



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Delgado, Juan Francisco

Desarrollo de películas multicomponentes a base de levadura. Evaluación de sus propiedades físicas y aplicaciones potenciales



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Delgado, J. F. (2021). *Desarrollo de películas multicomponentes a base de levadura. Evaluación de sus propiedades físicas y aplicaciones potenciales. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes* <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2949>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Desarrollo de películas multicomponentes a base de levadura. Evaluación de sus propiedades físicas y aplicaciones potenciales

TESIS DOCTORAL

Juan Francisco Delgado

delgado.jfrancisco@gmail.com

Resumen

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido ampliamente utilizada para la producción de bebidas y alimentos fermentados. En este trabajo, se estudió el desarrollo de películas de biomasa de levadura por casting. Los resultados mostraron que la biomasa de levadura es una fuente viable para ser utilizada en películas biodegradables utilizando la combinación de homogeneización, tratamiento térmico y otra homogeneización. Se añadió glicerol como plastificante y las películas obtenidas se evaluaron a través de tracción uniaxial, degradación térmica, color, cinéticas e isothermas de sorción de agua y permeabilidad al vapor de agua. Cuando se incrementó el contenido de glicerol, la temperatura de transición vítrea se desplazó de 64,5 a 0,5°C, se alcanzó una deformación a ruptura de 12%, el módulo elástico disminuyó de 88 a 9 MPa y la sorción de agua de las películas aumentó de 0,49 a 0,79 g de H₂O / g de materia seca. Las cinéticas de hidratación permitieron obtener la solubilidad del agua en la película y el coeficiente de difusión. El coeficiente de permeabilidad experimental al vapor de agua fue obtenido a través del método ASTM-E96 y éste se comparó con el coeficiente de permeabilidad obtenido multiplicando el coeficiente de difusión y la solubilidad del vapor de agua en la película. Se encontró una excelente correspondencia entre ambas mediciones. El aumento de la solubilidad del vapor de agua en las películas impulsó el aumento del coeficiente de permeabilidad, mientras que en películas de mayor espesor se observó un mayor coeficiente de difusión y una menor solubilidad. El pH de las dispersiones cambió la deformación a ruptura de las películas desde 7,6±2,3% (pH 4) a 29,1±4,6% (pH 11). Con respecto a la degradación térmica, se observó un desplazamiento gradual de la temperatura de máxima velocidad de degradación entre pH 4 y 11. Se estudió el papel de las fracciones soluble e insoluble de levadura y cómo ambas impactan en las características de las películas. La fracción soluble aumentó el color pardo, la solubilidad del agua en la película y disminuyó el módulo elástico y la resistencia a la tracción. La mayor deformación a ruptura, entre las películas preparadas con mezclas de fracciones soluble e insoluble, se encontró a pH 11 y 100% de fracción insoluble. No obstante, el comportamiento no fue

superior al de una película preparada con la biomasa sin separar. Se estudió la incorporación de nanofibras de celulosa obtenidas a partir de cáscaras de arroz y de nanocelulosa de origen bacteriano, como refuerzo de la película, para mejorar las características mecánicas. La nanocelulosa bacteriana fue más efectiva e incrementó el módulo elástico, la resistencia a la tracción, la deformación y tenacidad a ruptura. Asimismo, se estudió la incorporación de timol para conferir a las películas características antioxidantes y se realizó una evaluación de su liberación en medios simulantes, obteniendo más de 80% de actividad antioxidante, medida en términos de % RSA (radical scavenging activity). Se exploró también la posibilidad de utilizar levadura residual cervecera y de procesar el material a través de moldeo por compresión.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae yeast has been widely used for the production of fermented beverages and foods. In this work, the development of films by the casting method was studied through the combination of one or two high-pressure homogenizations and heat treatment of dispersions. The results showed that yeast biomass is a viable source for use in biodegradable films using the combination of homogenization, heat treatment, and a further homogenization. Glycerol was added as a plasticizer and films were evaluated using different techniques to analyse mechanical behaviour, thermal properties, colour, water sorption, and water vapour transport. When the glycerol content was increased, the glass transition temperature shifted from 64.5 to 0.5°C, the reached elongation at break was 12%, the elastic modulus decreased from 88 to 9 MPa and the water sorption of the films increased from 0.49 to 0.79 g of H₂O/g of dry matter. Hydration kinetics allowed obtaining the solubility of water vapour in the film and the diffusion coefficient. When the glycerol content was increased, the water vapour solubility increased while the diffusion remained constant. The increase in film thickness decreased the water vapour solubility and increased the diffusion coefficient. Experimental water vapour permeability was obtained through the ASTM-E96 method and was compared with an alternative way to obtain the permeability coefficient, i.e., the product of the diffusion coefficient and the solubility coefficient of the water vapour in the film. Great correspondence between both methodologies was found. The increase in water vapour permeability of films, with the addition of glycerol, was due to increased water vapour solubility in the film matrix, while thicker films had a higher diffusion coefficient and a lower water vapour solubility. The pH of the dispersions modified the elongation at break of films from $7.6 \pm 2.3\%$ (pH 4) to $29.1 \pm 4.6\%$ (pH 11). Regarding the thermal degradation, a gradual shift of the maximum temperature of the degradation rate of films was observed between the minimum and maximum pH studied (4 to 11). Different assays were proposed to understand the changes promoted by pH in soluble and insoluble fractions of yeast biomass and how each fraction impacted on the characteristics of films. The soluble fraction increased the

brown colour and solubility of the water vapor in the film, but decreased the elastic modulus and tensile strength. The highest elongation at break was found at pH 11 and 100% of the insoluble fraction. The addition of cellulose nanofibers from rice husks and bacterial nanocellulose was studied as film reinforcement to improve mechanical characteristics. In addition, thymol was incorporated in the films in order to give antioxidant characteristics to them, and an assessment of the release of thymol in different media was carried out. The possibility of using brewing residual yeast and processing the biomass by compression-molding were also explored.



Universidad
Nacional
de Quilmes

Desarrollo de películas multicomponentes a base de levadura

Evaluación de sus propiedades físicas y aplicaciones potenciales

Juan Francisco Delgado

Tesis doctoral, diciembre de 2019

Doctorado en Ciencia y Tecnología



Secretaría de Posgrado

**Desarrollo de películas multicomponentes a base de levadura
Evaluación de sus propiedades físicas y aplicaciones potenciales**

Tesis presentada para obtener el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la
Universidad Nacional de Quilmes

Ing. Juan Francisco Delgado

Director: Dr. Jorge Ricardo Wagner

Codirectora: Dra. Mercedes Ana Peltzer

Consejero académico: Lic. Orlando de la Osa

Laboratorio LOMCEM - Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes

Tesis defendida en forma oral y pública el 2 de marzo de 2020 en la Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

El jurado estuvo integrado por:

Dra. Celina Raquel Bernal (Universidad de Buenos Aires – CONICET)

Dra. María Alejandra Bertuzzi (Universidad Nacional de Salta – CONICET)

Dra. María Alejandra García (Univerisdad Nacional de La Plata – CONICET)

Publicaciones

Los resultados de este trabajo fueron presentados parcialmente en las siguientes reuniones científicas:

2015 – XI Simposio Argentino de Polímeros (Santa Fe, Argentina).

2015 - XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (Córdoba, Argentina).

2016 - VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. (Córdoba, Argentina).

2016 - 2^{do} Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los Alimentos (Punta del Este, Uruguay).

2017 - 6^{to} Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales (San Martín, Argentina).

2017 - XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (Mar del Plata, Argentina).

2017 - XII Simposio Argentino de Polímeros (Los Cocos, Argentina).

2018 - 3^{ra} Reunión de Jóvenes Investigadores de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes (Bernal, Argentina).

2018 - XVI Simposio Latinoamericano de Polímeros (SLAP 2018) y XIV Congreso Iberoamericano de Polímeros (CIP 2018) (Mar del Plata, Argentina).

Los resultados de este trabajo fueron publicados parcialmente en las siguientes revistas científicas:

Delgado, J. F., Sceni, P., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2016). Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 83-91.

Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2018). Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 240-247.

Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Wagner, J. R., & Salvay, A. G. (2018). Hydration and water vapour transport properties in yeast biomass-based films: A study of plasticizer content and thickness effects. *European Polymer Journal*, 99, 9-17.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a los directores de mi trabajo, Dr. Jorge R. Wagner y Dra. Mercedes A. Peltzer, quienes han puesto su conocimiento y esfuerzo en el desarrollo de esta tesis y han guiado mis pasos desde lo humano y lo profesional. También quiero agradecer al consejero Lic. Orlando de la Osa y a la Dra. Vanesa Ludemann que me introdujeron al ámbito de la investigación científica y han enriquecido este trabajo con sus ideas, propuestas y análisis.

Agradezco especialmente al Dr. Andrés Salvay con quien desarrollé los experimentos y trabajé en las explicaciones del capítulo V.

En el camino recorrido para desarrollar esta tesis doctoral tuve el honor de compartir mis horas con quienes han realizado su trabajo final en este marco. Mi agradecimiento a Ana C. Aquino, Carla I. Moyano, Florencia G. Lopes y Laura G. Alonso.

Este trabajo fue posible por la beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Res. 4845/2014 y la beca de arancel de la Universidad Nacional de Quilmes. La tesis fue realizada en el marco del programa de investigación PUNQ “Investigaciones aplicadas al desarrollo del sector alimentario” financiado por la Universidad (Expedientes 1008/11, 1410/15 y 1300/19). La Universidad también me otorgó un subsidio para asistir a una reunión científica (VIEF 2017, Res. 1769/17).

Agradezco también a quienes me han abierto las puertas de diferentes instituciones para realizar ensayos, cuyos resultados son parte de esta tesis. A DI Adrián Oviedo, DI Bernardo Villares Had y Dr. Juan José Ortiz de la Fundación Argentina de Nanotecnología, al Laboratorio de Microscopía Electrónica del INTI – Miguelete, al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA – CONICET - UNLP) y al Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología (ITPN – CONICET – UBA).

Especialmente les agradezco a las Dras. María Laura Foresti, Patricia Cerrutti y a la Lic. Ema Cavallo que proveyeron la nanocelulosa bacteriana y al Sr. Matías Montero que brindó la levadura residual de su proceso de producción de cerveza.

Índice

Publicaciones	7
Agradecimientos	9
Capítulo I: Introducción y objetivos de la tesis	21
1.1 Acerca del tema de esta investigación	21
1.2 Materiales poliméricos, polímeros biodegradables y no degradables	24
1.2.1 Introducción a los materiales poliméricos	24
1.2.2 Polímeros biodegradables obtenidos por producción de microorganismos: ácido poliláctico y polihidroxialcanoatos	27
1.2.3 Polisacáridos	29
1.2.4 Proteínas	30
1.2.5 Mezclas de polímeros naturales	31
1.3 Levaduras	32
1.4 Métodos de ruptura celular	37
1.5 Formación de películas con materiales poliméricos	41
1.5.1 Comportamiento de películas de polímeros naturales con el agua ..	42
1.5.2 Propiedades mecánicas de las películas obtenidas con polímeros naturales	44
1.5.2.1 Características mecánicas generales	44
1.5.2.2 Plastificantes, pH de las dispersiones que generan las películas y refuerzos de celulosa	45
1.6 Materiales y envases activos	50
1.6.1 Introducción a los envases activos	50
1.6.2 Diseño y mecanismos de acción de los envases antioxidantes	53
1.6.3 Timol, compuesto de múltiples aplicaciones	54
1.6.4 Migración de compuestos antioxidantes	56
1.7 Conclusión del capítulo I	58
1.8 Objetivos de la tesis doctoral	58

Objetivo general	58
Objetivos específicos.....	59
Hipótesis de trabajo	59
Capítulo II: Materiales y métodos	61
2.1 Método de preparación de películas	61
2.1.1 Materiales utilizados	61
2.1.2 Estudio del efecto de la presión sobre la ruptura celular	61
2.1.3 Calorimetría diferencial de barrido de las dispersiones sometidas a homogeneización	62
2.1.4 Evaluación de la combinación de diferentes tratamientos sobre dispersiones de levadura.....	62
2.1.5 Determinación de la distribución de tamaños de partículas en las dispersiones de levadura.....	63
2.1.6 Preparación de películas de levadura con las dispersiones tratadas	64
2.1.7 Evaluación de la calidad de las películas obtenidas.....	64
2.1.8 Cinética de sorción de agua en las películas	64
2.2 Efecto del plastificante en las características de las películas.....	65
2.2.1 Preparación de las películas plastificadas	65
2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido de temperatura modulada (MDSC)	66
2.2.3 Análisis termogravimétrico (TGA)	67
2.2.4 Análisis de las películas y residuos por espectroscopía en infrarrojo (ATR-FTIR).....	67
2.2.5 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial de películas con plastificante	68
2.2.6 Caracterización microestructural mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	68
2.3 Estudio de la hidratación y la permeabilidad al vapor de agua de las películas con plastificante	69
2.3.1 Películas utilizadas para los ensayos.....	69
2.3.2 Isotermas de sorción de agua: influencia del glicerol	69
2.3.3 Densidad de las películas	70
2.3.4 Cinética de sorción de agua: influencia del glicerol.....	70

2.3.4.1 Modelo de intervalo de tiempo corto (STL)	72
2.3.4.2 Tipo de transporte a través de las películas.....	72
2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua	73
2.3.5.1 Determinación de la permeabilidad a partir de los coeficientes de difusión y solubilidad.	73
2.3.5.2 Determinación experimental de la permeabilidad al vapor de agua a través del método ASTM E96.....	74
2.3.6 Permeabilidad al vapor de agua en diferentes gradientes de humedad relativa y espesores.....	76
2.3.7 Análisis estadístico de los datos de interacción con el agua	77
2.4 Efecto del pH de la dispersión en las características de las películas	77
2.4.1 Preparación de películas con dispersiones a diferente pH.....	77
2.4.2 Características del comportamiento térmico, mecánico y óptico según la influencia del pH	78
2.4.2.1 Influencia del pH en la degradación térmica	78
2.4.2.2 Influencia del pH en los ensayos mecánicos de tracción uniaxial	78
2.4.2.3 Determinación de color y opacidad de películas preparadas a diferente pH.....	78
2.4.2.4 Determinación de la permeabilidad al vapor de agua de películas obtenidas de dispersiones con distinto pH.....	80
2.4.3 Influencia del pH en la estructura de las películas	80
2.4.3.1 Espectroscopía en infrarrojo.....	80
2.4.3.2 Microscopía de fuerza atómica	80
2.4.3.3 Solubilidad en soluciones seleccionadas	80
2.4.3.4 Cuantificación de proteínas solubilizadas en las soluciones seleccionadas	81
2.4.4 Análisis estadístico de los resultados de interacción con el pH.....	82
2.5 Estudio del rol de las fracciones soluble e insoluble en la formación y las características de las películas	82
2.5.1 Preparación de dispersiones con fracciones solubles e insolubles ..	82
2.5.2 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial de películas obtenidas con modificación en la composición y el pH de las dispersiones	83

2.5.3 Cinéticas de hidratación de películas obtenidas con modificación en la composición y el pH de las dispersiones	85
2.5.4 Permeabilidad al vapor de agua de películas con modificación en la composición y el pH de las dispersiones	85
2.5.5 Análisis de la degradación térmica de películas con modificación en la composición	85
2.5.6 Efecto de la composición y el pH de las dispersiones en el color de las películas.....	86
2.5.7 Espectroscopia infrarroja de películas preparadas a partir de distinto pH y composición	86
2.5.8 Análisis estadístico de la interacción del pH y la composición, cálculo de las superficies de respuesta	86
2.6 Estudio de la incorporación de refuerzos	86
2.6.1 Preparación de cáscaras de arroz micronizadas	86
2.6.2 Preparación de nanofibras de celulosa de cáscaras de arroz	87
2.6.3 Nanocelulosa bacteriana	88
2.6.4 Caracterización de las nanofibras obtenidas a partir de cáscaras de arroz y nanocelulosa bacteriana	89
2.6.5 Preparación de las películas reforzadas con fibras de cáscara de arroz y nanocelulosa bacteriana	89
2.6.6 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial y permeabilidad al vapor de agua	90
2.7 Desarrollo de películas activas: Incorporación y liberación de un compuesto antioxidante	90
2.7.1 Preparación de películas con timol incorporado.....	90
2.7.2 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial.....	91
2.7.3 Determinación del color de las películas con timol.....	91
2.7.4 Determinación del timol presente en las películas mediante extracción sólido - líquido	91
2.7.5 Estudio de la migración de timol en simulantes alimentarios	92
2.7.5.1 Determinación del timol liberado mediante espectroscopía UV .	93
2.7.5.2 Determinación de timol mediante HPLC-UV	93
2.7.6 Determinación del coeficiente de difusión de timol.....	93
2.7.7 Determinación de la energía de activación del proceso difusivo	95

2.7.8 Medición de la capacidad antioxidante del timol en los extractos de migración	96
2.7.9 Determinación de la concentración inhibitoria media del timol	96
2.8 Preparación de películas a partir de levadura residual cervecera	98
2.8.1 Características de la levadura residual	98
2.8.2 Ensayos sobre las películas obtenidas con levadura residual.....	98
2.9 Preparación de películas gruesas a través de moldeo por compresión..	99
2.9.1 Condiciones de procesamiento	99
2.9.2 Evaluación de las características de películas gruesas obtenidas a través de moldeo por compresión.....	100
2.10 Características generales de los análisis estadísticos	100
Capítulo III: ¿Es posible obtener películas a partir de biomasa de levadura? .	101
3.1 Introducción	101
3.2 Ensayos para determinar las condiciones de tratamiento	102
3.2.1 Efecto del proceso de homogeneización sobre la ruptura de las células de levadura.....	102
3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido de dispersiones tratadas a diferentes presiones	104
3.2.3 Distribución de tamaño de partícula de las dispersiones de levadura tratadas	105
3.3 Caracterización de películas de levadura obtenidas por dispersiones tratadas.....	108
3.3.1 Evaluación de la calidad de las películas obtenidas.....	108
3.3.2 Características de hidratación.....	110
3.3.3 Cinética de la sorción de agua.....	110
3.3.4 Isotermas de sorción de agua.....	111
3.4 Conclusiones del capítulo III	114
Capítulo IV: ¿Cómo influye el plastificante en las características de las películas?	117
4.1 Introducción	117
4.2 Caracterización térmica de las películas	117
4.2.1 Calorimetría diferencial de barrido con modulación de temperatura (MDSC)	117

4.2.2 Análisis termogravimétrico (TGA)	120
4.3 Espectroscopía en infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	123
4.4 Evaluación de las propiedades mecánicas.....	127
4.5 Características de la influencia del plastificante en la hidratación de las películas	129
4.5.1 Cinética de la sorción de agua.....	129
4.5.2 Isotermas de sorción de agua.....	129
4.6 Conclusiones del capítulo IV	132
Capítulo V: ¿Cómo se transfiere el vapor de agua a través de la película?	135
5.1 Introducción	135
5.2 Caracterización microestructural de las películas.....	137
5.3 Efecto del glicerol en la cinética de sorción	138
5.4 Efecto del espesor	141
5.5 Tipo de difusión del agua a través de la película.....	143
5.6 Permeabilidad al vapor de agua.....	145
5.6.1 Efecto del glicerol y comparación entre la permeabilidad ASTM-E96 y la obtenida por el producto de la difusividad y la solubilidad	146
5.6.2 Efecto del espesor y comparación entre la permeabilidad del método ASTM-E96 y la obtenida del producto de la solubilidad y la difusividad ...	149
5.7 Estudio del efecto de la humedad relativa (presión de vapor de agua) y el espesor en la permeabilidad	153
5.8 Conclusiones del capítulo V	157
Capítulo VI: Efecto del pH de las dispersiones en las características de las películas de levadura	159
6.1 Introducción	159
6.2 Influencia del pH en el comportamiento de flujo de las dispersiones.....	160
6.3 Degradación térmica de las películas.....	160
6.4 Propiedades mecánicas.....	162
6.5 Determinaciones de color y opacidad	164
6.6 Determinación del coeficiente de permeabilidad al vapor de agua	166
6.7 Análisis de los espectros en infrarrojo de las películas	168

6.8 Microscopía de fuerza atómica y medición de la rugosidad superficial..	170
6.9 Solubilidad diferencial de las películas a distintos pHs en soluciones seleccionadas	171
6.10 Preparación de películas a través de moldeo por compresión	175
6.11 Conclusiones del capítulo VI	181
Capítulo VII: Efecto de las fracciones de la levadura y el pH en las películas	183
7.1 Introducción	183
7.2 Ensayos de tracción uniaxial.....	184
7.3 Características de hidratación y permeabilidad al vapor de agua.....	190
7.4 Efecto del contenido de fracciones soluble e insoluble sobre la degradación térmica	193
7.5 Efecto de las fracciones soluble e insoluble y el pH en el color	194
7.6 Espectroscopía en infrarrojo: relación entre bandas	196
7.7 Conclusiones del capítulo VII	200
Capítulo VIII: Efecto de la incorporación de refuerzos en las películas	203
8.1 Introducción	203
8.2 Refuerzo de películas con cáscara de arroz micronizada	204
8.2.1 Características de la cáscara de arroz micronizada.....	204
8.2.2 Características de las películas reforzadas con cáscara de arroz micronizada (CAM)	205
8.3 Refuerzo de películas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)	207
8.3.1 Características de las nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)	207
8.3.2 Características de las películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)	210
8.4 Refuerzo de películas con nanocelulosa bacteriana (BC)	214
8.4.1 Características de la nanocelulosa bacteriana (BC).....	214
8.4.2 Características de las películas reforzadas con nanocelulosa bacteriana (BC)	215
8.5 Aspecto de las secciones transversales de las películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz y de celulosa bacteriana.....	220
8.6 Permeabilidad al vapor de agua de películas reforzadas	220

8.7 Conclusiones del capítulo VIII	222
Capítulo IX: Características de películas con timol.....	225
9.1 Introducción	225
9.2 Extracción y recuperación del timol incorporado a las películas.....	226
9.3 Características mecánicas de las películas con timol.....	227
9.4 Efecto del timol sobre el color de las películas	228
9.5 Migración en simulante acuoso	229
9.6 Migración en simulante graso	230
9.7 Capacidad antioxidante del timol liberado	236
9.8 Conclusiones del capítulo IX	239
Capítulo X: Películas de levadura residual cervecera	241
10.1 Introducción	241
10.2 Análisis de la levadura residual antes de la preparación de películas	242
10.3 Color de las películas preparadas con levadura residual	246
10.4 Degradación térmica, hidratación y características mecánicas de películas de levadura residual.....	249
10.5 Conclusiones del capítulo X	252
Capítulo XI: Conclusiones generales y aplicaciones potenciales de las películas de levadura	253
Referencias bibliográficas	261
Lista de ecuaciones	289
Lista de figuras.....	291
Lista de tablas.....	297
Anexo I.....	299
Anexo II.....	301
Anexo III.....	303
Abreviaturas.....	305

Dedicado a mis padres, Juan Ramón y Silvia

Capítulo I: Introducción y objetivos de la tesis

1.1 Acerca del tema de esta investigación

Uno de los desafíos actuales de la producción industrial es mejorar la eficiencia de los procesos a través de un uso sostenible de los recursos, valorizando los subproductos generados y reutilizándolos en otros procesos. La racionalidad en el uso de los recursos y la mejora en la explotación de los mismos significa una atenuación del impacto que tienen las actividades humanas en el medio ambiente y también significa una mejora de la competitividad de las empresas (Bello, 2014; Pearson *et al.*, 2012). Estas estrategias están resumidas en lo que se conoce como los 12 principios de la ingeniería verde (Gómez-Cívicos, 2008). En un artículo publicado por Anastas y Zimmerman (2003) se proponen los principios fundamentales de la ingeniería verde, siendo su espíritu el desarrollo sostenible de las actividades humanas en el tiempo. Los principios establecen que es mejor evitar la generación de residuos que tratarlos o limpiarlos una vez que se producen (principio 2), que los procesos de separación y purificación deben ser diseñados de manera tal de minimizar el consumo de energía y el uso de materiales (principio 3) y que los productos, procesos y sistemas deben ser diseñados de manera tal de maximizar su eficiencia (principio 4). Por otra parte, en el principio 6 se sostiene que el esfuerzo realizado en el reciclado, reúso o tratamiento debe ser considerado como una inversión y en los principios 10 y 11 se determina que los productos, procesos y sistemas deben tener el mayor grado de integración posible (disminuyendo las corrientes residuales) y que se debe pensar en la vida posterior a la utilización. En el anexo I se transcriben los doce principios de la ingeniería verde.

En este sentido las corrientes residuales de las industrias de producción y procesamiento de alimentos suelen generar efluentes ricos en proteínas, polisacáridos, lípidos y otros componentes con propiedades funcionales que pueden ser aprovechadas en otros procesos (García – García *et al.*, 2019). En caso de no ser aprovechados industrialmente, los compuestos presentes en las corrientes deben ser tratados antes del volcado en cursos de agua (Devesa – Rey *et al.*, 2011). El potencial perdido también deber ser visto como un costo de no calidad, por no aprovechar sus propiedades funcionales.

En la industria alimentaria, las corrientes residuales poseen en general gran carga de materia orgánica y son ricas en contenido de fósforo y nitrógeno por su contenido de proteínas. Muchas investigaciones actuales dedican sus esfuerzos a estudiar propiedades funcionales de la materia orgánica residual en busca de agregarle valor y promover su uso en nuevas aplicaciones.

Se entiende por biomasa integral a la materia total que compone a una porción delimitada de un ser o varios seres vivos (Wierny *et al.*, 2015). La utilización de la biomasa será clave en el futuro, dentro de una economía que tiende a la integración de los procesos. La bioeconomía es, en su definición ampliada, la utilización sustentable de recursos renovables para la generación de nuevos productos e insumos de base biológica que tengan el fin de producir alimentos y materiales, incluyendo también en insumos a los biocombustibles, productos medicinales y farmacéuticos.

La integración de los procesos desde las explotaciones agrícolas hacia la comercialización de los productos al consumidor permite disminuir el impacto de nuestras actividades humanas. La biomasa de los procesos fermentativos es también una gran fuente de recursos de compuestos que pueden ser aprovechados por sus propiedades funcionales (Pinto *et al.*, 2015). En este sentido, las levaduras han sido empleadas en diversas investigaciones que buscan nuevas aplicaciones en alimentos, además de las tradicionales relacionadas con la producción de etanol y CO₂. Se ha propuesto el empleo de estos hongos unicelulares como fuente de bioemulsificantes debido a la capacidad emulsionante de las proteínas de la pared celular. Con algunas modificaciones, por ejemplo, la lisis de polisacáridos ligados a las proteínas, éstas demostraron ser aptas para la estabilización de los sistemas coloidales (Barriga *et al.*, 1999; Vasallo *et al.*, 2005). También se publicaron otras aplicaciones para las levaduras y/o sus componentes como potenciadores del sabor, estabilizantes, producción de materias colorantes, entre otras (Wagner *et al.*, 2008).

Las levaduras contienen aproximadamente un 40-60% de proteínas dependiendo de su etapa de desarrollo y de las fuentes de crecimiento. Se pueden obtener concentrados y aislados con diversas propiedades funcionales tales como la retención de agua, la capacidad de modificar el comportamiento reológico y de disminuir la tensión superficial entre fases oleosas y acuosas

(Sceni *et al.*, 2009; Pacheco y Sgarbieri, 1998; Kinsella, 1986). La pared celular de la levadura, que habitualmente se obtiene por la ruptura de la célula en condiciones de estrés osmótico o por acción enzimática, se comercializa para el engorde de animales o la industria farmacéutica. Varios autores han señalado las propiedades funcionales de los polisacáridos que componen la pared, β -glucanos y mananos. Los β -glucanos, componentes de la pared celular, poseen efectos inmunomoduladores y son capaces de acelerar la cicatrización de heridas (Chan *et al.*, 2009), en la industria alimentaria podrían utilizarse como espesante de alimentos (Paul *et al.*, 1986 y Xiu *et al.*, 2011) y en la industria cosmética, se han introducido en desodorantes de preparaciones orales, enjuagues bucales y pañales (Kwiatkowski, S. y Kwiatkowski, S. E., 2012). A pesar de la multiplicidad de usos propuestos para la levadura, se ha explorado levemente la posibilidad de utilizar algunos de sus componentes como material para películas y recubrimientos, en particular se ha propuesto el uso de la pared celular y de sus componentes (Novák *et al.*, 2012), así como se han patentado usos y procedimientos para encapsular, recubrir u obtener películas a partir de ellos (Kasai y Eguchi, 2009; Shirasu *et al.*, 2002). No obstante, en estos documentos, publicaciones y patentes no se propone un uso de toda la biomasa y en la bibliografía consultada mediante buscadores de publicaciones científicas y patentes, no hay antecedentes del empleo completo de la biomasa de microorganismos para la preparación de películas biodegradables.

La elección del tema de la presente investigación se fundamenta en la necesidad de buscar nuevas aplicaciones de materias primas y subproductos de la industria alimentaria. Las levaduras son empleadas tradicionalmente en la industria por su capacidad fermentativa y en el caso de las cerveceras representan un importante subproducto industrial. Según estimaciones de Ferreira *et al.* (2010), el volumen de levadura generado es 1,5 – 2,5% del volumen de cerveza final, por lo que representa un subproducto importante cuyo destino mayoritario es la producción de alimento para animales. No obstante, como se dijo antes, las levaduras poseen una gran potencialidad para aplicaciones de mayor valor agregado, como el desarrollo de películas biodegradables, que permite la incorporación de agentes capaces de ser liberados de forma controlada, con diferentes aplicaciones en la industria alimentaria (material soporte, sistemas activos), en la farmacéutica (cápsulas

blandas de liberación controlada) y en agroindustria (cobertura de siembra y crecimiento, *mulching*).

1.2 Materiales poliméricos, polímeros biodegradables y no degradables

1.2.1 Introducción a los materiales poliméricos

En la bibliografía clásica de la ciencia de materiales se clasifica a éstos en grandes grupos, uno de ellos es el de los materiales poliméricos, de gran importancia por la diversidad de aplicaciones que tienen. Se llama coloquialmente “plásticos” a los materiales formados por monómeros basados en carbono que son moldeables o conformables por operaciones que aplican temperaturas y presiones elevadas. Dado lo difuso del concepto, se suele preferir “materiales poliméricos” que es una denominación más técnica basada en la naturaleza repetitiva de unidades enlazadas a través de uniones covalentes (Ohring, 1995).

Los plásticos pueden ser clasificados en elastómeros, termoplásticos y termorrígidos. Los elastómeros son materiales que pueden deformarse de gran manera con bajos esfuerzos, como el caucho, el poliuretano o los fluoropolímeros. Los termoplásticos son materiales que funden o fluyen bajo la aplicación de alta temperatura y presión, como el polipropileno, el polietileno, polietileno terftalato, acrilonitrilo butadieno estireno, poliamida, poliestireno, politetrafluoroetileno, entre otros. Los termorrígidos, por el contrario, una vez que adoptaron una forma a alta temperatura ya no pueden ser nuevamente moldeados porque se degradan, como es el caso de las resinas epoxi (Jones y Ashby, 2005). Aunque la mayoría de estos materiales son derivados del petróleo, en el caso de polietileno, polipropileno y el polietileno terftalato, existen versiones comerciales muy difundidas basadas en recursos renovables, que no son biodegradables, pero sí son totalmente reciclables. En la figura 1.1 se observa que, de la demanda de plásticos en la Unión Europea por tipo de polímero en 2018, el sector del envasado concentra el 40%.

