lácticos conduce por lo general a la obtención de Poli (D-L-ácido láctico) (PDLLA), que son amorfos. El uso de catalizadores estereoespecíficos, puede llevar a formar PLA heterotáctico de mayor cristalinidad.

A nivel mundial, la empresa Cargill fue una de las primeras compañías que desarrolló los polímeros de PLA. Cargill comenzó a

investigar la tecnología de producción de PLA en 1987, y su producción en planta data de 1992. En 1997 Cargill se asoció con la empresa Dow Chemical Company, creando NatureWorks LLC. Otras empresas productoras de PLA son: Teofan (Alemania), Hycail (Holanda) y Mitsui Chemicals Inc (Japón).

Una de las características que ha suscitado gran interés en el PLA, es su capacidad de ser biodegradado bajo condiciones adecuadas, a diferencia del resto de los polímeros sintéticos. Esta propiedad le confiere una gran ventaja desde el punto de vista ecológico, además de ser un polímero que se obtiene a partir de recursos renovables. Sin embargo, los altos costos en su producción hacen que resulte de difícil implementación para el reemplazo de los plásticos convencionales derivados del petróleo. Recientemente, materiales compuestos de PLA que comprenden otros polímeros o materiales inorgánicos, están siendo investigados con el objetivo de reducir los costos. Para este fin, los polímeros naturales tales como celulosa, almidón, proteína de soja y otros residuos agrícolas, son utilizados a menudo como polímeros renovables de bajo costo para formar compuestos con PLA (Bo et al., 2010).

Debido a esto, es que se planteó la utilización de dos componentes para formar un material compuesto. Uno de ellos es el PLA (polímero sintético) mientras que el otro es SPI. Los materiales compuestos que finalmente se obtuvieron, presentaron excelentes propiedades por la sinergia producida entre las propiedades beneficiosas del PLA (excelentes propiedades mecánicas, baja solubilidad en agua, baja permeabilidad al vapor de agua) y las de SPI (bajo costo, excelentes propiedades filmogénicas y baja permeabilidad al oxígeno, aromas y lípidos).

VII.2. Resultados y discusión

VII.2.1. Preparación de las películas bicapa

Las películas se prepararon utilizando diferentes proporciones (%) de los componentes que la forman. Se utilizaron las siguientes relaciones SPI / PLA: SPI 100, 60/40 y 50/50 denominando las películas como SPI 100, SPI-PLA 60/40 y SPI-PLA 50/50, respectivamente. Las mismas se prepararon mediante el método de “*doble casting*”. El procedimiento de preparación se encuentra descrito en el capítulo II y se puede observar esquematizado en la Figura VII.2.1.1.

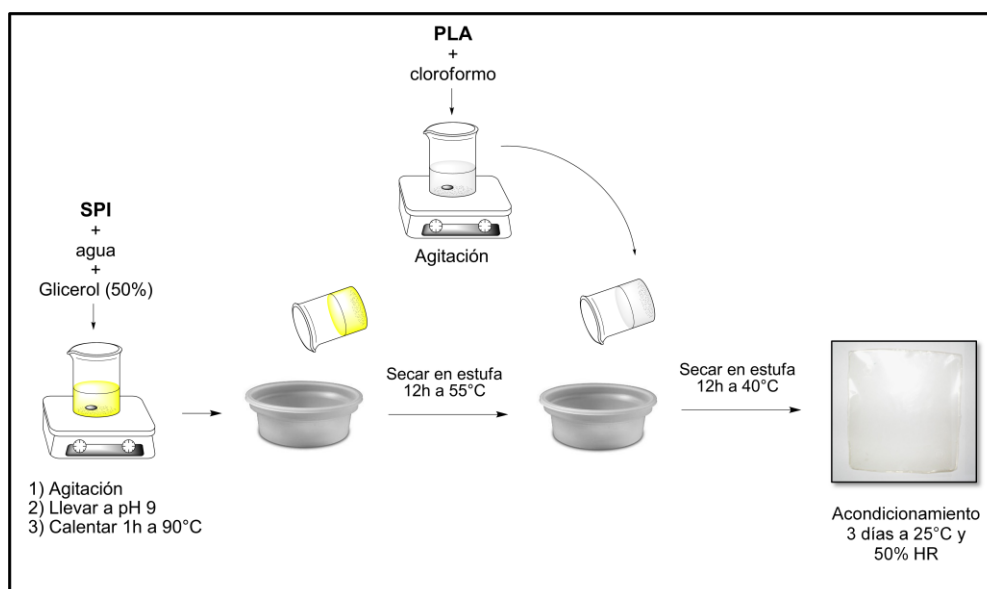


Figura VII.2.1.1. Procedimiento de preparación de las películas SPI-PLA

Las películas sintetizadas mostraron gran compatibilidad entre las capas, ya que no se observó separación en ninguna de las determinaciones realizadas.

También, las películas bicapa mostraron ser termosellables mediante la utilización de un instrumento tradicional de sellado térmico. La Figura VII.2.1.2 muestra la apariencia de la película SPI-PLA 60/40 sellada para formar una bolsa y el instrumento utilizado para tal fin. La posibilidad de ser termosellada representa una importante ventaja tecnológica para la

utilización de este material como embalaje o recubrimiento. Las películas fueron caracterizadas físico-química, térmica y mecánicamente mediante la utilización de diferentes técnicas.

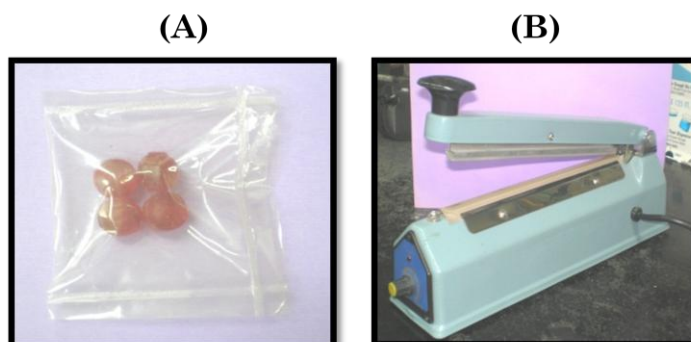


Figura VII.2.1.2. (A) Apariencia de la película SPI-PLA 60/40 termosellada y (B) termoselladora utilizada.

VII.2.2. Caracterización química de las películas SPI-PLA

La caracterización química de ambas caras de la película SPI-PLA 50/50 se llevó a cabo por espectroscopía infrarroja mediante la utilización del accesorio de reflectancia total atenuada (FT-IR-ATR). Esta técnica permite la obtención de los espectros de las superficies de la película. Se obtuvieron espectros con características diferentes para cada cara, donde se pudieron observar las bandas características de cada compuesto puro.

Las bandas de absorción características observadas para la capa de SPI fueron encontradas a $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ (tensiones de los grupos O-H y N-H, capaces de formar enlaces puente hidrógeno con el grupo carbonilo del enlace peptídico); 2928 cm^{-1} (estiramiento asimétrico C-H alifático); 1644 cm^{-1} (estiramiento C=O); 1536 cm^{-1} (deformación N-H); 1398 cm^{-1} (deformación N-H); 1234 cm^{-1} (estiramiento N-C) y 1104 cm^{-1} (estiramiento C-O).

En los espectros de la superficie correspondiente a la capa de PLA, se observaron los siguientes picos: una absorción débil a 2994 cm^{-1} (estiramiento C-H alifáticos); 1748 cm^{-1} (estiramiento C=O); 1454 cm^{-1} (deformación asimétrica C-H de $-\text{CH}_3$); 1382 cm^{-1} (deformación simétrica C-H de $-\text{CH}_3$); 954 cm^{-1} (deformación O-H de ácido carboxílico) y a 1186 y 1078

cm⁻¹ (estiramiento C-O). Las mismas bandas características fueron previamente informadas en literatura (Bo et al., 2010; González et al., 2011; Guerrero et al., 2011, 2010; Jiménez Bonilla et al., 2012; Soliman et al., 2007). De este modo, fue posible confirmar la naturaleza química de cada componente. Se determinó también que los dos polímeros no se mezclaron entre sí durante la preparación ya que los espectros obtenidos de cada capa corresponden a los espectros de cada componente puro. Además, se llevó a cabo un espectro de IR convencional a través de la película, en la que se encontraban representadas las dos capas de película, ya que se pudieron observar las bandas características de ambos componentes. Los espectros realizados son mostrados en la Figura VII.2.2.1.

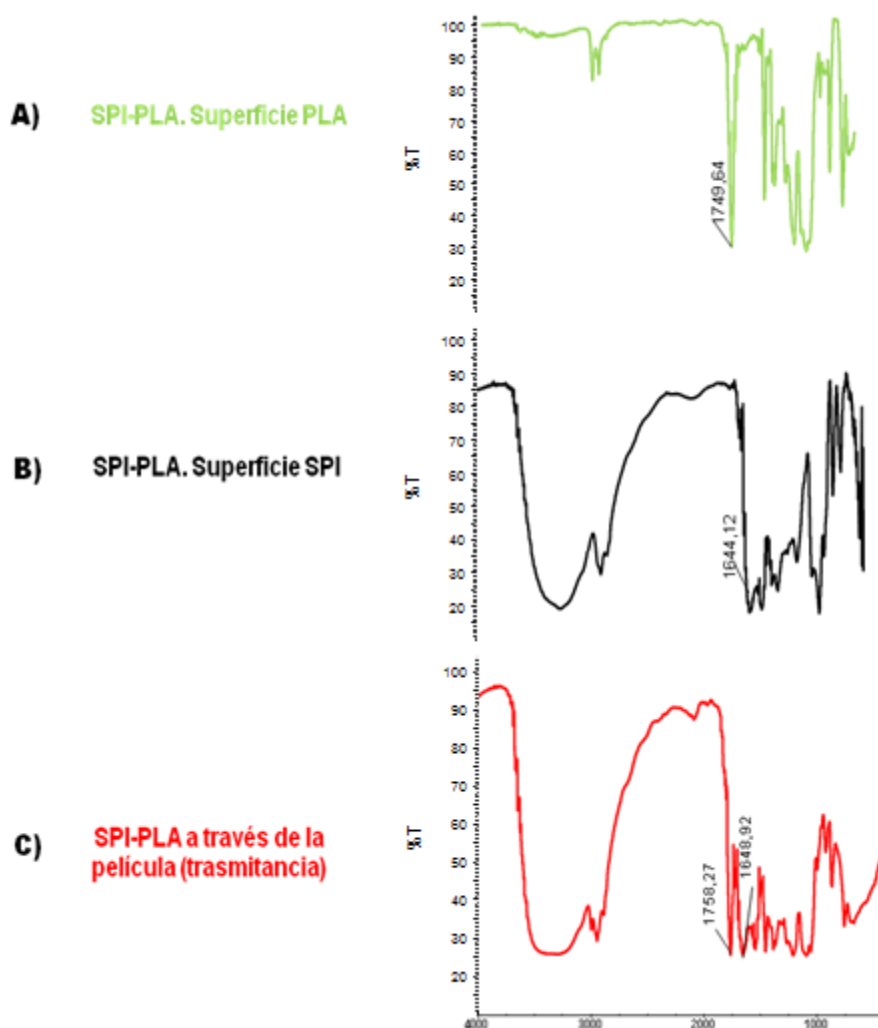


Figura VII.2.2.1. Espectros FT-IR de la película SPI-PLA 50/50: A) capa de PLA; B) capa de SPI; C) ambas capas

VII.2.3. Caracterización física de las películas SPI-PLA

Las muestras fueron caracterizadas físicamente mediante la determinación de la opacidad de cada película. La Tabla VII.2.3.1 muestra los resultados obtenidos. Es bien sabido que PLA forma películas transparentes (Martino et al., 2009). Los valores de opacidad obtenidos en las películas preparadas fueron particularmente bajo, lo cual representa la notable transparencia de las películas. Por otra parte, las películas que contienen PLA son más transparentes que la que no lo contiene. La baja opacidad de las películas bicapa nos da una idea de la gran compatibilidad presente entre las dos capas.

Película	Opacidad (UA/ μm)
SPI 100	$1,35 \pm 0,20^B$
SPI-PLA 60/40	$0,82 \pm 0,05^A$
SPI-PLA 50/50	$0,71 \pm 0,12^A$

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla VII.2.3.1. Valores de opacidad de las películas SPI-PLA

A su vez, se realizaron determinaciones de ángulo de contacto. Como ya se explicó anteriormente, este factor representa una medida de la humectabilidad de una superficie por un líquido. En líneas generales, define el carácter hidrófilo / hidrófobo de la superficie.

Los resultados de las determinaciones del ángulo de contacto medidos en ambas superficies de las películas y las fotografías de las gotas de agua formadas pueden ser observados en la Figura VII.2.3.1.

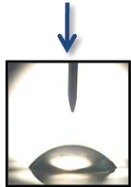
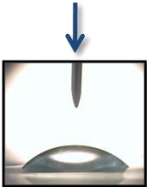
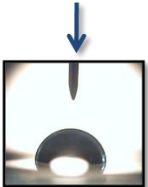
SPI	SPI-PLA lado SPI	SPI-PLA lado PLA
$(46,95 \pm 4,53)^\circ$	$(46,81 \pm 1,54)^\circ$	$(82,20 \pm 2,48)^\circ$
		

Figura VII.2.3.1. Valores de ángulo de contacto medidos en ambas superficies de las películas (SPI 100 y SPI-PLA 50/50) y fotografías de las gotas de agua obtenidas durante las determinaciones.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que la capa de PLA es sustancialmente más hidrofóbica que la capa de SPI y que además la presencia de la capa de PLA en las películas bicapa no afecta prácticamente el valor del ángulo de contacto de la superficie de SPI en comparación con la película SPI 100. La hidrofobicidad producida por la capa de PLA brinda un comportamiento diferente a las películas bicapa al momento de sufrir la interacción del agua. Estos cambios en el comportamiento, representan algunas de las mejoras de las mismas con respecto a las películas de SPI como se analiza en los siguientes ensayos.

Continuando con la caracterización de estos materiales preparados, se realizaron estudios con el objetivo de analizar el efecto de la variación en el carácter hidrofílico/hidrofóbico de las películas sobre ciertas propiedades relevantes en las que influye el agua. Como era de esperar, se observó una marcada disminución en el índice de hinchamiento (S), contenido de humedad (MC), cantidad de materia soluble total en agua (TSM) y permeabilidad al vapor de agua (WVP), cuando se aumentó la proporción de PLA ya que disminuye la afinidad del material por el agua. Los resultados se muestran en la Tabla VII.2.3.2.

Cuando se realizó el estudio del índice de hinchamiento, se encontró que, al momento en que las películas se pusieron en contacto con agua,

mostraron inicialmente un estado de reblandecimiento, seguido por un aumento en el hinchamiento por absorción de agua. Por otra parte, en todos los casos, S aumentó marcadamente en los primeros minutos del ensayo para luego comenzar a disminuir, ya que parte de la película fue probablemente perdida por solubilización durante el ensayo. Un comportamiento similar fue encontrado para las películas de SPI entrecruzadas con Gen (ver capítulo III) (González et al., 2011). Los resultados mostraron una marcada diferencia entre el hinchamiento de las películas SPI 100 y ambas SPI-PLA, siendo mayor la disminución a medida que aumenta la proporción del PLA en la película. Este comportamiento también fue reportado en la literatura para mezclas físicas de SPI y PLA preparadas por extrusión (Zhang et al., 2006).

A su vez, se estudió la cantidad de materia soluble total (TSM) de cada película en agua. La solubilidad en agua es una propiedad que restringe las posibles aplicaciones de estos materiales, sobre todo en el ámbito de la conservación de alimentos. Películas con baja solubilidad en agua son necesarias para la protección de los alimentos con actividad de agua (aw) alta o intermedia (Sébastien et al., 2006).

En el presente trabajo se encontró que la TSM para las películas que contienen PLA fue mucho menor respecto a la de la película SPI 100, siendo el componente proteico el que es parcialmente solubilizado en las películas bicapa. Esta disminución representa una notable mejora en el comportamiento del material al momento de ser utilizado en contacto con agua.

Por otro lado, es sabido que el PLA posee buenas propiedades de barrera al vapor de agua (Siparsky et al., 1997). Esto pudo ser demostrado en los estudios de permeabilidad de las películas, donde se obtuvieron disminuciones en los valores después de la adición de la capa de PLA, es decir que los valores de permeabilidad al vapor de agua obtenidos para las películas bicapa resultaron inferiores en comparación con los obtenidos para la película SPI 100. En literatura se encuentra descrito un sistema de

múltiples capas que muestra un efecto similar producido por capas de PLA en películas proteicas (gelatina) (Martucci y Ruseckaite, 2010). En este trabajo de referencia, el efecto es más marcado (hay mayor disminución) ya que son dos capas de PLA que cubren la capa de proteína, formando una película de tres capas.

Película	S (%)	TSM (%)	WVP ($\cdot 10^{11} \text{ g m Pa}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)	MC (%)
SPI 100	1005,4 ± 56,2 ^B	83,4 ± 10,4 ^B	14,9 ± 0,5 ^A	32,3 ± 2,3 ^B
SPI-PLA 60/40	209,3 ± 10,8 ^A	32,0 ± 15,2 ^A	3,4 ± 0,1 ^B	27,5 ± 2,5 ^B
SPI-PLA 50/50	185,4 ± 12,4 ^A	40,1 ± 5,0 ^A	2,3 ± 0,1 ^C	18,5 ± 3,4 ^A

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla VII.2.3.2. Índice de hinchamiento (S), materia soluble total (TSM), contenido de humedad (MC) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las diferentes películas SPI-PLA.