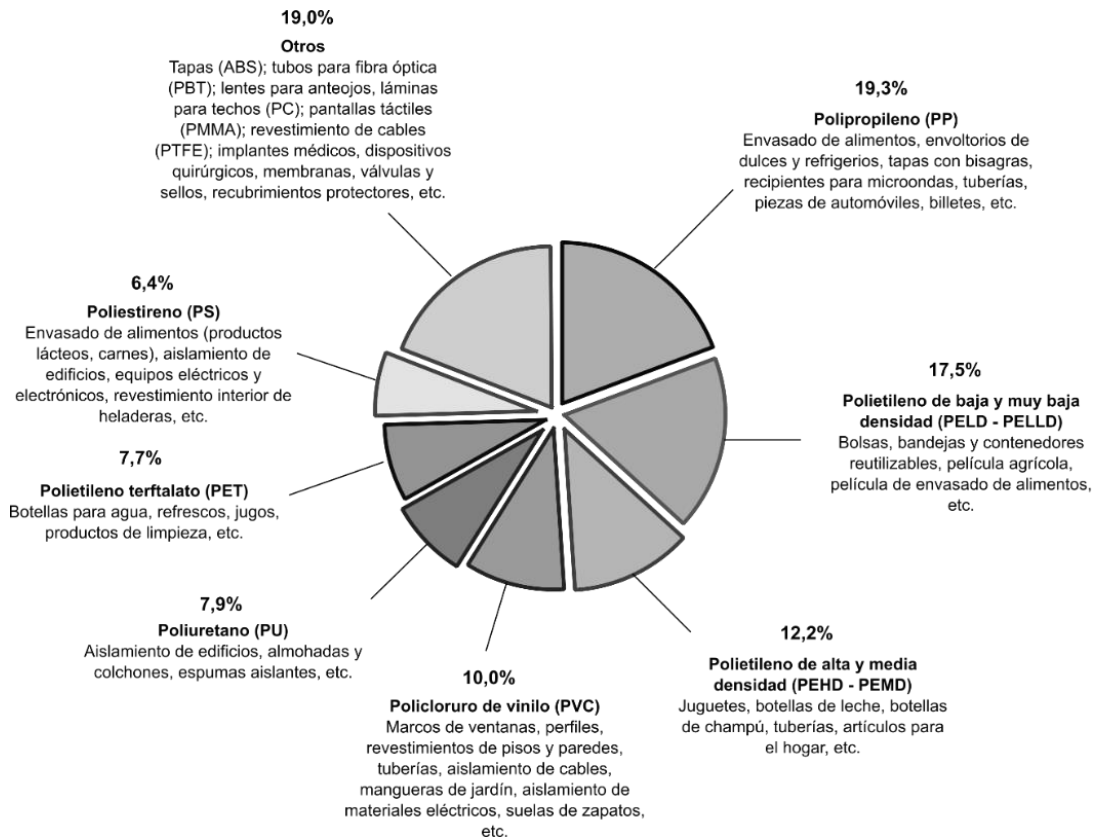
Se entiende por materiales biodegradables a aquellos que pueden ser degradados por acción biológica en un período de tiempo determinado (3 meses), además pueden ser compostables si producen un abono de calidad para las plantas. Hay materiales basados en petróleo y gas, que son sintéticos, pero

también biodegradables. Son ejemplos de éstos, polibutileno-succinato, polibutileno-adipato, policaprolactona y alcohol polivinílico. Para la producción de los polímeros a base de petróleo y gas se realizan reacciones de polimerización por condensación o por adición de los monómeros (Koutinas *et al.*, 2014). Debido a la dependencia general de la industria plástica del petróleo, por ser la materia prima de producción, las modificaciones en su costo provocan cambios en el precio de los productos. Estos cambios, a su vez, impactan en las decisiones de los gobiernos, las empresas y los consumidores o usuarios. El aumento del precio del petróleo significa un impulso al desarrollo de alternativas a la explotación de petróleo, alentando el desarrollo de productos y la producción de energía a través de medios que no están basados en el crudo.

La conciencia sobre el impacto de las actividades humanas en el medio ambiente empuja a que los materiales plásticos sean biodegradables y se generen a partir de fuentes renovables. El costo de los materiales biodegradables continúa siendo elevado y debido a esto se exploran nuevas fuentes de polímeros, por ejemplo, las corrientes residuales, como una manera de reducir el costo de producción. No obstante, al tratarse de un problema social donde la conducta de los actores es central, el problema no puede resolverse exclusivamente con el desarrollo de nuevos materiales. Se necesita que la sociedad sea responsable y se comprometa con el cuidado del ambiente. De esta manera, el cambio necesario requiere varias acciones desde el ámbito de la producción, por ejemplo, repensar los procesos para hacerlos más eficientes, evitando el derroche innecesario de recursos y disminuyendo el volumen de residuos a tratar. Desde el rol de consumidores y/o usuarios de productos y servicios podemos disminuir el consumo de envases de corta vida útil, reutilizarlos cuando son aptos, facilitar la clasificación de los residuos inevitables y disponer finalmente cada uno de ellos de manera responsable.

En la figura 1.2 se observa la capacidad de producción de polímeros a base de recursos renovables por regiones, se excluyó África por la falta de datos. En la figura 1.3 se observa la capacidad global de producción de polímeros a partir de recursos renovables, con la discriminación entre los biodegradables y los no biodegradables. En ambos gráficos se puede ver que, a pesar del crecimiento en el tiempo, es necesario un impulso en la producción de los mismos.

Figura 1.1 Distribución de la demanda de plásticos en la Unión Europea



Datos a 2018, gráfico adaptado del informe de Plastics Europe, 2019.

Figura 1.2 Capacidad mundial de producción de plásticos basados en fuentes renovables en 2018 y proyección a 2023

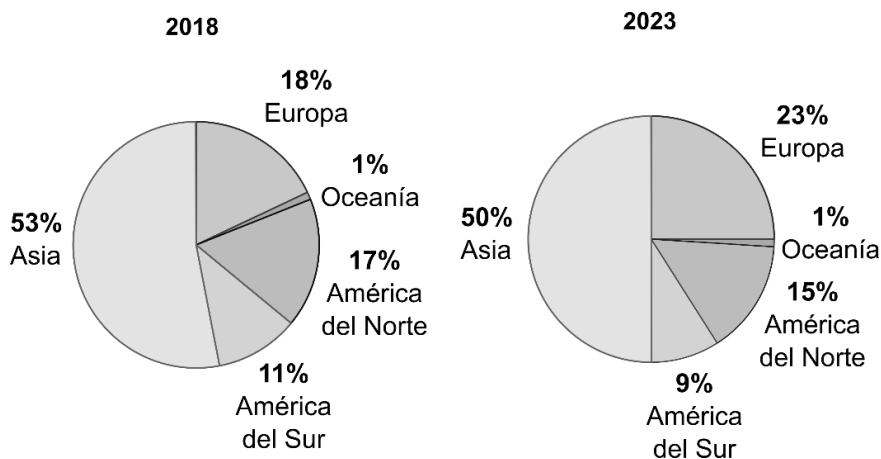


Gráfico adaptado del informe del Instituto para la Ecología y la Innovación Nova (Chinthapalli et al., 2019). No se incluyen en los datos poliuretanos, resinas epoxi y acetato de celulosa.

En los materiales biodegradables obtenidos a partir de recursos renovables, las características de procesamiento y uso dependen de cada polímero y son muy diversas entre ellos, muchos coinciden en su hidrofiliidad afecta su desempeño debido a la hidratación, aunque hay también materiales hidrofóbicos. A continuación, se hace una breve reseña de los más importantes de acuerdo a su producción y uso.

Figura 1.3 Evolución de la producción global de plásticos basados en fuentes renovables desde 2017 a 2023 (desde 2019 son proyecciones)

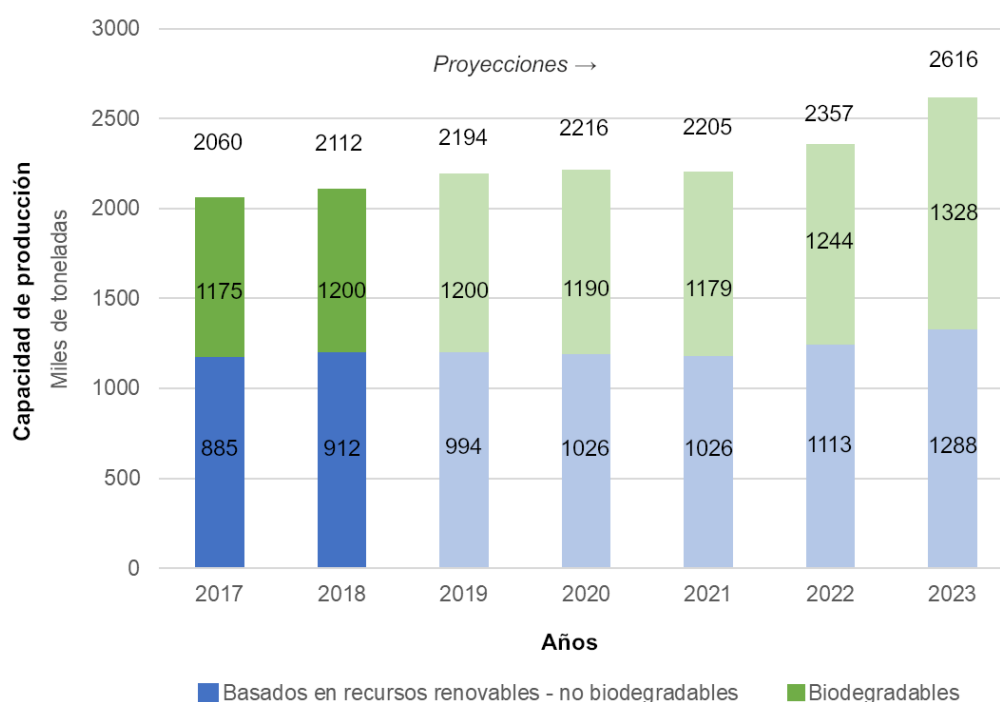


Gráfico adaptado del informe del Instituto para la Ecología y la Innovación Nova (Chinthapalli et al., 2019) y European Bioplastics (2018).

1.2.2 Polímeros biodegradables obtenidos por producción de microorganismos: ácido poliláctico y polihidroxialcanoatos

El ácido poliláctico (PLA) es uno de los materiales más extendidos, ha tenido buena aceptación en las industrias por sus características de procesamiento y por los consumidores debido a sus prestaciones. El ácido láctico se obtiene por

fermentación de la glucosa por bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Sporolactobacillus*. La selección del género y la especie depende entre otras cosas del estereoisómero buscado (L, D, o la proporción de mezcla buscada) y en general se desea que buena parte del medio de cultivo haga uso de biomasa residual para reducir los costos. No obstante, la mayor parte de la producción se obtiene a partir de almidón de maíz, aunque existen otras fuentes muy difundidas como el almidón de mandioca. Luego de la producción del monómero, para obtener el PLA se realiza la polimerización por condensación utilizando catalizadores. Las propiedades finales dependerán del porcentaje de oligómeros, de la mezcla de estereoisómeros utilizada (o no), entre otros factores. El PLA posee un punto de fusión de 150 – 160 °C. La transparencia del material depende del grado de cristalinidad en la muestra, cuanto más cristalino, menos transparente. El módulo elástico es 3 - 4 GPa y la tensión máxima es 50 – 70 MPa (Jiménez *et al.*, 2012), lo cual lo hace un material prometedor para aplicaciones en envasado de alimentos. La temperatura de transición vítrea se encuentra entre 55 y 65 °C y la deformación a ruptura es 2 a 10%, menor a la del polietileno, polímero de referencia para la producción de envases. No es apto para realizar contenedores de bebidas calientes y puede ser plastificado con adipatos o el propio monómero o bien, tratado térmicamente para mejorar la deformación a ruptura. Como tal, es una mala barrera a los gases, pero puede acompañar sistemas multilaminados con otros materiales que sean una mejor barrera.

Por su parte, la síntesis de los polihidroxialcanoatos como el polihidroxibutirato, el polihidroxivalerato y sus copolímeros, es realizada por microorganismos específicos. El polímero de interés se acumula en una vacuola de reserva. Al finalizar el proceso de producción, se realiza la extracción y purificación del compuesto sintetizado.

El polihidroxibutirato de cadena corta (P(3HB)) tiene un módulo elástico de 3,5 GPa y una baja deformación a ruptura (1 a 15%). El largo de la cadena puede incrementar dicha deformación. Su temperatura de fusión es de 170-180 °C y la copolimerización con hidroxivalerato o hidroxidecanoato disminuyen la temperatura de fusión a 130 °C y en el caso del hidroxidecanoato, aumenta mucho la deformación a ruptura, hasta 300% (Mozejko-Ciesielska y Kiewisz, 2016).

1.2.3 Polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros donde la unidad repetida es un azúcar, habitualmente una hexosa o un derivado de ella. Los polisacáridos cumplen diferentes funciones en los organismos, pero esencialmente son dos, funciones de estructura o de reserva energética. El almidón es de los polisacáridos más utilizados en la industria alimentaria por sus diversas aplicaciones y su gran disponibilidad, en la naturaleza es la reserva energética de las plantas. A través de ciertas modificaciones con aditivos y gelatinización se pueden alcanzar deformaciones a ruptura superiores a 200%, aunque la tensión máxima suele ser menor a la del polietileno (Nascimento *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2012).

En la industria de envases ha llegado a utilizarse en productos realizados por soplado e inyección (Thunwall *et al.*, 2008; Mayer y Elion, 1994). Respecto de sus características negativas, la fluctuación de las propiedades, especialmente las mecánicas, con la humedad relativa ambiente es posiblemente una de sus mayores falencias, característica compartida con otros polisacáridos y las proteínas que son utilizadas para realizar películas (Mehyar y Han, 2004). Otros polisacáridos muy difundidos son la celulosa, el quitosano, las pectinas y los alginatos. El quitosano es uno de los polímeros biodegradables de mayor desarrollo, es un polisacárido de carga positiva, con capacidad antimicrobiana (Dutta *et al.*, 2009, Coma *et al.*, 2002). Se cree que la capacidad antimicrobiana *per se* que posee el polímero no depende del grado de deacetilación sino de la capacidad de adherirse a la membrana celular de las bacterias y entorpecer el intercambio de sustancias entre el medio y el microorganismo (Elsabee y Abdou, 2013). Las propiedades mecánicas son similares a las de otros polímeros naturales y dependen del tipo y grado de plastificación, así como de la humedad a la que está expuesto. En particular, la deformación a ruptura informada por diferentes autores está entre 10 y 30% y la resistencia a la tracción de una película plastificada no supera 20 MPa, inferior a la del PLA (Suyatma *et al.*, 2005, Caner *et al.*, 1998). La resistencia a la tracción de las películas de quitosano depende del peso molecular utilizado y del grado de deacetilación.

La celulosa es un polisacárido no aprovechable desde el punto de vista nutricional por el humano. Consiste en 10000 a 15000 repeticiones de la unidad $(C_6H_{10}O_5)_n$. El establecimiento de puentes de hidrógeno intercatenarios entre

unidades adyacentes de glucosa estabiliza la configuración del polímero. Uno de los primeros plásticos obtenidos a base de celulosa fue el celofán, una buena barrera a los gases, aunque sus propiedades se modificaban negativamente cuando el mismo era expuesto al agua. Su producción tuvo su auge en la década del '50 del siglo XX y luego comenzó a decaer. No obstante, la celulosa es uno de los biopolímeros más disponibles y con mayores aplicaciones y productos derivados. En el último tiempo ha cobrado cada vez mayor interés la obtención de productos nanométricos, como nanofibras y nanocristales, por sus diversas aplicaciones. Por ejemplo, es imprimible, transparente y puede actuar como sustrato para la producción de pantallas flexibles, posee buenas propiedades mecánicas y de barrera a los gases, al mismo tiempo que puede actuar como aditivo modificando las propiedades de otros materiales.

1.2.4 Proteínas

En el caso de las fuentes proteicas, las más difundidas para la producción de películas biodegradables son la gelatina (Sobral *et al.*, 2001), el caseinato de sodio (Schou *et al.*, 2005), las proteínas de suero de leche (α -lactoalbúmina y beta-lactoglobulina) (Coughlan *et al.*, 2004), las proteínas aisladas de soja (las mayoritarias son la glicinina, β y γ -conglucina) (Kokoszka *et al.*, 2010), la zeína de maíz (Del Nobile *et al.*, 2008) y el gluten de trigo (Domenek *et al.*, 2004). Algunas proteínas como la gelatina, son muy utilizadas para la producción de láminas y pequeños recubrimientos, especialmente en la industria farmacéutica (Ali *et al.*, 2018). Sus características mecánicas son muy dependientes de la presencia de plastificantes, al igual que en los polisacáridos y en particular, del agua (Calva-Estrada *et al.*, 2019). Las películas basadas en proteínas se destacan como barrera a los gases, aunque esta barrera disminuye con el contenido de agua y los plastificantes (Murrieta-Martínez *et al.*, 2018). Las películas formadas con proteínas pueden alcanzar elongaciones a ruptura superiores al 100% (como en el caso de gluteninas, gliadinas de trigo, zeína, caseínas, debidamente plastificadas) y en general, su módulo elástico y la tensión a ruptura son bajos en comparación con los polímeros sintéticos e incluso el almidón (Calva-Estrada *et al.*, 2019). Para lograr un aumento del módulo elástico fueron propuestas varias estrategias, una de ellas fue el entrecruzamiento covalente de los polipéptidos. Los agentes más eficaces han

sido el glutaraldehído y la transglutaminasa, aunque ninguno de estos es apto para el consumo alimentario por lo que se prefieren otros agentes, de acción más suave, pero aptos para el contacto con alimentos (Bourtoom, 2009). Un entrecruzamiento pronunciado puede provocar un aumento drástico del módulo elástico, pero un entrecruzamiento moderado puede mejorar la elongación sin un cambio elevado del módulo elástico o de la tensión máxima. Chambi y Grosso (2006) prepararon películas con diferentes combinaciones de gelatina bovina y caseína. Los resultados de los ensayos mecánicos de tracción uniaxial realizados sobre las películas mostraron que la incorporación de gelatina aumenta la resistencia a la tracción, pero no se produce un cambio con la acción de la transglutaminasa, mientras que, en la deformación a ruptura, se encontró que en la proporción de 75% de caseína y 25% de gelatina con la acción de la enzima se podía duplicar el valor respecto de la muestra sin agente entrecruzante. En otro caso, en gelatina bovina tipo A junto a carbonato de calcio, Wang *et al.* (2015) obtuvieron un incremento gradual de la deformación a ruptura con la incorporación de transglutaminasa.

1.2.5 Mezclas de polímeros naturales

Los enfoques tradicionales para desarrollar nuevos materiales biodegradables fueron la purificación de sustancias interesantes de su contexto nativo, ya sea proveniente de biomasa vegetal o animal, realizar modificaciones físicas o químicas para mejorar su capacidad de formar películas y sus propiedades, y estudiar el impacto de estos cambios en las características del producto final (Han, 2014; Visakh y Thomas, 2010). Algunos autores han estudiado mezclas intencionales de proteínas, polisacáridos u otros polímeros para encontrar posibles efectos sinérgicos entre ellos (Yu *et al.*, 2006). Las interacciones entre macromoléculas se han estudiado en películas compuestas como proteína de suero y polisacáridos, aislado de proteína de suero, gelatina y alginato de sodio, y compuestos de pectina y gelatina de piel de pescado o proteína de harina de soja (Yoo y Krochta, 2011; Wang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007), así como el efecto de los agentes de reticulación (Su *et al.*, 2010) con la expectativa de una mejora en las propiedades mecánicas o de barrera (Brindle y Krochta, 2008). En un trabajo publicado recientemente, se ha propuesto otro enfoque (el de la presente tesis) que es aprovechar toda la biomasa de microorganismos, como la levadura

Saccharomyces cerevisiae, con la aplicación de tratamientos físicos que mejoran la formación de película. Este enfoque se basa en la hipótesis de que las macromoléculas o los biopolímeros (principalmente proteínas y polisacáridos) pueden actuar cooperativamente para construir una estructura resistente y los compuestos de bajo peso molecular contribuyen a plastificarla. De esta manera, este nuevo enfoque contribuye a un proceso más limpio con menos desperdicio, lo que agrega valor a una gran cantidad de componentes.

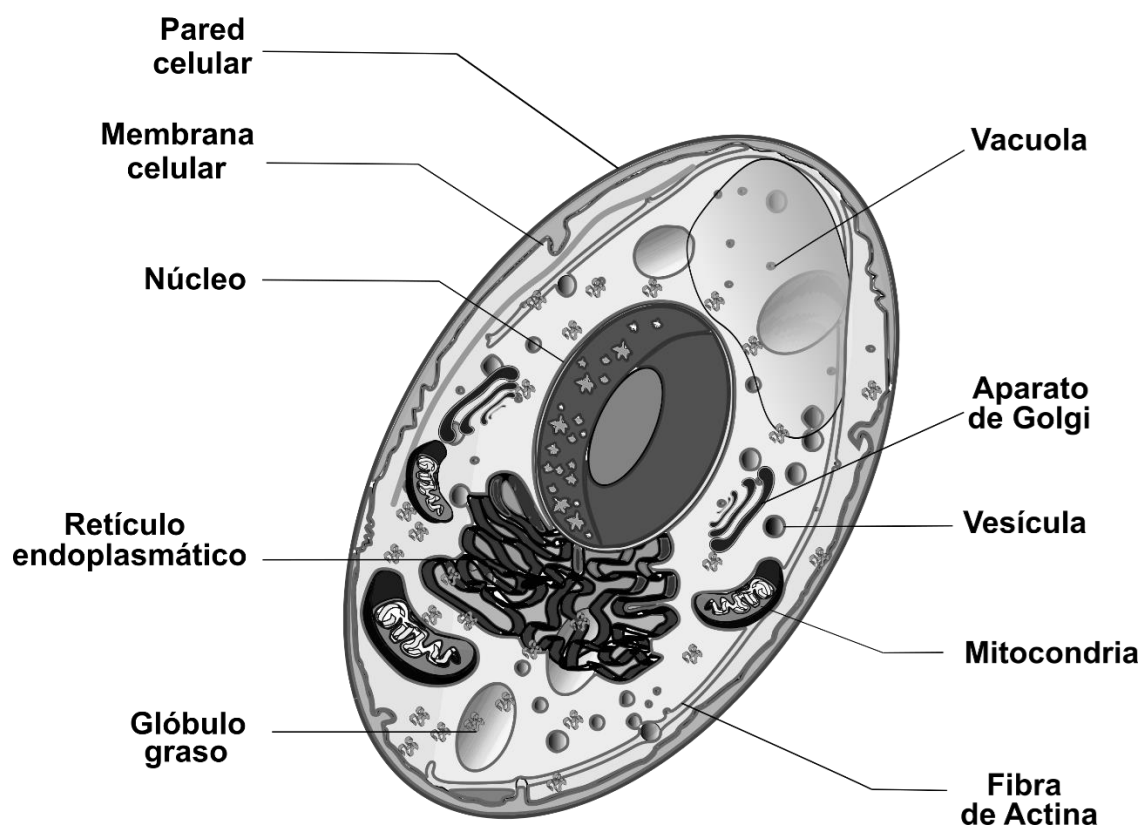
1.3 Levaduras

Las levaduras son un grupo diverso de microorganismos que pertenecen al reino *Fungi* y a la clase ascomicetes o basidiomicetes, algunos son hongos imperfectos de los que no se conoce la fase de reproducción sexual. Pueden encontrarse en forma de ascos libres de 1 a 8 células o en formas hifales. Son microorganismos aeróbicos, aunque varios géneros son capaces de obtener energía a través de la fermentación. Esta capacidad es una de las características de su aprovechamiento tecnológico. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más ampliamente difundida por su aplicación en la fermentación de las masas panarias y en la producción de bebidas fermentadas. Se trata de un fermentador vigoroso de azúcares, mono y disacáridos. Las levaduras del género *Saccharomyces* se reproducen frecuentemente por gemación, aunque son capaces de reproducirse también por vía sexual.

La célula de levadura consiste en una cubierta externa denominada pared celular, muy permeable pero resistente a esfuerzos mecánicos, compuesta mayormente por polisacáridos (figura 1.4). La pared celular significa entre un cuarto y un tercio de la masa seca de la célula (Lesage y Bussey, 2006; Nguyen *et al.*, 1998), esto depende de las condiciones de crecimiento y el estadio madurativo. Los polisacáridos mayoritarios son β -glucanos, polímeros de glucosa con uniones $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow6)$. Los β -glucanos pueden ser solubles o insolubles en medio alcalino, los insolubles en pH alcalino varían entre el 15% y el 48% y los solubles entre 10% y 48%, la diferencia entre los solubles y los no solubles en medio alcalino es que los primeros son lineales con uniones $\beta(1\rightarrow3)$ y los segundos, están altamente ramificados por uniones $\beta(1\rightarrow6)$ (Fleet y Manners, 1976). Los β -glucanos altamente ramificados con enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ tienen un grado de polimerización de 24 y una masa promedio de 150 kDa,

mientras que los $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanos tienen un grado de polimerización de 240 y una masa promedio de 1500 kDa. Existe también una fracción mayoritariamente ligada por uniones $\beta(1\rightarrow3)$ y ligeramente ramificada con uniones $\beta(1\rightarrow6)$, que es insoluble en ácido y en álcali. La totalidad de los β -glucanos en la pared celular es poco más de la mitad de su masa; Santipanichwong y Supphantharika (2009) realizaron el aislamiento de los β -glucanos de pared celular de levadura residual cervecera y obtuvieron un rendimiento de 51%.

Figura 1.4 Célula de levadura *S. cerevisiae* y descripción de organelas



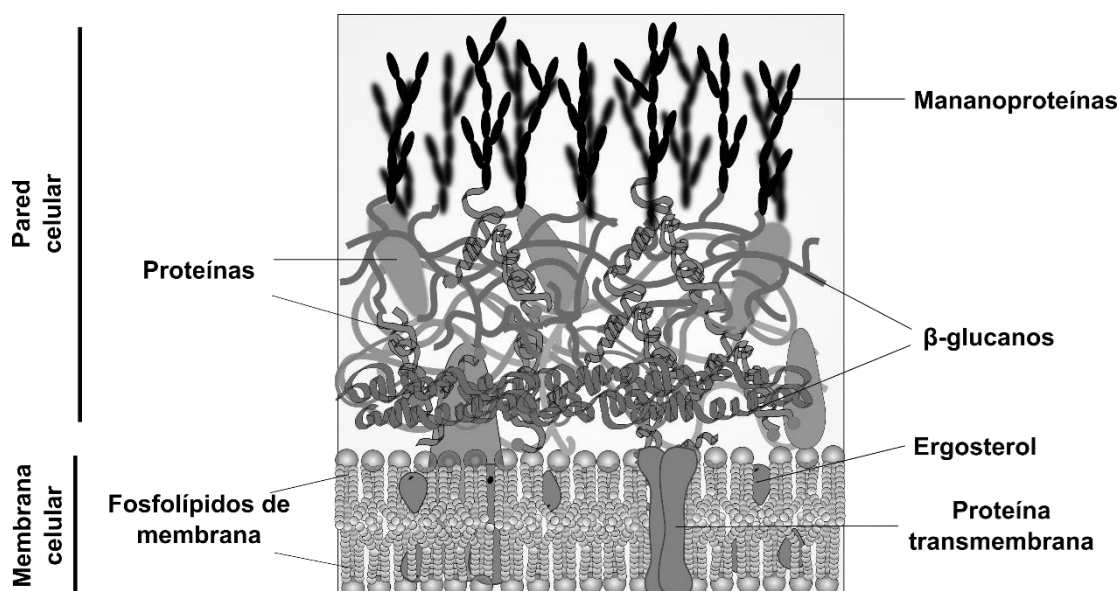
Jerárquicamente, los β -glucanos están dispuestos en la pared de la siguiente manera, los lineales, de uniones $\beta(1\rightarrow3)$ se encuentran en el interior a modo de hélice, como un resorte, capaces de absorber las expansiones y contracciones debidas a la deshidratación y rehidratación (figura 1.5). En las partes externas de la pared se ubican los $\beta(1\rightarrow6)$ glucanos, altamente ramificados y generalmente asociados a las proteínas de pared celular. Las proteínas también pueden unirse directamente a los $\beta(1\rightarrow3)$ glucanos a través de un enlace conocido como ASL (enlace sensible al álcali). Los β -glucanos solubles en álcali

son capaces de formar geles de acuerdo a lo demostrado por Santipanichwong y Suphantharika (2009) y Thammakiti *et al.* (2004).

Además de los β -glucanos, existen proteínas glicosiladas con polímeros de manosa, denominadas mananoproteínas, que significan alrededor de un cuarto de la masa de la pared celular. Existen al menos 20 glicoproteínas y más allá de las funciones generales de la pared, cumplen diversas funciones específicas para la célula. Las mananoproteínas consisten en 50% a 95% de polisacáridos y se ubican en la parte externa de la pared, extendiéndose hacia el interior de la misma. Las mananoproteínas que cumplen roles estructurales consisten aproximadamente en 90% de polisacárido y 10% de proteína, mientras que las unidades manosa también se encuentran en las enzimas periplásmicas, de mayor contenido proteico. Barriga *et al.* (1999) obtuvieron una fracción, denominada α , con buenas propiedades emulsificantes a partir de las mananoproteínas, pero con una reducción del contenido de polisacárido respecto del original. La fracción de gran contenido de polisacáridos es pobre estabilizando emulsiones. Se han postulado diversas aplicaciones tecnológicas de las mananoproteínas en la producción de vino, por ejemplo, adsorción de ocratoxina A, estimulación del crecimiento de bacterias malolácticas, inhibición de la cristalización del tartrato, floculación de las levaduras, entre otras (Caridi, 2006).

La presencia de quitina en las levaduras es reducida, a diferencia de los hongos filamentosos que la poseen en gran medida. Es frecuente encontrar quitina en el anillo del cuello de la célula madre, en el tabique primario y en las escaras. En las paredes laterales no hay quitina, por lo que se puede concluir que no es esencial para la resistencia mecánica de la misma. La pared celular cumple la función de protección de la célula de agentes externos de estrés, así como también de la turgencia interna. Klis *et al.* (2006) señalaron también dos funciones adicionales de la pared celular, el mantenimiento de la forma de la célula y el andamiaje necesario para las proteínas. Las proteínas relacionadas con la pared celular limitan la permeabilidad de la pared celular a macromoléculas, cerrándola a un tamaño de exclusión de 740 Dalton, la protegen del ataque de enzimas externas, evitan la pérdida de precursores en la construcción de la pared y contribuyen a la retención de agua junto a los grupos fosfato de los carbohidratos en las proteínas glicosiladas.