VII.2.4. Caracterización mecánica de las películas SPI-PLA

Para evaluar las propiedades mecánicas de las películas preparadas se realizaron ensayos de tracción siguiendo la metodología descrita por la correspondiente norma ASTM (ASTM Standard (D882-02), 2002). Se obtuvieron curvas tensión-deformación, a partir de las cuales se determinaron la resistencia a la tracción (TS), el módulo de Young (E) y la elongación a la rotura (EB) (propiedades representativas de los materiales en forma de películas). A partir de los resultados que se muestran en la Tabla VII.2.4.1, se pudo demostrar que la presencia de PLA produce marcadas disminuciones de EB y aumentos en TS y E, lo que significa que el material se vuelve menos elongable y más resistente, convirtiéndose en un material más rígido. A su vez, un aumento en la proporción de PLA produce un efecto aún más marcado. Un comportamiento similar se ha descrito en bibliografía para sistemas proteicos de gelatina recubiertos de dos capas de PLA (Martucci y Ruseckaite, 2010). Los autores explican que el hecho de que la respuesta mecánica de las películas preparadas no responde a una

regla de simple mezclado de los componentes, es asignado a las interacciones entre los mismos, (particularmente las interacciones entre el grupo carbonilo del PLA y el hidrógeno de los enlaces peptídicos de las proteínas) en la interfaz proteína/PLA.

Película	EB (%)	TS (MPa)	E (MPa)	Espesor (μm)
SPI 100	$24,63 \pm 0,13^B$	$1,08 \pm 0,34^A$	$22,80 \pm 6,14^A$	45 ± 8^A
SPI-PLA 60/40	$1,09 \pm 0,09^A$	$8,57 \pm 1,61^B$	1085 ± 134^B	51 ± 6^A
SPI-PLA 50/50	$1,25 \pm 0,02^A$	$13,69 \pm 0,94^C$	1579 ± 52^C	54 ± 5^A

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla VII.2.4.1. Elongación a la rotura (EB), resistencia a la tracción (TS), módulo de Young (E) y espesor de las películas SPI-PLA.

VII.2.5. Caracterización térmica de las películas SPI-PLA

Se realizaron curvas de descomposición térmica mediante un análisis termo gravimétrico (TGA) de los componentes utilizados en la preparación de la película y de la película SPI-PLA 60/40 (Figura VII.2.5.1).

En la curva de descomposición térmica de la película SPI 100, cuatro pérdidas de masa significativas pudieron ser encontradas. Las primeras dos ($56,20$ y $159,15$ °C) corresponden a la eliminación de las moléculas de agua presentes en la SPI (agua incluida y adsorbida, respectivamente). La descomposición térmica de la proteína consiste en un proceso que comienza a 225 °C y termina a 350 °C, donde pudieron ser observados dos puntos de máxima velocidad ($236,95$ y $302,35$ °C) para dos degradaciones diferentes de la fracción proteica. A 550 °C, el residuo obtenido fue del 18%. En la curva de descomposición térmica de la película de PLA, se pudo observar una drástica pérdida de masa correspondiente a la temperatura de descomposición del PLA a $358,25$ °C. Por otra parte, la película bicapa SPI-PLA muestra una superposición de los procesos de pérdida de masa de los componentes implicados. Además, la pérdida de agua también pudo ser

observada tal como fue corroborada en la película SPI 100. En cuanto a la degradación principal, se comprobó que este proceso se desarrolló a una temperatura similar a la de la película SPI 100. En la superposición de los tres TGA, se pudo observar que la película bicapa mostró un mejor comportamiento térmico hasta los 300 °C (más estabilidad) con respecto a la película SPI 100, ya que, a igual temperatura, las pérdidas de masa son más bajas. Un comportamiento térmico similar se encuentra descrito en la literatura para mezclas SPI-PLA (Calabria et al., 2009).

Se realizaron curvas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para las películas SPI 100, PLA y SPI-PLA 60/40. En la curva obtenida para la película SPI 100, no se observó temperatura de fusión, mientras que en la curva de PLA se observó un evento de fusión a 157,01 °C con un ΔH_f de 18,70 J/g. La curva de la película bicapa mostró la sumatoria de las propiedades de sus componentes. Sin embargo, en esta película, el fenómeno de fusión del PLA se encuentra influenciado por la capa de SPI ya que muestra disminución en su temperatura siendo esta de 154,48 °C y el ΔH_f de 6,328 J/g.

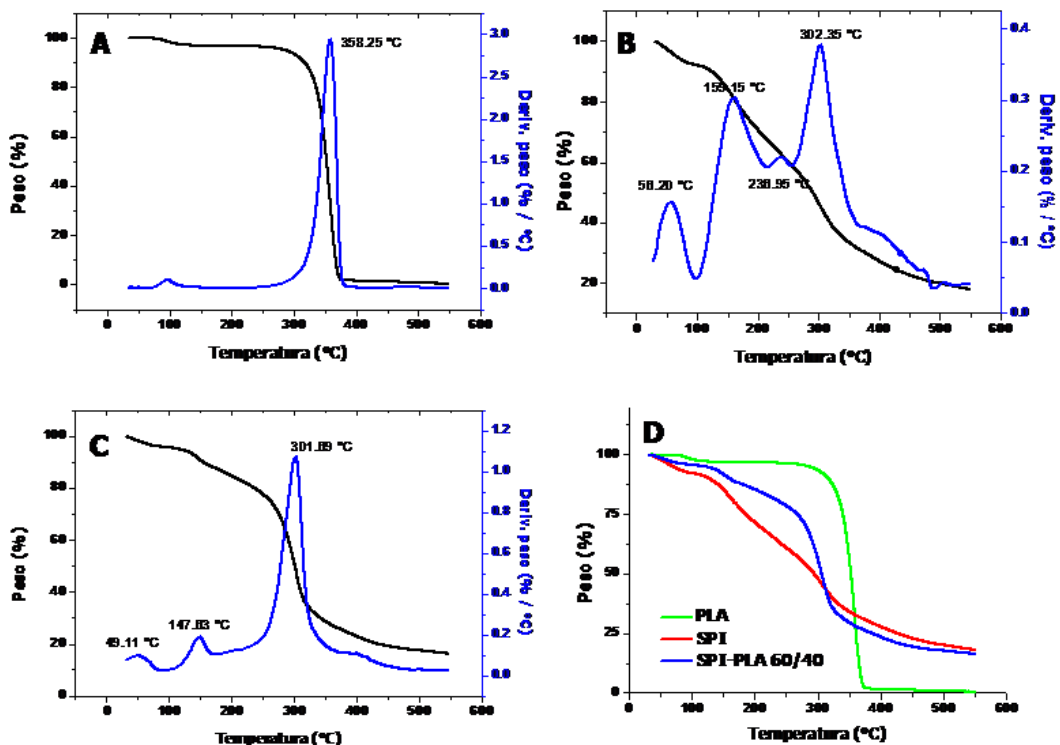


Figura VII.2.5.1. TGA y DTGA (derivada) de las películas PLA (A); SPI 100 (B); SPI-PLA 60/40 (C) y superposición de los TGA de las tres películas (D).

VII.2.6. Ensayos de biodegradación de las películas SPI-PLA

El seguimiento de la degradación de las diferentes películas (SPI 100, SPI-PLA 60/40 y SPI-PLA 50/50) se llevó a cabo durante 75 días bajo condiciones de enterramiento en suelo. La humedad del suelo se mantuvo constante a (36 ± 3) %. Este valor de humedad se mantuvo por debajo de la humedad de saturación del suelo para reducir al mínimo la pérdida de masa por solubilización en agua. El ensayo se realizó por triplicado. El porcentaje de pérdida de masa en cada película fue representada en un gráfico en función del tiempo (días) (Figura VII.2.6.1). De acuerdo con los datos, se observó que después de 55 días, la película SPI 100 alcanzó el 100% de la degradación, mientras que las películas SPI-PLA 60/40 y 50/50 fueron degradados por encima de 60 y 50%, respectivamente. Estos resultados sugieren que la totalidad de la capa de SPI fue degradada en este tiempo, mientras que sólo una porción de la capa de PLA se degradó en el período analizado. Recordando los resultados obtenidos en los ensayos de biodegradación de las películas de SPI entrecruzadas con Gen (capítulo III), observamos que la biodegradación completa de la película de SPI 100 fue alcanzada en 19 días realizando un ensayo de biodegradación similar. Esta diferencia se explica de acuerdo a que aquel ensayo fue realizado a una humedad relativa de suelo mayor (48 ± 4) % (González et al., 2011) demostrando la estrecha relación existente entre la humedad disponible y la actividad microbiana del suelo.

Retomando al ensayo correspondiente a las películas SPI-PLA, vemos que después de 75 días, la degradación alcanzada fue de 80 y 65% para las películas SPI-PLA 60/40 y 50/50, respectivamente. La capa de PLA se encuentra parcialmente degradada, mostrando un menor porcentaje de degradación en comparación con el componente SPI. Los puntos en la Figura VII.2.6.1 muestran los valores de pérdida de peso (%), mientras que las líneas continuas indican la tendencia de degradación.

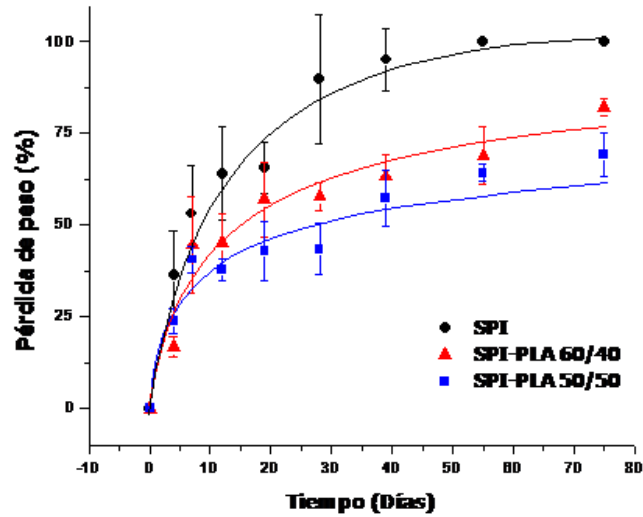


Figura VII.2.6.1. Pérdida de peso de los diferentes films en función del tiempo.

Luego de haber descrito la caracterización físico-química y la degradación de las películas SPI-PLA, se prepararon películas que contenían agentes activos con las que se evaluó el rendimiento de este material como recubrimiento activo (antibacteriano y antifúngico) de alimentos. Estos resultados son desarrollados y mostrados en el Capítulo VIII.

VII.3. Conclusiones parciales

En esta parte del trabajo se lograron preparar películas biodegradables de dos componentes (SPI y PLA) en forma de una y dos capas por el método de “*casting*” sin la necesidad del agregado de agentes compatibilizantes, adhesivos o modificaciones químicas de las superficies de las mismas. En las películas sintetizadas no se observó separación de fases demostrando compatibilidad entre las mismas. Estas, pudieron ser caracterizadas completamente desde el punto de vista físico-químico, mecánico y térmico. Se realizó esta evaluación observando en general que con el agregado de PLA se lograron mejoras muy marcadas de propiedades fundamentales donde tiene influencia el rol del agua, tales como TSM, WVP y S. Este efecto se debió puramente al aumento del carácter hidrofóbico brindado por la capa de PLA a las películas bicapa. Por otro lado, las excelentes propiedades mecánicas que posee el PLA han contribuido a mejorar los materiales bicapa sintetizados produciéndose un efecto sinérgico en estas propiedades debido a las interacciones presentes en ambos componentes.

Por otro lado, las películas bi-capas obtenidas resultaron muy transparentes y termo-sellables, lo cual representa una gran ventaja tecnológica al momento de ser implementadas a nivel industrial para diversas aplicaciones, principalmente como recubrimientos. Las propiedades finales de la película SPI-PLA 50/50 fueron levemente mejores respecto a las de SPI-PLA 60/40, por lo que sería muy útil determinar cuál es la menor cantidad de PLA necesario para obtener las mejores propiedades.

Se logró desarrollar un material de dos componentes donde se vieron reflejadas las características beneficiosas de ambos, manteniendo un costo razonable y logrando excelentes propiedades generales para diferentes áreas de aplicación.

VII.4. Bibliografía

- ASTM Standard (D882-02), 2002. “Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting”. ASTM International West Conshohocken, PA. doi:10.1520/ D0882-02, www.astm.org.
- Bo, L., Long, J., Hongzhi, L., Jinwen, Z., 2010. Synergetic effect of dual compatibilizers on in situ formed poly (lactic acid)/ soy protein composites. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 6399–6406.
- Calabria, L., Bandeira, A.L., Giacomelli, C., Schmidt, V., 2009. Morfologia e propriedades térmicas de blendas biodegradáveis a base de spi e pla, in: *Proceedings of 10º Congresso brasileiro de polímeros*, Foz do Iguaçu, PR, Brazil.
- González, A., Strumia, M.C., Alvarez Igarzabal, C.I., 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering* 106, 331–338.
- Guerrero, P., Retegi, A., Gabilondo, N., De la Caba, K., 2010. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering* 100, 145–151.
- Guerrero, P., Stefani, P.M., Ruseckaite, R., De la Caba, K., 2011. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering* 105, 65–72.
- Jiménez Bonilla, P., Sibaja Ballesteros, M., Vega–Baudrit, J., 2012. Síntesis y caracterización de poli(ácido L-láctico) por policondensación directa, obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (*Musa acuminata* AAA variedad Cavendish cultivar Gran naine) en Costa Rica. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 13, 52–59.
- Koide, S., Shi, J., 2007. Microbial and quality evaluation of green peppers stored in biodegradable film packaging. *Food Control* 18, 1121–1125.
- Martino, V.P., Jiménez, A., Ruseckaite, R. A., 2009. Processing and characterization of poly (lactic acid) films plasticized with commercial adipates. *Journal of Applied Polymer Science* 112, 2010–2018.
- Martucci, J.F., Ruseckaite, R. A., 2010. Biodegradable three-layer film derived from bovine gelatin. *Journal of Food Engineering* 99, 377–383.
- Sébastien, F., Stéphane, G., Copinet, A., Coma, V., 2006. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with

antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydrate Polymers* 65, 185–193.

Siparsky, G.L., Voorhees, K.J., Dorgan, J.R., Schilling, K., 1997. Water transport in polylactic acid (PLA), PLA/polycaprolactone copolymers, and PLA/polyethylene glycol blends. *Journal of Environmental Polymer Degradation* 5, 125–136.

Soliman, E.A., Tawfik, M.S., El-Sayed, H., Moharram, Y.G., 2007. Preparation and characterization of SPI based edible biodegradable films. *American Journal of Food Technology* 2, 462–476.

Zhang, J., Jiang, L., Zhu, L., 2006. Morphology and properties of soy protein and polylactide blends. *Biomacromolecules* 7, 1551–1561.

Capítulo VIII

Aplicaciones de las películas

Capítulo VIII

Aplicaciones de las películas

En este capítulo se describen tres aplicaciones ensayadas para tres de las películas desarrolladas en esta tesis. La elección de cada aplicación resultó de un análisis de las propiedades finales de cada una. Las aplicaciones ensayadas son: utilización en sistemas de liberación controlada de fármacos en sistemas oculares, utilización como recubrimiento de alimentos con capacidad reductora de colesterol y utilización como recubrimiento antimicrobiano de alimentos.



Figura VIII.1. Fotografías de las tres aplicaciones ensayadas.

VIII.1. Utilización de las películas SPI-Gen como sistema de liberación de un fármaco de uso oftalmológico

VIII.1.1. Introducción

En la actualidad, los sistemas utilizados para terapias oculares específicas se centran principalmente en la utilización de soluciones y suspensiones disponibles comercialmente para ser administradas en la superficie del ojo en forma de gotas o geles. La mayor parte de estas formulaciones farmacéuticas son administradas con dos propósitos principales: a) para el tratamiento en el exterior del órgano de afecciones tales como conjuntivitis, blefaritis, queratitis seca, etc. o b) para el tratamiento intraocular de patologías como glaucoma, uveítis, endoftalmitis, entre otras; donde es necesario la permeabilidad de los principios activos a través de la córnea u otra membrana. Sin embargo, la biodisponibilidad de los fármacos administrados en forma tópica muestra grandes limitaciones debido a la pérdida rápida y extensiva de la formulación desde la zona precorneal en virtud del drenaje y del recambio lagrimal (Shulin, 1998). Se le suma a esto, la notable disminución de la penetración de fármacos por esta vía por ser la cornea una barrera altamente eficiente.

Después de la aplicación de una gota oftálmica, menos del 5% del fármaco aplicado atraviesa la córnea y alcanza tejidos intraoculares, mientras que la mayor parte del mismo es absorbida sistémicamente vía conjuntiva y conducto nasolacrimal (S. D. Palma et al., 2007).

A esto se le suman los inconvenientes que ofrecen al paciente estos tratamientos debido a la incomodidad que genera la aplicación de pequeños volúmenes del medicamento con tanta frecuencia (aplicaciones cada 3 o 4 horas).

Por todo esto, es que en la actualidad, se están realizando desarrollos tendientes a diseñar sistemas de liberación de fármacos que resulten más

eficientes, buscando una capacidad de liberación de forma sostenida y/o controlada con el objeto de aumentar la concentración del fármaco en el interior del órgano por un período prolongado de tiempo. Además, se busca también que la vía de aplicación sea más cómoda y práctica para su aplicación por parte de los usuarios.

Algunos de los sistemas en desarrollo en la actualidad, corresponden a la utilización de liposomas (Cortesi et al., 2006; Ebrahim et al., 2005), nano y micro partículas (Araújo et al., 2009; Cai et al., 2008; de la Fuente et al., 2010) y formación de geles *in-situ* (Cao et al., 2007; Gratieri et al., 2011; Tayel et al., 2013), pero los sistemas de liberación ocular en forma de películas, suelen considerarse la alternativa más práctica para este fin.

Por su naturaleza hidrofílica, las películas formadas por materiales biodegradables, poseen en general la capacidad de contener fármacos del tipo hidrofílicos. Sin embargo, al estar inmersas en entornos acuosos, se observa la rápida difusión de las drogas por disolución a través de la matriz, generando una liberación rápida y poco sostenida en el tiempo.

Una liberación eficiente es aquella que mantiene los valores de concentración efectiva del fármaco de manera constante en el medio donde se quiera liberar por un tiempo preestablecido. En la Figura VIII.1.1.1 se muestra una comparación esquemática de dos liberaciones donde una de ellas (línea negra) representa una liberación sostenida en el tiempo y la otra (línea roja) una liberación no sostenida donde se requiere de 4 dosis para mantener el efecto por el mismo período. Se puede observar además que mediante la utilización del sistema de liberación convencional, las concentraciones obtenidas no alcanzan los niveles mínimos para ser efectivos por momentos, mientras que en otros, las concentraciones alcanzan valores tóxicos para el organismo o tejido. Por el contrario, el sistema de liberación sostenida, mantiene los niveles de concentración dentro de lo que se denomina ventana terapéutica por un período prolongado de tiempo.

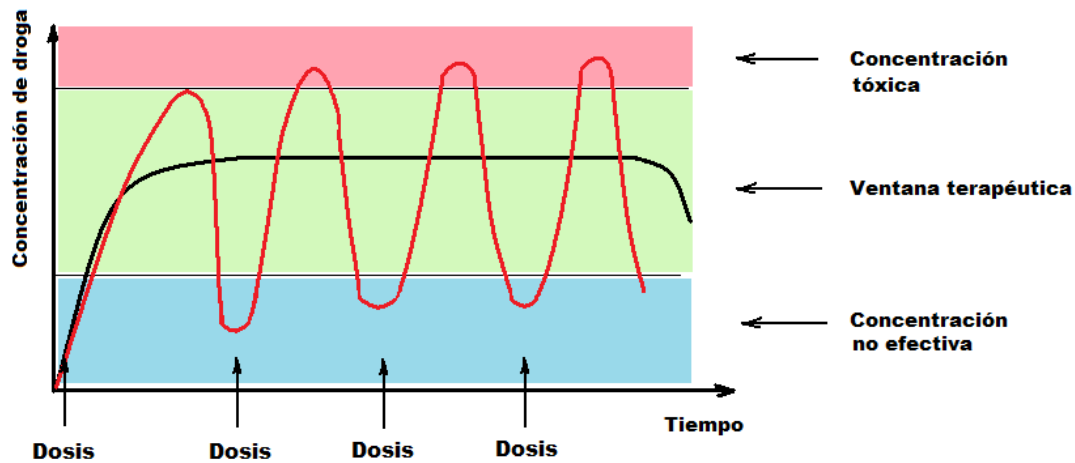


Figura VIII.1.1.1. Comparación esquemática de una liberación sostenida (representada con línea negra) y de una liberación no sostenida en el tiempo (representada con línea roja).

Como se dijo anteriormente, las películas formadas a partir de matrices hidrofílicas, tienen la capacidad de ser cargadas y retener drogas o fármacos de características hidrofílicas. Por otro lado, las películas cuyas matrices están constituidas por redes tridimensionales formadas por estructuras entrecruzadas, tienen la capacidad de hincharse en solventes acuosos de manera controlada (de acuerdo al grado de entrecruzamiento producido) (A. González et al., 2011). Cuando este hinchamiento es generado en una matriz que contiene un fármaco en su interior, este puede disolverse en el solvente y de esta forma difundir al medio (Figura VIII.1.1.2). Como el hinchamiento, y por ende la cantidad de agua que ingresa al seno de la matriz puede ser controlado, decimos que la liberación del fármaco también puede ser controlada (Aldana et al., 2012). Por ende, si la película posee la correcta relación entre hidrofiliidad estructural y grado de entrecruzamiento, la liberación del fármaco puede alcanzarse de forma sostenida (Alvarez-Lorenzo et al., 2013; M. S. Kim et al., 2012; Singh et al., 2009; Xu et al., 2007).

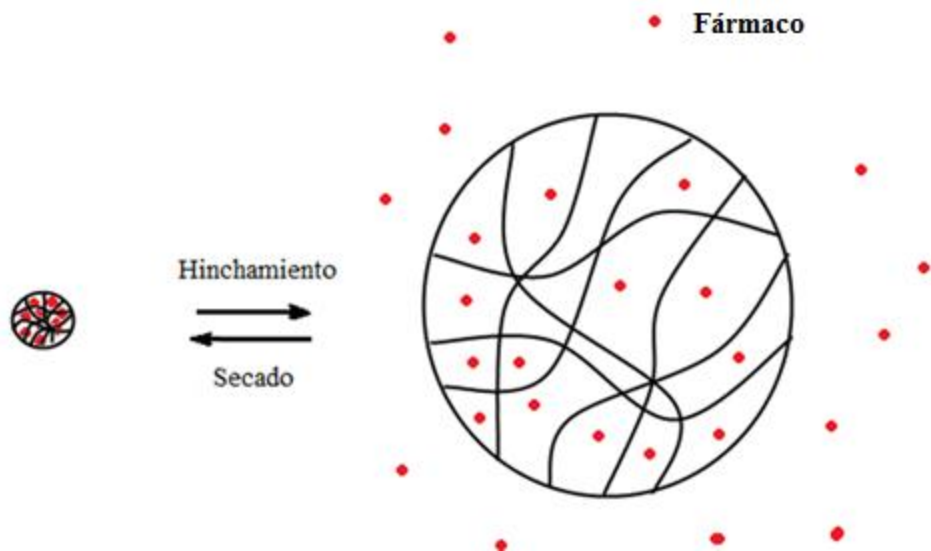


Figura VIII.1.1.2. Esquema de la difusión de un fármaco desde el seno de una matriz hidrofílica hacia el medio producido por el hinchamiento de la misma.

Las películas entrecruzadas SPI-Gen desarrolladas en el Capítulo III de esta tesis cumplen con las características necesarias para su implementación como dispositivo de liberación de fármacos en terapia ocular debido a que cumplen con las características descritas anteriormente (son matrices hidrofílicas entrecruzadas) y además están formadas por componentes biocompatibles y poseen baja solubilidad en agua, buenas propiedades mecánicas y coloración intensa, lo que ayudaría mucho al paciente a la hora de la correcta aplicación. Además por su pequeña superficie y espesor y ausencia de puntas, estas películas no causarían molestias o incomodidades en el ojo.

Es por esto que se las eligió para ser aplicadas en sistemas de liberación de drogas para ser usada en terapia oftalmológica.

El glaucoma es la principal causa de ceguera en el mundo, particularmente entre las personas de edad avanzada. Esta enfermedad de los ojos se caracteriza generalmente por el aumento patológico de la presión intraocular (PIO) por falta de drenaje del humor acuoso, y tiene como condición final común una neuropatía óptica que se caracteriza por la

pérdida progresiva de las fibras nerviosas del nervio óptico y cambios en su aspecto.

Esta enfermedad asintomática ocasiona la pérdida progresiva de las funciones visuales, acompañado de un signo que es la hipertensión ocular. Cuando las cantidades de humor acuoso formado en los procesos ciliares, excede la cantidad drenada, la presión intraocular aumenta. Si la hipertensión ocular persiste durante un tiempo suficientemente largo, provoca daños irreversibles en todas las estructuras oculares, que se traduce en una disminución característica del campo visual y concluye con la atrofia del nervio óptico y posterior ceguera (Fundacion Argentina de Glaucoma, 2009, Tártara et al., 2008). Esta enfermedad puede afectar a cualquier persona. Un niño puede nacer con glaucoma congénito y ser detectado en los primeros momentos de vida, o puede desarrollarse durante la juventud, pero quienes corren mayor riesgo, por ser más frecuente, son las personas mayores de 40 años, con familiares que padecen glaucoma, personas con miopía, con diabetes y con hipotensión arterial.

El glaucoma generalmente se controla con la aplicación de gotas oftálmicas varias veces al día. Estas gotas disminuyen la presión intraocular reduciendo la producción humor acuoso o mejorando el drenaje del mismo. Para que el tratamiento sea eficaz, el medicamento debe ser aplicado en forma constante siguiendo rigurosamente el proceso sin interrupción.

Una de las drogas clásicamente utilizadas para esta enfermedad es el timolol maleato. Este, es un agente bloqueador no selectivo de los receptores β -adrenérgicos que no tiene actividad simpaticomimética intrínseca, depresora directa del miocardio ni anestésica local (estabilizante de membrana) importantes. Hasta ahora, no se ha determinado con precisión el mecanismo por el que el timolol reduce la presión intraocular, aunque algunos estudios indican que su acción predominante puede estar relacionada con una disminución de la formación del humor acuoso. La estructura molecular puede ser observada en la Figura VIII.1.1.3.

Por lo general, el efecto del timolol se inicia rápidamente, unos 20 minutos después de su aplicación en el ojo, lográndose la disminución máxima de la presión intraocular del 20 al 35% dos horas después de ser administrado. Es debido a que este fármaco es altamente estable y soluble en agua que resulta muy adecuado al momento de ser utilizado como fármaco modelo para el desarrollo de posibles sistemas de liberación de fármacos.

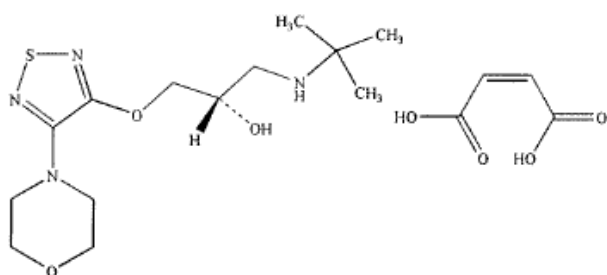


Figura VIII.1.1.3. Estructura molecular del timolol maleato.

En esta parte de la tesis, se aplicarán películas SPI-Gen entrecruzadas con distintas cantidades de genipina, cargadas con timolol maleato como sistema de liberación en terapia ocular. Para esto, se ensayará la liberación del fármaco en forma *in-vitro* en un medio acuoso y se determinará el efecto de la liberación de la droga en forma *in-vivo* determinando la disminución de la presión intraocular en conejos.

VIII.1.2. Resultados y discusión

VIII.1.2.1. Preparación y caracterización de las películas SPI-Gen, recubiertas y sin recubrir, conteniendo timolol maleato

Como se dijo anteriormente, se utilizaron las películas SPI-Gen con 0; 0,1; 1; 2,5; 5; 7,5 y 10% de Gen como dispositivos de liberación de fármacos. Además, también fueron preparadas las mismas películas pero recubiertas por una fina capa de poli (ácido láctico) (PLA). El objetivo de este recubrimiento fue producir un efecto retardante en la liberación del fármaco. Este efecto sería producido debido a las características hidrofóbicas del PLA que generaría una “barrera” a la entrada de agua al seno de las películas. Debido a esto, es que el hinchamiento se vería disminuido produciendo menor difusión de la droga al exterior, lo que se traduciría en una liberación más sostenida en el tiempo.

Para la preparación de las películas sin recubrir, se siguió la metodología descrita en la Sección II.2.1, realizando la adición de la droga sólida luego del calentamiento, cuando la solución ha alcanzado temperatura ambiente. Una vez obtenidas las películas, las mismas fueron cortadas en círculos de 4 mm de diámetro. Esta forma, que tendrán finalmente a la hora de ser utilizadas, se eligió ya que no posee puntas que puedan lastimar al ojo y además su tamaño permite que sean manejables pero que no produzca molestias al momento de ser insertadas bajo el párpado. La cantidad de droga contenida en cada porción de 4 mm de diámetro de película fue la correspondiente a 6 dosis, tomando como una dosis la cantidad de droga que contiene una gota de solución de timolol comercial. Se utilizó esta cantidad ya que es la necesaria para que la película actúe durante 2 días en el ojo. La Figura VIII.1.2.1.1 muestra el aspecto macroscópico de las películas a utilizar cortadas en la forma adecuada.

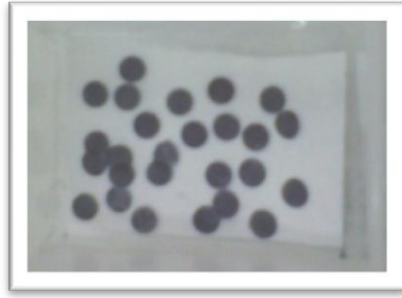


Figura VIII.1.2.1.1. Fotografía de películas circulares SPI-Gen 5% de 4 mm de diámetro conteniendo timolol maleato.

Para preparar las películas recubiertas con PLA (SPI-PLA o SPI-Gen-PLA), se procedió siguiendo la metodología descrita en la Sección II.2.1. de este trabajo de tesis. Se optó por esta metodología de preparación del recubrimiento de PLA por sobre la de “*casting*” (utilizada en el Capítulo VII de esta tesis para producir el recubrimiento de PLA en películas de SPI) ya que utilizando la metodología de “*casting*” no se logra recubrir el filo de las películas permitiendo la entrada de agua al seno de la película, produciendo separación entre las capas por hinchamiento del componente proteico.

A nivel visual, las películas recubiertas no difieren de las que no poseen el recubrimiento ya que la capa de PLA formada es muy delgada y transparente. El aspecto de las películas recubiertas es mostrado en la Figura VIII.1.2.1.2.



Figura VIII.1.2.1.2. Fotografía de películas SPI y SPI-Gen 5% conteniendo timolol al momento del secado en la formación del recubrimiento de PLA.

Para corroborar que el recubrimiento de PLA se haya formado correctamente, se utilizó espectrofotometría FT-IR con ATR. Esta metodología nos permitió obtener el espectro infrarrojo de la superficie de las películas mostrado en la Figura VIII.1.2.1.3.

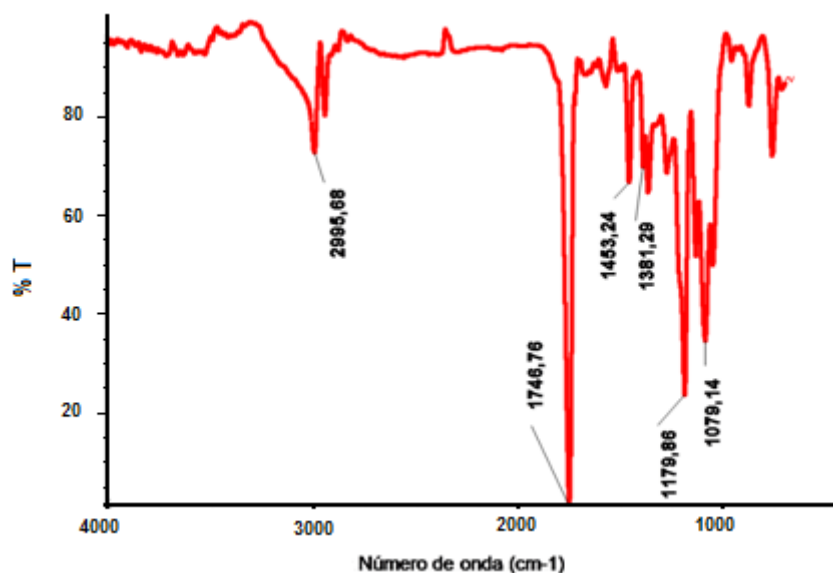


Figura VIII.1.2.1.3. Espectro FT-IR-ATR de las películas SPI-Gen-PLA conteniendo timolol maleato

Como se esperaba, el espectro obtenido corresponde al del PLA. En el mismo se pudieron observar las bandas características del PLA como la del estiramiento del carbonilo a $1746,76 \text{ cm}^{-1}$ y las bandas correspondientes al estiramiento C-O del grupo éster a 1179 y 1079 cm^{-1} . Esta observación nos permitió corroborar que las películas se encuentran completamente recubiertas por el PLA.

Una vez verificada la correcta preparación de los recubrimientos, se procedió a determinar si éste modifica las propiedades mecánicas de las películas. Para ello, se realizaron ensayos de tracción y se determinaron propiedades como la resistencia tensil (TS) y la elongación a la rotura (EB). Los resultados de estas determinaciones obtenidos por triplicado, se muestran en la Tabla VIII.1.2.1.1.

Películas	TS (MPa)	EB (%)
SPI	1,7 ± 0,3 ^A	19,8 ± 2,5 ^A
SPI-Gen 2,5%	2,6 ± 0,1 ^{BC}	18,3 ± 4,9 ^A
SPI-Gen 10%	2,7 ± 0,2 ^C	4,5 ± 0,3 ^B
SPI-PLA	2,1 ± 0,2 ^{AB}	21,5 ± 4,0 ^A
SPI-Gen 2,5%-PLA	3,7 ± 0,3 ^D	17,8 ± 1,7 ^A
SPI-Gen 10%-PLA	3,26 ± 0,09 ^D	8,8 ± 0,7 ^B

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla VIII.1.2.1.1. Valores de resistencia tensil (TS) y elongación a la rotura (EB) obtenidos para las películas SPI y SPI-Gen conteniendo timolol maleato recubiertas con PLA y sin recubrir.

Realizando una comparación entre las películas con distinta cantidad de entrecruzante para los *films* con el fármaco (con y sin recubrimiento), se puede observar que estas siguen un comportamiento idéntico al descrito en la Sección III.2.4 para las películas SPI-Gen sin fármaco adicionado. Un aumento de TS fue observado para las películas con 2,5% de Gen respecto de las películas SPI, mientras que los valores se mantuvieron constantes para mayores agregados de Gen. Se puede observar también, que los valores de TS y EB obtenidos para las películas con droga incorporada son relativamente menores en comparación con los mostrados en la Sección III.2.4 para las películas que no contienen droga (González et al., 2011). Este efecto es producido probablemente porque la droga ocluida entre las cadenas proteicas interaccionaría con las mismas, disminuyendo las interacciones existentes entre ellas. Esto se ve reflejado en un desmejoramiento significativo de las propiedades mecánicas de las películas, aunque no influye considerablemente en la práctica a la hora de la aplicación del dispositivo.

Comparando los *films* con droga, en presencia y ausencia del recubrimiento de PLA, se puede decir que el recubrimiento le brinda rigidez a las películas, ya que se observó incremento en TS. Este mismo efecto fue observado y descrito en la Sección VII.2.4 para películas de SPI recubiertas con PLA por el método de “*casting*” (González y Alvarez Igarzabal, 2013). Por otro lado, la presencia del recubrimiento no influyó considerablemente sobre la elongación de las películas ya que no se observó una disminución significativa de EB en comparación de las sin recubrir.