Figura 1.5 Corte de la membrana y la pared celular de la levadura *S. cerevisiae*



Entre la pared celular y la membrana fosfolipídica existe un espacio conocido como espacio periplásmico, con presencia de enzimas útiles al microorganismo, capaces de degradar sustancias complejas en moléculas más pequeñas que pueden atravesar la membrana y nutrir a la célula. La membrana plasmática es una bicapa fosfolipídica con complejos proteicos que facilitan el ingreso o egreso de sustancias. Posee un espesor de 7,5 nm y la capa interna está compuesta por fosfolípidos como fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, mientras que la externa está más enriquecida en fosfatidilcolina. Los lípidos del citoplasma y de la membrana celular son el 7% de la materia seca de la levadura (Delgado *et al.*, 2016). A diferencia de las células animales, donde es frecuente encontrar colesterol, en las levaduras es frecuente el ergosterol y una pequeña cantidad de zimoesterol (Van der Rest *et al.*, 1995).

La membrana celular representa en el peso celular total una fracción minoritaria y al momento de una ruptura por homogeneización se desintegra para formar micelas. Las funciones primarias de la membrana plasmática son la protección física de la célula, el control de la estabilidad osmótica y la regulación del transporte de sustancias. También sirve de anclaje para la citocinesis, el control de la síntesis y reparación de la pared celular y la localización de componentes de las vías de señales de transducción.

En el interior de la célula de levadura se encuentra la compartimentalización propia de una célula eucariota donde las funciones están especializadas en diferentes organelas. El pH interno es ligeramente ácido (5,2) y en el medio se encuentran solubles compuestos de bajo y medio peso molecular, tales como proteínas, glicógeno y otras macromoléculas solubles. Las entidades macromoleculares como ribosomas, proteosomas y partículas lipídicas se encuentran suspendidas en el citoplasma. En el citosol se encuentran numerosos complejos enzimáticos, enzimas glicolíticas, enzimas para la síntesis de proteínas y el mantenimiento de estructuras.

Las estructuras internas con mayor densidad de proteínas en el citoplasma, fuera de las vesículas de transporte son el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. El retículo endoplasmático es la organela clave donde se realizan los procesos que controlan la estabilidad, la modificación y el transporte de proteínas. Se trata de un sistema extendido de tubos ramificados recubiertos por una bicapa fosfolipídica. El retículo endoplasmático significa el 10% del volumen de la célula. Todas las proteínas de transporte de la membrana plasmática y de las diferentes organelas se producen en el retículo endoplasmático. Antes de ser transportadas, un sistema de plegado asistido controla la correcta conformación de las proteínas antes de emigrar al aparato de Golgi.

El aparato de Golgi consiste en una serie de sacos plegados, siendo la red de sacos *cis* la entrada al aparato y los sacos *trans*, la salida de él. En el aparato de Golgi se procesan proteínas y polisacáridos, se realiza la formación de complejos polisacárido – proteínas N-acetilglicosiladas, fosforilación de oligosacáridos, síntesis de protoglicano, modificación de lípidos, entre otras reacciones. También existe un sistema de transporte inverso desde el aparato de Golgi al retículo endoplasmático. Un sistema de control de calidad devuelve las proteínas que no fueron correctamente plegadas antes de ser liberadas para su empleo. Según la base de datos *Isoelectric point database* (Kozlowski, 2016), que calcula los puntos isoeléctricos de las proteínas secuenciadas de diferentes microorganismos, se observa que la distribución de puntos isoeléctricos de proteínas de *S. cerevisiae* es bimodal con centros en pHs 4 – 6 y 8 - 10.

Las células de *S. cerevisiae* pueden considerarse un coadyuvante o ingrediente alimentario, según sea el caso, de bajo costo y abundante. Wagner *et al.* (2009) explicaron que una suspensión de células de levadura se puede

tratar adecuadamente y que es posible aislar componentes de interés individuales. Este tratamiento se determina según la ubicación del compuesto, intracelular o extracelular. Cuando la localización del compuesto es extracelular, es posible separarlo por centrifugación o filtración. Por otro lado, si el compuesto es intracelular, es necesario romper la célula y luego separar la fracción insoluble y soluble. En la bibliografía se describen dos tipos de ruptura: mecánica y no mecánica (Liu *et al.*, 2013). Las metodologías mecánicas comprenden homogeneización a alta presión, molino de bolas, microfluidificador, prensa, entre otras. Las vías no mecánicas de ruptura son la lisis celular por tratamiento térmico y choque osmótico, la adición de solventes (tolueno) o el uso de detergentes y/o enzimas (Freimund *et al.* 2003 y Bzducha-Wróbel *et al.*, 2014). Sceni *et al.* (2009) describieron el fraccionamiento de células de levadura por su ruptura con un molino de bolas de vidrio y caracterizaron cada fracción, soluble e insoluble. La composición de la levadura de panadería prensada fue determinada en Delgado *et al.* (2016), el contenido de los principales macrocomponentes encontrado fue $7,72 \pm 0,04\%$ de ácidos nucleicos, $41,2 \pm 0,4\%$ de proteínas y $46,6 \pm 1,2\%$ de carbohidratos. Novák *et al.* (2012) describieron las aplicaciones de los componentes celulares de levadura para la preparación de películas biodegradables. Las suspensiones de polisacáridos de la pared celular de levadura ($\beta(1\rightarrow3)-(1\rightarrow6)$ -D-glucano) se aislaron de la levadura panadera para preparar películas con la adición de glicerol como plastificante. Las películas preparadas fueron insolubles en agua, compactas, no porosas y no cristalinas.

1.4 Métodos de ruptura celular

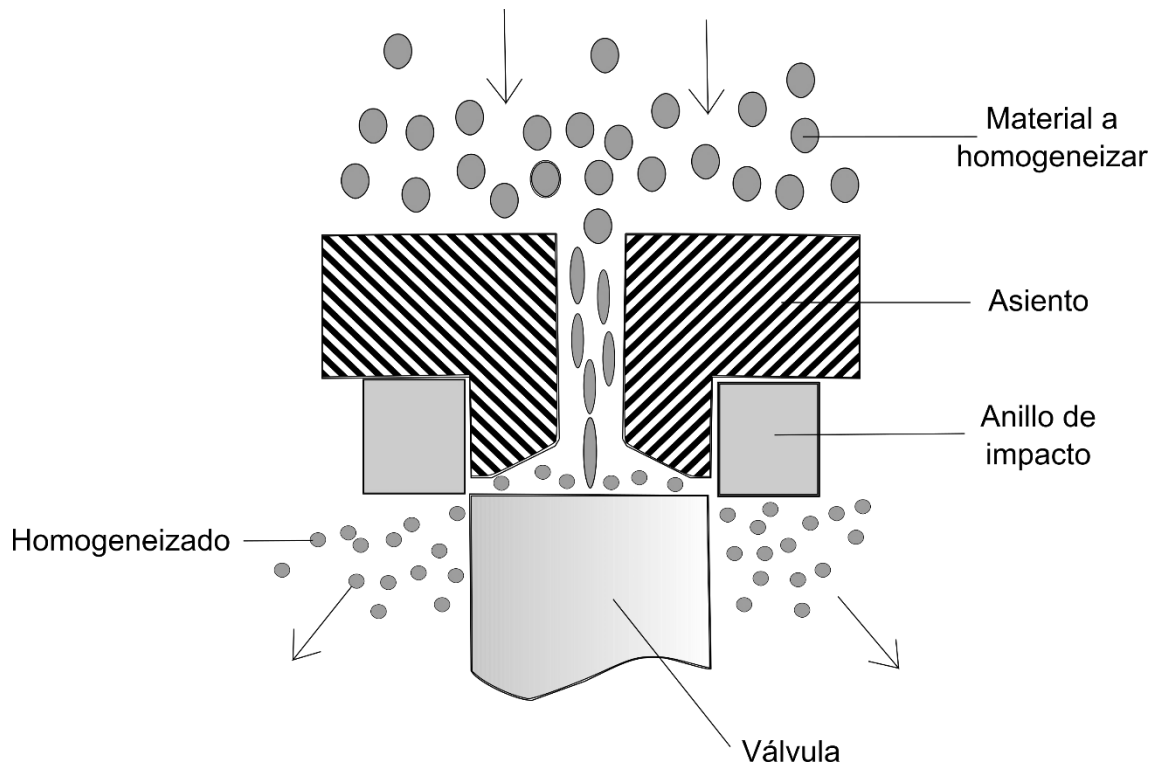
La ruptura de las células de levadura se puede realizar a través de diferentes métodos, que pueden clasificarse en mecánicos y no mecánicos. El interés en realizar la ruptura celular radica en facilitar la recuperación de los compuestos celulares, la elección de uno u otro método depende de qué se necesita obtener y en qué volumen. Liu *et al.* (2016) publicaron una extensa revisión de los métodos disponibles para realizar la ruptura celular. Entre los medios no mecánicos disponibles para la ruptura de las células están los campos eléctricos pulsados, la descarga eléctrica de alto voltaje y la ruptura enzimática por proteasas y glucanasas. La vía enzimática es la más difundida de estas

alternativas a nivel industrial, especialmente cuando se necesitan componentes de la pared celular. Borchani *et al.* (2014) mostraron un proceso donde combinaron dos tratamientos con enzimas, una savinasa (peptidasa) y una lipasa, lo que condujo a un rendimiento del 18% en β -glucano con una pureza del 79%. La lisis enzimática tiene sus aspectos negativos cuando se buscan preservar las características de las proteínas que componen a la levadura, ya que las enzimas realizan una lisis indiscriminada. Cuando se desea preservar distintas macromoléculas de la levadura, la mejor alternativa puede ser un método mecánico. La ruptura por medios mecánicos se puede realizar por molinos, equipos de ultrasonido, microfluidificadores y homogeneizadores de alta presión. El molino de bolas es uno de los equipos más efectivos para realizar la ruptura con alta eficiencia energética y fácil escalado. Consiste en una cámara cilíndrica con discos que se mueven en su interior y empujan un lecho de bolas que rompen las células. El tamaño de bolas, la cantidad de carga de las mismas, el número de pasos, el tiempo de residencia y la velocidad de agitación son las principales variables a considerar durante la operación del equipo. En el caso de la dispersión, la concentración de células también es una variable importante para la eficacia alcanzada en la ruptura (Heim *et al.*, 2007). En general, las bolas más pequeñas (menores a 0,5 mm) tienen mayor eficiencia en la ruptura que las más grandes. No obstante, si el tamaño es demasiado pequeño, perjudica al rendimiento, dado que las bolas más pequeñas tienen tendencia a flotar. Mientras que Currie *et al.* (1972) encontraron que la relación con la liberación de proteínas al medio seguía una cinética de orden lineal y la reducción en el tamaño de las bolas mejoraba el porcentaje de células rotas, Deters *et al.* (1976) encontraron lo opuesto, las bolas más pequeñas producían un menor número de células rotas. En la primera investigación se utilizó un molino industrial y en la segunda, un molino de laboratorio.

En la ruptura por ultrasonido, las altas frecuencias de las ondas producen el colapso de las burbujas de gases disueltos y del vapor de agua. La implosión de las burbujas y las ondas producidas por esto llevan a la ruptura de la pared. La efectividad de la ruptura depende de la potencia de la fuente de ultrasonido empleada y del volumen de dispersión a tratar con dicha fuente. También depende de la frecuencia de las ondas de ultrasonido, la concentración y la temperatura de la suspensión de células, el número de ciclos utilizado y el tiempo

de exposición. Liu *et al.* (2013) utilizaron sonicadores de baño y punta para romper células de levadura en una dispersión al 1%. A través de los experimentos, evaluaron la aplicación de diferentes potencias de ultrasonido a 200 ml de suspensión y la relación de apagado – encendido en el ciclo de trabajo. Los investigadores encontraron una disminución en el tamaño de partículas, consecuente con la ruptura celular, conforme mayor potencia fue suministrada, al igual que en el caso de mayor tiempo de encendido. Al comparar la eficacia del tratamiento con un sonicador de punta y otro de baño a la misma potencia (600 W), el de tipo punta ($0,6 \text{ mg ml}^{-1}$ de proteína liberada) fue mucho más efectivo que el de baño ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ de proteína liberada) en la liberación de proteína desde la célula.

En forma resumida, un homogeneizador a válvula puede ser considerado como un sistema con una bomba de desplazamiento positivo, con un pistón que impulsa un flujo a través de una válvula de homogeneización y un anillo de impacto (figura 1.6). La ruptura de células consiste en someter las células a altas presiones, las células se rompen por el impacto y la cavitación local al impactar contra la válvula y el anillo de impacto. La válvula permite regular la presión de trabajo que es una de las variables más importantes para la ruptura en este equipo. Spiden *et al.* (2013) realizaron un estudio de la ruptura de células de levadura en homogeneizador a válvulas a diferentes presiones, desde 10 a 150 MPa. La concentración de las suspensiones fue de $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Si bien la presión de trabajo incrementó el grado de ruptura de las células, según diferentes indicadores como la viscosidad, la turbidez (medida a 750 nm), la liberación de proteínas o el conteo de células, se obtuvieron valores similares a partir de 99 MPa y 4 pasos de homogeneización. La ruptura por homogeneización de alta presión está muy difundida en la industria, sin embargo, para aplicaciones en las que se necesita purificar un compuesto o un grupo de compuestos de interés, se dificulta el proceso de extracción y purificación debido a la liberación masiva de compuestos intracelulares.

Figura 1.6 Representación de una válvula de homogeneización

Brookman (1974) propuso que la ruptura celular se produce por la abrupta diferencia de presión que existe entre el ingreso a la válvula y el egreso de la misma. Según propone la hipótesis, tamaño diferencia somete a las células a una compresión – descompresión que las células no pueden soportar y estallan. Más tarde, Keshavaz-Moore *et al.* (1990) aportaron evidencia acerca del rol que cumple la forma de la válvula del homogeneizador en el proceso de ruptura, su conclusión final fue que cerca del 20% de la ruptura obtenida después del primer paso se debe a la geometría de la válvula, el 80% restante se debe al impacto de las células con la unidad de la válvula. Ayazi-Shamlou *et al.* (1995) realizaron otros experimentos para determinar un modelo de ruptura de las células de levadura y llegaron a la conclusión que las células se rompen debido las fuerzas extensionales que existen en zonas del homogeneizador donde el flujo tiene forma hiperbólica plana como, por ejemplo, a la salida de la válvula de impacto. Estos autores también coinciden en la importancia de variables como la presión, la concentración de células e incluso, el tamaño de las mismas.

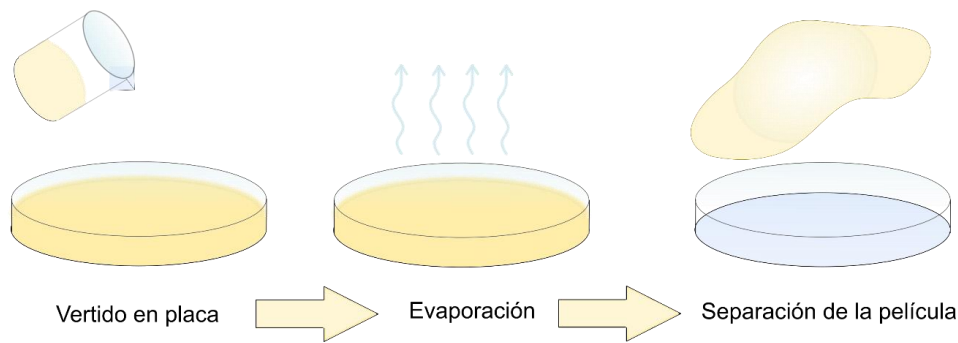
1.5 Formación de películas con materiales poliméricos

Los materiales poliméricos pueden ser procesados para obtener diversas formas de envases alimentarios como contenedores, bandejas, láminas, entre otros. Una película es una lámina fina de material que se coloca sobre un alimento u otro producto para protegerlo de agresiones externas e ingreso o egreso de sustancias (Robertson, 2005).

Las películas son formadas previamente a su aplicación, mientras que, en el caso de un recubrimiento, el mismo se forma luego de ser aplicado sobre la superficie del alimento, generalmente por evaporación de agua (Pavlath y Orts, 2005). Los polímeros naturales, tales como polisacáridos y proteínas, pueden ser utilizados para formar películas que además pueden ser comestibles, es decir, no sólo protegen al alimento, sino que también forman parte de él (Jeevahan y Chandrasekaran, 2019).

Con respecto a la obtención de películas, la técnica de formación más difundida a escala laboratorio es la evaporación de solvente o *casting* (Garrido *et al.*, 2016). En general, la solución o dispersión se coloca en una placa o en un contenedor y las películas se obtienen retirando el agua por convección a temperaturas por debajo de 60 °C (figura 1.7), aunque existen ciertas variantes (Otoni *et al.*, 2017). El método de *casting* permite la producción de películas a baja escala, con la ventaja de poder probar diferentes condiciones sin necesidad de contar con una gran cantidad de material. Sin embargo, no es un método popularizado a nivel industrial, dado que es un proceso discontinuo que requiere de gran consumo de energía para remover grandes cantidades de agua. Una variante de este método, que sí permite producciones de escala, es la metodología *tape-casting* (Ortiz *et al.*, 2017). En esta forma de producción, la solución o dispersión se coloca sobre un rodillo caliente en forma continua y el espesor se ajusta con una cuchilla que distribuye homogéneamente el producto. A medida que el rodillo gira, se produce la evaporación del solvente y la película se forma gradualmente, siendo retirada al final del giro por otra cuchilla y conducida fuera por un sistema de cintas. El resultado es una lámina del material.

Figura 1.7 Proceso simplificado de producción de películas por el método de *casting*



A nivel industrial predominan otras formas de producción, por ejemplo, la extrusión y luego el soplado o la inyección, que son métodos para el procesamiento de polímeros termoplásticos en grandes cantidades. La extrusión es un proceso en el cual un polímero es conducido por un tornillo, que lo somete a elevados esfuerzos de corte, contra un cañón contenedor a través de perfiles de presión y temperatura con el objetivo de formar *pellets* del material. Luego de la extrusión, el material podrá ser inyectado en un molde, soplado (para generar envases o bolsas) o calandrado para formar películas, entre otras posibilidades. Existe también la posibilidad de procesar el material por moldeo por compresión, con el objeto no ya de obtener películas, sino placas del material. El moldeo consiste en una prensa que comprime el material alojado en un marco entre dos placas, acondicionado a una temperatura suficiente para que el mismo funda o fluya según sea su condición (Ashter, 2016). De esta manera pueden obtenerse contenedores, recipientes, entre otros accesorios.

1.5.1 Comportamiento de películas de polímeros naturales con el agua

El contenido y la actividad de agua en los alimentos tienen un rol fundamental en la vida útil de los alimentos debido a que las reacciones químicas, el crecimiento microbiano, la turgencia en los tejidos se ven afectados por estos factores, por lo tanto, la protección del cambio en el contenido de agua (y su actividad, a_w) es necesaria para mantener la estabilidad en el alimento. Es por esto que se espera que los materiales utilizados para la protección del ingreso o egreso de agua del alimento tengan una baja permeabilidad al vapor y mantengan sus características por exposición a atmósferas de alta o baja humedad (Özden y

Bayindirli, 2002). En algunos casos, el envase puede actuar como agente de sacrificio, perdiendo en primer lugar su propia humedad y preservando la humedad del producto alimenticio, extendiendo su vida útil (Plotto *et al.*, 2004). Las películas preparadas a partir de polímeros naturales tienen una desventaja clara respecto de muchos polímeros sintéticos para actuar como barrera al vapor de agua debido a su alta hidrofiliidad, de hecho, la mayoría de los polímeros sintéticos que son buena barrera al vapor de agua poseen una permeabilidad en torno a 10^{-12} a 10^{-14} g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹ (Robertson, 2005), mientras que en los polímeros naturales la permeabilidad al vapor de agua suele estar en el orden de 10^{-10} g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹ a temperaturas de 20 - 25 °C (Embuscado y Huber, 2009), dos a cuatro órdenes por encima de los otros.

El estudio del transporte de agua a través de películas es esencial para una mejor comprensión y optimización de la función protectora de estas membranas (Kester y Fennema, 1986). Además, las películas de biopolímeros obtenidas de recursos agroindustriales como almidón, zeína de maíz, proteínas de suero de leche, proteínas de soja, entre otras, pueden interactuar fuertemente con el agua, ganando o perdiendo el contenido de agua fácilmente, de acuerdo con la humedad relativa (HR) del medio ambiente (Peltzer *et al.*, 2017, Pavlath y Orts, 2009). El agua de hidratación afecta las principales propiedades estructurales y funcionales de las películas hidrófilas porque actúa como plastificante al insertarse entre las cadenas de polímeros, espaciándolas, disminuyendo la temperatura de transición vítrea (T_g) y mejorando la flexibilidad (Cuq *et al.*, 1997a, Levine y Slade, 1988). La fuerte interacción y la relativa facilidad en la sorción y desorción de agua, según la exposición a ambientes con diferentes humedades relativas, afecta fuertemente las características de las películas, especialmente el desempeño mecánico y la permeabilidad a los gases.

El agua de hidratación desempeña un papel fundamental en el transporte de materia a través de películas (Kester y Fennema, 1986; Koelsch, 1994). La permeabilidad al vapor de agua en estos materiales depende de la hidratación o solubilidad del agua en la película, así como de su movilidad dentro de la misma (Roy *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 1985). Por lo tanto, la estructura química, la polaridad, el grado de cristalinidad, la densidad, el grado de reticulación, el peso molecular y el grado de polimerización, así como la presencia de otros plastificantes, son factores que afectan la permeabilidad, ya que influyen en las

propiedades de hidratación, el grado de movilidad molecular y la difusión en el material (Molyneux, 2001; McHugh y Krochta, 1994).

Los polisacáridos y las proteínas interactúan fuertemente con el agua, por lo que las películas preparadas con estos biopolímeros son películas hidrófilas. Las películas basadas en biomasa de levadura representan un buen modelo para el estudio de películas hidrofílicas y su interacción con el agua porque están formadas básicamente por polisacáridos y proteínas. En general, las películas hidrofílicas hechas de biopolímeros muestran isotermas de absorción de agua con un ligero aumento en la hidratación para valores bajos de a_w y un aumento significativo para $a_w > 0,6$. Esto sugiere una hidratación principalmente en formas de multicapa, con una pequeña monocapa. De esta manera, en estas películas hidrófilas, el agua de hidratación es agua móvil, no fuertemente unida a la matriz polimérica (Peltzer *et al.*, 2017).

El mecanismo por el cual las moléculas de agua se transportan a través de películas de polímeros naturales es complejo y aún no se comprende bien, especialmente debido a la fuerte dependencia del coeficiente de permeabilidad con el espesor de la película (Hu *et al.*, 2001; Gennadios *et al.*, 1994a; McHugh *et al.*, 1993) y el contenido de plastificante (Nazan Turhan y Sahbaz, 2004; Cuq *et al.*, 1997b; Gennadios *et al.*, 1994b).

Además de intervenir en la calidad de la barrera al vapor de agua, el agua también puede afectar características muy importantes de las películas, como el desempeño mecánico. Una excesiva plastificación por la inclusión de agua puede ser perjudicial para aplicaciones de envasado, así como también el cambio drástico en las propiedades debido a la fluctuación de la humedad en el ambiente. Uno de los grandes desafíos en los materiales basados en polímeros naturales es el control de las características mecánicas y la disminución del grado de interacción con el agua (Siracusa *et al.*, 2008).

1.5.2 Propiedades mecánicas de las películas obtenidas con polímeros naturales

1.5.2.1 Características mecánicas generales

Las propiedades mecánicas de las películas de polímeros naturales son, en general, inferiores a las de los polímeros sintéticos. Las películas obtenidas por

diversos métodos, evaporación del solvente/dispersante (*casting*), *tape-casting*, moldeo por compresión, extrusión, en general poseen un módulo elástico que no supera 200 MPa, la resistencia a la tracción raramente se encuentra por encima de 50 MPa (Calva-Estrada *et al.*, 2019) y la deformación a ruptura es variada, mientras algunos son quebradizos, con una deformación a ruptura inferior a 5%, otros al ser plastificados alcanzan deformaciones a ruptura de hasta 250% (Embuscado y Huber, 2009).

Las propiedades mecánicas de las películas pueden ser afectadas por la incorporación de un refuerzo o por el cambio en las interacciones entre los polímeros que las componen, debido a la incorporación de nuevos grupos funcionales (funcionalización o derivatización), plastificantes, la simple modificación del pH o la fuerza iónica de la solución/dispersión que genera la película. Las modificaciones de pH, la introducción de cationes divalentes en las dispersiones o soluciones han sido estudiadas por diferentes autores en películas de proteínas, polisacáridos y mezclas de ellos con diversos resultados.

1.5.2.2 Plastificantes, pH de las dispersiones que generan las películas y refuerzos de celulosa

Los plastificantes modifican de gran manera el comportamiento mecánico, siendo el agua el principal plastificante de los polímeros naturales. Tal como señalan Krauskopf y Godwin (2005), la IUPAC define a los plastificantes como sustancias que incorporadas a un material mejoran su flexibilidad, manipulabilidad y distensibilidad. Los plastificantes pueden reducir la viscosidad de los polímeros fundidos, disminuir la temperatura de una transición de segundo orden como la transición vítrea o reducir el módulo elástico. En el caso de los polímeros naturales, los plastificantes más utilizados suelen ser polioles, por su bajo peso molecular y por su capacidad de interacción con macromoléculas hidrofílicas. Vieira *et al.* (2011) realizaron una gran revisión de las sustancias plastificantes utilizadas en películas de polímeros naturales. El más frecuente de los plastificantes es el glicerol, aunque también habitualmente son utilizados en las publicaciones científicas sorbitol, otros monosacáridos y disacáridos, urea, etilenglicol y polietilenglicol.

El pH de las dispersiones o soluciones afecta la fortaleza de las interacciones intermoleculares. En el caso de geles, especialmente de los producidos a partir

de proteínas, la fortaleza del gel puede variar de acuerdo a la intensidad de la interacción (Puppo y Añón, 1998). Cuando el pH se acerca al punto isoeléctrico de la proteína donde la carga neta es cero, las fuerzas de corto alcance, como las fuerzas de dispersión de London o de Van der Waals predominan mientras que, lejos del punto isoeléctrico, son importantes las fuerzas electrostáticas debido a la carga neta de la proteína. En este caso, las fuerzas de corto alcance pueden estar desfavorecidas y la red que se formará tendrá características diferentes. En los polisacáridos, el pH puede afectar la solubilidad y la carga neta de los grupos funcionales, por ejemplo, en los que cuentan con grupos funcionales ácidos, como las pectinas, donde a pHs alcalinos la carga neta es negativa (Espitia *et al.*, 2014), mientras que, en el quitosano, a pHs ácidos la carga neta es positiva (Elsabee y Abdou, 2013). La carga neta afecta la posibilidad de establecer interacciones con cationes metálicos, lo que repercutirá en la fortaleza de la red formada.

La incorporación de partículas tales como arcillas, fibras, así como partículas de orden nanométrico como nanotubos, nanocristales o nanofibras está destinada a modificar las propiedades mecánicas, aunque también puede tener repercusión en la capacidad de barrera al vapor y también a los gases (Souza y Fernando, 2016). Los materiales compuestos consisten en tres partes de gran interés, la fase continua o matriz, el refuerzo o fase dispersa y la región de interfase (Ngo, 2018). Si al incorporarse un refuerzo a una película existe una buena adhesión interfacial, aumenta la resistencia de la misma, ya que la fase continua descarga el esfuerzo en las partículas dispersas que cuentan con mayor resistencia (Yao *et al.*, 2013).

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los grandes pilares de la alimentación mundial y el almidón que se obtiene a partir de él es muy valorado para diversos fines, no solo alimentarios. La industrialización del cariopse, que incluye el endospermo (de gran contenido almidonoso), el embrión, las capas de aleurona, que es la fracción más rica en proteínas, el tegumento y el pericarpio, genera industrialmente un subproducto que es la cáscara de arroz, conocida también como glumela, con dos partes principales, palea y lema. La cáscara de arroz es de naturaleza abrasiva, posee bajo valor nutritivo y alto contenido de cenizas (Jurado *et al.*, 2003) debido a la presencia de sílice. Se estima que en 2018 se obtuvo una cosecha mundial de 770 millones de toneladas de arroz cáscara, lo

que implica 510 millones de toneladas de arroz blanco (FAO, 2018). En Argentina el volumen de producción es de 1.050.000 toneladas por año. Las cáscaras de arroz contienen 80% de sustancias orgánicas y el 20% son materiales inorgánicos. Los principales componentes elementales son: carbono (C), 37,05% p/p, hidrógeno (H), 8,80% p/p; nitrógeno (N), 11,06% p/p; silicio (Si) 9,01% p/p y oxígeno (O), 35,03% p/p. Estas cáscaras están compuestas por 20-22% de hemicelulosa; 30-35% de celulosa y 25-30% de lignina (Mansaray y Ghaly, 1998). A partir de la cáscara de arroz se pueden obtener fibras y fibrillas que son capaces de modificar el comportamiento mecánico de películas obtenidas con polímeros naturales. En este trabajo se exploró la obtención de nanofibras de arroz para reforzar las películas de levadura.

La nanotecnología es un campo de la ciencia y la tecnología que estudia las propiedades y las aplicaciones, así como su manipulación, de la materia en el orden nanométrico. Se trata de una tecnología de tipo transversal porque cruza a sectores muy diferentes de la ciencia y la tecnología, sirviendo como una nueva herramienta para continuar con el desarrollo. Se habla habitualmente de nanopartículas cuando al menos una de las dimensiones de las mismas posee menos de 100 nm (Rauscher *et al.*, 2014), aunque todavía no hay consenso sobre una definición con límites tajantes (Boholm y Arvidsson, 2016; Maynard, 2011; Kreyling *et al.*, 2010), dado que hay “nanotecnología” con tamaños ligeramente mayores. Los denominados nanomateriales son materiales que se encuentran en la escala nanométrica y han ganado atención en las últimas tres décadas por sus propiedades particulares, por ejemplo, su interacción con el campo electromagnético, la gran relación de aspecto o su gran relación área/volumen en relación a la de las partículas más grandes. Las nanopartículas pueden modificar el comportamiento de materiales o bien, proveerles nuevas características para que respondan a determinadas aplicaciones.