VIII.1.2.2. Ensayos de liberación in-vitro en medio acuoso

Los ensayos de liberación se realizaron en solución salina de Ringer con el objetivo de simular el fluido lagrimal. Los ensayos de liberación se realizaron utilizando trozos de 4 mm de diámetro de las diferentes películas SPI-Gen recubiertas y sin recubrir conteniendo 6 dosis de Timolol Maleato. Se introdujeron las películas en 50 mL de solución de Ringer y se determinó la concentración del fármaco en función del tiempo.

La cuantificación de la droga fue realizada por espectrofotometría UV-Visible. Mediante la realización de una curva de calibración se determinó un coeficiente de extinción molar de $8584,9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Los resultados obtenidos pueden observarse en las Figuras VIII.1.2.2.1 y VIII.1.2.2.2 donde se muestran los porcentajes de liberación del fármaco en función del tiempo para las películas sin recubrir y recubiertas con PLA, respectivamente.

Para su mejor interpretación, estos resultados son mostrados también en forma numérica en las Tablas VIII.1.2.2.1 y VIII.1.2.2.2 para las películas sin recubrir y recubiertas, respectivamente.

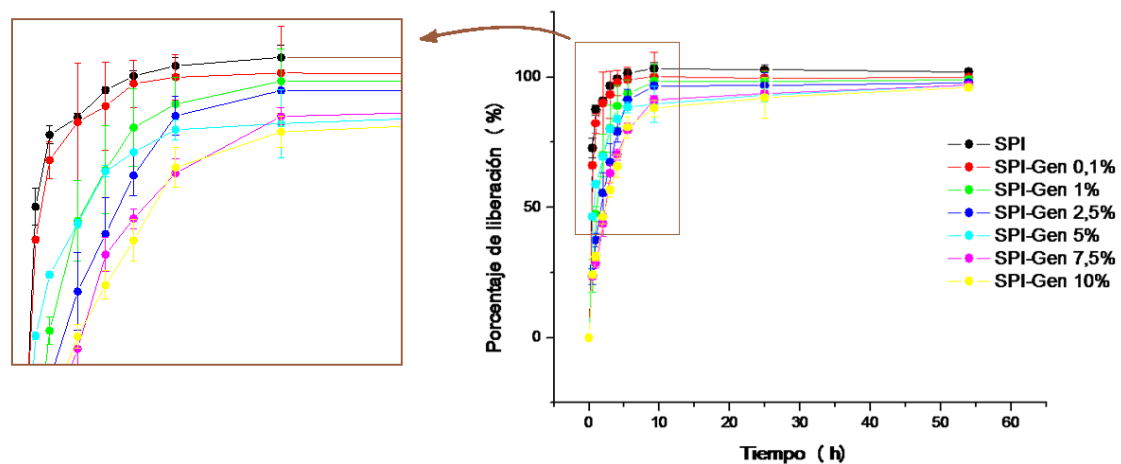


Figura VIII.1.2.2.1. Porcentaje de timolol maleato liberado de las películas SPI-Gen sin recubrir en función del tiempo.

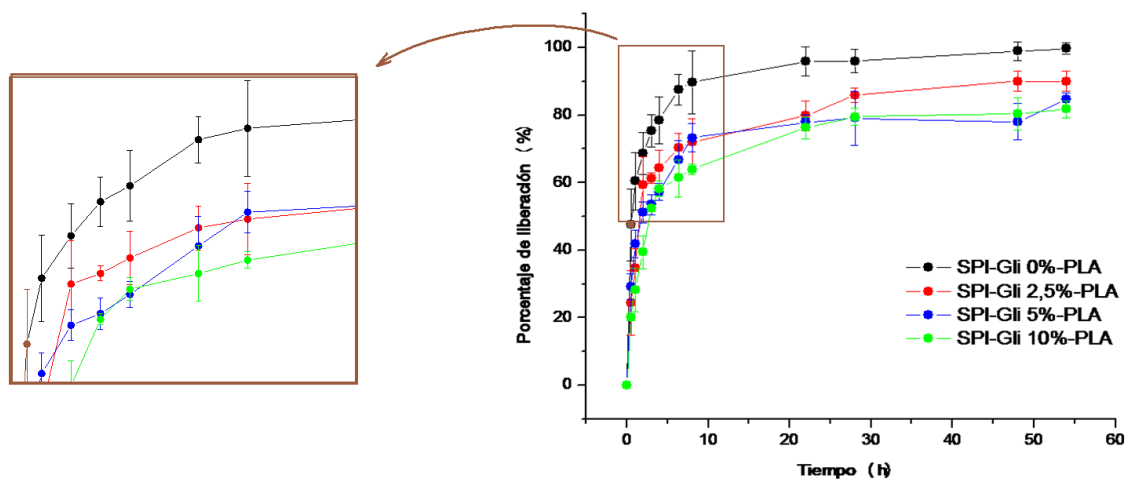


Figura VIII.1.2.2.2. Porcentaje de timolol maleato liberado de las películas SPI-Gen-PLA (recubiertas con PLA) en función del tiempo.

Película	50% timolol liberado (horas)	75% timolol liberado (horas)	80% timolol liberado (horas)
SPI	0,37	0,90	1,70
SPI-Gen 0,1%	0,47	1,37	2,02
SPI-Gen 1%	1,55	3,55	4,40
SPI-Gen 2,5%	2,41	4,74	5,36
SPI-Gen 5%	1,06	4,30	11,25
SPI-Gen 7,5%	2,84	7,26	8,96
SPI-Gen 10%	3,37	7,8	17,58

Tabla VIII.1.2.2.1. Tiempo empleado por las películas SPI-Gen sin recubrir para la liberación del 50, 75 y 80% del timolol maleato cargado.

Película	50% timolol liberado (horas)	75% timolol liberado (horas)	80% timolol liberado (horas)
SPI-PLA	0,60	3,02	4,49
SPI-Gen 2,5%-PLA	1,63	13,39	22,27
SPI-Gen 5%-PLA	1,89	14,19	32,78
SPI-Gen 10%-PLA	2,85	20,65	39,47

Tabla VIII.1.2.2.2. Tiempo empleado por las películas SPI-Gen-PLA (recubiertas con PLA) para la liberación del 50, 75 y 80% del timolol maleato cargado.

Un primer análisis de los resultados mostrados anteriormente, permite identificar una liberación muy rápida para las películas sin recubrimiento y que poseen bajo grado de entrecruzamiento. Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos para las películas recubiertas y sin recubrir, se puede observar claramente que un aumento en el grado de entrecruzamiento, producido por una mayor cantidad de Gen agregada, produce una disminución en la tasa de liberación, es decir que la película libera el fármaco de forma más lenta y por ende más sostenida a medida que presenta mayor entrecruzamiento. Por ejemplo, para el caso de las películas sin recubrimiento, el 80% de liberación de la droga en la película sin entrecruzante se logra en 1,7 h, mientras que a la película con 2,5% de Gen le toma 5,36 h y a la que contiene 10% de Gen, 17,58 h. La misma tendencia se observa en las películas recubiertas.

Por otro lado, observando el efecto producido por la presencia o no del recubrimiento de PLA sobre la tasa de liberación, se encontró una disminución muy marcada de la misma. Por ejemplo, a la película SPI sin recubrir le toma 1,7 h en liberar el 80% de la droga mientras que para la SPI-PLA (recubierta) le toma 4,49 h. Lo mismo ocurre por ejemplo para la película SPI-Gen 10% sin recubrir, donde el 80% de droga es liberado en 17,58 h mientras que la misma película recubierta lo hace en 39,47 h. En la Figura VIII.1.2.2.3 se pueden visualizar estas comparaciones realizadas ya que se muestran superpuestas las liberaciones de las películas sin

entrecruzante y con la mayor cantidad de entrecruzante, y en presencia y ausencia de recubrimiento.

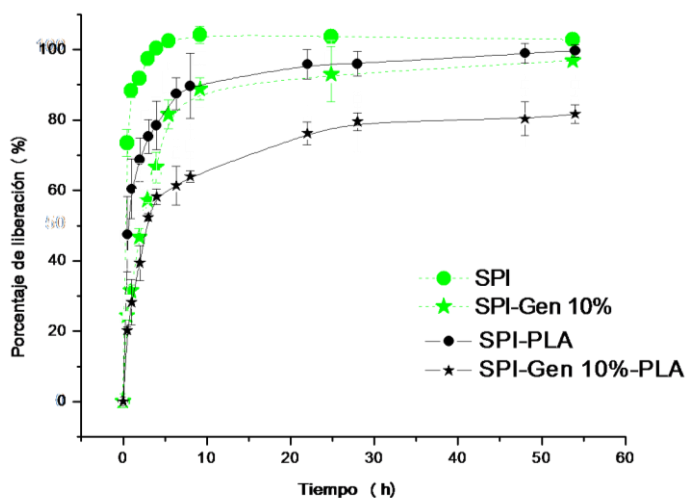


Figura VIII.1.2.2.3. Porcentajes de liberación de las películas sin entrecruzante (SPI) y con la mayor cantidad de entrecruzante (SPI-Gen 10%) en presencia y ausencia de recubrimiento de PLA, en función del tiempo.

En sistemas de liberación preparados a partir de películas, son tres los factores a considerar al momento de evaluar su eficacia: el tiempo de permanencia, es decir el tiempo en que el *film* se encuentra adherido en el lugar donde se lo colocó, la cantidad de fármaco liberado y el patrón de liberación obtenido. Siguiendo estas consideraciones, se puede afirmar que un sistema de liberación eficaz es aquel que se encuentre en su lugar de aplicación durante un período considerable de tiempo y que durante este lapso libere la totalidad del fármaco que contiene de una forma controlada y sostenida. Dependiendo de su estructura química, cada fármaco interactuará con la matriz de las películas de una forma especial, brindando tiempos de liberación característicos.

Así, si se utilizan películas entrecruzadas de SPI como las desarrolladas en esta parte de la tesis, las más indicadas serían las que poseen el recubrimiento de PLA y la mayor cantidad de Gen ya que son las que liberan la droga más lentamente por lo que la totalidad de la droga podría ser liberada en un mayor período de tiempo.

Lo importante de los resultados obtenidos en esta parte de la tesis, radica en que se han desarrollado dos estrategias de modificación de películas proteicas (entrecruzamiento y utilización de un recubrimiento hidrofóbico) capaces de modificar la tasa de liberación de un fármaco en función de los requerimientos necesarios y de esta forma poder obtener el sistema óptimo para cada aplicación.

VIII.1.2.3. Ensayos de bioadhesión, irritación y eficacia hipotensora en conejos

Para determinar la efectividad del dispositivo de liberación en terapia ocular, se procedió a la realización de ensayos *in-vivo* en conejos. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con los Doctores Santiago D. Palma e Ignacio Tártara del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC).

En estos ensayos, se realizaron determinaciones de irritabilidad y bioadhesión de las películas a la mucosa del ojo, así como también la determinación de la presión intraocular (PIO) como medida indirecta de evaluación de la liberación del fármaco contenido en las mismas.

La bioadhesión es una característica fundamental que las películas deben poseer ya que esta es la que regirá el tiempo de permanencia de las mismas en el sitio de acción. Los principales factores a tener en cuenta son el tiempo total de adhesión, el grado de adhesión y el tiempo de liberación efectiva (Calles et al., 2013). A los fines de estimar la bioadhesión de los *films* a las mucosas oculares de los animales, las diferentes películas fueron colocadas en el fondo del saco, bajo los párpados de los conejos. La Figura VIII.1.2.3.1 muestra el sitio de acción de las películas.

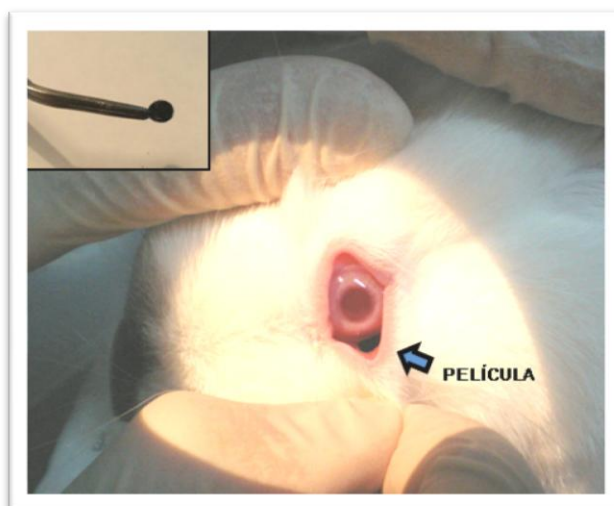


Figura VIII.1.2.3.1. Fotografía de una película utilizada para terapia ocular y del sitio de aplicación de las mismas en el ojo.

Mediante técnicas manuales se determinó la adhesión de las películas a la mucosa ocular en diferentes tiempos. Además, se observó el comportamiento de los *films*, evaluando cambios de tamaño y espesor. El grado de bioadhesión fue clasificado en una escala numérica desarrollada en el grupo de investigación del Dr. Palma, de acuerdo al comportamiento observado (Tártara, 2012). Esta clasificación se muestra en la Tabla VIII.1.2.3.1.

Bioadhesión	Comportamiento del <i>film</i>
0	Se desplaza espontáneamente fuera del ojo
1	Se mantiene en el fondo de saco, pero no se adhiere a la conjuntiva bulbar o a la palpebral en forma permanente
2	Se mantiene en el fondo de saco y se adhiere a una conjuntiva en particular aunque se realicen maniobras de movimiento palpebral
3	Igual al anterior pero en este caso se mantiene el <i>film</i> adherido aunque las maniobras de frotación palpebral sean forzadas
4	Se mantiene adherido aunque se intente desplazarlo con una espátula.

Tabla VIII.1.2.3.1. Valoración numérica para películas de acuerdo al comportamiento de bioadhesión observado (Tártara, 2012).

Los resultados numéricos obtenidos de acuerdo al comportamiento de adhesión de cada película se muestran en la Figura VIII.1.2.3.2.

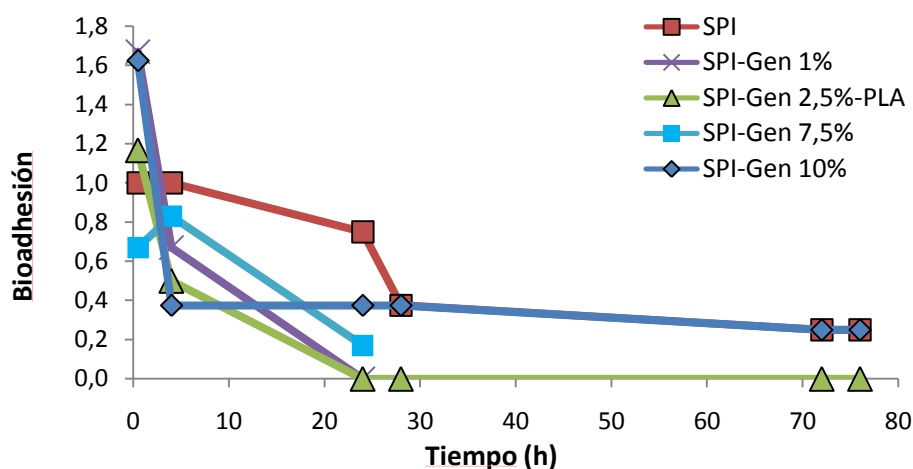


Figura VIII.1.2.3.2. Comportamiento bioadhesivo de las películas a distintos tiempos.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura VIII.1.2.3.2, se pudo estimar que la adhesión no varía considerablemente de acuerdo a las características estructurales de las películas ya que las diferentes cantidades de entrecruzante presente o la presencia o ausencia del recubrimiento de PLA no modificaron significativamente la bioadhesión, encontrándose casi todos los valores entre 0 y 1 en un período de tiempo comprendido entre 2 y 24 h. A partir de esto, podemos definir que las películas se mantendrán en el ojo por 24 h, siendo este tiempo el período efectivo durante el cual la película podría liberar fármaco. Si bien este período no es óptimo (ya que el dispositivo sería más eficiente si permanecieran en el ojo por dos o tres días), representa un tiempo adecuado en el que la droga puede cumplir su función. Es de esperar que si estas películas se utilizaran en humanos, los tiempos de permanencia en el ojo fueran mayores, no debido a un cambio en la bioadhesión de la película al ojo, sino por el hecho de que los humanos poseen 2 párpados (superior e inferior), mientras que los conejos poseen 3 (superior, inferior y un tercero que se cierra en dirección perpendicular a la de los otros dos). Este tercer

párpado es el causante del arrastre sufrido por la película hacia la zona del lagrimal, siendo expulsada del saco conjuntival.

Para evaluar la irritación que potencialmente podían producir las películas al ojo se realizó a cada tiempo una determinación con oftalmoscopio en busca de signos de irritación, evaluando enrojecimiento, microlesiones corneales y conjuntivales. A partir de estas determinaciones, se logró observar la ausencia de enrojecimiento, microlesiones u otros factores que sugieran irritación producida por las películas a los distintos tejidos del ojo a lo largo de todo el período en el cual la película se encontró alojada en el ojo.

Una vez determinada la ausencia de irritación, se procedió a verificar el comportamiento de liberación del fármaco en sistemas *in-vivo*. Si bien la concentración de timolol en lágrima o en plasma puede ser determinada analíticamente (Hiratani et al., 2005) o estimada mediante simulaciones a partir de los valores obtenidos *in-vitro* (Finne and Urtti, 1992), en este trabajo se optó por estimarla indirectamente mediante la determinación del efecto producido por el fármaco liberado. Debido a que el timolol maleato posee propiedades hipotensoras, se procedió a determinar la PIO de los conejos a distintos tiempos luego de aplicadas las películas, comprobando si se presentan efectos hipotensores y la duración de los mismos.

Aunque los ojos de los conejos son fisiológicamente diferentes a los de los seres humanos en términos de fisionomía de los párpados, parpadeo y recambio lagrimal, la disposición del timolol en el líquido lagrimal en estos animales proporciona una buena estimación del comportamiento en los seres humanos (Sasaki et al., 1997; Yamamura et al., 1999).

Se procedió a determinar la PIO de un grupo de 6 conejos para luego aplicar cada película conteniendo 6 dosis de timolol maleato a estos animales en ambos ojos (n=12). La determinación de la PIO fue repetida cada 2 horas. Luego de la valoración de cada película, se dejó transcurrir por

lo menos 7 días para volver a utilizar los mismos animales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VIII.1.2.3.3. Los datos correspondientes a las gotas comerciales (Zopirolo DM de Laboratorios ELEA) fueron extraídos de bibliografía (Calles et al., 2013) y se muestran aquí simplemente con fines comparativos.

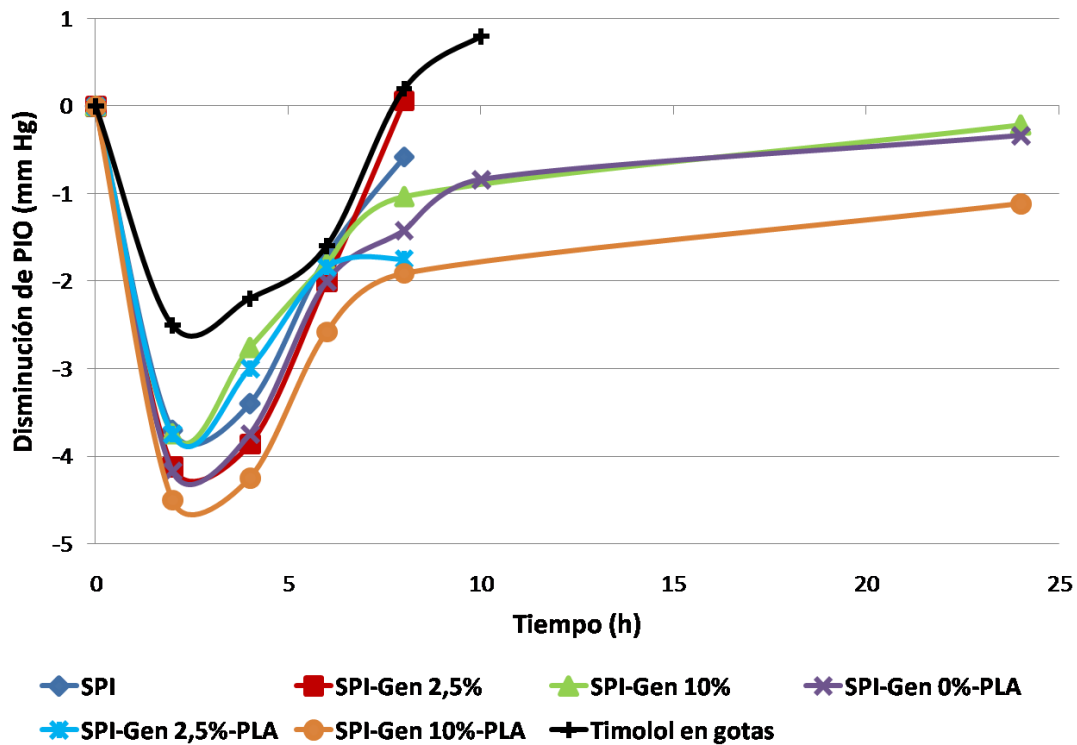


Figura VIII.1.2.3.3. Valores de PIO antes ($t=0$) y después de la aplicación de las películas y gotas en función del tiempo.

De los resultados mostrados en la Figura VIII.1.2.3.3, se puede observar una mayor disminución de PIO entre las 2 y 4 h luego de aplicar las películas, siendo este tiempo idéntico al informado para las gotas comerciales (Calles et al., 2013). Por otro lado, la disminución de PIO alcanzada por las películas a este tiempo, es mayor a la informada para las gotas comerciales. Este efecto es probablemente debido a que una mayor cantidad de droga se encuentra presente en el ojo, producto de la liberación producida por las películas en comparación con la cantidad de droga que se encontraría presente aplicando una dosis de las gotas comerciales. Un incremento en la concentración de las gotas oftálmicas seguramente no logrará una mayor disminución de la PIO ya que como se encuentra

demostrado en bibliografía, un aumento en la dosis no es efectiva para conseguir niveles sostenidos de fármaco ya que a mayores concentraciones, la biodisponibilidad ocular de la droga disminuye (Hiratani et al., 2005).

Completando esta comparación, se pudo determinar que todas las películas mantuvieron el efecto por más tiempo que las gotas comerciales ya que por ejemplo, a las 8 h de aplicadas las gotas, la PIO ha retomado los valores iniciales mientras que todas las películas (con excepción de la SPI-Gen 2,5%) mantienen la PIO por debajo de los estos valores. Un comportamiento similar es descrito en bibliografía para películas biodegradables entrecruzadas de ácido hialurónico e itacónico (Calles et al., 2013) y para nanopartículas soportadas en lentes de contacto (H. J. Jung et al., 2013).

Por otro lado, como era de esperar, se pudo observar que las películas recubiertas con PLA respecto a las sin recubrir y las más entrecruzadas respecto de las menos entrecruzadas, mantienen la disminución de PIO por más tiempo. Presumiblemente este efecto viene dado por una liberación más lenta del fármaco. En comparación con los ensayos *in-vitro* de liberación en medio acuoso, se observa la misma tendencia de liberación de las diferentes películas. Así, observando la Figura VIII.1.2.3.3 se puede verificar que al cabo de 8 h, las películas sin recubrimiento y con bajo grado de entrecruzamiento, han liberado casi completamente el fármaco que poseían. A este tiempo, se puede observar que la disminución de PIO es marcadamente menor a las que se presentan utilizando las películas con altos grados de entrecruzamiento o recubiertas, las cuales se encuentran alrededor de 2 puntos por debajo de los valores iniciales. Este efecto también se ve reflejado a las 24 h, donde la película recubierta que posee mayor grado de entrecruzamiento (SPI-Gen 10%-PLA) es la que mantiene una disminución de PIO apreciable (mayor a 1 punto), en comparación con las otras. En este punto, vale aclarar que en estas determinaciones se utilizaron conejos normotensos, por lo que se piensa que utilizando conejos hipertensos, estos efectos de disminución de PIO conseguidos, se verían incrementados.

VIII.1.3. Conclusiones parciales

En esta parte de la tesis se logró desarrollar la utilización de las películas entrecruzadas SPI-Gen recubiertas con PLA y sin recubrir como dispositivos de liberación de fármacos para terapias oculares. Se determinó que las propiedades mecánicas de las películas se ven optimizadas por la presencia del recubrimiento. Por otro lado, se evaluó la liberación en medio acuoso concluyendo que se ve influenciada por el grado de entrecruzamiento de las películas donde las más entrecruzadas son las que permiten una liberación más lenta. Además se determinó que el recubrimiento de PLA disminuye aún más la tasa de liberación en comparación con las películas sin recubrir. De igual manera, este comportamiento también fue observado mediante de la estimación indirecta de la liberación a partir de la determinación de la efectividad hipotensora de las películas, demostrando además que las películas no producen irritación en los ojos. Mediante ensayos de determinación de PIO en conejos a los que se les ha colocado estas películas, se logró comprobar que mediante el empleo de películas de alto grado de entrecruzamiento recubiertas con PLA, se logró una disminución muy importante de la PIO por un periodo prolongado (igual o mayor a las 24 h).

Basados en todos estos resultados, se concluye que este sistema de liberación brindaría numerosos beneficios en comparación con los sistemas de liberación utilizados en la actualidad como pueden ser gotas oftálmicas, ya que resultarían más cómodos para su aplicación por parte del paciente (ya que bastaría con una sola aplicación al día) brindando un efecto mayor y más prolongado en el tiempo.

Estos resultados promisorios brindan las bases para la potencial implementación de estas películas en sistemas de liberación de fármacos en animales domésticos o incluso seres humanos.

VIII.2. Utilización de las películas SPI-NCA como recubrimiento activo capaz de captar y retener colesterol en alimentos

VIII.2.1. Introducción

El “envasado **activo** de alimentos” representa una de las principales áreas de investigación en el envasado de alimentos. Esta rama se ha centrado en el desarrollo de nuevas técnicas capaces de mejorar las propiedades de conservación y calidad de los alimentos en función de su interacción con el empaque. Tal como se encuentra descrito en el Reglamento (CE) N° 450/2009 de la comisión de la Unión Europea sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos (Unión Europea, 2009), un envase activo de alimentos representa el grupo de los materiales destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado y la calidad del alimento envasado. Estos envases se encuentran diseñados para incorporar intencionalmente componentes que puedan liberar sustancias en el alimento envasado o en su entorno o puedan absorber sustancias del alimento o de su entorno.

La legislación de la Unión Europea aplica como requisitos generales que los envases activos no pueden ceder sus componentes a los alimentos en cantidades que puedan representar un peligro para la salud humana, provocar una modificación inaceptable de la composición de los alimentos, o causar una alteración de las características organolépticas de éstos. Además, el etiquetado, la publicidad y la presentación de los materiales u objetos no deberán inducir a error por parte de los consumidores.

En la sección VIII.3 de esta tesis se describen los conceptos teóricos y el desarrollo de un sistema capaz de liberar sustancias al alimento envasado, y en esta sección se hará referencia a los sistemas capaces de absorber sustancias de los alimentos envasados.

Entre los sistemas de envasado activo absorbedores de sustancias de los alimentos o de su entorno, se encuentran los absorbedores de oxígeno, dióxido de carbono, etileno, agua, olores y sabores desagradables o sustancias indeseables. Dentro de este grupo, los más implementados a nivel comercial en la actualidad son los absorbedores de oxígeno, humedad y etileno, alcanzando el 35, 16 y 47%, respectivamente (Restuccia et al., 2010).

Por lo general, este tipo de sistemas absorbedores de gases se pueden presentar como películas multilaminares o como dispositivos externos que pueden ser introducidos en el interior del envase. La composición del agente absorbedor variará de acuerdo al componente que se desea absorber. La Figura VIII.2.1.1 muestra en forma esquemática estos dos sistemas.

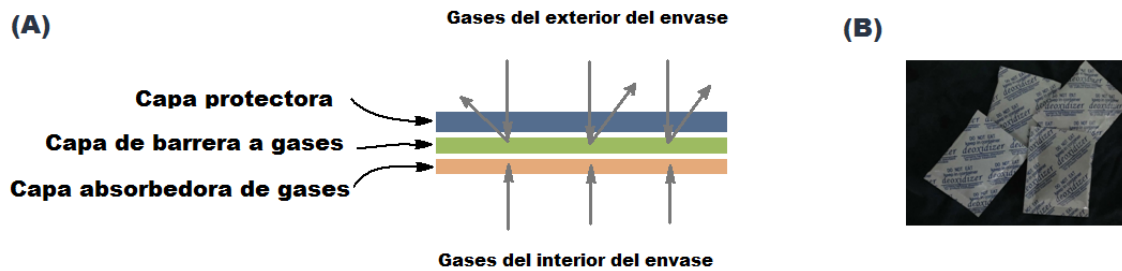


Figura VIII.2.1.1. Sistemas absorbedores de gases en forma de películas multilaminares (A) y en forma de sobre a ser envasado con el alimento (B).

Debido a que en bibliografía se presenta una amplia gama de materiales activos absorbedores de gases, es que en esta parte del trabajo de tesis se decidió centrar la atención en un sistema que sea capaz de absorber sustancias indeseables contenidas en los alimentos, en particular, el colesterol.

Una dieta baja en colesterol es recomendada para prevenir complicaciones médicas como arteroesclerosis, trombosis o enfermedades cardiovasculares, las cuales son la primera causa de muerte en el mundo según la Organización Mundial de la Salud.

La forma más fácil y eficiente de controlar los niveles de colesterol es por medio de la dieta, por lo que se encuentra una gran oferta de alimentos

disponibles comercialmente con bajo contenido de colesterol o grasas, entre los que se encuentran por ejemplo las leches parcial o totalmente descremadas. A nivel industrial, la grasa se separa de la leche para producir leche descremada mediante diversos procesos de centrifugado. Un sistema de envasado activo con la capacidad de captar y retener colesterol, reduciría la cantidad del mismo desde el momento del envasado hasta el consumo del producto. Este sistema elimina la necesidad de procesos de separación de colesterol o grasas, previo al envasado, lo cual representaría beneficios económicos y prácticos a nivel industrial.

En literatura existen reportes de sistemas capaces de retener colesterol, basados en la utilización de ciclodextrinas. A nivel de desarrollo científico se encuentran reportes de sistemas capaces de disminuir la concentración de colesterol en alimentos como leche (L. Alonso et al., 2009; López-de-dicastillo et al., 2011; Tahir et al., 2013), manteca (Jung et al., 2005; Kim et al., 2006), crema (Shim et al., 2003), yema de huevo (Chiu et al., 2004), y queso (Bae et al., 2008; E. M. Han et al., 2008), sin embargo, ninguno de estos sistemas se encuentra aún en proceso de desarrollo a nivel comercial. Estos sistemas pueden ser encontrados en forma de polvos (L. Alonso et al., 2009; J J Kim et al., 2006; Shim et al., 2003), esferas (Chiu et al., 2004) o inmovilizados sobre soportes sólidos insolubles (Tahir and Y. Lee, 2013; Tahir et al., 2013). También se han desarrollado sistemas basados en películas (López-de-dicastillo et al., 2011), sin embargo, aún no han sido aplicados en películas biodegradables de base proteica.

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos los cuales constan de seis (α -ciclodextrina), siete (β -ciclodextrina), ocho (γ -ciclodextrina) o más unidades de glucopiranosas unidas mediante enlaces alfa-(1,4). Las CD son producidas a partir de almidón por una cepa de bacterias llamadas *Bacillus macerans*. El 97% de las CD que se utilizan comercialmente son β -CD debido a que los procesos de purificación de la α -CD y la γ -CD aumentan considerablemente sus costos de producción.

La β -CD muestra una estructura tridimensional de forma cónica de características hidrofílicas en su exterior y que posee una cavidad cilíndrica de 6 a 6,5 Å de diámetro de características hidrofóbicas. La estructura de la β -CD puede ser observada en la Figura VIII.2.1.2.

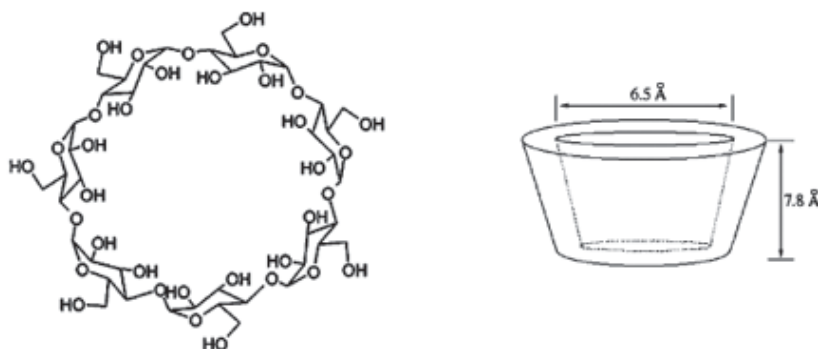


Figura VIII.2.1.2. Estructura de la β -CD

La cavidad hidrofóbica que la β -CD posee es capaz de formar complejos de inclusión con una amplia gama de moléculas huésped orgánicas principalmente por medio de fuerzas débiles, tales como de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, y enlaces puente hidrógeno, mientras que la superficie hidrofílica posibilita la disolución de la CD en agua lo que incrementa las posibilidades de utilización que la misma posee. Es por esto que, por ejemplo, en la industria alimenticia las CD han sido empleadas para encapsular sabores (Jouquand et al., 2004) o para retener, y de esta forma eliminar, sabores u olores no deseados de alimentos (Astray et al., 2009).

El colesterol es una molécula apolar, la cual por su tamaño (cola de 5,42 Å de diámetro) es compatible con el tamaño de la cavidad de la β -CD. La estructura del colesterol puede ser observada en la Figura VIII.2.1.3.

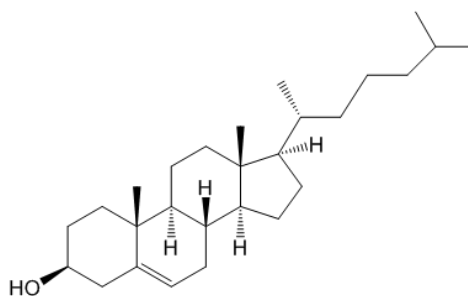


Figura VIII.2.1.3. Estructura del colesterol

En la literatura es posible encontrar reportes de complejos de inclusión colesterol / β -CD en proporciones que van de 1:1 a 1:3 (Yamamoto et al., 2005). La principal fuerza impulsora para la formación del complejo es la liberación de moléculas de agua de la cavidad. Estas se ven reemplazadas por moléculas de colesterol presentes en la solución para alcanzar una asociación apolar-apolar entre el huésped y el receptor. Además, este reemplazo produce disminución de la tensión del anillo de la CD que resulta en un estado de energía más estable (López-de-dicastillo et al., 2011).

En general, en las aplicaciones en las cuales se utiliza CD en alimentos, se realiza el agregado directamente a soluciones acuosas para la posterior precipitación y separación de los complejos de inclusión, siendo estos pasos necesarios para la eliminación de los compuestos no deseados del alimento. La alternativa que se desarrolla en esta parte de la tesis contempla la incorporación de β -CD a una película para ser utilizada como capa interior en un envase contenedor de leche. De esta forma, este envase, tendría la capacidad de captar y retener el colesterol del alimento, reduciendo su concentración en el mismo. Utilizando esta estrategia, se elimina la necesidad de extraer los complejos de inclusión de la leche ya que los mismos quedarían soportados en el envase.