La celulosa está estructurada en forma de fibrillas que conectadas forman fibras. De acuerdo a la evidencia disponible, en las plantas vasculares, la fibrilla, unidad elemental de la pared celular, está formada por 36 cadenas de celulosa (Chinga-Carrasco, 2011). Una fibrilla elemental de celulosa posee 3,5 nm de diámetro. Las fibrillas tienen dominios altamente ordenados, cristalinos, que están aislados entre sí e intercalados entre los dominios amorfos. Las fibras de celulosa se reúnen con las hemicelulosas y la lignina para formar macrofibras

que dan rigidez y resistencia mecánica a los tejidos vegetales. La celulosa también puede obtenerse de algas, tunicados y bacterias, y en el caso de estas últimas, a través de la producción por bacterias del ácido acético (Esa *et al.*, 2014). La ventaja de la producción de celulosa bacteriana es que se obtiene una estructura constituida únicamente por celulosa sin hemicelulosas o lignina, con altísima capacidad de retención de agua. La hidrólisis de las secciones amorfas de las fibrillas de celulosa permite obtener cristales. Las nanopartículas de celulosa son materiales nanométricos que han ganado gran atención en el último tiempo debido a sus múltiples aplicaciones, entre las que se pueden encontrar la fabricación de pantallas electrónicas flexibles, la mejora de las propiedades mecánicas de papel y materiales de envasado, la formación de compuestos con resistencia a la compresión y al impacto, la estabilización de emulsiones y la formación de geles con elevada capacidad de retención de agua, el empleo en dispositivos biomédicos por su compatibilidad y resistencia, entre otras aplicaciones (Malho, 2015). En particular las nanofibras y los nanocristales pueden ser utilizados para modificar las propiedades mecánicas de películas (Perumal *et al.*, 2019). Las nanofibras de celulosa son nanopartículas de elevada relación de aspecto (largo/diámetro), se caracterizan por elevado módulo elástico cercano a 140 GPa y por su resistencia a la tracción, que es de aproximadamente 1 GPa (Eichhorn *et al.*, 2010). Los nanocristales poseen una gran resistencia a la tracción (7,7 GPa, según la determinación teórica) y pueden ser utilizados para reforzar compuestos, disminuir la permeabilidad de ciertos sistemas (Fortunati *et al.*, 2014) y formar cristales líquidos cuando se dispersan en agua, entre otras aplicaciones. González *et al.* (2019b) usaron nanofibras de celulosa de cáscara de soja para mejorar el módulo de películas biodegradables hechas con aislado de proteína de soja. Encontraron que al incorporar las fibras al 40% en peso, el módulo creció 8 veces y la resistencia a la tracción lo hizo 4 veces. Se han publicado trabajos en los se obtienen nanofibras a partir de cáscaras de arroz, en general se buscan fuentes residuales para poder incrementar su valor. Kalita *et al.* (2015) obtuvieron fibras a partir de cáscaras de arroz de dos variedades, una de otoño y otra de verano. Luego de un proceso que involucró la limpieza con una solución alcalina de NaOH, un intenso tratamiento con vapor durante 8 horas repetido dos veces y un tratamiento de blanqueo con NaOH, ácido acético e hipoclorito de sodio, se obtuvieron las

nanofibras. La moda poblacional de la variedad estival tuvo un diámetro ligeramente superior (40-50 nm) al de las fibras obtenidas de la variedad de otoño (30-40 nm). Johar *et al.* (2012) señalaron que el tratamiento de blanqueo reduce el tamaño de las fibras debido a que se elimina lignina y hemicelulosas que actúan como material adhesivo entre las fibras. Las fibras obtenidas de cáscara de arroz disminuyeron su diámetro de 170 a 7 μm debido al blanqueo y luego fueron convertidas en nanocristales mediante una hidrólisis ácida. Las cáscaras de arroz son un subproducto muy abundante y las nanofibras obtenidas a partir de esta fuente son un posible refuerzo para las películas de levadura. Kargarzadeh *et al.* (2017) utilizaron nanocristales y fibras de celulosa para reforzar películas de almidón. El módulo elástico de las películas se incrementó de 12 MPa a más de 40 MPa con la incorporación de 6% de nanocristales, mientras que las fibras (7 μm de diámetro) no produjeron un cambio de gran magnitud en el módulo. La deformación a ruptura se mantuvo en la muestra con nanocristales, mientras que, en las películas reforzadas con fibras, la deformación cayó. Este último resultado puede deberse a una insuficiente interacción matriz – refuerzo, dado que por las características de uno y otro se descarta que exista incompatibilidad, podrían mejorarse si se utilizan fibras de menor tamaño de diámetro, aumentando la relación de aspecto. Por otra parte, Montoya *et al.* (2018) utilizaron nanocelulosa de origen bacteriano para reforzar películas de almidón termoplástico, la solución se preparó con almidón al 4% p/p y celulosa bacteriana al 7,5% p/p. Las películas estaban destinadas a almacenar piezas de mango. Mientras que la resistencia a la tracción aumentó al doble, el módulo elástico se incrementó más de diez veces luego de 5 días de almacenamiento a 5 °C y 75% de HR. Después de 10 días de almacenamiento, el esfuerzo fue similar entre las películas modificadas con nanocelulosa y las no modificadas, mientras que el módulo de las películas modificadas con nanocelulosa si bien disminuyó, siguió siendo varias veces superior al de las películas sin modificar. Por otra parte, tanto en las películas de proteína de soja como en las de almidón, la incorporación de nanofibras perjudicó a la deformación.

1.6 Materiales y envases activos

1.6.1 Introducción a los envases activos

Los envases pueden intervenir en el desarrollo microbiano, inhibiendo a los microorganismos patógenos, controlando el crecimiento de la flora alterante o bien, evitando reacciones de deterioro que disminuyen la calidad iniciadas o promovidas por agentes físicos y químicos, secuestrando metales, entre otras cosas (Realini y Marcos, 2014). De esta manera el envase tiene un rol activo en la preservación de la vida útil del alimento y deja el rol pasivo de ser sólo un contenedor. Los envases activos pueden ser emisores o absorbedores de sustancias. El reglamento de la Comisión Europea 450 (UE, 2009) define a los materiales activos como aquellos que están “destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado del alimento envasado”. Luego afirma que “están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán sustancias en el alimento envasado o en su entorno o absorberán sustancias del alimento o de su entorno”. En el ámbito de la producción alimentaria los materiales absorbedores generalmente están preparados para capturar oxígeno, etileno o dióxido de carbono. Los capturadores de oxígeno están basados en la utilización de sales de hierro, enzimas o ácido ascórbico y son frecuentes comercialmente en las tapas de botellas de cerveza y vino, donde el oxígeno puede promover reacciones de oxidación que pueden alterar el sabor de las bebidas. Los capturadores de etileno se utilizan para prolongar la vida útil de frutas climatéricas dado que el etileno es la hormona de maduración. La tecnología de atrapamiento consiste en utilizar sales de permanganato de potasio (KMnO_4) o paladio, o las más modernas estructuras metal-orgánicas. En el caso del agua, comercialmente se utilizan absorbedores que consisten en almohadillas con poliacrilato de sodio, aunque también existen otras tecnologías que involucran el uso de celulosa. Para los productos cárnicos existen emisores de CO_2 con ácidos y bases, que se activan al recibir el agua por goteo del músculo. El CO_2 emitido actúa descendiendo el pH del músculo y modificando la composición de la atmósfera en contacto con el producto, lo que controla el crecimiento de microorganismos. (Mihindukulasuriya y Lim, 2014).

En los desarrollos de películas y recubrimientos, es frecuente encontrar que se incluyen compuestos antioxidantes y antimicrobianos, dado que la oxidación

y la alteración microbiana son las principales causas de deterioro de los alimentos.

Los envases activos antimicrobianos surgieron como una alternativa para controlar el crecimiento de microorganismos alterantes e inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos en la superficie de los productos, a través de distintos mecanismos. De acuerdo con White *et al.* (2002), un grupo reducido de patógenos son los responsables de las intoxicaciones por ingestión de alimentos contaminados que llevan a la muerte. Los microorganismos patógenos principales son *Salmonella* (34%), *Listeria* (28%), *Toxoplasma* (21%), virus varios (7%), *Campylobacter* (5%), y *Escherichia coli* O157:H7 (3%). El restante 5% se encuentra distribuido entre distintos microorganismos como *Yersinia pestis*, *Vibrio* sp., *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes*, y *Staphylococcus aureus*. Una tendencia actual es el desarrollo de envases antimicrobianos para la industria alimentaria a través de la incorporación de sustancias de origen natural que puedan ser activas contra el amplio espectro de microorganismos. Se prefiere en el caso de utilizar aditivos, que sean aquellos identificados como GRAS (por las siglas en inglés *generally recognized as safe*). De esta manera, se busca reemplazar ciertos aditivos presentes en la formulación de envases, como el caso de algunos antimicrobianos/antioxidantes de origen sintético (Ramos *et al.*, 2012).

La forma más eficaz de evitar la rancidez oxidativa de los alimentos es removiendo el oxígeno presente en el espacio de cabecera y evitando el ingreso de nuevo oxígeno desde la atmósfera externa. Industrialmente, es relativamente caro y difícil llegar a atmósferas modificadas que contengan menos del 1% de oxígeno. Por otra parte, los materiales de envase de aceites y grasas son seleccionados entre un compromiso de precio y calidad de barrera al oxígeno. El vidrio es una excelente barrera, pero su precio es más elevado que el de polímeros sintéticos como el policloruro de vinilo o el polietileno tereftalato. Para evitar la oxidación de los lípidos existe otra estrategia, que es el uso de compuestos antioxidantes. Los antioxidantes son compuestos capaces de inhibir las reacciones de oxidación, a través de dos vías posibles. Una de ellas es a través de la transferencia de electrones, estabilizando e inhibiendo a los propagadores de la reacción, los radicales libres, especialmente los peróxidos y alcóxidos. La otra vía posible es la descomposición de los radicales, evitando

que puedan involucrarse en la propagación del conjunto de reacciones de oxidación. Los donantes de electrones más activos son los polifenoles, más efectivos que los galatos, el ácido nordihidroguaiaarético y los flavonoides. Las aminas aromáticas también inhiben a través de la transferencia de electrones. Las quinonas son inhibidores por recepción de electrones, compiten con el oxígeno por la reacción con los radicales alquilo. Dado que a presiones atmosféricas la reacción entre el oxígeno y los radicales alquilo es extremadamente rápida, las quinonas sólo son eficaces como antioxidantes a presiones parciales muy bajas, donde la velocidad de reacción es inferior (Pokorny *et al.* 2001).

Los compuestos azufrados como el ácido tiodipropiónico, la metionina y los tioéteres son capaces de descomponer a los radicales libres y evitan que estén disponibles para las reacciones de oxidación. También se considera dentro de esta vía a todos los compuestos que son capaces de atrapar iones metálicos que favorecen la aparición de radicales libres.

Los aceites esenciales son responsables del aroma y el sabor característico de las especias y hierbas. Varios de ellos, como los de canela, clavo de olor, cilantro, ajo, nuez moscada, orégano, perejil, romero, salvia, mostraron ser inhibidores de diversas bacterias y mohos debido a que están compuestos en su mayoría de sustancias fenólicas (Burt, 2004). La característica lipofílica común de los compuestos de los aceites esenciales hace posible su penetración en la membrana plasmática (Hill *et al.*, 2013), generando rupturas por donde se fuga el material citoplasmático, lo que produce la muerte celular. Diferentes aceites esenciales fueron incorporados y probados en matrices biodegradables obteniendo resultados positivos en la inhibición de bacterias y hongos. Por ejemplo, el aceite esencial de orégano fue introducido en películas producidas con proteínas de leche (Oussalah *et al.*, 2004), así como el aceite esencial de ajo en películas a base de aislados de proteínas de trigo (Seydim *et al.*, 2006). Los compuestos que integran los aceites esenciales, especialmente los polifenoles son antioxidantes, como fue explicado, por su capacidad de brindar un electrón para estabilizar a los radicales libres. La actividad antioxidante de los aceites esenciales y sus compuestos fue probada para diferentes sustratos. Tsimidou *et al.* (1995) comprobaron que el empleo de 1% de hojas de orégano tenía la misma efectividad que 200 ppm de butilhidroxianisol (BHA) para prevenir

la oxidación de aceite de caballa. En películas, también es frecuente encontrar desarrollos orientados a la capacidad antioxidante. Recientemente, Talón *et al.* (2019) han publicado un trabajo donde incorporaron eugenol encapsulado a películas de almidón de maíz. La encapsulación del eugenol trajo un efecto positivo en la capacidad antioxidante, las películas con el eugenol encapsulado tuvieron mayor actividad antioxidante que las películas con el compuesto libre. La capacidad antioxidante fue cuantificada a través de la reacción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y la determinación del EC50, la concentración de antioxidante necesaria para reducir 50% de la cantidad inicial de DPPH. Los autores propusieron la aplicación de las películas como contenedores de aceite de girasol. En otra investigación, Afonso *et al.* (2019) probaron la capacidad antioxidante de películas de quitosano reacetilado con polvo de semillas de annato, utilizando el método ORAC (capacidad de captura de radicales de oxígeno, por sus siglas en inglés). De acuerdo a los resultados, los autores propusieron que las películas preparadas con capacidad antioxidante podrían ser utilizadas en aplicaciones cosméticas.

1.6.2 Diseño y mecanismos de acción de los envases antioxidantes

Gómez - Estaca *et al.* (2014) realizaron una extensa revisión de los desarrollos en envases antioxidantes donde se puede ver que las formas de entrega de antioxidantes de mayor difusión comercial tienen el activo en forma separada del envase, ya sea en forma de gel, pad, pintura superficial o sachet que se adhiere al mismo. Estas formas de entrega del activo se denominan “dispositivos independientes”. Cuando el activo se incorpora al material para obtener un “material antioxidante”, es necesario franquear varios obstáculos hasta lograr la aplicación apropiada. Para la utilización a escala de los materiales antioxidantes los compuestos activos deben ser incorporados junto con los polímeros que forman la matriz en el proceso de producción y generalmente, las temperaturas utilizadas para procesar el polímero afectan y degradan al compuesto antioxidante. Esto implica una limitación para el procesamiento y producción de envases a partir del material antioxidante. Por otra parte, la liberación del antioxidante debe ser sostenida en el tiempo y no explosiva. Los antioxidantes incorporados al material deben cumplir las mismas regulaciones que los aditivos de los alimentos, especialmente en los límites máximos de concentración. La

liberación del antioxidante se puede entender como un proceso de transporte y un equilibrio de concentraciones entre un mínimo de dos fases que componen al sistema, el material del envase y el medio al que se libera, que es el alimento. El activo se reparte entre las fases de acuerdo a la afinidad por una u otra. Si los antioxidantes son volátiles, se incorpora una tercera fase que es el ambiente y también puede existir una fase adicional si existe un espacio de cabecera entre el alimento y el envase. También puede ocurrir que el activo sólo se encuentre a nivel de superficie a manera de recubrimiento y que el resto de la matriz del envase no contenga el antioxidante. La relación de concentraciones dada por el coeficiente de reparto entre las fases es importante para el éxito en la liberación del activo. Si fuera necesaria una gran liberación del activo, el coeficiente de reparto entre el recubrimiento que posee el activo y el alimento debe ser bajo. Si solo el recubrimiento contiene activo y el resto de la película no lo contiene, el coeficiente de reparto entre el recubrimiento y la matriz debe tener un valor alto, porque si no fuera así, la matriz de la película podría retenerlo excesivamente, dificultando su liberación. En el caso de que exista un espacio de cabecera entre el alimento y el envase y el activo sea volátil, un bajo coeficiente de solubilidad mantiene una alta concentración del activo en la fase gaseosa.

1.6.3 Timol, compuesto de múltiples aplicaciones

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un compuesto fenólico que se halla en los aceites esenciales de plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae* (géneros *Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* y *Monarda*), familia a la que pertenecen el orégano y el tomillo (Marchese *et al.*, 2016). Es un compuesto hidrofóbico, soluble en alcohol y poco soluble en agua y otros solventes polares. Se puede separar por destilación fraccionada a partir del aceite esencial de las hojas de las plantas, aunque existe también un procedimiento industrial patentado por la empresa Bayer donde puede obtenerse timol por reacción a partir de *m*-cresol y propileno en un reactor tubular a presión que contiene alúmina activada (Mukhopadhyay, 2004). El timol tiene diferentes aplicaciones en las industrias alimentaria, de saborizantes y perfumes debido a su aroma y sabor. Además de sus características aromáticas se ha demostrado la actividad antimicrobiana del timol en diferentes especies de géneros de bacterias Gram-positivas como *Micrococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus* (particularmente la especie *aureus*),

Bacillus (especies *licheniformis* y *thuringiensis*), y *Listeria* (especie *innocua*) así como en especies de diferentes géneros de bacterias Gram-negativas, *Escherichia (coli)*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Salmonella*, *Serratia* y *Yersinia*. El efecto inhibitorio varió según la sensibilidad del microorganismo (Marchese *et al.*, 2016). Del mismo modo, Abbaszadeh *et al.* (2014) publicaron resultados de la aplicación del timol como una alternativa natural para controlar el crecimiento de hongos en alimentos en lugar de implementar fungicidas sintéticos.

Otras investigaciones probaron la capacidad del timol como efecto repelente de mosquitos, en particular Park *et al.* (2005) publicaron el efecto sobre *Culex pipiens pallens* y en el caso de Zahran y Abdelgaleil (2011) ampliaron el estudio a las larvas de esta especie. Se ha demostrado también efecto insecticida y actividad genotóxica en la mosca común *Drosophila melanogaster* (Karpouhtsis *et al.* 1998) una de las plagas más frecuentes en la industria alimentaria. Por otra parte, el timol tiene capacidad antioxidante, esta capacidad está relacionada a su estructura, se sabe que los monoterpenos con grupos –OH adyacentes presentan actividad y la ubicación de ese grupo donante de hidrógeno es fundamental (Cai *et al.*, 2004). Según informó Embuscado (2015) en una revisión de los antioxidantes naturales, el aceite esencial de tomillo es el segundo de mayor poder inhibitorio en la reacción del DPPH. El aceite esencial de tomillo contiene además de timol, varios compuestos que pueden tener actividad antioxidante: carvacrol, p-cumeno-2,3-diol, ácidos fenólicos como gálico, cafeico y rosmarínico, diterpenos fenólicos y flavonoides.

La aplicación de este tipo de compuestos es limitada en productos terapéuticos debido a la baja solubilidad en agua, lo que limita su entrega a las células. Debido a esto la capacidad antioxidante debería ser enfocada primariamente a la protección de alimentos susceptibles de oxidación que puedan ver alteradas sus características organolépticas y disminuida, luego, su vida útil.

El timol y otros componentes naturales de los aceites esenciales han sido registrados por la Comisión Europea para su uso como saborizantes en alimentos ya que son inofensivos para la salud del consumidor (Marchese *et al.*, 2016). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha clasificado a estos compuestos como GRAS. En el Código Alimentario Argentino, el timol está catalogado como un aromatizante con olor pungente a

especies y no se ha establecido un límite máximo admitido. Hay una gran variedad de casos de su incorporación exitosa en varias películas biodegradables, y sus capacidades antimicrobianas y antioxidantes fueron comprobadas en las diferentes matrices. Se ha reportado la adición de timol en películas de ácido poliláctico (PLA) (Ramos *et al.*, 2014), en mezclas de quitosano y almidón (Pelissari *et al.*, 2009), en films de gelatina (Li *et al.*, 2018), en recubrimientos realizados con zeína (Del Nobile *et al.*, 2008), así como en otras matrices. La particularidad del timol es que, al ser poco afín al agua, puede ser incluido en materiales hidrofóbicos sin mayores problemas de compatibilidad.

En el trabajo de Ramos *et al.* (2014) la mejor combinación según los autores fue una mezcla de 2,5% de arcillas y 8% de timol respecto al peso de PLA. Esa mezcla consiguió más de 84% de inactivación del radical DPPH. Por otra parte, Davoodi *et al.* (2017) realizaron películas con un derivado de almidón (*hetastarch*) y timol, analizaron la capacidad antioxidante por el método del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y del DPPH, la actividad antimicrobiana (frente a *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*) y las propiedades mecánicas. Curiosamente encontraron que el timol actuaba como plastificante del almidón, disminuyendo la resistencia a la tracción y el módulo elástico e incrementando al doble la deformación a ruptura. Además, hallaron que la concentración mínima inhibitoria del timol atrapado en la película es el doble de la correspondiente al timol libre para la mayoría de las bacterias estudiadas.

1.6.4 Migración de compuestos antioxidantes

El proceso de migración es un fenómeno de transferencia de materia, al poner en contacto el envase que contiene el compuesto activo con un alimento o un simulante de él (en el cual la cantidad inicial de activo es cero) se genera un gradiente de concentraciones que rige el proceso de transferencia. Si el envase es un medio no poroso, el aditivo se moviliza a través de la película mediante difusión hasta llegar a la interfase con el alimento o simulante, en donde se solubilizan y finalmente difunden hacia su interior (Bhunia *et al.*, 2013), cumpliendo este mecanismo con la ley de Fick de transferencia de materia. Las resistencias existentes en el proceso de migración de un activo desde una película hacia el medio el alimento o simulante son tres: la resistencia propia del

material del envase, la existente en la interfase (relacionada con la solubilización de los activos en el simulante o alimento) y aquella proveniente de la solución (Arvanitoyannis y Kotsanopoulos, 2014). Si bien este modelo es útil para entender el fenómeno en forma global, en la realidad, algunos supuestos en los que está basado pueden no verificarse. Varios autores hicieron propuestas complementarias para explicar cómo sucede realmente la migración de sustancias. Mastromatteo *et al.* (2009) estudiaron la migración del timol en películas de almidón en contacto con una solución acuosa y propusieron que el fenómeno se desarrolla en varias etapas. La primera es la difusión del agua hacia la matriz polimérica, que ocasiona una relajación macromolecular y luego se produce la contradifusión del compuesto activo desde la red polimérica hinchada hacia el exterior. Por su parte, Ouattara *et al.* (2000) plantearon un modelo similar, en el cual el simulante ingresa primero a la matriz y disuelve el compuesto activo, permitiendo la posterior liberación del polímero, en este caso se trata de una situación no fickiana, ya que la transferencia de activo no depende exclusivamente de la diferencia de concentraciones. Esta secuencia transcurre hasta que la película se satura de simulante y no es posible extraer más cantidad de compuesto, observando una meseta (etapa de equilibrio) cuando se mide la concentración de la misma en la solución. Uno de los intereses en modelar los fenómenos de migración en procesos fickianos radica en poder conocer el coeficiente difusivo (D) parámetro que permite conocer la facilidad o no de liberación de los aditivos para que cumplan con la función propuesta y los requerimientos legales en el caso de un envase en contacto con alimentos.

El estudio de la liberación de compuestos activos a través de envases es fundamental para el desarrollo de los mismos, ya que determina si podrán ejercer o no su función de proteger al alimento de los agentes de deterioro. De esta manera, la liberación de los antioxidantes no debe ser más lenta que la propagación de los radicales. Los antioxidantes deben encontrarse en el medio a proteger para estabilizar a las especies reactivas y evitar que la reacción continúe propagándose. Las características del alimento o del simulante juegan un rol fundamental en la liberación de los antioxidantes (Cagri *et al.*, 2004). Las características de la película (polaridad, estado vítreo o gomoso, modo de obtención) y cómo interaccionan los activos con ésta también son muy importantes en la liberación (Bhunja *et al.*, 2013; Gemili *et al.*, 2010). Según como

se relacionen, será más o menos sencilla la liberación a través de la película. Adicionalmente, la volatilidad del compuesto y su tamaño molecular influyen de manera directa, ya que la difusión se verá favorecida cuanto mayor sea la tendencia a pasar a la fase gaseosa y cuanto menor sea su peso molecular.

1.7 Conclusión del capítulo I

La finalidad de este trabajo es demostrar la potencialidad de la biomasa celular de levadura para producir películas aptas para la industria con fines de envasado, recubrimiento y/o protección. La caracterización de las dispersiones y de las películas se planteó de manera amplia, para conocer el impacto de las variables de procesamiento sobre la formación de las películas y sus características finales, así como también la determinación de las principales características que hacen a la aplicación y la mejora de las mismas, interviniendo variables e incorporando aditivos. En la bibliografía no hay descripciones sobre el uso de la célula completa de levadura para producir películas, es decir tanto los componentes de su pared celular, como los del citoplasma. Se decidió estudiar esto en forma acabada para lograr el máximo aprovechamiento posible de los polímeros naturales (principalmente los polisacáridos y las proteínas). La determinación de la capacidad real de la biomasa para la producción de películas, con sus alcances y limitaciones, despojándose de cualquier sesgo voluntarista sobre las mismas es el ánimo de este trabajo, como único camino de aportar luz sobre este tema.

1.8 Objetivos de la tesis doctoral

Objetivo general

Obtener películas a base de biomasa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, optimizando las condiciones de obtención y evaluando sus propiedades físicas, de manera de identificar claramente su potencial y sus limitaciones para el empleo en envases y recubrimientos destinados a la industria de los alimentos, mejorando su vida útil y agregando valor a un subproducto de la industria alimentaria.

Objetivos específicos

- Estudiar variables de tratamientos (ruptura celular, pH, fracciones soluble e insoluble y tratamiento térmico) y su efecto sobre la capacidad de producir películas a partir de dispersiones de levadura.
- Evaluar las condiciones de transformación y obtención de películas por diferentes métodos a fin de otorgarles características adecuadas para su utilización en contacto con alimentos.
- Analizar la influencia de la composición, la cantidad de plastificante y el refuerzo con micro y nanopartículas de celulosa sobre la permeabilidad al vapor de agua, las propiedades mecánicas, térmicas y estructurales de las películas de levadura.
- Analizar la liberación de un antioxidante en la matriz de levadura para su posterior aplicación.

Hipótesis de trabajo

La biomasa de la levadura *S. cerevisiae* es una fuente posible de materiales biodegradables debido a su composición rica en proteínas y polisacáridos. Es posible valerse de los componentes celulares en forma integral utilizando tratamientos físicos adecuados para la formación de películas con propiedades y características adecuadas para la protección de alimentos.

Capítulo II: Materiales y métodos

2.1 Método de preparación de películas

2.1.1 Materiales utilizados

En este trabajo se utilizó levadura panadera comercial y levadura residual de una cervecería artesanal proveniente de un productor del Gran Buenos Aires. La descripción completa de las características de la levadura residual se encuentra detallada en el capítulo X, donde se describe la obtención de películas a partir de ésta. La levadura comercial panadera utilizada fue obtenida de CALSA AB-MAURI Argentina S.A. en sus presentaciones comerciales de 50 g y 500 g (bajo la marca Virgen).

El resto de los materiales utilizados se detalla en cada ensayo, la calidad de los mismos fue de grado analítico.

2.1.2 Estudio del efecto de la presión sobre la ruptura celular

Se utilizó levadura panadera comercial (500 g, 33 g/100 g de materia seca). La biomasa se dispersó en 2 litros de agua destilada y se lavó por centrifugación a 4 °C y 1.380 ×g (Centrífuga Beckman J2-MC, Beckman Coulter Inc., EUA) durante 20 minutos. Posteriormente, se preparó una primera dispersión de 10% peso/peso (p/p) en agua destilada, utilizando el sedimento de la centrifugación anterior y se sometió a una homogeneización continua bajo diferentes condiciones de presión de 40 a 125 MPa, durante 9 minutos en un homogeneizador a válvula (Panda 2K NS1001L, GEA Niro-Soavi, Italia). Para disminuir el incremento de la temperatura durante la homogeneización y la coagulación proteica dentro del equipo, el homogeneizado se enfrió entre los ciclos de homogeneización con un baño de agua con hielo. Una vez obtenidas las dispersiones, se realizó un tratamiento térmico durante 20 min en baño a 90 °C para producir la desnaturalización de proteínas. A través de calorimetría diferencial de barrido (ver sección 2.1.3) se determinaron las condiciones de temperatura para que el tratamiento térmico produjera la desnaturalización. Los resultados obtenidos se compararon con lo informado en una publicación previa (Otero *et al.*, 2002).

Las dispersiones tratadas en homogeneizador de alta presión se colocaron en tubos de centrífuga de 15 ml. Dado que las proteínas de levadura al ser desnaturalizadas pueden formar coágulos que retienen físicamente agua, la formación de coágulos puede estar directamente relacionada con la liberación de proteínas y su cantidad, por lo que se analizó el volumen de coágulos formados. Se repitió la experiencia por triplicado.

Las dispersiones fueron observadas con un microscopio óptico digital (400×, PentaView, Celestron) antes de ser tratadas térmicamente. Se utilizó una leve tinción con azul de metileno para facilitar la visualización del campo al microscopio.

2.1.3 Calorimetría diferencial de barrido de las dispersiones sometidas a homogeneización

Para analizar el grado de desnaturalización de las proteínas producido por el tratamiento de homogeneización, se colocaron 5 – 10 µl de dispersión, tratadas a 40, 50, 75, 100 y 125 MPa, así como una dispersión sin tratar en cápsulas herméticas Tzero de aluminio (cápsulas de TA Instruments de inercia térmica reducida y gran superficie de contacto calorímetro – base de cápsula). Con un calorímetro de barrido diferencial (TA Instruments Q200, Delaware, EE.UU.) se equilibró la temperatura a -10 °C (se evitó la congelación que sucede habitualmente a -20 °C) y se realizó un barrido de temperatura a 10 °C min⁻¹, hasta 100 °C. Se analizaron los eventos térmicos encontrados en el flujo de calor con respecto a la temperatura utilizando el programa Universal Analysis (v4.5, TA Instruments, EE.UU.). La temperatura y la constante de celda del DSC se calibraron utilizando indio como patrón de referencia (Patrón TA Instruments F08S001). Se informó la temperatura de centro de pico trazando la línea de base sobre las endotermas.

2.1.4 Evaluación de la combinación de diferentes tratamientos sobre dispersiones de levadura

Las dispersiones al 10% p/p se sometieron a diferentes tratamientos que combinaron la homogeneización y el tratamiento térmico a 90 °C en un baño de agua durante veinte minutos. La condición de presión de homogeneización seleccionada fue 125 MPa, de acuerdo con los resultados obtenidos en los

ensayos indicados en la sección anterior. Los diferentes procedimientos se combinaron haciendo un tratamiento antes del otro como se describe a continuación:

Sin tratamiento, células enteras (E); sólo tratamiento térmico (T); sólo homogeneizado a 125 MPa (H); homogeneizado a 125 MPa seguido de tratamiento térmico (HT); tratamiento térmico seguido de homogeneización a 125 MPa (TH) y homogeneizado a 125 MPa seguido de tratamiento térmico y una segunda homogeneización (HTH).

2.1.5 Determinación de la distribución de tamaños de partículas en las dispersiones de levadura

La distribución del tamaño de partícula (PSD) de las dispersiones obtenidas por ruptura a diferentes presiones y de las realizadas por combinación de tratamientos se analizó mediante difracción láser estática utilizando el equipo Malvern Mastersizer® 2000M (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) en el rango de 0,1 – 1.000 μm . El volumen utilizado para las mediciones fue de 0,2 ml de dispersión o el equivalente para lograr una oscurecimiento en el rango 10-20% en 600 ml de agua con agitación a 2.000 rpm (Hydro Pump 2000MU, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) a temperatura ambiente. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los resultados se informaron como frecuencia en volumen y en número ($\times 100$). Los parámetros ópticos aplicados fueron: índice de refracción relativo de partículas dispersas y agua, 1,52 y 1,33, respectivamente y el coeficiente de absorción: 0,1. Para garantizar la representatividad de la distribución adquirida respecto de la distribución real de las partículas, se verificó que el parámetro residual del modelo de Mie (que se utilizó para obtener la distribución de tamaños de partículas) estuviera siempre por debajo del 1% con todos los parámetros proporcionados (índices de refracción y coeficiente de absorción). Dado que el índice de refracción de la pared celular es diferente al del material citoplasmático, se eligió utilizar un índice de refracción para la pared celular que permite la determinación del tamaño de la célula de manera rápida. Chaudhari *et al.* (2012) utilizó como índice de refracción 1,53 para la célula de levadura y tuvo buenos resultados.