VIII.2.2. Resultados y discusión

VIII.2.2.1. Preparación de las películas conteniendo β -CD

Para el desarrollo de las películas retenedoras de colesterol se utilizaron como base las películas SPI-NCA (proteína de soja – nanocristales de almidón) con el agregado de CD ya que uno de los requerimientos consistía en que las películas tuvieran baja solubilidad en agua para mantener las CD soportadas sobre la misma y evitar de esta forma que las mismas sean liberadas a la leche. Para la preparación de las películas se procedió de la misma forma que en la preparación de las películas SPI-NCA pero se realizó el agregado de las CD en polvo sobre la solución filmogénica, luego del agregado de los NCA (Sección II.2.1). Debido a que para esta aplicación se requieren películas poco solubles en agua, es que se utilizaron las correspondientes con 5 y 20% de NCA (con respecto a la masa de SPI), siendo sus TSM 21,6% y 22,8%, respectivamente. Utilizando estas como base, se prepararon películas sin β -CD y con 0,05 g (14% respecto de la masa de SPI), 0,25 g (71,4% respecto de la masa de SPI) y 0,5 g (143% respecto de la masa de SPI) de β -CD. El aspecto de las películas con β -CD fue similar al que no las contenía, aunque su opacidad fue aumentando a medida que mayor era el agregado de β -CD.

VIII.2.2.2. Ensayos de retención de colesterol de leche utilizando películas SPI-NCA conteniendo β -CD

Para los ensayos de retención de colesterol en leche, se procedió en un primer momento al acondicionamiento de las películas. Este acondicionamiento consistió en una inmersión en agua destilada y posterior secado en estufa con el objetivo de retirar las CD que puedan no estar sujetas a la misma.

Trozos correspondientes a la mitad de las películas preparadas (de 32 cm²) fueron inmersos en leche entera la cual se encontraba contenida en

frascos de vidrio esterilizados. Además de los frascos que contenían películas se dispusieron frascos con leche sin la presencia de películas. Los frascos fueron cerrados herméticamente, envueltos en papel aluminio para protegerlos de la luz y almacenados en heladera a 10 °C por 10 días. Un período de análisis de 10 días representa el tiempo mínimo de interacción que existe entre el alimento y el envase. En realidad, la leche comercial puede interactuar hasta un mes con el envase, ya que este es el tiempo que transcurre por lo general entre el envasado y el vencimiento de la misma. Luego de los 10 días, se procedió a retirar las películas de los frascos de vidrio y a cuantificar el colesterol presente en cada muestra para determinar la disminución de colesterol en cada caso respecto a las muestras que no estuvieron en contacto con las películas.

Al momento de retirar las películas de los frascos se observó que las mismas se encontraban en perfecto estado de integridad estructural.

El aspecto de las películas luego de ser retiradas de los frascos con leche puede observarse en la Figura VIII.2.2.2.1.

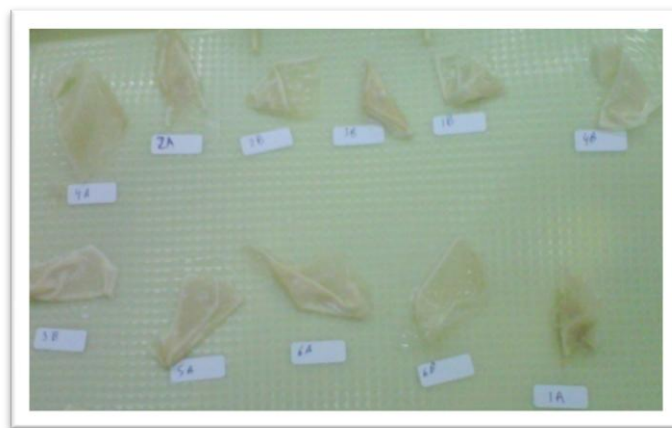


Figura VIII.2.2.2.1. Fotografía de las películas SPI-NCA conteniendo β -CD luego de permanecer en contacto con la leche por 10 días.

La cuantificación de colesterol en leche se realizó por el método del estándar externo mediante cromatografía gaseosa siguiendo un procedimiento descrito en bibliografía (Rendón Marín y Pineda Orozco,

2010). Para esto, se realizó una curva de calibración inyectando en el cromatógrafo de gases soluciones de concentración conocida de colesterol y graficando el área correspondiente a los pico obtenidos en función de las concentraciones de las mismas. La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura VIII.2.2.2.2.

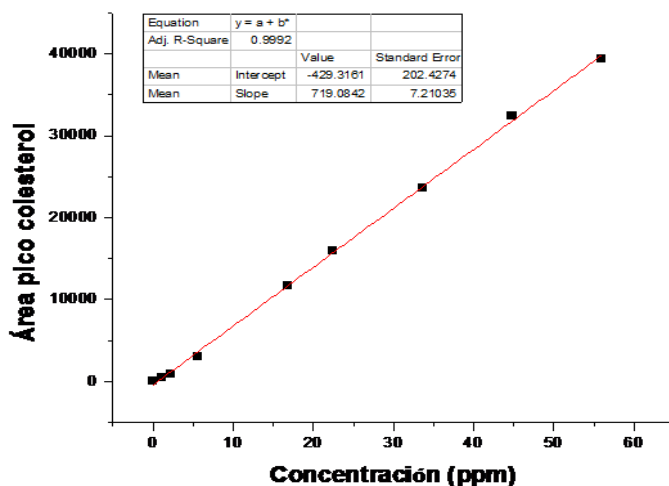


Figura VIII.2.2.2.2. Curva de calibración para soluciones de concentración conocidas de colesterol

Mediante el ajuste a una recta, se determinó la pendiente de 719,08 UÁrea/ppm y la ordenada al origen fue de -429,3161 UÁrea (unidades de Área).

Una vez realizado esto, se procedió a la determinación de colesterol en las muestras de leche. Para este propósito, se realizó la saponificación del colesterol, una extracción y la posterior cuantificación por inyección en un cromatógrafo de gases. Este procedimiento fue descrito en la Sección II.2.7 de esta tesis. El área del pico de colesterol de cada muestra fue determinada como un promedio de las áreas correspondientes de tres inyecciones. Esto fue realizado para evitar fluctuaciones producidas por el detector del equipo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VIII.2.2.2.1.

Película	Volumen leche (mL)	Colesterol (ppm)	Disminución de colesterol respecto a leche sin tratar (%)
-	50	(4,7 ± 0,1) ^A	-
SPI - NCA 5%	50	(4,7 ± 0,2) ^A	-0,50
SPI - NCA 20%	50	(4,6 ± 0,2) ^A	0,15
SPI - NCA 5% - β-CD 14%	50	(4,6 ± 0,4) ^A	1,31
SPI - NCA 20% - β-CD 14%	50	(4,6 ± 0,1) ^A	0,77
SPI - NCA 5% - β-CD 71%	50	(3,7 ± 0,2) ^B	20,10
SPI - NCA 20% - β-CD 71%	50	(3,5 ± 0,3) ^B	25,76
SPI - NCA 5% - β-CD 143%	50	(2,8 ± 0,1) ^C	40,52
SPI - NCA 20% - β-CD 143%	50	(2,6 ± 0,0) ^D	43,30

Los valores correspondientes a una columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($P \geq 0,05$) de acuerdo al test de Turkey.

Tabla VIII.2.2.1. Resultados obtenidos de los ensayos de retención de colesterol en muestras de leche.

De los resultados obtenidos puede observarse que las películas con 5 y 20% de NCA sin el agregado de β-CD (películas control), no produjeron disminución de colesterol en las muestras de leche, por lo que concluimos que ningún componente de las películas SPI-NCA, tiene la capacidad de retener colesterol. Para las películas que contienen β-CD en baja proporción (14 %) se observan pequeñas disminuciones, no significativas, mientras que películas con mayores cantidades de β-CD, producen disminuciones muy marcadas, siendo mayores a medida que mayor es la cantidad de β-CD presente en las películas. Esto, nos indica que la β-CD actúa eficazmente como receptor de colesterol formando un complejo de inclusión entre la cavidad de la misma y la cola hidrofóbica del colesterol. Por otro lado, la variación en la cantidad de NCA presente en las películas no afecta significativamente la retención de colesterol. Solo en el caso de mayor agregado de β-CD, se observa mayor capacidad de retención de colesterol de la película con 20% de NCA respecto de la de 5%.

El ensayo con películas conteniendo cantidades de β -CD mayores al 143% (que *a priori* brindaría mayores disminuciones de colesterol en las muestras de leche) no fue realizado ya que grandes cantidades de β -CD imposibilitaron la correcta dispersión de la misma en las películas y en algunos casos la misma formación de las películas.

Los resultados obtenidos se condicen con los consultados en literatura, donde para películas de poli (vinil alcohol) con 20 y 30% de β -CD, se obtiene 6,2 y 8,3% de disminución de colesterol en leche (López-de-dicastillo et al., 2011).

VIII.2.3. Conclusiones parciales

La preparación de películas proteicas biodegradables poco solubles en agua posibilitó el desarrollo de películas capaces de captar y retener colesterol cuando se las puso en contacto con alimentos ricos en este compuesto. El agente actuante como secuestrador de colesterol es la β -CD, la cual fue agregada a las películas al momento de la preparación. Estas películas mostraron ser eficaces en lograr disminución de colesterol en muestras de leche entera por simple inmersión en el líquido por un período de 10 días. Disminuciones de entre el 20 y el 40% de la cantidad de colesterol fueron obtenidas variando las cantidades de β -CD presente en las películas. Estos resultados son promisorios para la implementación de este material, por ejemplo, como capa interior de un envase multilaminado contenedor de alimentos grasos como la leche. Además, estos resultados abren una gran posibilidad de aplicación de estas películas, no sólo como secuestrantes de colesterol, sino también de otras sustancias lipofílicas no deseadas presentes en alimentos como por ejemplo aldehídos producidos en procesos de pérdida de la calidad de los alimentos, siempre y cuando su estructura sea compatible con la de la cavidad hidrofóbica de la CD.

VIII.3. Utilización de las películas SPI-PLA como recubrimiento activo (antimicrobiano) de alimentos

VIII.3.1. Introducción

Como fue definido en la sección VIII.2.1, un envase activo puede ser definido como un tipo de material que cambia las condiciones de envasado para extender la vida útil, mejorar la seguridad y el mantenimiento de la calidad interactuando directamente con los alimentos (Quintavalla and Vicini, 2002). Una de las tendencias actuales y con buenas perspectivas a futuro en cuanto a los envases activos se refiere, consiste en incorporar aditivos a las formulaciones con el fin de ampliar la funcionalidad de las películas biodegradables. Se pueden agregar agentes antimicrobianos, antioxidantes, además de vitaminas y minerales para enriquecer las formulaciones desde el punto de vista nutricional. La incorporación de agentes activos a diferentes matrices se ha utilizado comercialmente para la liberación de drogas y pesticidas en artículos para el hogar, textiles, implantes quirúrgicos, productos farmacéuticos y otros dispositivos biomédicos pero pocas aplicaciones relacionadas con los alimentos se encuentran disponibles actualmente (López, 2011).

El desarrollo de microorganismos es la principal causa de deterioro de gran número de alimentos. La aplicación directa de agentes antimicrobianos sobre la superficie de los alimentos (por pulverización ó inmersión) no siempre es efectiva debido a que su rápida difusión al interior limita su efectividad sobre la microbiota superficial. Además, esta metodología conlleva a la utilización de grandes cantidades del agente antimicrobiano que en última instancia es ingerida completamente por el consumidor.

Es por esto que en la actualidad se presenta a los envases activos antimicrobianos como una alternativa eficiente a ser implementada en el sector alimentario. Dentro de la amplia gama de envases activos que se

encuentran en etapa de desarrollo, el envase antimicrobiano es uno de los tipos de envases activos más innovadores y prometedores desarrollados durante la última década. Estos envases incluyen sistemas capaces de inhibir el desarrollo y la acción de microorganismos, lo que permitiría reducir las pérdidas de productos por descomposición, extendiendo la vida útil de los mismos. Además, la reducción del crecimiento de patógenos reduce el riesgo de enfermedades causadas por alimentos contaminados.

Diversos envases antimicrobianos han sido desarrollados empleando variadas metodologías, entre las cuales se pueden mencionar:

- Envases con capacidad de emisión o eliminación de compuestos volátiles antimicrobianos (secuestradores de oxígeno, emisores de óxido de cloro, fungicidas);
- Envases capaces de liberar agentes activos (antibacterianos, antifúngicos) en el alimento. En este caso la incorporación de los mismos puede ser dentro de la matriz polimérica del envase o sobre la superficie del polímero por inmovilización de agentes mediante enlaces iónicos o covalentes;
- Envases que evitan el crecimiento de microorganismos por contacto (sales de plata);
- Materiales con propiedades inherentes antimicrobianas (quitosano, alginatos, poliamidas irradiadas).

Para cumplir con su finalidad, el agente antimicrobiano debe difundir hacia la superficie del alimento, por lo tanto las características de la superficie y la cinética de la difusión son cruciales. La liberación de los antimicrobianos desde el envase ha sido objeto de varios estudios y se ha demostrado que debe ser lenta, para mantener una concentración del agente sobre la superficie del alimento tal que sea superior a la concentración crítica inhibitoria (Sanjurjo et al., 2006).

Diversos agentes antimicrobianos han sido incorporados en matrices biopoliméricas. Los agentes más ampliamente incorporados son aquellos que se utilizan en la manufactura de los alimentos en las industrias alimenticias

como por ejemplo sorbato de potasio (Franssen et al., 2004; L. N. Gerschenson, 2010; Pranoto et al., 2005), nisina (Jin y Zhang, 2008; Marcos et al., 2013; Votavová et al., 2010), natamicina (Fajardo et al., 2010; González y Alvarez Igarzabal, 2013; Ramos et al., 2012) y ácido láurico (Dawson et al., 2007). Por otro lado, también se encuentran en desarrollo envases conteniendo nanopartículas de plata (Wang et al., 2012; Yoksan y Chirachanchai, 2010). Otro gran grupo de agentes antimicrobianos incorporados en biopolímeros representan los llamados aceites esenciales o los compuestos principales de los mismos. Es el caso del carvacrol (Guarda et al., 2011; Mastromatteo et al., 2009; M. Ramos et al., 2012) y timol (A. González and Alvarez Igarzabal, 2013; Karagöz et al., 2010; M Mastromatteo et al., 2009; Marianna Mastromatteo et al., 2009) (agentes principales de los aceites esenciales de tomillo y orégano) y el aceite esencial de ajo (Pranoto et al., 2005), anís, cardamomo, etc. (Ramos-García et al., 2010).

Debido a que la función de un recubrimiento activo de alimentos no se limita sólo a contener y proteger los mismos, es que para su desarrollo es necesario que el material a utilizar satisfaga diversas propiedades fundamentales las cuales se encuentran descritas en literatura (Rhim et al., 2013). La Figura VIII.3.3.1 muestra las propiedades que deben ser contempladas al momento de implementar esta aplicación.



Figura VIII.3.3.1. Propiedades que necesitan ser satisfechas para el desarrollo de un recubrimiento activo de alimentos

Como se describió en el capítulo VII de esta tesis, las película preparada a partir de proteínas de soja y poli (ácido láctico) presentaron un excelente balance de propiedades finales. Entre ellas se pueden enumerar los bajos valores de hinchamiento y solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua y excelentes propiedades ópticas y mecánicas. Todas estas propiedades logradas posibilitan el uso de estas películas en diversas aplicaciones. En particular, la utilización del mismo como recubrimiento activo de alimentos parece ser la más propicia ya que las propiedades necesarias pueden ser completamente satisfechas. A las características antes mencionadas, se le suman las excelentes propiedades de barrera a gases y aromas y la capacidad de almacenar y liberar agentes activos que posee la capa de proteínas de soja.

En esta parte de la tesis se describe el empleo de la película SPI-PLA 60/40 como recubrimiento activo de alimentos mediante la incorporación de un agente antifúngico (natamicina) u otro antibacteriano (timol) en la capa proteica. Se ensayó la inhibición del crecimiento de mohos y levaduras (mediante ensayos visuales y microbiológicos) y de bacterias (mediante ensayos microbiológicos). La elección de los agentes activos a utilizar se llevó a cabo con la finalidad de utilizar distintas familias de antimicrobianos así como también distintas fuentes de obtención.

La **natamicina**, también conocida como “Primaricina”, es un fungicida activo frente a hongos y levaduras, que fue aislada por primera vez en 1955. Su estructura es la de un macrólido polieno generado por la bacteria *Actinomiceto Streptomyces natalensis*. La natamicina comercial se elabora mediante la fermentación de este microorganismo en un medio rico en carbohidratos (Bimal, 2012). La natamicina no tiene actividad bactericida; lo que lo convierte en el antifúngico más utilizado para prevenir el desarrollo superficial de hongos y levaduras en la producción de quesos ya que no presenta acción desfavorable alguna para el proceso de maduración del mismo. Además, es más económica y efectiva frente a otros antifúngicos debido a que actúa en menores cantidades respecto al sorbato

de potasio. A diferencia de otros sorbatos, impide la migración de las levaduras y los mohos hacia el interior del producto. La estructura de la natamicina puede ser observada en la Figura VIII.3.1.1.

Por otro lado, el **timol** (2- iso propil-5-metilfenol), es un agente antibacteriano y antioxidante cristalino, incoloro y de olor característico que se encuentra presente en la naturaleza en los aceites esenciales de tomillo y orégano. El timol pertenece al grupo de los terpenos y es estructuralmente similar a carvacrol, el cual tiene el grupo hidroxilo en una ubicación diferente en el anillo fenólico. El modo de acción de ambas sustancias se basa probablemente en la capacidad de desintegrar la membrana externa de las bacterias gram-negativas y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Burt, 2004). La estructura del timol puede ser observada en la Figura VIII.3.1.1.

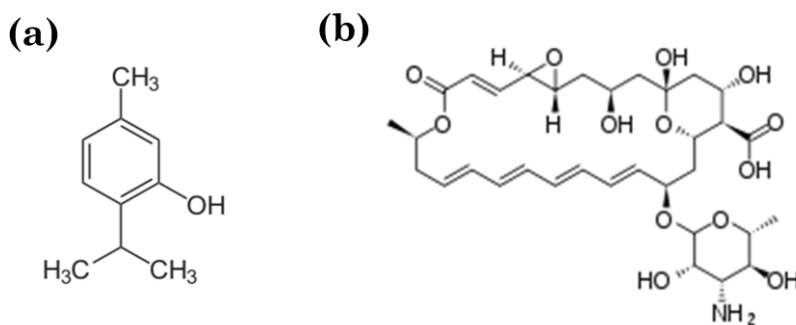


Figura VIII.3.1.1. Estructura molecular de timol (a) y natamicina (b).

VIII.3.2. Resultados y discusión

VIII.3.2.1. Preparación de las películas activas

La preparación de las películas activas se llevó a cabo utilizando la misma metodología que la preparación de las películas SPI-PLA con la excepción de que los agentes activos fueron incorporados a la capa de SPI al momento de preparar la solución filmogénica evitando el paso de regulación del pH. Los agentes activos se añadieron directamente a las dispersiones acuosas de SPI después del calentamiento, una vez que la misma se ha enfriado hasta alcanzar temperatura ambiente. Se eligió a la capa de SPI por sobre la de PLA para contener los agentes activos ya que se necesita cierto carácter hidrofílico para que los agentes activos difundan a la superficie de alimentos que contienen cantidades apreciables de agua y de esta forma cumplir con su finalidad. Se utilizaron diferentes cantidades de agentes antibacterianos y antifúngicos aunque los mejores resultados se obtuvieron para las formulaciones con 0,33 y 25% m/m respecto de SPI para natamicina y timol respectivamente, por lo que los resultados descriptos en este capítulo se obtuvieron utilizando estas cantidades.

El secado de las películas se realizó en un horno durante 12 horas a 45 °C y 72 h a temperatura ambiente para las películas que contienen natamicina y timol, respectivamente. Las temperaturas de secado fueron modificadas con respecto a la metodología de preparación de las películas sin agente activo ya que estos son susceptibles a altas temperaturas.

El aspecto de las películas activas no varía con respecto a la película sin agente activo, siendo de características transparentes y homogéneas.

VIII.3.2.2. Ensayos de inhibición de mohos sobre alimentos

Una vez preparadas las películas se procedió a determinar la eficacia de las mismas. En un primer momento, se llevó a cabo una determinación

visual cualitativa de inhibición del crecimiento de mohos sobre la superficie de distintos alimentos.

Se utilizaron tres materiales diferentes como recubrimientos de productos alimenticios: una bolsa de polipropileno comercial (marca Ziploc), la película SPI - PLA 60/40 sin agente activo (control) y la película SPI-PLA 60/40 conteniendo natamicina como agente antifúngico. Se estudió el comportamiento de los productos alimenticios recubiertos y almacenados en heladera durante un período máximo de 55 días. Las fotografías de los alimentos a distintos tiempos se muestran en la Figura VIII.3.2.2.1.

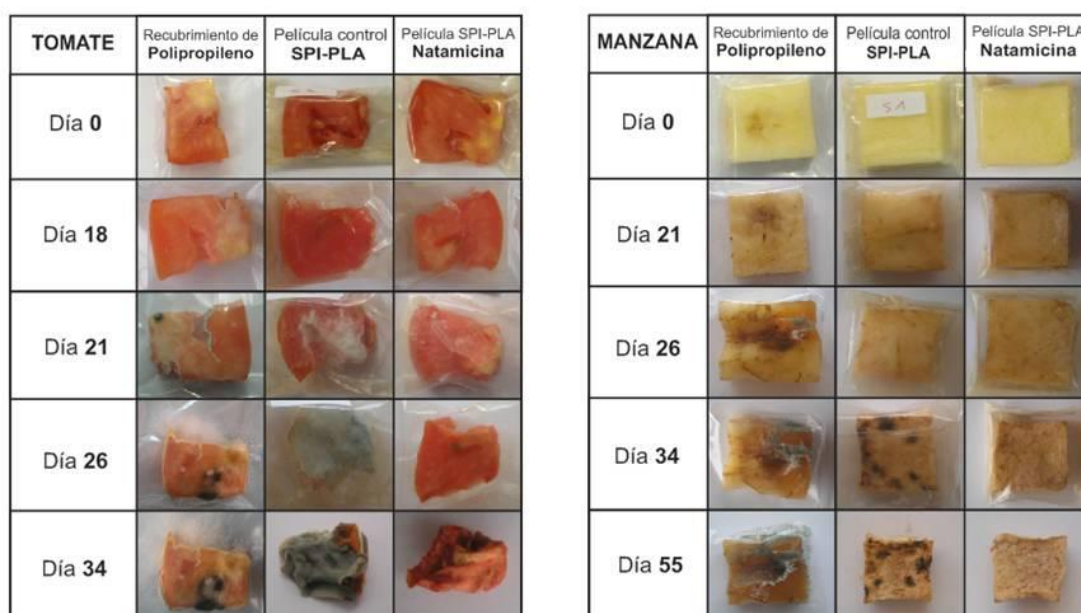


Figura VIII.3.2.2.1. Análisis visual del comportamiento de trozos de tomate y manzana recubiertos con un envase comercial de polipropileno, con la película SPI-PLA 60/40 sin agente activo y con la película SPI-PLA 60/40 conteniendo natamicina.

Los resultados obtenidos para tomate muestran que luego de 21 días se observaron signos de deterioro con la aparición de moho en los trozos envasados con la película SPI-PLA control, y con la bolsa de polipropileno comercial. Estas señales no se observaron para los trozos de tomate recubiertos con la película que contiene natamicina. Luego de los días 26 y

34, la aparición de moho fue mucho más marcada para todos los recubrimientos a excepción del que contiene natamicina. En este caso, sólo se observó una marcada pérdida de agua, sin embargo, no se encontró presencia de mohos. Observando estos resultados, se pudo determinar que la película que contiene natamicina podría retrasar la aparición de moho en el tomate por un período mayor a los 13 días con respecto a la bolsa de polipropileno comercial.

Analizando el comportamiento de los recubrimientos en trozos de manzana, se observó la presencia de mohos en el recubrimiento de polipropileno comercial luego del día 26, sin observarse en los otros casos. Luego del día 34, el crecimiento de moho pudo ser observado en el alimento recubierto con la película SPI-PLA control, mientras que con la película activa, la manzana sólo mostró signos de deshidratación. El estudio en manzana después de 55 días permite concluir de que el mayor crecimiento de moho se encontró para el envase de polipropileno comercial, y que la aparición de moho pudo ser retrasada durante al menos 29 días utilizando la película que contiene natamicina con respecto al empaque de polipropileno comercial.

Por otro lado, una rebanada de queso de pasta blanda fue parcialmente recubierta con la película SPI-PLA 60/40 que contenía natamicina y se comparó el crecimiento de mohos en la zona recubierta con respecto a la zona sin recubrir. Al cabo de 6 días de almacenamiento a temperatura ambiente, se observó un crecimiento inicial de moho en la superficie libre (no en contacto con el recubrimiento). Por el contrario, no se detectó crecimiento de moho en la superficie recubierta debido a la acción inhibidora del agente activo. El aspecto de la rebanada de queso al momento de iniciar el ensayo y luego de transcurrido el tiempo predeterminado se muestra en la Figura VIII.3.2.2.2.

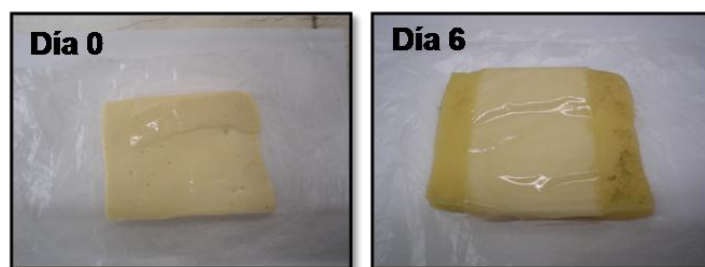


Figura VIII.3.2.2.2. Análisis visual del comportamiento de una rebanada de queso de pasta blanda parcialmente recubiertos con la película SPI-PLA 60/40 conteniendo natamicina, antes y después de 6 días de almacenamiento.

En literatura existen ejemplos de películas de quitosano conteniendo natamicina, donde se ensayan las propiedades inhibitorias del crecimiento de mohos sobre queso, habiéndose logrado resultados similares a los descritos en esta parte de la tesis (Fajardo et al., 2010).

VIII.3.2.3. Ensayos microbiológicos de inhibición *in-vitro*

Se realizaron ensayos microbiológicos con las películas preparadas con los agentes activos timol (antibacteriano) y natamicina (antifúngico) con el fin de evidenciar la inhibición en el crecimiento de mohos (*Aspergillus* sp.), levaduras (*S. cerevisiae*) y bacterias (*E. coli* y *S. aureus*) utilizando el método de difusión en disco de agar en placas de Petri (Ramos et al., 2012). Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Mgter. Ricardo Toselli y el Bioq. Martin Der Ohanessiann del Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP) de la Facultad de Ciencias Químicas (UNC).

En estos ensayos, diferentes cantidades de agentes antibacterianos y antifúngicos fueron utilizadas. Los mejores resultados fueron obtenidos con 0,33 y 25% m/m con respecto a SPI de natamicina y timol, respectivamente. Como se muestra en la Figura VIII.3.2.2.3, se verificó la acción antifúngica de la natamicina, ya que las películas que contienen este agente activo inhibieron el crecimiento de mohos y levadura. Este resultado se obtuvo utilizando una cantidad muy baja de natamicina (0.33% m/m de SPI).

También se pudo observar una pequeña zona de inhibición en las inmediaciones del *film* (alrededor de 2 cm de diámetro). Esto sugiere que el agente activo difunde a través de la película, produciendo inhibición de la flora fúngica en una región mayor a la cubierta por la película. Las determinaciones con películas que contienen mayor cantidad de natamicina (0.52% m/m de SPI) mostraron una zona de inhibición más amplia. Como era de esperar, esta película no inhibió el crecimiento de bacterias. Un comportamiento similar en levaduras y bacterias también fue descrito para películas de proteínas de suero conteniendo natamicina (Ramos et al., 2012).

Por otro lado, las películas preparadas con el agregado de timol inhibieron el crecimiento de las dos cepas bacterianas (una Gram positiva y otra Gram negativa); sin embargo, no se observó inhibición de mohos o levaduras.

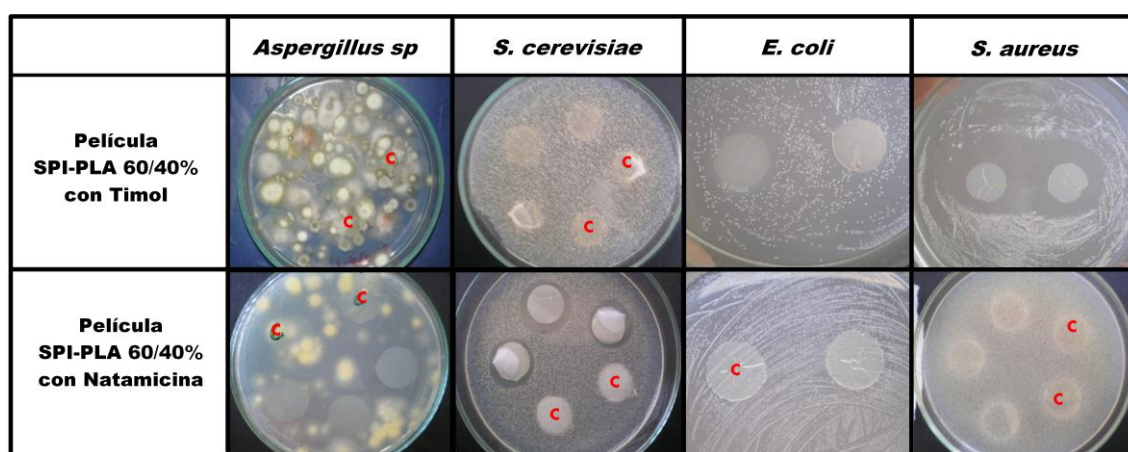


Figura VIII.3.2.2.3. Fotografías de los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición *in-vitro* del crecimiento de levaduras, mohos y bacterias. La letra **C** representa las películas control (sin agente activo).

Mediante este ensayo se llega a la conclusión de que estas películas se pueden utilizar para preparar envases activos para inhibir el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de los alimentos. Otras películas biodegradables conteniendo agentes antibacterianos similares fueron

descritos en la literatura (Ahmad et al., 2012; Atarés et al., 2010; Karagöz et al., 2010; Ramos et al., 2012).

VIII.3.3. Conclusiones parciales

Durante el desarrollo de esta parte de la tesis, se logró la preparación de un nuevo material de propiedades finales que se adecuan perfectamente para la utilización del mismo como material de recubrimiento activo de alimentos. Se realizó la incorporación de bajas cantidades de agentes activos a las películas, con el fin de evaluar la efectividad de las mismas en la inhibición del crecimiento de microorganismos, observando resultados positivos para la inhibición de mohos, levaduras y dos cepas de bacterias mediante ensayos visuales cualitativos y microbiológicos *in-vitro*. Estos resultados, sumados a las buenas propiedades físico-químicas y mecánicas obtenidas y desarrolladas en el Capítulo VII, mostraron que este material presenta un gran potencial de ser utilizado como material biodegradable para recubrimientos activos de los alimentos.

VIII.4. Bibliografía

- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Agustini, T.W., 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids* 28, 189–199.
- Aldana, A.A., González, A., Strumia, M.C., Martinelli, M., 2012. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. *Materials Chemistry and Physics* 134, 317–324.
- Alonso, L., Cuesta, P., Fontecha, J., Juarez, M., Gilliland, S.E., 2009. Use of β -cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. *Journal of Dairy Science* 92, 863–869.
- Alvarez-Lorenzo, C., Blanco-Fernandez, B., Puga, A.M., Concheiro, A., 2013. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 1148–1171.
- Araújo, J., Gonzalez, E., Egea, M.A., Garcia, M.L., Souto, E.B., 2009. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 5, 394–401.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* 23, 1631–1640.
- Atarés, L., Jesús, C. De, Talens, P., Chiralt, A., 2010. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 99, 384–391.
- Bae, H.Y., Kim, S.Y., Kwak, H. S., 2008. Comparison of cholesterol-reduced Camembert cheese using cross-linked β -cyclodextrin to regular Camembert cheese during storage. *Milchwissenschaft* 63, 153–156.
- Bimal, 2012. Nisin and Natamycin. <http://www.bimalpha.com>.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Cai, X., Conley, S., Naash, M., 2008. Nanoparticle applications in ocular gene therapy. *Vision Research* 48, 319–324.

- Calles, J.A., Tártara, L I, Lopez-garcía, A., Diebold, Y., Palma, S D, Vallés, E.M., 2013. Novel bioadhesive hyaluronan – itaconic acid crosslinked films for ocular therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 455, 48– 56.
- Cao, Y., Zhang, C., Shen, W., Cheng, Z., Yu, L., Ping, Q., 2007. Poly(N-isopropylacrylamide)–chitosan as thermosensitive *in situ* gel-forming system for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release* 120, 186–194.
- Chiu, S.-H., Chung, T.-W., Giridhar, R., Wu, W.-T., 2004. Immobilization of β -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk. *Food Research International* 37, 217–223.
- Cortesi, R., Argnani, R., Esposito, E., Dalpiaz, A., Scatturin, A., Bortolotti, F., Lufino, M., Guerrini, R., Cavicchioni, G., Incorvaia, C., Menegatti, E., Manservigi, R., 2006. Cationic liposomes as potential carriers for ocular administration of peptides with anti-herpetic activity. *International Journal of Pharmaceutics* 317, 90–100.
- Dawson, P.L., Carl, G.D., Acton, J.C., Han, I.Y., 2007. Efecto de películas a base de soya impregnadas con ácido láurico y nisina sobre el crecimiento de listeria monocytogenes en mortadela de pavo. *Poultry Science* 81, 721–726.
- De la Fuente, M., Raviña, M., Paolicelli, P., Sanchez, A., Seijo, B., Alonso, M.J., 2010. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 100–117.
- Ebrahim, S., Peyman, G.A., Lee, P.J., 2005. Applications of liposomes in Ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 50, 167–182.
- Europea, U., 2009. Reglamento (CE) N°450/2009 de la Comisión de 29 de mayo de 2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Fajardo, P., Martins, J.T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2010. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering* 101, 349–356.
- Finne, U., Urtti, A., 1992. Pharmacokinetic simulation reveals in vivo deviations from in vitro release of timolol from polymer matrices. *International Journal of Pharmaceutics* 84, 217–222.
- Franssen, L.R., Rumsey, T.R., Krochta, J.M., 2004. C: Food Chemistry and Toxicology. Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. *Journal of Food Science* 69, 1–4.