2.1.6 Preparación de películas de levadura con las dispersiones tratadas

Las películas basadas en biomasa de levadura se realizaron mediante el método de evaporación de solvente o dispersante (*casting*) utilizando las dispersiones preparadas con las combinaciones de tratamientos. Se retiró el aire de cada dispersión preparada con una bomba de vacío y se vertieron 20 g de cada dispersión acuosa en placas de Petri de plástico de 90 mm de diámetro. La evaporación del agua se realizó a 40 °C en un horno con circulación forzada de aire (Sanyo MOV 212F, Japón) hasta que el contenido de agua remanente de las películas fue de 10-15% después de 12 horas. El contenido de agua remanente fue determinado por pesaje antes y después del secado de las placas. Con este contenido de agua, las películas fueron fácilmente despegadas de las placas.

2.1.7 Evaluación de la calidad de las películas obtenidas

La calidad de las películas obtenidas se evaluó utilizando el método propuesto por Gontard *et al.* (1991) y modificado por De Moraes *et al.* (2013). Los aspectos de calidad considerados para la evaluación fueron la manipulabilidad, la homogeneidad y la continuidad en forma macroscópica (por evaluación visual). En el aspecto “manipulabilidad” se evaluó si la película se puede manipular sin romperse, el aspecto “continuidad” se determinó según la ausencia o presencia de roturas en la película y la “uniformidad” se analizó de acuerdo a la homogeneidad o no de la película. Esta evaluación se llevó a cabo sobre cinco ejemplares independientes.

2.1.8 Cinética de sorción de agua en las películas

Los experimentos de cinética de sorción de vapor de agua se realizaron a 24 °C con muestras de película completamente secas (deshidratadas previamente por sílica gel). Las muestras se colocaron en contenedores de sorción a 90% HR a través de una solución saturada de BaCl₂. Las muestras se retiraron a intervalos específicos de tiempo y se pesaron para la recopilación de datos. El contenido de agua h en función del tiempo t se ajustó con un modelo de cinética de primer orden (ecuación 2.1), utilizando una función biexponencial que tiene en cuenta dos procesos de sorción de agua (Salvay *et al.*, 2003):

Ecuación 2.1:
$$h(t) = h_0 + A_1 \left[1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_1} \right) \right] + A_2 \left[1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_2} \right) \right]$$

donde h_0 es el contenido inicial de agua, A_1 y A_2 son constantes que muestran la contribución relativa de cada proceso, y τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo para la sorción de agua de los procesos 1 y 2, respectivamente. El modelo biexponencial fue propuesto originalmente para la transición entre dos especies conformacionales con más de un subestado conformacional de ocurrencia simultánea. La ecuación es válida para cualquier ligante, siendo en este caso el agua.

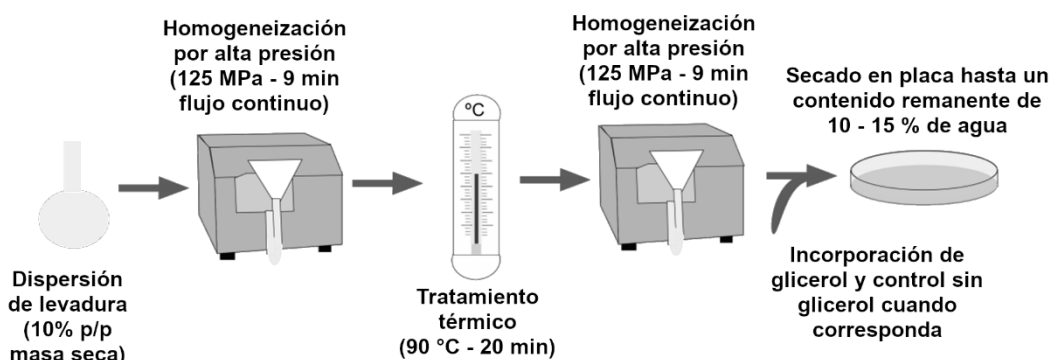
Para el ajuste de la función biexponencial se utilizó el programa SciDAVis (v1.13), a través del método de cuadrados mínimos.

2.2 Efecto del plastificante en las características de las películas

2.2.1 Preparación de las películas plastificadas

Como se describió anteriormente, se preparó una dispersión de 10% p/p de levadura de panadería comercial prensada, utilizando agua destilada. Antes del uso y al igual que en la descripción previa, las células de levadura se limpiaron dispersándolas en agua destilada y centrifugando a $1.380 \times g$. El sobrenadante se descartó y se utilizaron las células sedimentadas para preparar la dispersión inicial.

Figura 2.1 Proceso de producción de una película de levadura realizada por el método HTH (homogeneización, tratamiento térmico, homogeneización)



La dispersión al 10% p/p se sometió al tratamiento HTH elegido. El pH final de las dispersiones estuvo en el rango de $5,7 \pm 0,1$. De acuerdo a la revisión de bibliografía consultada, se seleccionó como plastificante glicerol y se añadió a las dispersiones en tres concentraciones diferentes, 10, 20 y 30% p/p de materia seca (m.s.) (HTH-10Gli, HTH-20Gli y HTH-30Gli, respectivamente). Se prepararon dispersiones sin glicerol como control (HTH-0Gli). Se volcaron 5, 10 y 20 gramos de cada dispersión en placas de Petri de polipropileno (90 mm de diámetro) para obtener espesores de aproximadamente 7, 15 y $30 \cdot 10^{-5}$ m. La evaporación del agua se realizó a 40 °C en un horno con circulación forzada de aire, hasta que el contenido de agua restante de las películas estuvo entre 10 y 15%. En la figura 2.1, se puede ver un diagrama simplificado del proceso de obtención de la película. Las muestras obtenidas se almacenaron a una humedad relativa del 43% (HR) u otras condiciones especificadas en cada estudio.

2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido de temperatura modulada (MDSC)

Para comprender el comportamiento térmico de las películas preparadas a partir de las dispersiones HTH y cómo se vieron afectadas por la presencia de glicerol, se acondicionaron muestras con diferentes porcentajes de plastificante a 21 °C y 0% HR (ambiente), utilizando sílica-gel hasta alcanzar el equilibrio (7 días), en desecadores debidamente preparados para tal fin. Se estudiaron los eventos térmicos relevantes en las películas de levadura secas y el efecto del plastificante sobre ellos.

Aproximadamente 5 a 10 mg de muestra se colocaron en cápsulas de aluminio Tzero (cápsulas de TA Instruments de inercia térmica reducida y gran superficie de contacto calorímetro – base de cápsula) y se sellaron con tapas herméticamente. Los estudios se realizaron utilizando un calorímetro de barrido diferencial con modulación de temperatura (TA Instruments Q200, Delaware, EE. UU.). El rango de temperaturas estudiado fue de -80 °C a 150 °C con una etapa de equilibrio previo a -80 °C durante 5 minutos, y luego la temperatura se incrementó a una velocidad de 10 °C min^{-1} con $\pm 1 \text{ °C}$ de amplitud de modulación y 40 segundos de período de tiempo. Los termogramas se analizaron a partir de su flujo de calor total, reversible y no reversible. Los análisis se realizaron por triplicado. Las temperaturas de las transiciones vítreas se determinaron en el

flujo de calor reversible utilizando el software TA Universal Analysis (v4.5, TA Instruments, EE. UU.) en el punto medio (*mid point*) de la transición. Por otro lado, las temperaturas de pico de los eventos endotérmicos se determinaron por integración en la señal de flujo de calor no reversible, trazando una línea de base de inicio a fin sobre el evento y tomando el punto medio de las mismas.

2.2.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

El estudio de la degradación térmica de las muestras se llevó a cabo utilizando una termobalanza Q-500 (TA Instruments, Delaware, EE. UU.). Se registró la pérdida de peso de las películas en función de la temperatura. Se pesaron y analizaron aproximadamente 10 a 15 mg de muestra, calentando a una velocidad de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ en atmósfera de nitrógeno (caudales: 40 ml min^{-1} de balance y 60 ml min^{-1} en muestra), desde $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $600\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de las curvas TGA, se calcularon las temperaturas iniciales de degradación (T_{90}), es decir, las temperaturas a las que se alcanzó 10% de pérdida de peso con respecto al valor inicial. La velocidad de degradación máxima y la temperatura de cada zona de degradación (T_{pico}) se obtuvieron de la derivada del peso con respecto a la temperatura. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Además, se analizó una muestra de glicerol (grado analítico, Carlo Erba, Italia) bajo el mismo procedimiento, con el objetivo de conocer los eventos relevantes de descomposición térmica de este compuesto y relacionarlos con el comportamiento de las películas plastificadas.

Para estudiar la evolución en la degradación térmica de las películas, se obtuvieron residuos de muestras sin plastificante a diferentes temperaturas. Se pesaron aproximadamente 30 mg de muestra y se sometieron a calentamiento a razón de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ desde $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta diferentes temperaturas finales: 120, 150, 180, 200, 225, 250 y $275\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó un equilibrio de 1 min al alcanzar cada temperatura. Estos residuos se analizaron por espectroscopia infrarroja (ATR-FTIR) y previo al análisis se realizó una molienda en mortero del residuo obtenido.

2.2.4 Análisis de las películas y residuos por espectroscopía en infrarrojo (ATR-FTIR)

Los espectros infrarrojos de las películas y de los residuos descritos en la sección 2.2.3 se registraron en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} en un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) Shimadzu IR-Affinity (Shimadzu Co., Japón) equipado con un módulo de reflectancia total atenuada (GladiATR, Pike Technologies, USA). Los espectros de IR se midieron como un promedio de 45 barridos, una resolución de 4.0 cm^{-1} y el algoritmo de apodización Happ-Genzel. En las mediciones se introdujo la corrección por ATR y un suavizado (*smoothing*) de 5 puntos.

2.2.5 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial de películas con plastificante

Las pruebas de tracción uniaxial se realizaron en una máquina universal de ensayos mecánicos, Megatest® TC-500 II (Micrometric SRL, Buenos Aires, Argentina). Las películas se cortaron en tiras de 50 mm de largo por 10 mm de ancho con una cuchilla de acero inoxidable. Se colocaron en la máquina de ensayos con un espacio entre mordazas de 25 mm (las dimensiones utilizadas en las probetas no corresponden a una norma, sino que fueron una adaptación).

La temperatura se controló a 24 °C y las muestras de películas de HTH con diferentes cantidades de plastificante (10, 20 y 30% p/p m.s.) se acondicionaron a 53% HR (ambiente) a través de una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Las muestras sin plastificante no se analizaron debido a su fragilidad. Se utilizaron las muestras preparadas con 20 g y el espesor promedio de las muestras fue de $0,30 \pm 0,03$ mm, como resultado de 6 mediciones independientes en cada muestra, realizadas con un micrómetro digital (3109-25A, Insize, China). La velocidad seleccionada para realizar las pruebas fue de 5 mm min^{-1} y se analizaron al menos diez muestras de cada composición. La deformación a ruptura (%), el módulo elástico (calculado en la región lineal inicial) y la resistencia a la tracción (el valor máximo de fuerza sobre área alcanzado) se determinaron de acuerdo a la guía de la norma ASTM D882.

2.2.6 Caracterización microestructural mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

El equipo utilizado fue un microscopio electrónico de barrido SEM LEO EVO 40-XVP (Carl Zeiss AG, Alemania). Para una mejor visualización bajo el microscopio, las muestras se recubrieron con una fina capa de oro. Las

ampliaciones utilizadas fueron 500, 1000 y 3000× con un potencial de 5 kV. La presión absoluta durante el estudio fue de 80 Pa (condiciones de alto vacío). Las imágenes fueron adquiridas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica (INTI – Parque Miguelete).

2.3 Estudio de la hidratación y la permeabilidad al vapor de agua de las películas con plastificante

2.3.1 Películas utilizadas para los ensayos

Se utilizaron las películas preparadas con glicerol a diferentes concentraciones 0, 10, 20 y 30% p/p m.s. En este caso se colocaron volúmenes de 5, 10 y 20 g de dispersiones de HTH en placas de Petri de $8,6 \times 10^{-2}$ m de diámetro, a fin de obtener películas de espesores cercanos a $7, 15$ y 30×10^{-5} m, respectivamente. Las películas se obtuvieron por el método de casting siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en la sección 2.2.1.

2.3.2 Isotermas de sorción de agua: influencia del glicerol

Las isotermas de sorción de agua permiten estudiar la absorción de agua en equilibrio en función de HR o la actividad del agua ($a_w = \% \text{ HR}/100$) del medio ambiente. Las isotermas de sorción de las películas se determinaron gravimétricamente según un procedimiento estándar (Bertuzzi *et al.*, 2007). Se utilizaron siete contenedores de 1,5 L, cada uno de los cuales contenía una solución saturada de sales de LiCl, MgCl₂, K₂CO₃, NaBr, NaCl, KCl y BaCl₂, para generar un a_w de 0,11; 0,33; 0,43; 0,57; 0,75; 0,84 y 0,90; respectivamente (Spiess y Wolf, 1983). La atmósfera de aproximadamente 0% HR se generó utilizando sílica-gel. Se colocaron películas de 58 cm² y $30 \cdot 10^{-5}$ m de espesor en desecadores que contenían las soluciones saturadas o la sílica-gel. El pesado de las muestras se realizó utilizando una balanza analítica ($\pm 10^{-4}$ g). El contenido de agua o hidratación intrínseca h (g de agua por g de masa seca) se obtuvo en función de la diferencia entre el peso de la película hidratada a cada tiempo y el de la película completamente seca. Las pruebas de sorción se realizaron por duplicado en cada HR. Los experimentos se realizaron a 24 °C.

Las isotermas se ajustaron utilizando el modelo Guggenheim-Anderson-De Boer (GAB) (Guggenheim, 1966) a través de la ecuación 2.2:

Ecuación 2.2:

$$h(a_w) = \frac{N \cdot c \cdot k \cdot a_w}{[(1 + (c - 1)k \cdot a_w)(1 - k \cdot a_w)]}$$

donde N es el contenido de agua en la monocapa (g de agua por g de masa seca), es decir, la capa de agua en contacto directo con los polímeros de la biomasa y su valor está relacionado con la cantidad de sitios disponibles para la unión primaria de las moléculas de agua. Por otra parte, c es un parámetro relacionado con el calor de sorción de la monocapa, que también puede interpretarse como la fuerza de fijación del agua a la misma. Finalmente, k es un factor relacionado con el calor de sorción de la multicapa (Eim *et al.*, 2011) y representa la capacidad del agua para unirse a ésta (Salvay *et al.*, 2003).

2.3.3 Densidad de las películas

Para la determinación de la densidad de las películas, se secaron muestras con $5,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ de área circular a 0% HR en desecadores que contenían sílica-gel hasta lograr un peso constante, proceso que tomó alrededor de 7 días. Las películas se pesaron utilizando una balanza analítica ($\pm 10^{-4} \text{ g}$). El espesor se midió con un micrómetro digital ($\pm 10^{-6} \text{ m}$) en diez lugares diferentes de la película, obteniendo para cada muestra un valor promedio con un error inferior al 5%. La densidad de las películas se calculó a través de la ecuación 2.3.

Ecuación 2.3:

$$\rho_{m.s.} = \frac{m}{A \cdot L}$$

donde $\rho_{m.s.}$ es la densidad de la película seca (g m^{-3}), m la masa seca (g), A el área (m^2) y L el espesor (m).

2.3.4 Cinética de sorción de agua: influencia del glicerol

Las películas con diferente contenido de glicerol y espesor, secadas previamente con sílica-gel, se colocaron en placas de Petri y se ubicaron en un recipiente de sorción a 90% HR, que se generó utilizando una solución saturada de BaCl_2 . Se utilizó un ventilador para mantener condiciones uniformes dentro de los desecadores siguiendo las recomendaciones de otros autores (McHugh *et al.*, 1993). Las muestras se retiraron a intervalos específicos de tiempo y se ponderaron para la recopilación de datos. El pesaje de las muestras se realizó utilizando una balanza analítica ($\pm 10^{-4} \text{ g}$). El contenido de agua h , dado en

unidades de g de agua por g de masa seca se evaluó en función del tiempo t , tomando la diferencia entre la masa de la película hidratada y la de la película seca. Se realizaron tres réplicas de cada película. Los experimentos se llevaron a cabo a 24 °C.

El contenido de agua en función del tiempo, $h(t)$, se ajustó en este caso con la solución de la ecuación diferencial de transporte de materia de Fick, en forma de serie de Fourier, para la difusión unidimensional de agua en una placa plana con concentración promedio uniforme como describió Crank (1975) (ecuación 2.4):

Ecuación 2.4:
$$h(t) = h_{\infty} \left\{ 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp \left[-D_w^{eff} (2n+1)^2 \frac{\pi^2 t}{4L^2} \right] \right\}$$

donde h_{∞} es el contenido de agua en equilibrio, L es el espesor de la película y D_w^{eff} es el coeficiente de difusión aparente en unidades de $m^2 s^{-1}$ (en este texto se referirá a esta ecuación como modelo de Crank). Los experimentos de hidratación se realizaron con una superficie de la película expuesta a la atmósfera húmeda, por la cual las moléculas de agua penetran en dirección a la otra cara, en contacto con la placa de Petri. Debido a esto, en la ecuación 2.4, la longitud característica L es el espesor de la película.

En los experimentos cinéticos, h_{∞} se corresponde con el contenido de agua de la película en equilibrio al 90% HR. Este valor se usó para obtener el coeficiente de solubilidad del vapor de agua en la película $\beta = (h_{\infty} p_s^{-1})$ (Larotonda *et al.*, 2005), a la presión de saturación de vapor $p_s = 2687,3$ Pa correspondiente a la atmósfera de 90% HR a 24 °C. Según la ley de Henry, la solubilidad del vapor de agua en la película a 90% HR, S_w , está dada por la ecuación 2.5.

Ecuación 2.5:
$$S_w = \beta \rho_{m.s.} = \frac{h_{\infty}}{p_s} \rho_{m.s.}$$

donde S_w está en unidades de g de agua por m^3 de masa seca por Pa, p_s es la presión de vapor de saturación a la temperatura dada y $\rho_{m.s.}$ es la densidad de materia seca de la película.

También se utilizó el modelo Pilosof-Boquet-Bartholomai (PBB) (Pilosof *et al.*, 1985), para describir la hidratación de las películas a través de la ecuación 2.6.

Ecuación 2.6:

$$h(t) = h_0 + \frac{h_\infty t}{B+t}$$

donde h_0 es el contenido inicial de agua, h_∞ el contenido final de agua en equilibrio y B el tiempo (día) cuando $h(t) = h_\infty/2$. La constante de velocidad $K = 1 / (h_\infty B)$ se puede obtener en unidades de g de masa seca por cada g de H_2O absorbido por cada día.

2.3.4.1 Modelo de intervalo de tiempo corto (STL)

En el período inicial de sorción, la sorción de agua en función del tiempo $h(t)$ se puede expresar como se muestra en la ecuación 2.7 (Shankar, 1981).

Ecuación 2.7:

$$h(t) = 2h_\infty \left(\frac{D_w^i t}{\pi L^2} \right)^{1/2}$$

Se propuso la ecuación 2.7 para ajustar los datos de sorción iniciales, cuando $h(t) / h_\infty < 2/3$. A través del modelado con esta ecuación se puede obtener un valor del coeficiente de difusión inicial D_w^i , que tiene en cuenta la difusión de agua en la película durante el período inicial de sorción (primeras doce horas en estos experimentos). Como en las ecuaciones anteriores, L es el espesor de la película.

2.3.4.2 Tipo de transporte a través de las películas

Se utilizó el modelo Korsmeyer & Peppas (KP) (Korsmeyer y Peppas, 1981) para evaluar el tipo de transporte, ajustando los datos cinéticos con la ecuación 2.8.

Ecuación 2.8:

$$h(t) = h_\infty k t^n$$

donde k es una constante que depende de las características de la matriz, y n es el exponente difusional. La ecuación 2.8 es válida para $h(t)/h_\infty \leq 2/3$ al igual que la ecuación 2.7. La ecuación de Korsmeyer y Peppas se basa en la ecuación 2.7: cuando n es igual a 0,5, ambas ecuaciones son esencialmente iguales y el transporte es puramente fickiano. De esta manera, n es un indicador de cómo el proceso se desvía del transporte ideal y determina el tipo de difusión de agua a través de la película (Balaguer *et al.*, 2013; Alfrey *et al.*, 1966). Es así que los valores de n definen el tipo de difusión: $0 < n \leq 0,5$: difusión cuasi-fickiana o fickiana, $0,5 < n < 1$: difusión anómala o no fickiana, donde la difusión de agua y la

relajación de las cadenas de polímeros son procesos de orden similar. Si $n=1$ la difusión es mucho más rápida que el proceso de relajación de los polímeros, siendo la relajación la que controla el proceso de sorción. Si bien estos son los parámetros indicadores que se fundamentan en la resolución de la ecuación de Fick, pueden existir casos en los que procesos que se dan en simultáneo al transporte difusional modifiquen este parámetro, aunque el mecanismo principal de transporte sea el propuesto por Fick.

2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua

2.3.5.1 Determinación de la permeabilidad a partir de los coeficientes de difusión y solubilidad.

El transporte de agua a través de películas poliméricas depende de la hidratación o solubilidad del agua en la película, así como de la movilidad del agua dentro de la misma (Roy *et al.*, 2000; Rogers, 1985). Cuando no hay poros, grietas o perforaciones de la película, la permeabilidad P se puede expresar multiplicando el coeficiente de difusión D_w y el coeficiente de solubilidad S_w (Cuq *et al.*, 1997a). Por lo tanto, la permeabilidad al vapor de agua P_w se define como se muestra en la ecuación 2.9.

Ecuación 2.9:
$$P_w = D_w S_w$$

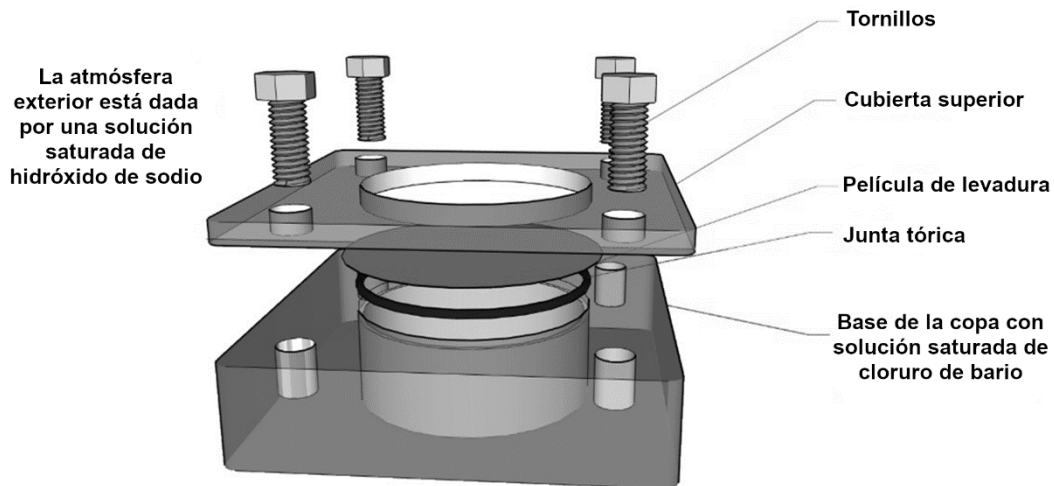
donde P_w se obtiene en unidades de $\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$, S_w y D_w se pueden obtener mediante la ecuación 2.5 y la ecuación 2.7, respectivamente. En el caso ideal, la permeabilidad es sólo una propiedad intrínseca de la película cuando D_w y S_w no están influenciados por el contenido de la sustancia permeante. En la mayoría de las películas biodegradables, el permeante (vapor de agua) interactúa con la película y los coeficientes D_w y S_w dependen de la diferencia de presiones parciales entre las caras de la película. La determinación indirecta de la permeabilidad, a través del producto de la solubilidad y la difusividad, se propuso como alternativa a la medición de la permeabilidad en forma clásica de la norma ASTM E96. Algunos autores han propuesto que las anomalías observadas en los resultados de la permeabilidad de películas hidrofílicas (cambios en el coeficiente de permeabilidad debidos al espesor, efectos del plastificante) son

debidos al método utilizado en la medición. Por ende, se han propuesto una serie de modificaciones, por ejemplo, corrección del espesor por hinchamiento de la película (*swelling*) durante el proceso de sorción de agua y corrección de la presión de vapor efectiva cerca de la película por la resistencia del aire. Se propone la metodología de determinación a través de la difusividad y la solubilidad para corroborar si las anomalías observadas por otros autores se deben al método de medición aplicado o a cuestiones intrínsecas de las películas.

2.3.5.2 Determinación experimental de la permeabilidad al vapor de agua a través del método ASTM E96

Para medir el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua P_w^{exp} de las películas se utilizaron celdas de acrílico y la metodología descrita en la norma ASTM-E96 (2016), tradicionalmente conocida como método de la copa. Las películas fueron acondicionadas durante diez días a 24 °C y 43% HR. Posteriormente, se colocaron en la parte superior de las celdas de permeabilidad que contenían una solución saturada de BaCl₂. La solución saturada de BaCl₂ proporcionó 90% HR. Las celdas de permeabilidad se colocaron a su vez en desecadores con 10% HR (en lugar de 0% HR como se indica en la norma), utilizando una solución saturada de NaOH (ver disposición de la celda utilizada en la figura 2.2, en el anexo se adjuntan los planos constructivos de las celdas). Se colocó un disipador sobre las películas para mantener condiciones uniformes dentro de los desecadores, de acuerdo con las recomendaciones de otros autores (Gennadios *et al.*, 1994a). De esta manera se intentó evitar que el aire en reposo se transforme en una resistencia adicional que, de no ser considerada, podría introducir un error de magnitud en la determinación del coeficiente de permeabilidad (Gennadios *et al.*, 1994a; McHugh *et al.*, 1993). Los experimentos se realizaron también a 24 °C.

Figura 2.2 Celdas utilizadas para el ensayo de permeabilidad al vapor de agua



Las mediciones se realizaron pesando la celda de permeabilidad en una balanza analítica ($\pm 10^{-3}$ g). La pérdida de peso en función del tiempo se graficó y cuando se alcanzó el estado de equilibrio (relación lineal entre la diferencia de concentraciones, o presiones parciales en este caso, y el cambio del peso con el tiempo) se registraron 10 horas más. El flujo de vapor de agua a través de la película J_w se calculó a partir de la pendiente de una regresión lineal de la pérdida de peso en función del tiempo ($\Delta m / \Delta t$) mediante la ecuación 2.10.

Ecuación 2.10:

$$J_w = \frac{1}{A} \left(\frac{\Delta m}{\Delta t} \right)$$

donde A es el área efectiva de la película expuesta ($2,2 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$). La permeabilidad al vapor de agua experimental P_w^{exp} se calculó de acuerdo con la ecuación 2.11.

Ecuación 2.11:

$$P_w^{\text{exp}} = \frac{J_w L}{\Delta p_w}$$

donde L es el espesor de la película, y $\Delta p_w = (p_{w2} - p_{w1})$ es la diferencia de presiones parciales de vapor de agua a través de la película y p_{w1} y p_{w2} son las presiones parciales de vapor de agua en la superficie exterior e interior de la película respecto de la posición en la celda de permeabilidad. La presión parcial

interna fue corregida por la resistencia del aire en el espacio de cabecera ($5 \cdot 10^{-3}$ m en los experimentos) entre el nivel de la solución saturada de BaCl_2 y la posición de la película. El experimento se llevó a cabo con películas de diferente contenido de glicerol y espesor, y se repitió tres veces para cada tipo de película.

La ecuación 2.9 se deriva de una combinación de las leyes de Fick y Henry para la difusión de vapor o gas a través de membranas y supone que no hay interacción entre la película y las moléculas de gas o vapor. Idealmente, cuando no se produce interacción entre una película de polímero y el vapor de agua permeante, la permeabilidad es independiente de la diferencia de presiones parciales. Sin embargo, en la permeación del vapor de agua a través de películas hidrofílicas existe una interacción fuerte entre permeante y permeado y depende de Δp_w . El valor de la permeabilidad obtenida a través de la ecuación 2.11 se denominó permeabilidad al vapor de agua P_w^{exp} (Kester y Fennema, 1989), obtenida por el método ASTM-E96.

2.3.6 Permeabilidad al vapor de agua en diferentes gradientes de humedad relativa y espesores

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos previos, se propuso profundizar en el efecto del espesor y la interacción con el agua, de manera de conocer la influencia de la presión parcial de agua y del espesor de las películas en el coeficiente de permeabilidad. En estos ensayos adicionales se estudió la permeabilidad obtenida experimentalmente (ecuación 2.11) de películas HTH con 25% de glicerol de tres espesores diferentes (0,07; 0,15 y 0,30 mm) en diferentes intervalos de humedades relativas a 24 °C. Los intervalos seleccionados fueron 10% - 90% (misma condición que en la situación anterior), 10% - 75%, 10% - 57%, 10% - 33%, 75% - 90%, 57% - 90%, 33% - 90%, 57% - 75%, 33% - 57% y 10% - 33% HR. La determinación se realizó por duplicado utilizando las celdas de permeabilidad del ensayo anterior, la circulación forzada de aire y las correcciones mencionadas para evitar errores en la determinación.

La solubilidad del vapor de agua en la película utilizada para la determinación del coeficiente de permeabilidad a través del producto de la difusividad y la solubilidad se calculó en este caso a través de la ecuación 2.12 (Roy *et al.*, 2000).

Ecuación 2.12:

$$S_W^{ins} = \rho \cdot \frac{(h_2 - h_1)}{(p_{w2} - p_{w1})}$$

Se trata de una solubilidad efectiva, en el rango de presiones parciales estudiado ($p_{w2}-p_{w1}$), que fue obtenida con la diferencia de hidratación máxima para cada condición de humedad (h_2-h_1). Dado que la curva de sorción de agua con respecto a la humedad relativa posee un crecimiento abrupto hacia altos valores de humedad relativa, es natural esperar un crecimiento de esta “solubilidad efectiva” respecto de lo que sucede a valores de baja humedad relativa. El coeficiente de difusividad D_w^{ins} para estos experimentos se obtuvo a través del cociente entre la permeabilidad ASTM-E96 y S_w^{ins} , (P_w^{exp}/S_w^{ins}) tal como lo realizaron Roy *et al.* (2000).

2.3.7 Análisis estadístico de los datos de interacción con el agua

Se realizó el análisis de las varianzas y una prueba de contrastes *post-hoc*. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor $<0,05$. Para este caso, se utilizaron los programas PSPP 0.8.5 (Free Software Foundation, Boston, EEUU) y R 3.2.2 (The R Foundation for Statistical Software, Viena, Austria) para el análisis de varianza (ANOVA) y los contrastes.

2.4 Efecto del pH de la dispersión en las características de las películas

2.4.1 Preparación de películas con dispersiones a diferente pH

Para preparar las películas de levadura, la biomasa se trató como se describió en la sección previa 2.2.1. Se midió el pH final de las dispersiones con un pHmetro (C861, Consort, Francia) y se ajustó usando soluciones de HCl 1M, NaOH 0,1 M y 1 M para alcanzar diferentes valores, desde 4 a 11, cambiando el pH en 1 unidad. En este grupo de ensayos se añadió glicerol como plastificante a todas las dispersiones, al 25% del contenido de levadura seca como concentración única. El rango de pH fue seleccionado en función de la revisión de bibliografía, de la posible solubilidad de los glucanos de pared celular, del punto isoelectrico de las proteínas de pared y de la experiencia previa en el trabajo en dispersiones de levadura del grupo.

Las dispersiones con distinto pH se analizaron en un reómetro (AR-G2, TA Instruments, EE.UU.) utilizando una geometría cono de 2° y 40 mm de diámetro. Se realizaron barridos de flujo desde 0 a 140 s⁻¹, utilizando el procedimiento de

flujo escalonado y adquiriendo 10 puntos por década logarítmica. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se utilizó 1 ml por cada ensayo. Los datos experimentales se ajustaron utilizando el modelo de Herschel – Bulkley (ecuación 2.13).

Ecuación 2.13:
$$\tau = \tau_0 + K * \dot{\gamma}^n$$

donde τ_0 es el esfuerzo de corte umbral, K es el índice de consistencia y n el índice de flujo. T es el esfuerzo de corte (variable respuesta) y $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación que es la variable modificada en el reómetro.

Finalmente, las películas se obtuvieron por secado de las dispersiones en placas de Petri de plástico y se sometieron al proceso de *casting* bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

2.4.2 Características del comportamiento térmico, mecánico y óptico según la influencia del pH

2.4.2.1 Influencia del pH en la degradación térmica

Para estudiar la degradación térmica de las películas y el efecto del pH, se analizó la pérdida de peso desde 50 °C hasta 600 °C a 20 °C min⁻¹ en atmósfera de nitrógeno. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

2.4.2.2 Influencia del pH en los ensayos mecánicos de tracción uniaxial

Las pruebas de tracción uniaxial se realizaron en la máquina universal de ensayos citada anteriormente. Las muestras se acondicionaron a 53% HR a 24 °C. El espesor de las películas se midió utilizando un micrómetro digital (3109-25A, Insize, China) en seis posiciones diferentes. Se determinó el módulo elástico, la deformación a la ruptura y la resistencia a la tracción. Se analizaron al menos 10 muestras.

2.4.2.3 Determinación de color y opacidad de películas preparadas a diferente pH

El color y la opacidad de las películas son de gran interés para la aplicación de las películas, en algunos casos se prefieren las transparentes, en otros casos se

acepta cierto grado de color y opacidad. La influencia del pH de las dispersiones en el color final de las películas se estudió utilizando el colorímetro Konica Minolta CR400 (Konica-Minolta, Japón), previamente calibrado utilizando un estándar blanco como referencia (L : 97,55, a : -0,04, b : 1,74). Las muestras se analizaron en cinco puntos aleatorios, en ambos lados, brillante y opaco, de acuerdo con la posición al momento del secado de la dispersión para obtener la película. Se midieron cuatro muestras para cada pH y la diferencia de color total (ΔE) se calculó con la ecuación 2.14.

$$\text{Ecuación 2.14: } \Delta E = \sqrt{(a_{film} - a_{standard})^2 + (b_{film} - b_{standard})^2 + (L_{film} - L_{standard})^2}$$

Para las determinaciones de opacidad, las muestras se manipularon cuidadosamente y se utilizó un método estándar modificado por Gontard *et al.*, (1992). Estos autores propusieron que la película sea cortada en forma de rectángulo, del tamaño de la cubeta, y ubicada del lado interno de la misma para ser analizada en el espectrofotómetro. La opacidad fue calculada como el área debajo de la curva de la absorbancia de la película en la cubeta, según la ecuación 2.15. Se analizaron las absorbancias en el rango de UV visible entre 400 y 800 nm utilizando una resolución de 0,5 nm. Con los datos obtenidos se realizó una comparación de las áreas de integración, para ello se utilizó el programa SciDAVis, realizando la integración numérica por el método lineal. La opacidad fue expresada como unidades de absorbancia en nanómetros e independizada del espesor de las películas, llamada *Opacidad normalizada* (UA nm mm⁻¹).

$$\text{Ecuación 2.15: } \textit{Opacidad normalizada} = \left(\int_{400\text{ nm}}^{800\text{ nm}} Abs_{\lambda} d\lambda \right) * (Abs\text{ más} * L)^{-1}$$

donde Abs_{λ} es la función de la absorbancia con respecto a la longitud de onda (λ), $Abs\text{ más}$ es la absorbancia máxima registrada en cada lote y L es el espesor de la película

Las películas se acondicionaron a 24 °C (53% HR) y luego se analizaron en el espectrofotómetro (T60, PG Instruments, Reino Unido), haciendo una línea de base sin la muestra. Se adquirieron las absorbancias de las longitudes de onda de 400 hasta 800 nm. Los resultados de opacidad se normalizaron por los espesores de las películas y por la absorbancia máxima registrada en cada lote para obtener una opacidad relativa. Las medidas se realizaron por triplicado.

2.4.2.4 Determinación de la permeabilidad al vapor de agua de películas obtenidas de dispersiones con distinto pH

Se realizaron estudios de transporte de vapor de agua para determinar la influencia del pH de las dispersiones en el coeficiente permeabilidad al vapor de las películas, utilizando el método descrito previamente en la sección 2.3.5.2. Se mantuvieron las condiciones de temperatura y las humedades relativas. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.4.3 Influencia del pH en la estructura de las películas

2.4.3.1 Espectroscopía en infrarrojo

Los espectros de IR de las películas (pH 4 a 11) con glicerol al 25% se determinaron utilizando la espectroscopía en infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (Afinnity-1, Shimadzu Co., Japón). Los espectros se registraron en modo de transmitancia (%) en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} , como un promedio de 45 exploraciones con una resolución de 4,0 cm^{-1} y apodización Happ-Genzel. El espectrofotómetro IR se equipó con el módulo Gladi-ATR® de Pike Technologies (Wisconsin, EE. UU.).

2.4.3.2 Microscopía de fuerza atómica

La rugosidad y el aspecto superficial de las muestras fueron medidos utilizando un microscopio de fuerza atómica (AFM) (Nanosurf, Flex-Axiom C3000, Suiza). La topografía de las películas preparadas con dispersiones ajustadas a pH 4, 6, 9 y 11 se obtuvo en modo contacto. Los valores de la media aritmética (S_a) y media cuadrática (S_q) de la rugosidad superficial se determinaron en un campo cuadrado de 10 μm de lado utilizando el programa Nanosurf C3000. Las determinaciones se realizaron en la Fundación Argentina de Nanotecnología (San Martín, Argentina).

2.4.3.3 Solubilidad en soluciones seleccionadas

Una forma fehaciente de comparar qué fuerzas moleculares están presentes o favorecidas en una matriz polimérica proteica es analizar la solubilidad diferencial de una película basada en la solubilidad de las proteínas en diferentes soluciones (Ciannamea *et al.*, 2014; Mauri y Añón, 2006). Aproximadamente 250

mg de películas obtenidas con diferentes pHs (4, 6, 9 y 11) se pusieron en contacto con 7,5 ml de cada solución diferente en agitación constante (25 °C, 135 rpm) durante 24 h. Cada una de las soluciones permite analizar a través de la solubilidad en forma diferencial qué interacciones se encuentran favorecidas en cada pH, es decir si las proteínas se encuentran estabilizadas por interacciones electrostáticas (S2) o hidrófobas (S3), puentes de hidrógeno (S4) o enlaces disulfuro (S6). La solución S5 permite medir la solubilidad en S2, S3 y S4 en conjunto. El agua destilada se marcó como solución S1. La solución S2 estaba compuesta por 0,086 M TRIZMA/HCl pH 8, $4 \cdot 10^{-3}$ M EDTA y 0,09 M glicina (Research AG, Argentina). Las soluciones de S3 y S4 se prepararon desde S2 agregando 5 mg ml⁻¹ SDS y 8 M de urea (dos veces por encima de la concentración micelar crítica), respectivamente (Research AG, Argentina). El exceso de urea es necesario para garantizar que todas las proteínas capaces de interactuar con SDS se vean afectadas y solubilizadas. Las soluciones S5 y S6 se prepararon agregando a S2 5 mg ml⁻¹ SDS y 8 M de urea, pero en el caso de S6, también se agregaron 25 mg ml⁻¹ de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Después de 24 h de exposición, las soluciones se separaron cuidadosamente de las películas y luego se centrifugaron a 1.000 ×g para descartar los residuos de la película más pequeños que pudieran quedar. Se mezcló 1,5 ml de cada sobrenadante con 0,375 ml de ácido tricloroacético al 60% p/p para precipitar las proteínas, luego se centrifugó a 10.000 ×g y se descartó el sobrenadante. Luego, se agregó 1,5 ml de etanol para eliminar el 2-mercaptoetanol. Se centrifugó nuevamente y se desechó el sobrenadante. Se añadió etanol a las proteínas precipitadas de todas las muestras, de manera tal que fueran sometidas al mismo tratamiento. Finalmente, las proteínas obtenidas se solubilizaron en NaOH 2 M antes de la cuantificación.

2.4.3.4 Cuantificación de proteínas solubilizadas en las soluciones seleccionadas

Las proteínas solubilizadas se cuantificaron mediante el ensayo tradicional de Biuret (Gornall *et al.*, 1949). Se utilizó seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como estándar de proteínas en diferentes concentraciones 0, 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 mg ml⁻¹ para preparar una curva de calibración (la concentración efectiva de BSA en la solución patrón se determinó a través de

la absorbancia 280 nm y el coeficiente de extinción molar, $43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Después de 30 minutos de reacción, la absorbancia de cada muestra se midió a 545 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Spectroquanta Pharo 300, Merck, Estados Unidos). La concentración de proteína solubilizada de cada película se expresó como mg de proteína soluble por cada mg de película.

2.4.4 Análisis estadístico de los resultados de interacción con el pH

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y una prueba *post-hoc* (HSD Tukey), el nivel de significancia del p-valor utilizado en los ensayos fue 0,05. Se utilizaron los programas PSPP 0.8.5 y R 3.2.2.

2.5 Estudio del rol de las fracciones soluble e insoluble en la formación y las características de las películas

2.5.1 Preparación de dispersiones con fracciones solubles e insolubles

Las dispersiones conformadas por las fracciones de levadura se prepararon como se describió en la primera sección, con algunas modificaciones. La levadura panadera se dispersó al 10% p/p después de una limpieza en centrífuga con agua destilada ($1.380 \times g$) (J2 Avanti XP, Beckmann, EE. UU.). Luego se colocó la dispersión en el homogeneizador de alta presión y se sometió a ruptura (125 MPa durante 9 min en flujo continuo). Al terminar esto, se separó la dispersión en dos fracciones, la soluble e insoluble, por centrifugación de la dispersión a $22.100 \times g$ durante 20 minutos. Se separó el sobrenadante o fracción soluble (SOL) y el sedimento o fracción insoluble (INS). La fracción insoluble se recuperó directamente y la fracción soluble se concentró en un rotavapor de laboratorio a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 60 cm de Hg de vacío hasta alcanzar el 12% p/p de concentración. Si bien esto implica un tratamiento térmico, el paso fue necesario para la posterior formulación de las mezclas. Las formulaciones se prepararon combinando SOL e INS en diferentes cantidades, desde 100% INS hasta 100% SOL, (85% INS - 15% SOL, 75% INS - 25% SOL, 65% INS - 35% SOL, 50% INS - 50% SOL, 25% INS - 75% SOL). Se utilizó como control una muestra sin separar la biomasa. A cada formulación se le aplicó el tratamiento térmico en baño a $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. El procedimiento se completó con una segunda

homogeneización por ultrasonido (5 min), sumergiendo la punta del homogeneizador ultrasónico (VCX 750, Sonics, EE. UU.) en un vaso de precipitado de 500 ml con un contenido de 250 ml de dispersión. El tratamiento se realizó en un ciclo de 30 s encendido y 30 s de apagado. A diferencia de las películas preparadas tradicionalmente, en este caso no se realizó la última homogeneización en el homogeneizador a válvula por el pequeño volumen disponible de cada mezcla. El glicerol se incorporó en diferentes porcentajes según el ensayo. La estandarización del pH se realizó utilizando HCl (1,0 N) y NaOH (0,1; 1,0; 2,0 N) para alcanzar los pHs de 4,0; 7,5 y 11,0. Se prepararon muestras con pH natural de las células de levadura (6,0) como control. Finalmente, las películas se obtuvieron por evaporación del agua a 40 °C durante 12 h.

2.5.2 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial de películas obtenidas con modificación en la composición y el pH de las dispersiones

Se realizaron pruebas de tracción para determinar el efecto del pH y la contribución de cada fracción al comportamiento mecánico. El primer análisis consistió en conocer el efecto del contenido insoluble/soluble en las propiedades mecánicas de las dispersiones a modo de una exploración preliminar. En cada grupo de pruebas, el pH se ajustó en caso de ser necesario a 6 y el glicerol se incluyó al 15% p/p m.s. El contenido de glicerol se redujo en estos ensayos para obtener películas incluso en los valores más altos de contenido de material soluble, dado que el material soluble contiene compuestos de bajo peso molecular que pueden plastificar el sistema y, si la concentración de glicerol es muy alta, la película es muy hidrofílica, se adhiere a la placa y no puede despegarse de ella aún luego de realizar el secado. Luego, se realizó un segundo análisis para profundizar en el estudio del efecto del contenido soluble e insoluble y el efecto del pH en la dispersión y la interacción, entre ambos factores a un nivel fijo de plastificante. En este caso, se agregó glicerol al 25% referido al contenido de masa seca de biomasa (debido al ensayo anterior se descartaron para el análisis los puntos con mayor contenido de soluble).

Tabla 2.1 Diseño del experimento para obtener una superficie de respuesta de las características mecánicas

Ensayo	X1	X2	Contenido de insoluble (%) (X1)	pH (X2)
1	-3	-1,2	50	4
2	-1	-1,2	65	4
3	1	-1,2	85	4
4	3	-1,2	100	4
5	-3	0	50	7,5
6	-1	0	65	7,5
7	1	0	85	7,5
8	3	0	100	7,5
9	-3	1,2	50	11
10	-1	1,2	65	11
11	1	1,2	85	11
12	3	1,2	100	11
13	0	0	75	7,5
14	0	0	75	7,5
15	0	0	75	7,5

El diseño del experimento se realizó en el *software* R, el factor pH se dividió en tres niveles y el contenido de material insoluble en cuatro. El motivo de la elección de un diseño no simétrico fue el interés particular en la inclusión de la relación natural del contenido insoluble/soluble en la biomasa de levadura (relación natural INS - SOL es de 65% a 35% aproximadamente, de acuerdo al análisis preliminar realizado). Los puntos seleccionados para el diseño fueron 50, 65, 85 y 100% de contenido insoluble y pH 4, 7,5 y 11. El punto central, 75% INS - 25% SOL a pH 7,5 se incluyó como punto adicional central. Los contenidos más altos de material soluble no se pudieron analizar debido a la dificultad de cortar las probetas para el ensayo de propiedades mecánicas. En la tabla 2.1 se muestra un resumen del grupo de ensayos planeados y la codificación del experimento. Las variables dependientes fueron el módulo elástico, la resistencia a la tracción y la deformación a ruptura que se obtuvieron a partir de curvas de esfuerzo - deformación. Los valores se calcularon de acuerdo con las

recomendaciones de la norma ASTM D882 y las probetas tuvieron el mismo tamaño que en los ensayos anteriores. Las pruebas de tracción uniaxial se realizaron a una velocidad de 5 mm min^{-1} . Las muestras analizadas con un espesor promedio de $0,18 \pm 0,03 \text{ mm}$ se acondicionaron antes de los ensayos mecánicos a 24 °C y 53% HR. Cada valor informado representó el promedio de diez muestras.

2.5.3 Cinéticas de hidratación de películas obtenidas con modificación en la composición y el pH de las dispersiones

Los experimentos cinéticos de hidratación se realizaron a 22 °C y 90% HR con un ventilador interno. Las curvas se ajustaron utilizando el modelo de Fick-Crank (ecuación 2.4) para obtener un coeficiente aparente (D_w^{eff}) del proceso de hidratación. La porción inicial de la curva de incorporación de agua en función del tiempo ($h_t/h_\infty < 2/3$) se ajustó con la ecuación 2.7 correspondiente al modelo STL. Las pruebas se realizaron por duplicado considerando un diseño factorial, dos factores y tres niveles, 0, 50 y 100% de contenido insoluble y pH 4, 7,5 y 11.

2.5.4 Permeabilidad al vapor de agua de películas con modificación en la composición y el pH de las dispersiones

De los resultados obtenidos en la cinética de hidratación, los valores de D_w^j y h_∞ se usaron para calcular el coeficiente de permeabilidad por el producto de D_w^j por S_w , de manera tal de comparar nuevamente con el coeficiente de permeabilidad experimental. El procedimiento experimental se llevó a cabo según lo detallado en la sección 2.3.5.1.

2.5.5 Análisis de la degradación térmica de películas con modificación en la composición

Las películas con diferentes contenidos de las fracciones insoluble/soluble se analizaron mediante análisis termogravimétrico, de acuerdo a lo descrito anteriormente para estos ensayos. En este caso se tomó la temperatura de degradación (T_{95}) se calculó cuando las muestras perdieron el 5% del peso inicial. Se colocaron porciones de películas (5 a 10 mg) en la balanza, las muestras estudiadas tenían un contenido creciente de material insoluble (0, 25, 50, 75 y 100%) a pH 6 y 25% de glicerol.

2.5.6 Efecto de la composición y el pH de las dispersiones en el color de las películas

La superficie de las películas (la superficie en contacto con la placa de Petri) se analizó utilizando el colorímetro mencionado en la sección 2.4.2.3. Las mediciones se realizaron en cinco puntos aleatorios en cada película analizada. Se midieron diez películas diferentes por cada condición señalada en la tabla 2.1, considerando el contenido insoluble y el pH de la dispersión como factores. Los resultados se proporcionan en la escala CIELab (L , a , b) y la diferencia de color total (ΔE) se calculó como se describe en la ecuación 2.14.

2.5.7 Espectroscopia infrarroja de películas preparadas a partir de distinto pH y composición

Se analizaron los cocientes de las absorbancias entre las bandas amida I y II y amida I y la banda 1031 cm^{-1} (atribuida a la flexión C-C en los polisacáridos). Se siguió el mismo diseño para la superficie de respuesta que para los ensayos de tracción uniaxial (tabla 2.1), siendo la variable de respuesta cada cociente. El dato de cociente introducido fue el promedio de 3 mediciones.

2.5.8 Análisis estadístico de la interacción del pH y la composición, cálculo de las superficies de respuesta

Las superficies de respuesta se obtuvieron utilizando el paquete *rsm* (Lenth, 2009) en el software R. Se incluyeron la ordenada al origen, los términos lineales, el término de interacción y los términos cuadráticos. Se obtuvieron los parámetros *R cuadrado múltiple*, *R cuadrado ajustado* y *falta de ajuste* como una medida de la bondad de ajuste. Se realizaron análisis de varianzas y pruebas de Tukey HSD para detectar diferencias significativas utilizando R (R Core Team, 2018), Jamovi (v0.9, Jamovi Project) e Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018). El límite de significatividad para el *p-valor* en las pruebas estadísticas fue de 0,05.

2.6 Estudio de la incorporación de refuerzos

2.6.1 Preparación de cáscaras de arroz micronizadas

Las cáscaras de arroz, lavadas previamente con una solución de HCl 1 N, fueron secadas a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas y micronizadas utilizando un molino de

cuchillas (FW 100). Posteriormente se utilizó un tamiz para separar partículas menores 500 μm y luego se utilizó otro para obtener tamaños menores a 125 μm . A la fracción que atravesó este último tamiz se la denominó “cáscara de arroz molida” (CAM). Las partículas menores a 125 μm se incorporaron a las dispersiones luego de la segunda homogeneización, con el plastificante. El pH se estandarizó a 6 y a 11. Las dispersiones se agitaron por 2 horas para una buena distribución de la cáscara micronizada. La cáscara micronizada se incorporó al 0,5, 1 y 2% p/p seco de levadura. El plastificante se adicionó al 25% p/p seco de levadura. La cáscara de arroz micronizada se envió al Centro de Celulosa y Papel del INTI-Sede Parque Miguelete para analizar los contenidos de holocelulosa (Browning, 1967), α -celulosa (TAPPI 203, 2009), lignina insoluble en ácido (TAPPI 222, 2006) e insolubles en alcohol – tolueno (TAPPI 204, 2017). La cáscara también se analizó en TGA, en condiciones de nitrógeno, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.2.3.

2.6.2 Preparación de nanofibras de celulosa de cáscaras de arroz

Para la preparación de las nanofibras de cáscaras de arroz se siguieron procedimientos indicados por Johar *et al.* (2012) y Marin *et al.* (2015) modificados. Por cada 1 g utilizado de CAM se incorporaron 20 ml de NaOH al 4% p/p. Esta mezcla se colocó en reflujo por 2 horas con agitación magnética, con el fin de eliminar lignina y buena parte de las hemicelulosas. Terminada esta etapa se lavó con agua destilada y se neutralizó a pH 7. Se filtró en embudo Büchner con papel de filtro Whatman N°3 y se secó en estufa a 105 °C. El sólido obtenido se mezcló con una solución de NaClO₂ (pureza 80%) 1,7% p/v, en buffer ácido acético/acetato de sodio (pH 4), a razón de 1 g de sólido por cada 30 ml de solución, calentando en reflujo por 2 horas. Esta operación se realizó dos veces. Finalmente se lavó y se neutralizó la mezcla a pH 7 y el sólido se secó en estufa a 105 °C. A través de este procedimiento se obtuvo la fracción celulósica.

La celulosa obtenida se trató con HCl 1 M en la relación 1 g de sólido por cada 25 ml de ácido. Esta mezcla se calentó a 90 °C durante 45 minutos con agitación, se lavó, neutralizó y secó. La función del tratamiento ácido suave fue exfoliar la fibra sin realizar una hidrólisis profunda que derivaría en la producción de nanocristales. Por último, para la preparación de las nanofibras se tomó la

fracción seca y se agregó agua destilada hasta obtener una dispersión 1% p/p para llevarla al homogeneizador a válvula con el objetivo de desfibrillarlas. Se comenzó por una presión de 30 MPa hasta alcanzar 100 MPa. Este proceso de homogeneización se realizó en ciclos con una duración total de 1 h. Así se obtuvo una dispersión (0,9 – 1% p/p) de nanofibras de celulosa en agua. Esta fracción fue empleada posteriormente en la preparación de películas reforzadas.

Dicha dispersión de nanofibras, tratada por el homogeneizador, se caracterizó a través de un barrido de flujo utilizando un reómetro equipado con una geometría cono de 2° y 40 mm de diámetro (AR-G2, TA Instruments, EE.UU.) a 21 °C. El barrido se realizó entre 0,05 y 200 s⁻¹ por triplicado. Para el ajuste de los datos experimentales se utilizó el modelo de Cross (ecuación 2.16). El modelo complejo consiste en una ecuación de cuatro parámetros, η_{∞} es la viscosidad a la que se tiende a grandes velocidades de deformación. α_C es una constante de tiempo relacionada con el tiempo de relajación del polímero, m es la constante de velocidad cruzada, un indicador de la dependencia de la velocidad de corte en la región de adelgazamiento de corte, η_0 es la viscosidad aparente a velocidad de corte cero, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación y η es la viscosidad aparente en cada velocidad de deformación estudiada. Los parámetros se determinaron como una regresión no lineal multivariada usando R (Cran Software, v. 3.4.4) y RStudio (RStudio Inc., v.1.1.456).

Ecuación 2.16

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{(1 + (\alpha_C \dot{\gamma})^m)}$$

2.6.3 Nanocelulosa bacteriana

Por otra parte, se incorporaron nanofibras de celulosa bacteriana. La celulosa bacteriana (BC) fue provista por el Grupo de Biotecnología y Materiales Biobasados de ITPN (UBA – CONICET). La celulosa bacteriana (BC) se produjo a partir de un cultivo de la cepa NRRL B-42 de *Gluconacetobacter xylinus*, en condiciones estáticas. La descripción de las características del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento se encuentran en la publicación realizada por los autores (Cerrutti *et al.*, 2016). La nanocelulosa provista se encontraba en una concentración de 0,9% p/p.

2.6.4 Caracterización de las nanofibras obtenidas a partir de cáscaras de arroz y nanocelulosa bacteriana

El producto del proceso de preparación de nanofibras a partir de cáscara de arroz fue caracterizado a través de un microscopio de fuerza atómica. Se obtuvo la altura en el eje Z (altura), el ancho y el largo de las fibras. Las imágenes fueron obtenidas secando una dispersión a 0,2% p/p de las fibras en mica. Se utilizó el microscopio Nanoscope V-Multimode (Veeco, Santa Barbara, CA) en modo de contacto, con una sonda de silicio modelo Arrow-NCR-50 (Nano World, Suiza) (frecuencia de resonancia en *cantilever*: 258 kHz, fuerza constante 42 N/m, radio de la punta 5-10 nm). Las frecuencias típicas de escaneo fueron 1 Hz - 1,5 Hz. El equipo pertenece al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas, Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Universidad Nacional de La Plata, CONICET.

Se caracterizó también el comportamiento de flujo de las dispersiones obtenidas luego del paso por el homogeneizador. Se utilizó el reómetro AR-G2 (TA Instruments, Estados Unidos). Se barrió el flujo a 25 °C, entre 0,01 y 100 s⁻¹, tomando 10 puntos por década logarítmica.

En cuanto a la celulosa bacteriana, se observaron las fibras a través de microscopía electrónica de barrido, con magnificaciones de 3000× (SEM Phenom ProX, ThermoFisher Scientific) en el Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología (ITPN), Buenos Aires, Argentina.

Los tamaños se determinaron a través de las escalas provistas en las imágenes utilizando el programa ImageJ (v. 1.48, Rasband W.S. National Institute of Health, 1997-2018).

2.6.5 Preparación de las películas reforzadas con fibras de cáscara de arroz y nanocelulosa bacteriana

En las dispersiones de levadura panadera al 10% p/p de levadura seca, homogeneizada y tratada térmicamente en las condiciones citadas previamente, se incorporó nanocelulosa bacteriana picada (BC) o nanofibras provenientes de cáscara de arroz (FA) en tres porcentajes finales 1, 3 y 5%, referidos a la materia seca de levadura. Dado que junto con las nanofibras se incorpora agua en cantidades diferentes según el porcentaje elegido, se añadió agua destilada a todas las dispersiones, a excepción de la de 5% de BC, de manera tal de

alcanzar en todas, la misma concentración de levadura en peso. La concentración final alcanzada de levadura fue alrededor de 6%. Los porcentajes de 1, 3 y 5% mencionados anteriormente están dados en función de este 6%. La BC se incorporó a la dispersión y previamente fue licuada en una procesadora hogareña durante 1 minuto. Una vez realizada esta preparación, se homogeneizaron las dispersiones a 125 MPa durante 9 min. Se mantuvo el procedimiento de preparación señalado previamente para la obtención de películas por *casting*.

2.6.6 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial y permeabilidad al vapor de agua

Se cortaron probetas según la descripción realizada en la sección 2.2.5, se mantuvieron las condiciones de velocidad y acondicionamiento (temperatura y humedad). Se analizaron 5 especímenes de cada porcentaje de adición de cáscara micronizada, 8 de nanofibras a base de cáscara de arroz y 6 con nanocelulosa. Se determinó el módulo elástico, la deformación a ruptura y la resistencia según lo señalado en la sección 2.2.5. La tenacidad máxima fue determinada en las películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz y nanocelulosa bacteriana sobre la curva de esfuerzo vs. deformación según la ecuación 2.17 (Moreira de Melo *et al.*, 2019).

Ecuación 2.17:
$$Tenacidad = \int_0^{\epsilon_f} \sigma(\epsilon) d\epsilon$$

donde ϵ es la deformación nominal, ϵ_f es la deformación a ruptura y $\sigma(\epsilon)$ es el esfuerzo para cada deformación.

Los ensayos de permeabilidad al vapor de agua se realizaron a través del método de la copa (ASTM-E96) de acuerdo a las condiciones señaladas en la sección 2.3.5.2. Los ensayos se realizaron con las películas reforzadas con 1, 3 y 5% de BC o FA y muestras sin refuerzo a pHs 6 y 11.

2.7 Desarrollo de películas activas: Incorporación y liberación de un compuesto antioxidante

2.7.1 Preparación de películas con timol incorporado

Se añadió timol (Research AG, San Fernando) como agente antioxidante, en diferentes porcentajes, solubilizándolo previamente en etanol absoluto para

obtener tres formulaciones distintas: 6%, 8% y 10% m.s. a cada dispersión HTH. También se preparó una dispersión control sin timol, a la que se le añadió 5 ml de etanol. Las dispersiones se mezclaron en agitador magnético durante 1 hora. Una vez finalizada la incorporación, las películas activas se obtuvieron por el método de *casting*. Dado que durante el secado puede perderse parte del timol, posteriormente, se analizó la cantidad de timol efectivamente retenido.

2.7.2 Ensayos mecánicos de tracción uniaxial

Las películas se analizaron de acuerdo a las condiciones mencionadas en la sección 2.2.5. Se determinaron los valores del módulo elástico, deformación a ruptura y resistencia a la tracción. Los resultados informados fueron un promedio de 10 mediciones.

2.7.3 Determinación del color de las películas con timol

Se analizó el color y la opacidad de películas con y sin timol. Las muestras de timol se analizaron con un colorímetro portátil (Konica Minolta, modelo CR-400). Las películas se colocaron sobre la superficie blanca estándar (sección 2.4.2.3) y se determinaron las coordenadas en el espacio CIELab. Se midieron 5 puntos de cada película del mismo espesor. Para el cálculo de la diferencia de color se utilizó la ecuación 2.14, sólo que en este caso la referencia utilizada fue la película sin timol a pH 6. Se tomaron los valores promedio de L , a y b para estas películas.

2.7.4 Determinación del timol presente en las películas mediante extracción sólido - líquido

Dado que el timol es una sustancia volátil, durante el secado realizado para obtener las películas, se podrían producir pérdidas antes de tener las películas listas. Para conocer cuál fue el contenido final en la película preparada se realizó una extracción del timol retenido. Se colocaron 0,3 g de película en tubos de ensayo y se les adicionó 4 ml de alcohol etílico. Para evitar la evaporación, los tubos se cubrieron con papel de aluminio. La extracción se realizó en un baño de ultrasonido (TB02, TestLab, Argentina) durante 20 minutos a 25 °C, por duplicado. Se realizaron diez extracciones sólido-líquido sucesivas, se centrifugó a 3000 $\times g$, se extrajo el sobrenadante y posteriormente, se cuantificó la cantidad

de timol extraído mediante espectrofotometría (T-60 PG Instruments, Gran Bretaña) cuantificando la absorbancia a 276 nm. Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración con patrones de timol en etanol a distintas concentraciones de 5, 15, 25, 35 y 50 ppm.

Para calcular la cantidad de activo total presente en las porciones de películas ensayadas se realizó un balance de materia (ecuación 2.18).

$$\text{Ecuación 2.18} \quad P * (1 - H) = G * x + T * x + x$$

donde P es el peso de las películas, H es la humedad de las mismas, G y T son las cantidades de glicerol y timol añadidas y x es la masa seca de levadura. La cantidad de timol incorporada en las películas se obtuvo multiplicando el porcentaje de timol teórico al contenido de levadura despejado.