- Fundacion Argentina de Glaucoma, 2009. Glaucoma
<http://www.fundacionglaucoma.com.ar>.
- Gerschenson, L.N., 2010. Películas activas conteniendo nisina o sorbato: liberación y efectividad del antimicrobiano, in: Proceedings of Agrobioenvases. pp. 5–6.
- González, A., Alvarez Igarzabal, C.I., 2013. Soy protein - poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids* 33, 289–296.
- González, A., Strumia, M. C., Alvarez Igarzabal, C.I., 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering* 106, 331–338.
- Gratieri, T., Gelfuso, G.M., De Freitas, O., Rocha, E.M., Lopez, R.F. V, 2011. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79, 320–327.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology* 146, 144–150.
- Han, E.M., Kim, S.H., Ahn, J., Kwak, H. S., 2008. Comparison of cholesterol- reduced cream cheese manufactured using crosslinked β -cyclodextrin to regular cream cheese. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21, 131– 137.
- Hiratani, H., Fujiwara, A., Tamiya, Y., Mizutani, Y., Alvarez-Lorenzo, C., 2005. Ocular release of timolol from molecularly imprinted soft contact lenses. *Biomaterials* 26, 1293–1298.
- Jin, T., Zhang, H., 2008. Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. *Journal of Food Science* 73, 8–16.
- Jouquand, C., Ducruet, V., Giampaoli, P., 2004. Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chemistry* 85, 467–474.
- Jung, H.J., Abou-Jaoude, M., Carbia, B.E., Plummer, C., Chauhan, A., 2013. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 165, 82–9.
- Jung, T. H., Kim, J. J., Yu, S.H., Ahn, J., Kwak, H. S., 2005. Properties of cholesterol-reduced butter and effect of gamma linolenic acid added

- butter on blood cholesterol. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18, 1646–1654.
- Karagöz, Z., Polat, G., Kodal, B., Candoğan, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *MESC* 86, 283–288.
- Kim, J J, Jung, T H, Ahn, J., Kwak, H S, 2006. Properties of cholesterol-reduced butter made with β -Cyclodextrin and added evening primrose oil and phytosterols. *Journal of Dairy Science* 89, 4503–4510.
- Kim, M.S., Park, S.J., Gu, B.K., Kim, C.-H., 2012. Ionically crosslinked alginate–carboxymethyl cellulose beads for the delivery of protein therapeutics. *Applied Surface Science* 262, 28–33.
- López, O.V., 2011. Tesis doctoral: Desarrollo, caracterización y aplicación de envases biodegradables a partir de almidón.
- López-de-dicastillo, C., Catalá, R., Gavara, R., Hernández-muñoz, P., 2011. Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds. *Journal of Food Engineering* 104, 380–386.
- Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M., Arnau, J., 2013. Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control* 30, 325–330.
- Mastromatteo, M, Barbuzzi, G., Conte, A., Nobile, M.A. Del, 2009. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 222–227.
- Mastromatteo, Marianna, Lucera, A., Sinigaglia, M., Rosaria, M., 2009. Combined effects of thymol , carvacrol and temperature on the quality of non conventional poultry patties. *Meat Science* 83, 246–254.
- Palma, S. D., Tártara, L. Ignacio, Manzo, R.H., Allemandi., D.A., 2007. Diseño de medicamentos para uso oftálmico: tendencias tecnológicas. *Revista Médico Oftalmólogo* 20, 20–24.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K., Salokhe, V.M., 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lwt-Food Science and Technology* 38, 859–865.
- Quintavalla, S., Vicini, L., 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62, 373–380.

- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., Garrigós, M.C., 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering* 109, 513–519.
- Ramos, Ó.L., Silva, S.I., Soares, J.C., Fernandes, J.C., Poças, M.F., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2012. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. *FRIN* 45, 351–361.
- Ramos-García, M., Bautista-Baños, S., Barrera-Nechea, L.L., 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28, 44–57.
- Rendón Marín, J.M., Pineda Orozco, L.M., 2010. Estandarización y verificación de la determinación de colesterol en leche y sus derivados por cromatografía de gases-FID. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Parisi, O.I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Puoci, F., Vinci, G., Picci, N., 2010. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control* 21, 1425–1435.
- Rhim, J.-W., Park, H.-M., Ha, C.-S., 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*. In Press.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., Jagus, R., 2006. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International* 39, 749–754.
- Sasaki, H., Yamamura, K., Mukai, T., Nishida, K., Nakamura, J., Nakashima, M., Ogasawara, M., Ichikawa, M., 1997. In vivo ocular pharmacokinetic model for designing dosage schedules and formulations of ophthalmic drugs in human. *Acta Med Nagasaki* 42, 45–5.
- Shim, S.Y., Ahn, J., Kwak, H S, 2003. Functional properties of cholesterol-removed whipping cream treated by β -Cyclodextrin. *Journal of Dairy Science* 86, 2767–2772.
- Shulin, D., 1998. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *PSTT* 1, 328–335.
- Singh, B., Sharma, V., Kumar, A., Kumar, S., 2009. Radiation crosslinked polymerization of methacrylamide and psyllium to develop antibiotic drug delivery device. *International Journal of Biological Macromolecules* 45, 338–347.

- Tahir, M.N., Kwon, C., Jeong, D., Cho, E., Paik, S.R., Jung, S., 2013. Cholesterol reduction from milk using β -cyclodextrin immobilized on glass. *Journal of Dairy Science* 96, 4191–4196.
- Tahir, M.N., Lee, Y., 2013. Immobilisation of β -cyclodextrin on glass: Characterisation and application for cholesterol reduction from milk. *Food Chemistry* 139, 475–481.
- Tártara, I., Jimenez Kairuz, A., Allemandi, D.A., Palma, S.D., 2008. Uso Racional de Tecnologías Sanitarias: Tratamiento del Glaucoma. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (2), 297-302.
- Tártara, I., 2012. Efecto del sistema portador sobre la biodisponibilidad intraocular de fármacos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Médicas, UNC.
- Tayel, S.A., El-Nabarawi, M.A., Tadros, M.I., Abd-Elsalam, W.H., 2013. Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 443, 293–305.
- Votavová, L., Klaudivová, K., Dobiáš, J., Št, M., Marek, M., Voldr, M., 2010. Polymer films releasing nisin and / or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Engineering* 99, 491–496.
- Wang, B.-L., Liu, X.-S., Ji, Y., Ren, K.-F., Ji, J., 2012. Fast and long-acting antibacterial properties of chitosan-Ag/polyvinylpyrrolidone nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers* 90, 8–15.
- Xu, Y., Zhan, C., Fan, L., Wang, L., Zheng, H., 2007. Preparation of dual crosslinked alginate–chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral site-specific drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 336, 329–337.
- Yamamoto, S., Kurihara, H., Mutoh, T., Xing, X., Unno, H., 2005. Cholesterol recovery from inclusion complex of beta-cyclodextrin and cholesterol by aeration at elevated temperatures. *Biochemical Engineering Journal* 22, 197–205.
- Yamamura, K., Sasaki, H., Nakashima, M., Ichikawa, M., Mukai, T., Nishida, K., Nakamura, J., 1999. Characterization of ocular pharmacokinetics of beta-blockers using a diffusion model after instillation. *Pharm Res* 16, 1596–1601.

Yoksan, R., Chirachanchai, S., 2010. Silver nanoparticle-loaded chitosan – starch based films : Fabrication and evaluation of tensile , barrier and antimicrobial properties. *Materials Science & Engineering C* 30, 891–897.

Capítulo IX

Conclusiones generales

Conclusiones generales

Debido a la excesiva e indebida utilización de productos plásticos derivados del petróleo, es que en la actualidad se sufren las consecuencias derivadas de la acumulación de los mismos. Los grandes problemas de contaminación ambiental que son generados a partir del destino final de estos materiales (enterramiento o incineración), motivaron a diversos sectores de la sociedad a desarrollar alternativas que brinden soluciones a corto o mediano plazo. El sector científico en general, se encuentra abocado a desarrollar materiales capaces de reemplazar parcialmente a los plásticos sintéticos tradicionales por otros de características biodegradables. En particular, la utilización de materiales biodegradables preparados a partir de fuentes de origen natural se presenta como una opción válida por el hecho de provenir de fuentes muy abundantes y de bajo costo. Además, por lo general pueden ser extraídos de desechos industriales, brindándoles valor agregado.

En general, estos desarrollos han demostrado que los materiales preparados directamente a partir de dichas fuentes naturales muestran inconvenientes de performance, como por ejemplo baja resistencia mecánica, fragilidad en estado seco o húmedo, alta permeabilidad a gases y vapor de agua y baja estabilidad térmica, por lo que sus propiedades no resultan óptimas ni suficientes para aplicaciones tecnológicas comunes.

Por este motivo, el presente trabajo de Tesis Doctoral basó sus objetivos en el desarrollo de diversas metodologías sintéticas, de modificación, acondicionamiento o de preparación de los materiales naturales de partida que posibiliten la obtención de materiales finales con propiedades macroscópicas óptimas, para su utilización en diversos sectores.

Se utilizó un aislado de proteínas de soja y quitosano como materiales de partida y se realizaron modificaciones químicas (mediante la formación de redes entrecruzadas por enlaces covalentes y no covalentes o copolimerización por injertos con polímeros sintéticos), mezclas con

nanorefuerzos obtenidos también a partir de un polisacárido natural y formación de películas bicapa utilizando poli (ácido láctico) como segundo componente. Aplicando estas estrategias se lograron materiales en forma de películas con propiedades optimizadas respecto de los materiales de partida. Las mejoras de las propiedades finales de los materiales, posibilitaron su implementación en diversas aplicaciones. Se llevaron a cabo ensayos utilizando las películas:

-Como dispositivo de liberación sostenida de fármacos: el sistema de liberación descrito, podría brindar beneficios en comparación con los sistemas de dosaje utilizados actualmente (ej. Gotas oftálmicas) ya que brindaría mayor comodidad al paciente y mayor efecto por más tiempo;

-Como material de recubrimiento activo de alimentos grasos con la capacidad de retener parte del colesterol contenido en el alimento: el sistema de películas secuestrantes de compuestos tales como colesterol, brindaría beneficios en el uso como capa interior de un envase multilaminado contenedor de alimentos grasos como la leche;

-Como material de recubrimiento antimicrobiano de alimentos: el material de recubrimiento activo en forma de película, otorgaría beneficios importantes por su capacidad de inhibición el crecimiento de microorganismos en la superficie de los alimentos.

En las tres aplicaciones se observaron excelentes resultados mostrando muy buen comportamiento por parte de las películas, sumado al hecho de ser en su totalidad materiales biodegradables. Dichas aplicaciones fueron elegidas de acuerdo a las propiedades finales de cada tipo de película y mediante el análisis exhaustivo de su relación estructura/propiedad. La diversidad de las aplicaciones ensayadas da una idea de la versatilidad que ofrecen las películas preparadas, dada de acuerdo a las propiedades inherentes de cada material.

Una característica especial lograda en el desarrollo de esta Tesis es el aporte que brinda al conocimiento científico en cuanto a las variadas temáticas abordadas:

- Se han desarrollado materiales a partir de metodologías disímiles entre sí, provenientes tanto del área de la química como de la ingeniería.
- Una amplia gama de metodologías han sido utilizadas en la caracterización de los materiales preparados, posibilitando un análisis muy completo desde diversos aspectos o puntos de vista.
- La demostración de la posibilidad de implementación de este tipo de materiales en aplicaciones diversas, da una idea del gran potencial que presentan los mismos y de la importancia que ellos poseerán para las sociedades del futuro.

Algunos de los resultados y conocimientos adquiridos durante este trabajo de tesis pueden ser implementados a mediano o largo plazo y sirven como bases para futuras investigaciones. Sin embargo, otros, por sus características, podrían ser aplicados a gran escala en corto plazo.

Por último, es importante remarcar que algunos de los resultados expuestos en este trabajo de tesis representan innovaciones tecnológicas muy relevantes. Por ejemplo, la utilización de películas entrecruzadas biodegradables para liberación de fármacos a nivel oftalmológico representa un desarrollo novedoso que posee muy pocos antecedentes similares. Por otro lado, si bien la implementación de algunos de los materiales como recubrimientos activos de alimentos representa un área que se encuentra en gran crecimiento, los resultados logrados hacen de este trabajo, un desarrollo muy importante al avance del conocimiento en esta temática.

*Aportes científicos derivados de este
Trabajo de Tesis Doctoral*

Aportes científicos derivados de este Trabajo de Tesis Doctoral:

Durante el desarrollo de esta Tesis de Doctorado se publicaron los siguientes **artículos científicos**:

1. **Cross-linked Soy Protein as Material for Biodegradable Films: Synthesis Characterization and Biodegradation.** A. González, M.C. Strumia and C.I. Alvarez Igarzabal. *Journal of Food Engineering*, 106 (2011) 331–338. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.05.030.
2. **Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled drugs release.** A. Aldana, A. González, M. C. Strumia and M. Martinelli. *Materials Chemistry and Physics*, 134 (2012) 317– 324. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2012.02.071
3. **Soy protein - poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging.** A. González and C.I. Alvarez Igarzabal. *Food Hydrocolloids*, 33 (2013) 289-296. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.03.010

El desarrollo de la presente Tesis Doctoral, también permitió realizar las siguientes contribuciones en **congresos nacionales e internacionales**:

Nacionales:

1. Presentación del trabajo titulado: “Materiales poliméricos biodegradables para ser usados en recubrimientos: Preparación por modificación de materiales de origen natural.” A. González, M. Strumia y C. I. Alvarez Igarzabal, en 4^{tas}. Jornadas de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas en la ciudad de Córdoba (Argentina).
2. Presentación del trabajo titulado: “Modificación de proteína de soja para preparación de recubrimientos biodegradables.” A. González, M. Strumia y C. I. Alvarez Igarzabal, en el Tercer Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de los Materiales en la ciudad de Concepción del Uruguay (Argentina).
3. Presentación del trabajo titulado: “Proteína de soja entrecruzada para preparación de *films* biodegradables: síntesis, caracterización y biodegradación”. A. González, M. Strumia y C. I. Alvarez Igarzabal, en el IX Simposio Argentino de Polímeros SAP 2011 desde el 15 al 18 de noviembre del 2011 en la ciudad de Bahía Blanca (Argentina).
4. Presentación del trabajo titulado: “Proteína de soja entrecruzada para preparación de *films* biodegradables: síntesis, caracterización y biodegradación”. A. González, M. Strumia y C. I. Alvarez Igarzabal, en las 5^{tas}. Jornadas de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas los días 30 de noviembre y 1 de diciembre del 2011 en la ciudad de Córdoba (Argentina).

5. Presentación del trabajo titulado: “Síntesis y caracterización de películas nano-reforzadas de proteína de soja”. Agustín González y Cecilia I. Alvarez Igarzabal, en X Simposio Argentino de Polímeros entre los días 28 y 30 de agosto del 2013 en la ciudad de Buenos Aires (Argentina).

Internacionales:

1. Presentación del Trabajo titulado: “Películas de quitosano entrecruzado con genipina como vehículo para la liberación bucal: síntesis y caracterización.” A. Aldana, A. González, M. Strumia y M. Martinelli, en Archipol V (Simposio Binacional de Polímeros Argentino-Chileno Archipol V) que se realizó en octubre de 2009 en la Ciudad de Los Cocos, Córdoba.

2. Presentación del trabajo titulado: “Modificación de proteína de soja para preparación de recubrimientos biodegradables.” A. González, M. Strumia y C. I. Alvarez Igarzabal, en las II Jornadas Internacionales sobre Avances en la Tecnología de Películas y Coberturas Funcionales en Alimentos (Agrobioenvases) los días 17 y 18 de mayo del 2010 en la ciudad de Buenos Aires (Argentina).

3. Presentación del trabajo titulado: “Modified soy protein as material for biodegradable coatings.” A. González, M. Strumia y C. I. Alvarez Igarzabal, en la ACS Summer School on Green Chemistry and Sustainable Energy 2010 los días 21 al 29 de Julio del 2010 en la ciudad de Golden, CO (Estados Unidos).

4. Presentación del trabajo titulado: “Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation”. A. González, M. Strumia y C. I. Alvarez Igarzabal, en el Segundo Taller de Órganos artificiales, biomateriales e Ingeniería de Tejidos

(OBI) desde el 28 al 30 de septiembre del 2011 en la ciudad de Mar del Plata (Argentina).

5. Presentación del trabajo titulado: “Preparación y caracterización de películas de proteína de soja modificadas con PMMA”. Agustín González, Sofía del Castillo y Cecilia I. Álvarez Igarzabal, en el XIII Simposio Latinoamericano de Polímeros y XI Congreso Iberoamericano de Polímeros (SLAP 2012) del 23 al 26 de septiembre del 2012 en la ciudad de Bodotá (Colombia).

6. Presentación del trabajo titulado: “Recubrimientos activos biodegradables preparados a partir de proteína de soja y poli (ácido láctico) y su utilización en alimentos. Agustín González, Martin Der Ohanessiann y Cecilia I. Alvarez Igarzabal, en las IV Jornadas Internacionales sobre Avances en la Tecnología de Películas y Coberturas Funcionales en Alimentos (Agrobioenvases 2012) los días 25 y 26 de septiembre del 2012 en la ciudad de Florianópolis (Brasil).

7. Presentación del trabajo titulado: “Preparación y caracterización de películas bi-capa de proteína de soja y PLA para su utilización como recubrimientos biodegradable de alimentos”. Agustín González y Cecilia I. Alvarez Igarzabal, en IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba 2012 (CICYTAC 2012) los días 14, 15 y 16 de noviembre del 2012 en la ciudad de Córdoba (Argentina).

8. Presentación del trabajo titulado: “Utilización de recubrimientos biodegradables antimicrobianos preparados a partir de proteína de soja y PLA en alimentos”. Agustín González, Martín Der Ohannessian y Cecilia I. Alvarez Igarzabal, en IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba 2012 (CICYTAC 2012) los días 14, 15 y 16 de noviembre del 2012 en la ciudad de Córdoba (Argentina).

9. Presentación del trabajo titulado: “Preparación y caracterización de recubrimientos biodegradables con propiedades antimicrobianas y su utilización en alimentos”. Agustín González y Cecilia I. Alvarez Igarzabal, en IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba 2012 (CICYTAC 2012) los días 14, 15 y 16 de noviembre del 2012 en la ciudad de Córdoba (Argentina).

10. Presentación del trabajo titulado: “Preparación y caracterización de películas de proteína de soja reforzadas con nanocristales de almidón” Agustín González, Cecilia I. Alvarez Igarzabal, en 13^{er} Congreso Internacional en Ciencia y Tecnología de Metalurgia y Materiales entre los días 20 y 23 de agosto del 2013 en la ciudad de Puerto Iguazú (Argentina).

Actualmente se encuentra en redacción debido a una invitación un **capítulo de libro** denominado “Modification Strategies of Soy Proteins for Food Packaging Applications” del libro “Functional Polymers in Food Science: From Technology to Biology”, el cual será publicado por Scrivener Publishing LLC en cooperación con John Wiley and Sons Ltd en el año 2014.

Además, parte del trabajo desarrollado en esta tesis recibió el siguiente **premio**:

- Premio CICyTAC 2012 - PACKAGING Y ALIMENTO INNOVADOR (Mención especial). Recibido por el trabajo “Preparación y caracterización de recubrimientos biodegradables con propiedades antimicrobianas y su utilización en alimentos”. Agustín González y Cecilia I. Alvarez Igarzabal, en el marco del IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba 2012