El rendimiento del activo en la película, a partir de los datos de la extracción-cuantificación, se obtuvo según la ecuación 2.19.

$$\text{Ecuación 2.19} \quad \% \text{ Migración} = \frac{T_m}{T_t} \times 100$$

T_m es la cantidad de timol cuantificada en 4 ml del solvente y T_t es la cantidad total del activo en las películas, estimada con la ecuación 2.18.

2.7.5 Estudio de la migración de timol en simulantes alimentarios

El ensayo de migración consistió en poner en contacto películas de 6 cm de largo y 1 cm de ancho ($15 \cdot 10^{-5}$ m de espesor) con 10 ml de los medios simulantes, soluciones de etanol al 95% v/v (simulante graso) y etanol al 10% v/v (simulante acuoso) según el reglamento N°10 (UE, 2010). Se respetó la proporción entre el área de las películas y la cantidad de simulante, determinada en la normativa 32/10 (GMC-Mercosur, 2010), donde la relación es de 6 dm²/L de simulante. Se realizaron mediciones a tiempos crecientes: 10, 15, 30 minutos, 1, 5, 12, 24, 48 y 120 horas para conocer liberación del compuesto activo en el tiempo. Una vez finalizado el tiempo de contacto, la solución fue separada de la probeta y posteriormente se determinó la concentración del compuesto liberado en el simulante alimentario.

Se realizaron los estudios a tres temperaturas distintas, a 4 °C (para determinar cómo es el comportamiento difusivo en condiciones de refrigeración), a 25 °C (para conocer cómo se desempeña el material al ser almacenado en

temperaturas entre 4 y 25 °C) y a 40 °C (para observar el comportamiento del material al ser almacenado entre los 25 y 40 °C). Las probetas se colocaron, por triplicado, en tubos de vidrio y se cubrieron con el simulante (asegurando la completa inmersión de la muestra en el líquido). Los tubos fueron ubicados en una estufa con circulación forzada de aire o en una cámara frigorífica según las condiciones del ensayo. En todos los casos, los simulantes se acondicionaron a las temperaturas correspondientes antes de ser agregados a los tubos.

2.7.5.1 Determinación del timol liberado mediante espectroscopía UV

La cuantificación del timol liberado al medio simulante se llevó a cabo leyendo la absorbancia a 276 nm en un espectrofotómetro UV (Spectroquanta Pharo 2000, Merck, Estados Unidos). Se prepararon patrones de timol en etanol 95% v/v y etanol 10% v/v (para eliminar el efecto matriz en la cuantificación del compuesto) en un rango de concentración entre 5 y 50 ppm.

2.7.5.2 Determinación de timol mediante HPLC-UV

La cuantificación del activo liberado en los simulantes estudiados (etanol 95% y etanol 10%) a 25 °C se realizó mediante cromatografía líquida, utilizando un cromatógrafo de alta resolución con detector UV (UV/Vis 156, Gilson, EE.UU.). Se utilizó una columna de fase reversa C18 (Teknochroma) de 150 mm de largo y 5 micrones de poro. El ensayo se realizó con un flujo isocrático a un caudal de 1,2 ml min⁻¹. La fase móvil utilizada fue 50:50 acetonitrilo-agua y el volumen de inyección empleado fue de 10 µl. La longitud de onda empleada para la detección del timol fue 276 nm y para la determinación de la concentración en los extractos, se realizó una curva de calibración con patrones de timol de concentraciones conocidas (25-500 ppm), relacionándolos con el área debajo de la curva de la señal de timol.

Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos y luego filtradas en un filtro de 0,22 µm antes de ser inyectadas en el cromatógrafo.

2.7.6 Determinación del coeficiente de difusión de timol

Para conocer el coeficiente de difusión de timol en la etapa inicial, se empleó la ecuación 2.20 (Crank, 1979), esta ecuación es idéntica a la ecuación 2.7 (modelo STL), aplicada en este caso a la migración de timol. El coeficiente *D* es el

coeficiente difusivo inicial y es calculado cuando la relación M_t/M_∞ , cuando ésta es menor a 2/3. La relación M_t/M_∞ es la fracción de la masa del analito liberada respecto de la masa total en el equilibrio, en donde M_t representa la masa del compuesto de interés liberado en un tiempo t , y M_∞ se refiere a la máxima cantidad que se libera en la condición de equilibrio (Crank, 1979) Dentro de este período, existe un intervalo de tiempo donde el fenómeno de transferencia se sostiene de manera cuasi-estacionaria, lo que implica que el activo llega hacia la superficie de la película con la misma velocidad de la que se solubiliza y se retira de la misma.

Ecuación 2.20

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{2}{l} \left(\frac{Dt}{\pi^2} \right)^{1/2}$$

M_t/M_∞ es la fracción (adimensional), l es el espesor de la película en mm, t es el tiempo en segundos y D es la difusividad inicial ($\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$).

Para obtener el coeficiente difusivo aparente del proceso en general, existen dos ecuaciones posibles a aplicar, cuya aplicación varía de acuerdo a la magnitud de las resistencias involucradas en la transferencia. La primera de ellas (Chung *et al.*, 2001) es la ecuación 2.21:

Ecuación 2.21

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{2\alpha(1+\alpha)}{1+\alpha+\alpha^2 q_n^2} \exp\{-Dq_n^2 t/l^2\}$$

En esta ecuación, M_0 (en ppm o mg/kg de simulante) es la concentración inicial del migrante en la película en el instante previo al comienzo de la migración, M_t (en ppm o mg/kg de simulante) es la concentración del migrante en la película en el tiempo t y se incorpora el parámetro α , definido en la ecuación 2.22:

Ecuación 2.22

$$\alpha = \frac{1}{K} \frac{V_s}{l}$$

El parámetro α es la relación másica de timol en el simulante y en la película en la situación de equilibrio que de manera indirecta marca la relación entre las resistencias involucradas en el proceso. Los valores de α fueron expresados en m^2 , K es un coeficiente de partición determinado como $\frac{M_{p\infty}}{M_{f\infty}}$. $M_{p\infty}$ es la concentración en el film en el equilibrio y $M_{f\infty}$ es la cantidad del migrante en el simulante en el equilibrio, V_s es el volumen del fluido y l es el espesor de la película. El coeficiente de partición se define como la relación de

concentraciones de migrante en el alimento y el polímero en equilibrio (Canellas *et al.*, 2010; Nerin, 2012).

La segunda ecuación utilizada para hallar el coeficiente global, propuesta por Crank (1979) es también una solución de la segunda ley de Fick para la geometría placa plana (ecuación 2.23), similar a la utilizada en la transferencia de vapor de agua. Se considera una concentración promedio a lo largo de toda la geometría.

Ecuación 2.23
$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\{-D(2n+1)^2 \pi^2 t / l\}$$

La ecuación 2.23 es una forma particular de la ecuación 2.20 y se llega a la misma cuando α tiende a infinito. Según el caso, se aplicará una u otra ecuación dependiendo de las condiciones en las que se realice la transferencia.

Para obtener el coeficiente de difusión, se ajustaron matemáticamente los puntos medidos por espectrometría y por HPLC con las ecuaciones mencionadas anteriormente. Para realizar el modelado con la ecuación 2.21, se iteraron valores iniciales de α y se observó cuál de ellos permitía el mejor ajuste de los datos experimentales (Chung *et al.*, 2002).

Se utilizó el *software* RStudio (versión 3.5.0) para la determinación de este coeficiente y de la concentración en la cual se establece el equilibrio en los distintos sistemas. Se utilizó el paquete especial *nlstools* (v1.0-2, Florent Baty y Marie-Laure Delignette-Muller).

2.7.7 Determinación de la energía de activación del proceso difusivo

Para obtener la energía de activación del proceso de difusión se utilizaron los coeficientes difusivos calculados para las muestras de 6, 8 y 10% timol en el simulante graso a las tres temperaturas ensayadas. Se usó el modelo de Arrhenius (ecuación 2.24), donde D es el coeficiente de difusión ($\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$); E_a es la energía de activación para el proceso de difusión (kJ mol^{-1}); R , es la constante universal de los gases ($\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$); T , la temperatura absoluta (K) y A es el factor preexponencial.

Ecuación 2.24
$$\ln(D) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

2.7.8 Medición de la capacidad antioxidante del timol en los extractos de migración

Para comprobar el efecto antioxidante del compuesto migrado desde la película al simulante, se empleó el método ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) de acuerdo a la descripción de Re *et al.* (1999). El radical ABTS^{•+} se generó por reacción de 7 mM de solución acuosa ABTS con 2,45 mM de K₂S₂O₈ en la oscuridad con el objetivo de evitar reacciones secundarias de degradación durante 12-16 horas (solución A). Luego, se preparó la solución B a partir de 80 ml de agua *Milli-Q* y 1 ml de la solución A formada anteriormente. Se ajustó la absorbancia de la solución B entre 0,68 y 0,72 a 734 nm. Las muestras analizadas del timol fueron las obtenidas a partir de los extractos provenientes del ensayo de migración en simulante graso, a distintos tiempos, 1, 5, 24 y 120 horas y para las tres temperaturas estudiadas. Por último, para la medición de las muestras con timol, se dejó reaccionar durante 6 minutos en oscuridad y por duplicado.

2.7.9 Determinación de la concentración inhibitoria media del timol

La concentración inhibitoria media (IC₅₀) es la concentración de timol requerida para obtener una absorbancia del 50% de la correspondiente a la solución blanco. Se realizaron distintos patrones de timol a diferentes concentraciones, partiendo de una solución inicial de 30 mg mL⁻¹ de timol y luego se midieron muestras a partir de esta última con las siguientes diluciones: 0, 1:50, 1:20, 2:25 y 1:10, agregando 900 µL de solución B y ajustando el volumen con agua *Milli-Q* (tablas 2.2 y 2.3). Los ensayos se realizaron por duplicado. El IC₅₀ se calculó como la concentración a la cual se reduce al 50% la formación de radicales ABTS^{•+}.

Tabla 2.2 Preparación de soluciones de timol para el trazado de curva de calibración

Muestras	Blanco	1/50	1/20	2/25	1/10
Timol (μl)	0	20	50	80	100
Agua (μl)	100	80	50	20	0
ABTS ^{•+} (μl)	900	900	900	900	900

Tabla 2.3 Concentración de soluciones patrón de timol para el trazado de curva de calibración

Diluciones	Concentración (mg ml⁻¹)
Blanco	0,0
1/50	0,6
1/20	1,5
2/25	2,4
1/10	3

La determinación del porcentaje de actividad de inhibición radicalaria (RSA, %) se realizó sustrayendo la absorbancia de la muestra a analizar a cada tiempo a la absorbancia que se obtiene de una solución de ABTS^{•+} en contacto con agua destilada (blanco), que no tiene actividad antioxidante, y dividiendo todo por la absorbancia del blanco. El porcentaje se obtiene al multiplicar por cien (ecuación 2.25).

Ecuación 2.25
$$\%RSA = \frac{(Abs_{blanco} - Abs_{muestra}(t))}{Abs_{blanco}} \cdot 100$$

2.8 Preparación de películas a partir de levadura residual cervecera

2.8.1 Características de la levadura residual

La biomasa de levadura residual se obtuvo de una cervecería de la localidad de Berazategui, de diferentes procesos de producción de cerveza *Golden* y *Honey*, la levadura utilizada fue la variedad *ale*, *S. cerevisiae* (FermoAle AY4-AEB Group, Italia). El contenido de masa seca de la corriente residual fue 13,6% y el pH 5,8. La levadura se lavó en una centrífuga (J2-MC, Beckmann, EUA) a 3800 $\times g$, analizando la turbidez del sobrenadante en cada lavado, que se determinó en espectrofotómetro por integración de las absorbancias entre 400 y 800 nm. El barrido de absorbancias a diferentes longitudes de onda se realizó con una cubeta de 3 ml que contenía el sobrenadante de cada centrifugación. Por otra parte, se determinaron también la densidad del sobrenadante por picnometría, la cantidad de proteína soluble por el método de *Biuret* (Gornall *et al.*, 1949) y los azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956). Se observaron las células de levadura al microscopio óptico digital (Pentaview, Celestron, EE.UU.) y se determinó la distribución de tamaños de partícula por dispersión estática de la luz, utilizando el procedimiento de la sección 2.1.5.

Para la preparación de las dispersiones, la biomasa se estandarizó a 10% p/p m.s. La ruptura de las células se realizó en el homogeneizador a válvula (125 MPa - 9 min). Luego se realizó el tratamiento térmico (90 °C - 20 min) y se homogeneizó nuevamente en las mismas condiciones que para las películas de levadura panadera. De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió ajustar el pH a 6 y a 11 utilizando HCl (0,1 N) y NaOH (0,1, 1, 2 N). Se agregó glicerol (Research AG, San Fernando) al 15 y al 25% p/p m.s. Se colocaron 10 y 20 g en placas de Petri de 90 mm y se secaron en una estufa con circulación forzada de aire a 40 °C durante 12 horas hasta obtener un contenido de agua remanente de 10 a 15 %.

2.8.2 Ensayos sobre las películas obtenidas con levadura residual

Sobre las películas obtenidas con levadura residual se realizaron ensayos de color (sección 2.5.6), de tracción uniaxial (sección 2.2.5) y degradación térmica en nitrógeno (sección 2.2.3). Para el análisis de los resultados de color se utilizó la metodología de análisis de componentes principales, denominada

comúnmente como *PCA*. Los cálculos se realizaron a través de los programas R y RStudio y los paquetes complementarios *FactoMineR* (v1.42, Husson, F., Josse, J., Le, S. y Mazet, J.) y *Factoextra* (v1.05, Kassambara, A. y Mundt, F.). Las películas obtenidas se cortaron en tiras y se acondicionaron a 24 °C – 53% HR de acuerdo a las condiciones indicadas en la sección 2.2.5. La velocidad del ensayo de tracción fue de 5 mm min⁻¹ y la distancia entre mordazas fue de 25 mm. A partir de la curva de fuerza y desplazamiento se obtuvieron la deformación a ruptura, el módulo elástico y la resistencia a la tracción.

2.9 Preparación de películas gruesas a través de moldeo por compresión

2.9.1 Condiciones de procesamiento

Para la producción de películas a través de moldeo por compresión se utilizó polvo obtenido a partir de películas de dispersiones HTH. Las dispersiones fueron preparadas de acuerdo a la descripción previa del proceso HTH sin agregado de glicerol. El pH se ajustó a 11 utilizando soluciones de NaOH (1 y 2 N). Luego las películas se obtuvieron por *casting* en placas, se molieron en un molino de cuchillas y se tamizaron en un tamiz de 125 µm de tamaño de poro. Para la preparación de las películas gruesas a través de moldeo por compresión se utilizó una prensa (#3925, Carver, EE.UU.) con control de temperatura ubicada en el Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología. Se utilizaron placas cubiertas con cinta de politetrafluoroetileno para facilitar el desmolde de las películas obtenidas. El glicerol se incorporó en diferentes porcentajes 15, 25 y 35% p/p m.s. Se cargaron 3 g de material plastificado en las placas sin limitador y se variaron las condiciones de temperatura y presión. En primer lugar, se seleccionó 125 °C para la temperatura y tres condiciones de presión 1,5; 3 y 4,5 MPa, realizando una etapa de calentamiento a la temperatura correspondiente durante 2 min, sin presión aplicada y una segunda etapa de 8 min con temperatura, aplicando cada presión indicada. Posteriormente, se mantuvo la presión a 1,5 MPa y se analizaron diferentes temperaturas, 125, 140, 145 y 150 °C, utilizando sólo 15 y 25% de glicerol. En estos ensayos, el proceso de aplicación de presión y temperatura fue de 10 min (reemplazando el programa 2 min + 8 min anterior), seguido de 3 minutos de enfriamiento a temperatura

ambiente. Finalmente, se desmoldaron las películas y se almacenaron para los ensayos posteriores.

2.9.2 Evaluación de las características de películas gruesas obtenidas a través de moldeo por compresión

Los ensayos mecánicos se hicieron bajo las condiciones señaladas en la sección 2.2.5. La superficie de las probetas (películas) donde se produjo la ruptura en los ensayos de tracción, se observaron en un microscopio electrónico de barrido de mesa (Phenom GSR, Fisher Thermo Scientific) utilizando diferentes aumentos. Los resultados de las películas preparadas por moldeo por compresión se detallan en el capítulo VI, donde primero se analizó el efecto del pH en las películas preparadas por *casting*.

2.10 Características generales de los análisis estadísticos

En donde no se ha señalado especialmente, la prueba de homogeneidad de varianzas (a través del test de Bartlett), el análisis de varianzas de 1 y 2 factores y la prueba de contrastes, HSD Tukey, se realizaron a través del programa informático InfoStat (v2018I).

Capítulo III: ¿Es posible obtener películas a partir de biomasa de levadura?

3.1 Introducción

Las células de *S. cerevisiae* pueden considerarse ingredientes de grado alimentario, abundantes y de relativo bajo precio. Estos hongos unicelulares han sido utilizados por la industria alimentaria principalmente para la producción de etanol y dióxido de carbono, en las industrias de producción de cerveza, vino y de productos de panadería. Wagner *et al.*, (2009) explicaron que una suspensión de células de levadura puede tratarse adecuadamente y que es posible aislar componentes individuales de interés para distintas aplicaciones. La forma de aislamiento se elige según la ubicación del compuesto, si éste se encuentra en un zona intracelular o extracelular. Las levaduras contienen aproximadamente 40 a 60% de proteínas y se obtienen como concentrados y aislados que poseen propiedades funcionales como la retención de agua, la modificación del comportamiento reológico y la actividad interfacial (Sceni *et al.*, 2009, Pacheco y Sgarbieri, 1998). No hay trabajos que hagan uso de las proteínas de levadura para la producción de películas, mientras que sí hay antecedentes del uso de β -glucanos de levadura para tal fin. Novák *et al.* (2012) aislaron el polisacárido de la pared, β -(1-3)-(1-6)-D-glucano de suspensiones de levadura, para preparar películas con la incorporación de glicerol como plastificante. El uso de todos los polímeros disponibles podría ser un diferencial y, por otra parte, evitar el descarte de polímeros de utilidad potencial.

En este capítulo se describen los resultados del uso de la totalidad de la biomasa de levadura para producir películas, analizando las condiciones necesarias para su desarrollo. Se propuso estudiar las condiciones de homogeneización para romper la pared celular y liberar materiales intracelulares, y analizar el efecto de la temperatura en la desnaturalización de las proteínas. Para esto se realizó el estudio de la distribución de tamaños de partículas y el ensayo de las dispersiones en un calorímetro diferencial de barrido. La combinación de estos tratamientos podría ser efectiva para la preparación de películas, pero, ¿cómo influye uno u otro y sus combinaciones en las características finales de las películas?

Finalmente, el capítulo ofrece un análisis sobre cómo influye la combinación y el orden de los tratamientos para desarrollar las películas en la cinética de hidratación.

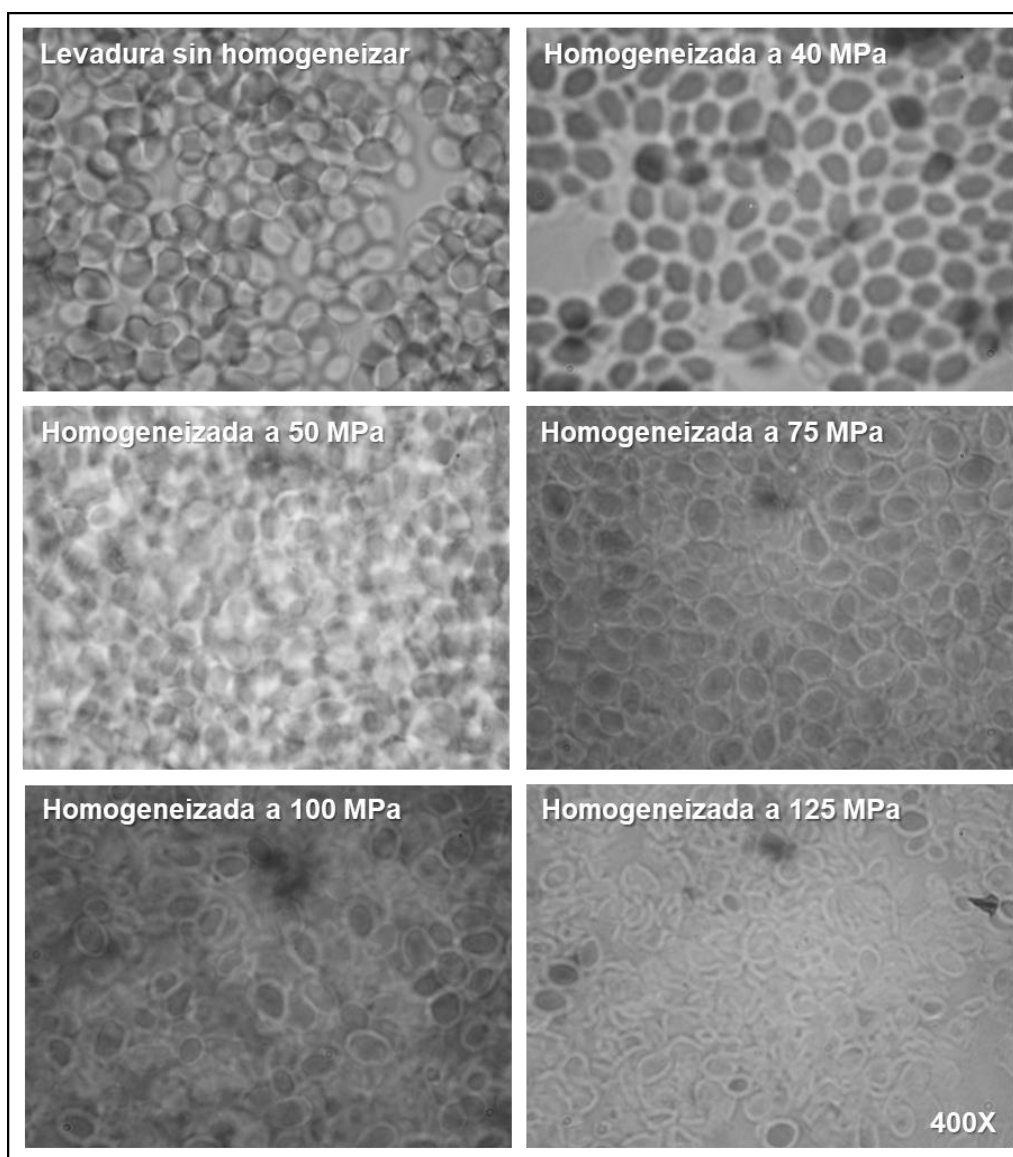
3.2 Ensayos para determinar las condiciones de tratamiento

3.2.1 Efecto del proceso de homogeneización sobre la ruptura de las células de levadura

En la Figura 3.1, se muestran las microscopías ópticas de las dispersiones de levadura sometidas a diferentes presiones de homogeneización. Se puede ver cómo la pared celular es fragmentada conforme se incrementa la presión desde 75 MPa a 125 MPa. Por debajo de 75 MPa, las células se observan íntegras desde el campo que ofrece el microscopio, aunque pueden presentar fisuras locales que no son visibles al mismo.

Los resultados de este estudio demostraron que la homogeneización a 125 MPa es la condición más adecuada para procesar células de levadura ya que conduce a la liberación de una cantidad conveniente de material intracelular, una ruptura apropiada de la pared celular y una buena retención de agua en la estructura formada luego del tratamiento térmico. Las proteínas liberadas al medio durante el proceso de homogeneización son un indicador indirecto del grado de ruptura de las células. En este trabajo, la liberación se cuantificó de manera indirecta, analizando el volumen de sedimento formado luego del tratamiento térmico a 90 °C. Como será ampliado posteriormente, la liberación de proteínas y la posterior formación de una estructura que retiene agua a través de la desnaturalización de las proteínas, están muy relacionadas con la habilidad para formar películas. La cuantificación de las mismas puede realizarse por diversos métodos de análisis de proteínas, en particular, métodos colorimétricos como los empleados por Sceni *et al.* (2009). En ese trabajo, los autores determinaron el contenido de proteínas e hidratos de carbono de diferentes fracciones de la biomasa levadura, obtenidas por centrifugación a 3.500 ×g, luego de la ruptura por homogeneización. La fracción correspondiente al sedimento contenía alrededor de 72% de hidratos de carbono y un contenido de 20% de proteína. Dicha fracción corresponde mayoritariamente a la pared celular que comprende a los β -glucanos y a las mananoproteínas.

Figura 3.1 Efecto de la presión de homogeneización sobre la integridad de las células de levadura vistas al microscopio óptico (400×)



El sedimento de la centrifugación puede arrastrar también proteínas solubles que pertenecen a la membrana y al citoplasma celular. El 7% del total determinado en esta fracción eran efectivamente proteínas solubles. Otros componentes son minoritarios y entre ellos, los más destacados son los fosfolípidos de membrana que significan el 5% del peso total y luego los ácidos nucleicos. El sobrenadante, obtenido después de la ruptura y separación por centrifugación, está enriquecido en proteínas. En el trabajo de Sceni *et al.* (2009) la fracción soluble se separó en tres fracciones, todas con altos contenidos de proteínas (mayores al 48%). Los contenidos fueron determinados utilizando un inhibidor de la actividad

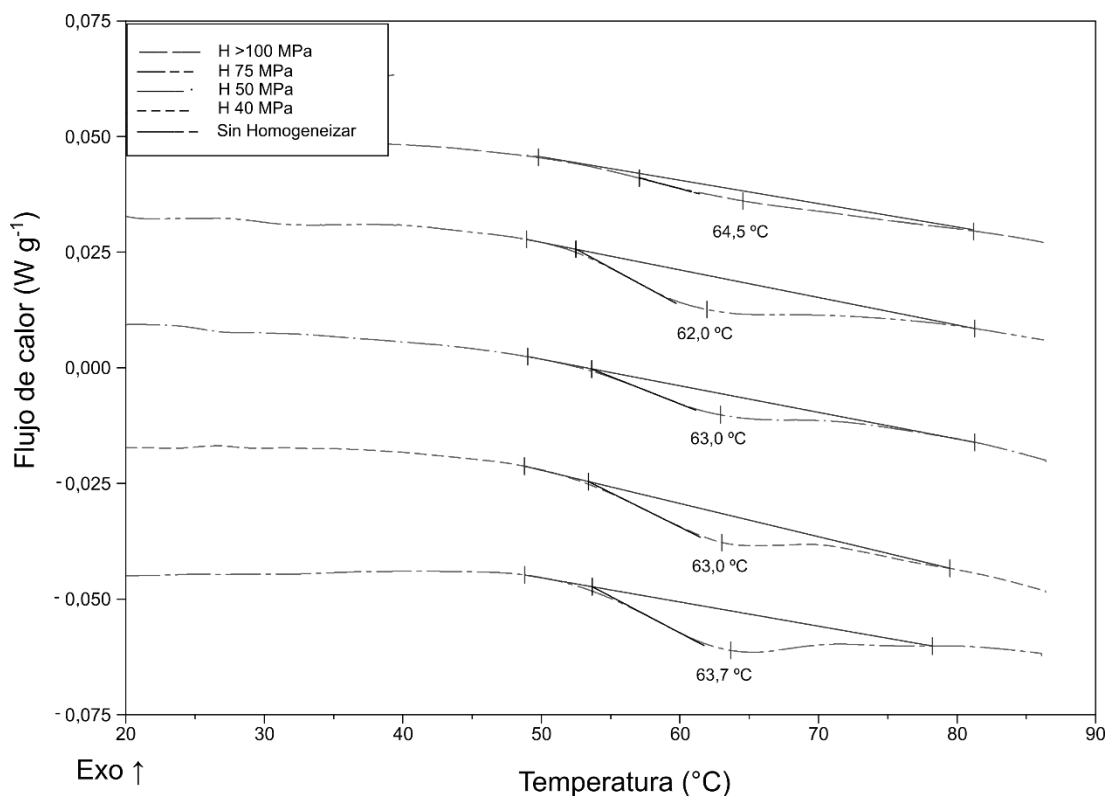
proteásica, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) dado que desde la ruptura hasta la determinación podría registrarse una proteólisis que alteraría los valores determinados de proteína cruda, corregida y soluble. Efectivamente, se observó un aumento de los valores de proteína soluble respecto de las mismas fracciones sin PMSF.

El aumento de la presión de homogeneización produjo un incremento del volumen de coágulo formado durante el tratamiento térmico. El volumen del sedimento de centrifugación se cuantificó y se obtuvo la relación entre éste y el volumen total de dispersión centrifugada. La relación pasó de 0,3 en una dispersión sin homogeneizar a 0,4 a 40 y 50 MPa y luego se incrementó a 0,6 a 75 MPa y 0,7 a 100 y 125 MPa. El aumento del volumen en el sedimento puede atribuirse al coágulo formado por las proteínas liberadas al sobrenadante, que es capaz de retener agua.

3.2.2 Calorimetría diferencial de barrido de dispersiones tratadas a diferentes presiones

En la Figura 3.2 se muestran los termogramas DSC de las dispersiones sometidas a distintas presiones de homogeneización. Se puede observar que la desnaturalización de las proteínas de levadura sin homogeneizar se centra en torno a los 64 °C, pero sucede en un amplio rango de temperaturas, que se extiende desde 50 °C hasta 80 °C. Estudios previos concuerdan con estas temperaturas y demostraron que la desnaturalización de las proteínas de las células completas de *S. cerevisiae* se da aproximadamente a los 66 °C (Otero *et al.*, 2000), lo que confirma que luego del tratamiento de homogeneización las proteínas se desnaturalizaron sólo parcialmente. Se observa que el área de la endoterma (que es proporcional a la entalpía de desnaturalización) se modificó con la presión aplicada y que aún a la mayor presión (>100 MPa) quedaron proteínas sin desnaturalizar, por lo que se hace necesario aplicar un tratamiento térmico posterior para desnaturalizarlas completamente. De acuerdo a los resultados, es posible decir que la desnaturalización de la proteína está garantizada a los 90 °C. Por esto, se seleccionó una combinación de temperaturas y tiempos que garanticen con holgura la desnaturalización proteica e inactivación enzimática: 90 °C y 20 minutos.

Figura 3.2 Termogramas obtenidos en calorimetría de barrido diferencial de dispersiones de levadura con y sin tratamiento de homogeneización a diferentes presiones

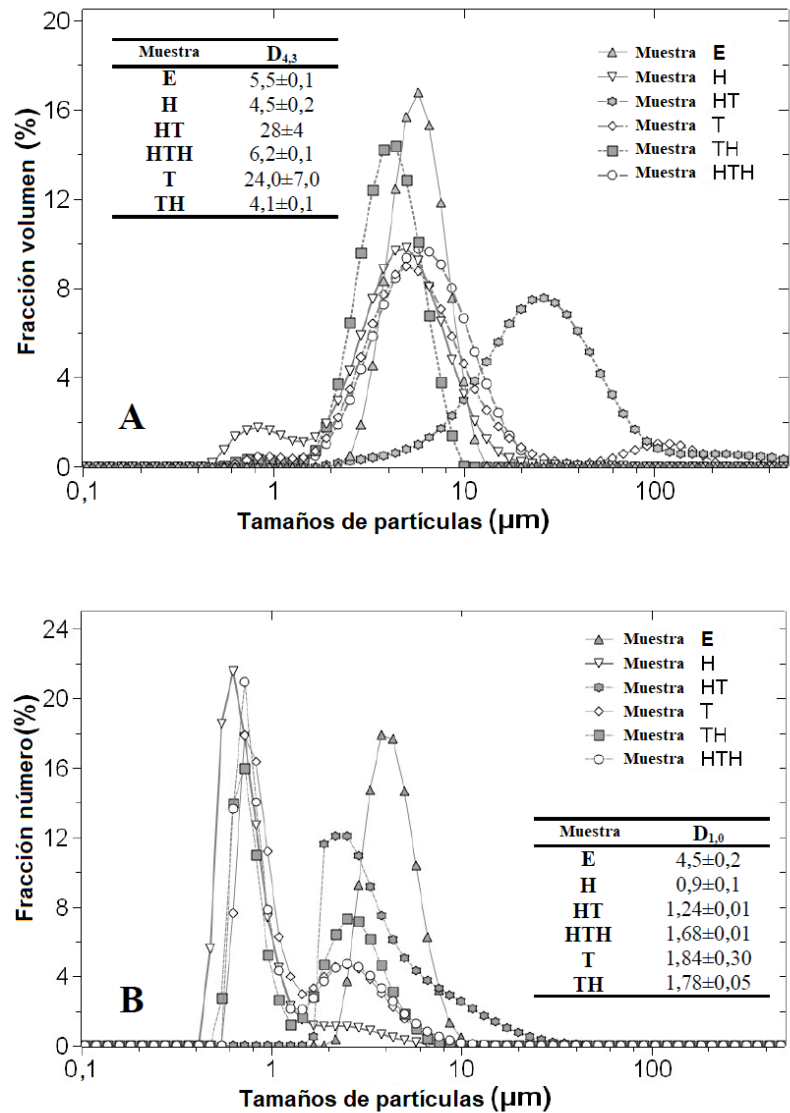


3.2.3 Distribución de tamaño de partícula de las dispersiones de levadura tratadas

Las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas a diferentes presiones de tratamiento de las dispersiones complementan lo observado en las microscopías. La figura 3.3 muestra la distribución del tamaño de partícula de las dispersiones tratadas con las combinaciones de los tratamientos de homogeneización y tratamiento térmico estudiados, según se indicó en la sección 2.1.4 del capítulo II, *Materiales y métodos*. La figura 3.3A muestra las distribuciones en fracción volumen. Las dispersiones T y H se muestran en la distribución en fracción volumen con una moda poblacional en la distribución de 5 μm . Este tamaño corresponde al de una célula que mantiene su forma original, pero con algunas fisuras que no son perceptibles por la técnica. Sin embargo, la dispersión T presentó otra población centrada en 120,2 μm , lo que indica que se formaron aglomerados durante el tratamiento térmico. El tratamiento térmico

desestabiliza la membrana celular lo que posibilita la permeación de material citoplasmático, así como desnaturaliza las proteínas liberadas y las que continúan en el espacio interno. La liberación de material interno no es masiva, porque la estructura de la pared celular continúa actuando como obstáculo para el transporte. Una vez formados los agregados internos, éstos no pueden atravesar fácilmente los poros de la pared celular. Las proteínas de pared pueden actuar como adhesivos, facilitando la aglomeración entre las células. En la muestra HT, se liberó material intracelular al medio externo producto de la primera homogenización y luego, después del proceso térmico, se produjo la desnaturalización y la agregación de proteínas (Wagner *et al.*, 2008). Esto se reflejó a través de una amplia distribución de tamaños de partículas extendida hasta 200 μm (figura 3.3A). Cuando se aplicó el tratamiento térmico antes de la homogeneización (muestra TH), los resultados mostraron una distribución de tamaño bimodal (figuras 3.3A y B). En este caso, la desnaturalización de las proteínas tuvo lugar en el citoplasma y la agregación estuvo limitada por la pared celular. Posteriormente, la homogeneización rompió estos agregados y el proceso final determinó el perfil de la distribución. Por lo tanto, el orden del tratamiento es muy importante, incluso si los tratamientos aplicados fueran idénticos, HT o TH. La muestra HTH mostró un perfil de distribución similar al de TH. En ambas muestras, los agregados se rompieron debido a la homogeneización final. El diámetro medio sobre el volumen, $D[4,3]$, también llamado media de De Brouckere, es más sensible a los procesos de agregación por el gran peso de las partículas más grandes (Palazolo *et al.*, 2011).

Figura 3.3 Comparación de las distribuciones de tamaños de partículas de dispersiones con diferentes tratamientos: A) distribución en % volumen y B) distribución en % número de muestras con diferentes tratamientos.



E: sin tratamiento, células enteras; T: sólo tratamiento térmico; H: solo homogeneización; HT: homogeneización seguido de tratamiento térmico; TH: tratamiento térmico seguido de homogeneización; HTH: homogeneización seguida de tratamiento térmico y homogeneización adicional.

Como se muestra en la figura 3.3A, los valores de $D_{4,3}$ fueron diferentes entre las muestras, probablemente debido a que la desnaturalización de la proteína ocurrió dentro de la célula en la muestra de TH y fuera de la célula en la muestra de HTH. La figura 3.3B muestra la distribución del tamaño de partícula en

fracción número con media numérica (D1,0) o también media aritmética, este valor es sensible sólo a la cantidad de partículas. La figura 3.3B muestra que las dispersiones H, TH y HTH presentaron dos poblaciones, una de ellas centrada en 1 μm , correspondiente a pequeñas partículas provenientes de la pared celular, rota debido a la homogeneización y, en el caso de la dispersión de T, debido a la solubilización de algunos componentes de la pared celular y del citoplasma.

3.3 Caracterización de películas de levadura obtenidas por dispersiones tratadas

3.3.1 Evaluación de la calidad de las películas obtenidas

Las combinaciones de tratamientos que produjeron las mejores dispersiones formadoras de películas fueron HT, TH y HTH, es importante la combinación de la homogeneización por alta presión y el tratamiento térmico. De hecho, el orden de los tratamientos influyó en las características finales de las películas. Los mejores resultados se obtuvieron en la combinación HTH con una buena manipulabilidad, continuidad y uniformidad, las dispersiones TH y HT formaron películas frágiles a la manipulación y presentaron algunas grietas en la matriz, lo que afectó la continuidad, más allá de la posibilidad de obtener películas, la ausencia de grietas es clave para poder realizar ensayos mecánicos. Estas grietas, las que no son fácilmente perceptibles a la vista y más aún las visibles, resultan en lugares de falla en el sistema, imposibilitando la obtención de características mecánicas inherentes al material del sistema, a la cantidad y calidad de los enlaces involucrados. Los resultados de los ensayos mecánicos de las películas preparadas con dispersiones HTH se entregan en el capítulo IV, donde se analiza la influencia del plastificante.

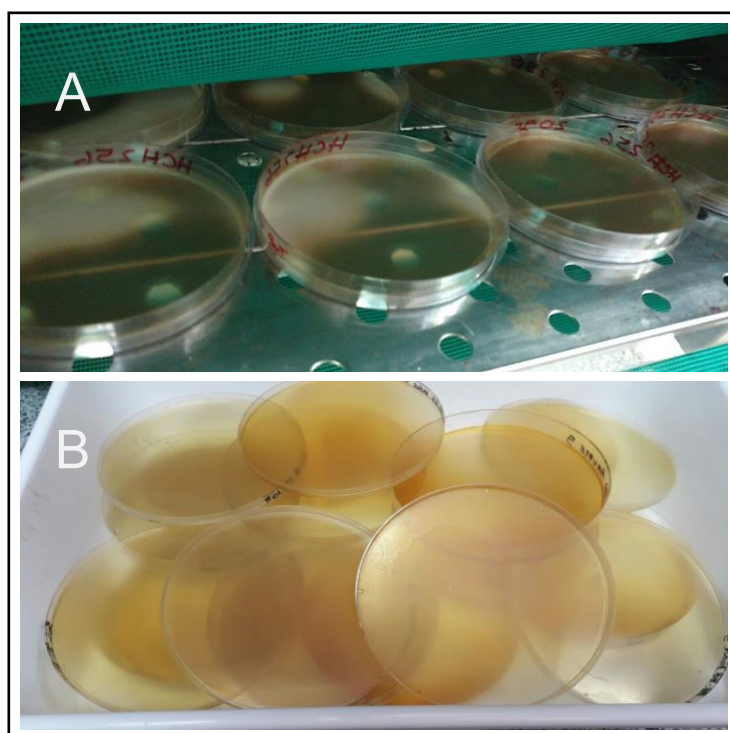
Las películas formadas a partir de dispersiones HT presentaron mayor cantidad de roturas que las TH. Esto puede deberse a la ruptura de los agregados formados durante el calentamiento a través del proceso de homogeneización. En la figura 3.4A se ven placas con dispersiones HTH durante el secado y en la 3.4B las películas obtenidas luego del *casting*.

Las combinaciones de tratamientos aplicadas a las dispersiones de levadura condujeron a suspensiones con características y propiedades que tienen

diferentes capacidades de formar películas. La homogeneización a alta presión rompió la pared celular de la levadura y el material intracelular se liberó al medio circundante como se mostró en la sección previa (Spiden *et al.*, 2013). Mientras tanto, el tratamiento térmico produjo inactivación de las reacciones enzimáticas, desnaturalización de proteínas y despliegue de la triple hélice de β -glucano presente en la pared celular (Novák *et al.*, 2012).

Cuando las proteínas se desnaturalizan dentro de la célula, forman agregados dentro de éstas, por lo que la red necesaria para dar estructura a la película no se forma. Cuando las dispersiones de levadura se homogeneizaron previamente, la escisión de la pared celular libera material intracelular, luego el tratamiento térmico produce el despliegue de proteínas y β -glucanos, las interacciones proteína-proteína se incrementan y se forman agregados. Con la segunda homogeneización los agregados se rompen finamente por lo que se obtiene una matriz homogénea para la formación de la película.

Figura 3.4 Fotografías de la preparación de películas: A) dispersiones HTH en placa durante el secado y B) películas obtenidas una vez completado el secado



A partir de los resultados obtenidos en levadura panadera, si las proteínas y el material celular general se encuentran en estado conservado, aplicando los

tratamientos necesarios es posible obtener películas a partir de la biomasa completa de la levadura.

En este punto, los resultados demostraron que es posible lograr dispersiones formadoras de película utilizando toda la biomasa y la combinación de homogeneización, tratamiento térmico y segunda homogeneización. Para que el material alcance condiciones necesarias de procesamiento es necesario realizar algunas modificaciones en las formulaciones, como la incorporación de plastificantes (Vieira *et al.*, 2011), refuerzos (Pereda *et al.*, 2011) o la modificación de la afinidad al agua para disminuir la fluctuación de las propiedades con la humedad ambiente (Slavutsky y Bertuzzi, 2015).

3.3.2 Características de hidratación

La reducción del intercambio de agua entre los alimentos y el medio ambiente es un rol importante de los materiales de envase, en particular para reducir el secado de alimentos húmedos. La solubilidad del vapor de agua en la película afecta directamente las propiedades de barrera contra la humedad, además, el aumento en el contenido de agua provoca un incremento de la deformación a ruptura y una disminución en la resistencia a la tracción y el módulo elástico debido a su acción plastificante (Cuq *et al.*, 1997a). Por lo tanto, es importante caracterizar especialmente la hidratación en la matriz de la película a través de la cinética de las isothermas de sorción de agua (Coupland *et al.*, 2000). Para caracterizar la hidratación de las películas de levaduras, se estudiaron muestras de T, TH y HTH. La película T se seleccionó para observar el efecto de un tratamiento puramente térmico y explorar los cambios en la hidratación producidos por uno o dos tratamientos de homogeneización de alta presión, la TH por la combinación de homogeneización y tratamiento térmico y la HTH porque fue la dispersión seleccionada finalmente para la preparación de las películas.

3.3.3 Cinética de la sorción de agua

La figura 3.5A muestra las gráficas de las cinéticas de la absorción de agua para la película T, TH y HTH, a 90% HR. La tabla 3.1 muestra el contenido de agua en equilibrio con el ambiente seleccionado (90% HR), obtenido de los ajustes de los datos experimentales. Se encontró que h_{∞} fue $0,31 \pm 0,01$, $0,33 \pm 0,01$ y

$0,48 \pm 0,02$ (g H₂O por g m.s.) para las películas T, TH y HTH, respectivamente. Estos valores muestran que los tratamientos sucesivos de homogeneización a alta presión de la dispersión producen un incremento en la hidratación de las películas. Esto probablemente se debe a que el material liberado desde la célula y la pared tienen diferentes procesos de hidratación. En el caso de la muestra HTH, la primera homogeneización por alta presión rompe la pared celular, permitiendo la liberación de proteínas citoplasmáticas, luego en el tratamiento térmico se agregaron, pero fuera de la estructura de la pared. En cambio, con el tratamiento térmico realizado antes de la homogeneización a alta presión, los agregados se formaron dentro del espacio celular lo que modificó la disponibilidad de los grupos hidrofílicos y, por lo tanto, produjo diferencias en la hidratación.

Los datos muestran que la absorción de agua puede ser modelada como un proceso biexponencial dependiente del tiempo para todas las muestras de películas estudiadas. La tabla 3.1 muestra ambas velocidades de absorción de agua $1/\tau_1$ y $1/\tau_2$ para las muestras estudiadas. Las velocidades obtenidas describen un proceso rápido y un proceso lento. Dado que el material citoplásmico liberado fuera de la célula es más accesible a la hidratación del agua en comparación con el complejo celular restante y que ambos tienen diferente afinidad, es razonable proponer que el comportamiento de la cinética de absorción de agua se deba a dos formas de hidratación diferentes, una de ellas a partir del material intracelular liberado (proceso rápido) y otra a partir del complejo de la pared celular (proceso lento). Además, es posible ver en la tabla 3.1 que las velocidades de sorción de agua $1/\tau_1$ y $1/\tau_2$ aumentaron con los pasos de homogeneización aplicados a la dispersión. Este efecto puede deberse a la ruptura de agregados hidrófobos y al agrietamiento de la pared celular que hacen que las moléculas de agua sean más accesibles al complejo interno. En consecuencia, la película HTH se hidrata más rápidamente y en mayor cantidad.

3.3.4 Isotermas de sorción de agua

Las porciones de películas se equilibraron a diferentes humedades relativas para obtener las isotermas de sorción de agua. Las isotermas de deshidratación comenzaron en el equilibrio a 90% HR y las isotermas de hidratación comienzan a partir de muestras completamente secas. Para las muestras de todas las

películas, se observó un ligero aumento en el contenido de agua h para valores pequeños de a_w , y un aumento significativo para $a_w > 0,6$ (figura 3.5B). El gran aumento en el contenido de agua después de $a_w = 0,6$ sugiere una hidratación mayoritaria en la zona de multicapa, con una monocapa de hidratación muy pequeña. La mayor parte del agua de hidratación es agua móvil que no está fuertemente ligada a la película.

Tabla 3.1 Parámetros de ajuste de la cinética de absorción de agua al 90% HR y los valores de los parámetros ajustados para las isotermas de sorción mostradas en las Figuras 3.5A y B, respectivamente.

Cinética de sorción (ajustada por la función biexponencial)

Película y procedimiento	h_{∞} (g H ₂ O por g m.s.)	$1/r_1$ (día ⁻¹)	$1/r_2$ (día ⁻¹)	R^2	χ^2 (10 ⁻⁵)
T	0,31 ± 0,01	2,2 ± 0,3	0,36 ± 0,04	0,9987	2,5
TH	0,33 ± 0,01	5,5 ± 0,9	0,45 ± 0,07	0,9946	4,2
HTH	0,48 ± 0,02	7,7 ± 0,9	0,53 ± 0,07	0,9991	2,4

Isotermas de sorción (ajustada por el modelo GAB)

Película	Condición de análisis	N (g H ₂ O por g m.s.)	c	k	R^2	χ^2 (10 ⁻⁵)
T	Deshidratación	0,07 ± 0,01	1,0 ± 0,1	0,90 ± 0,01	0,9968	4,25
	Hidratación	0,06 ± 0,01	1,0 ± 0,1	0,93 ± 0,01	0,9972	3,79
TH	Deshidratación	0,07 ± 0,01	1,3 ± 0,1	0,92 ± 0,01	0,9980	2,89
	Hidratación	0,06 ± 0,01	1,2 ± 0,1	0,95 ± 0,01	0,9979	3,06
HTH	Deshidratación	0,09 ± 0,01	1,5 ± 0,1	0,97 ± 0,01	0,9993	1,21
	Hidratación	0,08 ± 0,01	1,4 ± 0,1	0,98 ± 0,01	0,9996	1,13

Las cinéticas fueron ajustadas por el modelo biexponencial y las isotermas por el modelo GAB (Guggenheim – Anderson y De Boer). R^2 y χ^2 (chi cuadrado) son parámetros estadísticos.

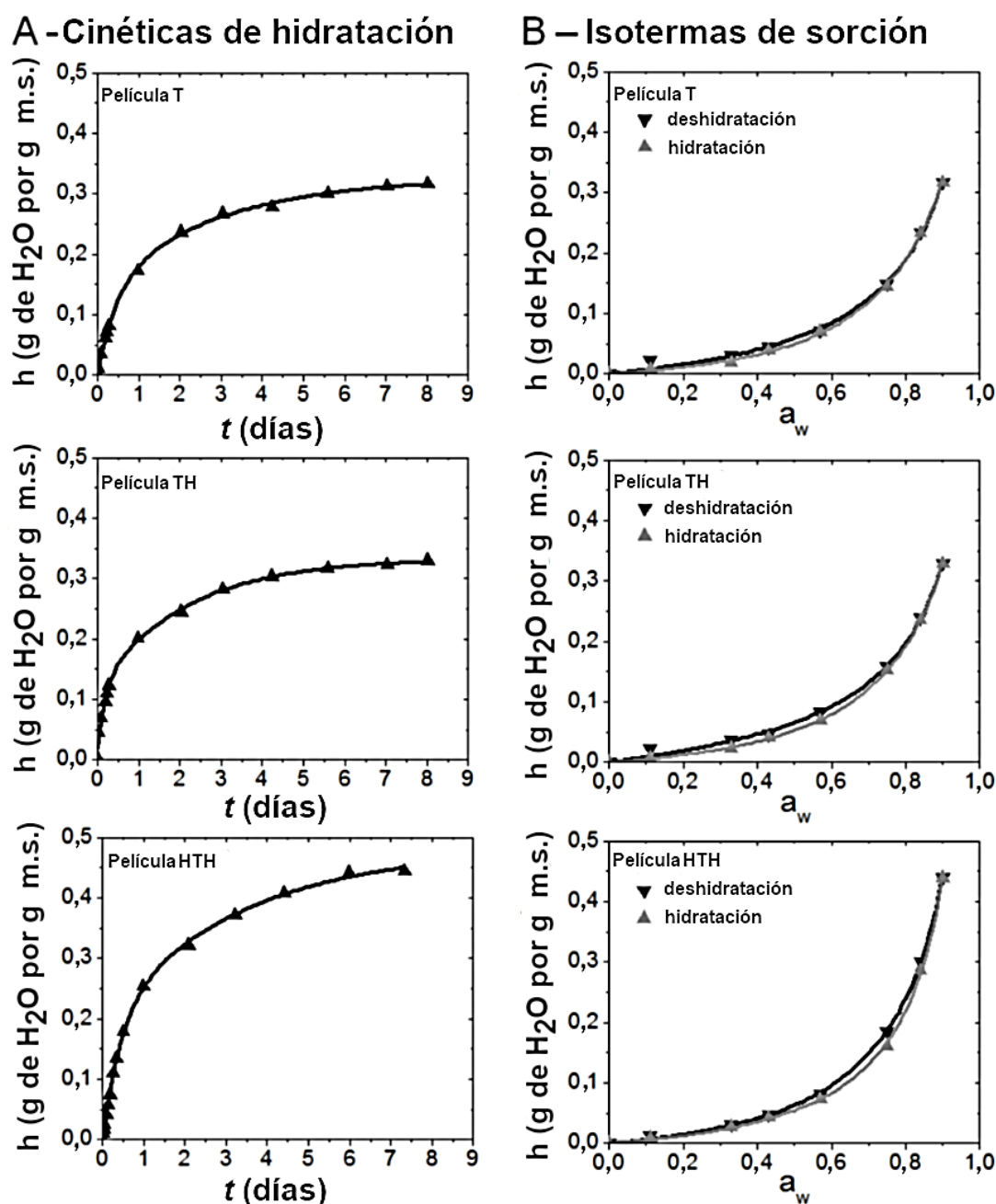
Las isotermas de deshidratación e hidratación se analizaron utilizando la fórmula de GAB descrita en la ecuación 2.2 y los parámetros ajustados se muestran en la tabla 3.1. El parámetro c está relacionado con la fuerza de la unión del agua a la monocapa y k representa la capacidad de la unión del agua a la multicapa,

ambos aumentaron con el número de homogeneizaciones aplicadas a la dispersión. Estos resultados también coinciden con que la película HTH es ligeramente más hidrófila en comparación con las muestras de película TH y T.

El ciclo completo de desorción-sorción mostró un débil efecto de histéresis, la histéresis es pequeña ya que el tratamiento térmico, primero, y el procesado por casting, luego, modificaron sitios disponibles a la interacción con el agua. Se ha informado que, para las proteínas previamente desnaturalizadas, el secado completo no produce efectos notables de irreversibilidad e histéresis en las isothermas de absorción de agua (Salvay *et al.*, 2003).

Las isothermas de sorción obtenidas para las películas de levadura son comparables con las isothermas de sorción reportadas en la literatura para películas basadas en almidón (Slavutsky y Bertuzzi, 2015 y Bertuzzi *et al.*, 2007), películas basadas en hidroxipropilmetilcelulosa (Pastor Navarro, 2010), y películas basadas en proteínas miofibrilares (Cuq *et al.*, 1997a).

Figura 3.5 Curvas de hidratación para películas de levadura T, TH y HTH: A) Cinética de la hidratación a 90% HR (24 °C) y B) Isotermas de sorción de agua: isotermas de deshidratación (▼) e isotermas de hidratación (▲).



T: sólo tratamiento térmico; TH: tratamiento térmico seguido de homogeneización; HTH: homogeneización seguida de tratamiento térmico y homogeneización adicional.

3.4 Conclusiones del capítulo III

Las células de la levadura *S. cerevisiae* demostraron ser capaces de formar películas cuando se aplicaron tratamientos específicos. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de tratamientos en el siguiente orden:

homogeneización, tratamiento térmico y homogeneización de la dispersión de levadura. Los componentes citoplasmáticos deben liberarse de las células a altas presiones de homogeneización para que estén disponibles para la formación de la película. Esa liberación debe ser anterior al proceso de calentamiento para que las proteínas puedan formar una red que constituya la matriz de la película. Si las proteínas se encuentran dentro de la célula, también se producirán los mismos procesos, pero el entramado de proteínas desnaturalizadas estará confinado a la célula y no permitirá la formación de la película.

La liberación de material intracelular tiene efectos positivos en la habilidad de formación de película porque al ser liberadas, las proteínas están disponibles para interactuar entre ellas, lo que también tiene consecuencias en la sorción de agua y la resistencia térmica. La homogeneización (H) debe ir acompañada de un tratamiento térmico (T) para inactivar las enzimas, desnaturalizar las proteínas y desplegar los polisacáridos. Las películas obtenidas con dispersiones de HTH mostraron los mejores atributos, una gran continuidad y homogeneidad sin pequeñas grietas en comparación con otras películas obtenidas de las dispersiones T o TH. La hidratación de las películas se incrementó con el número de procesos de homogeneización aplicados a las dispersiones de levadura y podría relacionarse también con los mejores atributos mecánicos requeridos para la manipulación de la película. De acuerdo con los resultados obtenidos, la biomasa de levadura debe considerarse como una alternativa valiosa a las fuentes tradicionales de polímeros biodegradables para generar nuevas películas biodegradables. Debe ser procesada por los tratamientos físicos correctos en un determinado orden para desarrollar el potencial de la biomasa.

En el siguiente capítulo se caracterizarán las propiedades de las películas obtenidas por el procedimiento seleccionado, y plastificadas con glicerol en diferentes porcentajes.

Capítulo IV: ¿Cómo influye el plastificante en las características de las películas?

4.1 Introducción

Los plastificantes aumentan la flexibilidad de la película debido a su capacidad para reducir las interacciones entre las cadenas de polímeros, generalmente son moléculas pequeñas con varios grupos hidroxilo disponibles para establecer interacciones de tipo puente de hidrógeno. Para poder ser plastificantes deben ser compatibles y miscibles con el polímero a plastificar. Los plastificantes más comúnmente usados en películas basadas en biopolímeros son los polioles, como el glicerol (Mali *et al.*, 2004). Las películas hechas de polímeros naturales son frágiles y tienen baja capacidad de deformación a ruptura. Ya sea para su procesamiento industrial o para su aplicación final, es necesaria la incorporación de plastificantes para mejorar la manipulabilidad y la procesabilidad de las películas. El objetivo principal de este capítulo fue caracterizar las películas obtenidas a partir de biomasa de levadura con agregado de plastificante en tres aspectos centrales: comportamiento mecánico, hidratación y características térmicas, así como la relación con el glicerol como plastificante.

4.2 Caracterización térmica de las películas

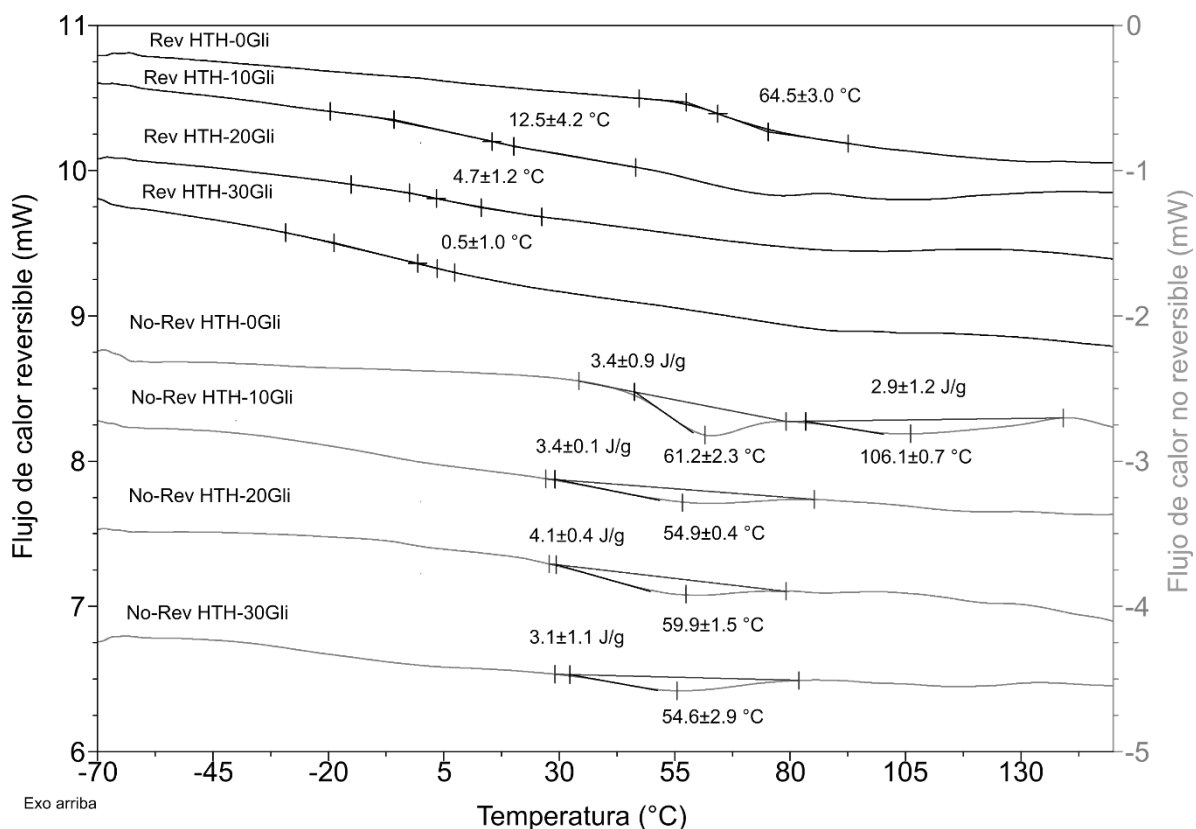
4.2.1 Calorimetría diferencial de barrido con modulación de temperatura (MDSC)

En la figura 4.1 se muestran los termogramas de las películas HTH con diferente contenido de glicerol. En dicha figura se muestra el flujo reversible y no reversible determinado a partir del ensayo con modulación de temperatura. Las muestras se estudiaron en condiciones secas para observar eventos térmicos independientemente del contenido de agua de las películas que también puede ejercer un efecto de plastificación. Cuando se incorporó plastificante a las formulaciones, como puede esperarse en un sistema plastificado (Chaudhary *et al.*, 2011; Lourdin *et al.*, 1997), la temperatura de transición vítrea (T_g) disminuyó (flujo reversible, figura 4.1). En la muestra HTH-0Gli se encontró una T_g a $64,5 \pm 3,0$ °C. Las películas HTH sin incorporación de glicerol resultaron muy frágiles para la tracción en condiciones ambientales, ésto se debe al estado

vítreo de las muestras, ya que la T_g se encontró muy por encima de la temperatura ambiente. Cuando se agregó un 10% de glicerol, (HTH-10Gli), la T_g descendió a $12,5 \pm 4,2$ °C que, por estar debajo de la temperatura ambiente, implica un estado gomoso en la película y, por ende, un aumento de la flexibilidad. La incorporación adicional de glicerol produjo una disminución mayor en los valores de T_g , encontrándose temperaturas de $4,7 \pm 1,2$ °C y $-0,3 \pm 1,2$ °C, para las muestras HTH-20Gli y HTH-30Gli, respectivamente. A diferencia de lo que sucede en las muestras amorfas de sustancias puras o en formulaciones de composición simple, donde la temperatura de transición vítrea implica un rango de temperatura estrecho, las muestras de múltiples componentes compuestas por proteínas y polisacáridos, pueden involucrar rangos de temperatura más grandes y su forma puede no ser tan marcada como sucede en algunos polímeros sintéticos (Jara y Pilosof, 2009). Partiendo del análisis térmico, la selección apropiada de la cantidad de glicerol podría ubicarse entre 20 y 30% debido a que garantizan el estado gomoso, de mayor elasticidad. Para la elección deberá pesarse también el comportamiento en hidratación y en los ensayos de tracción uniaxial.

En el flujo de calor no reversible se observaron dos endotermas en las muestras sin glicerol, las temperaturas de estas endotermas fueron $61,2 \pm 2,3$ °C y $106,1 \pm 1,0$ °C. Es posible que estos eventos estén relacionados con los β -glucanos de acuerdo a una revisión bibliográfica previa (Novak *et al.*, 2012) y a experiencias previas realizadas a este trabajo en β -glucano purificado por el procedimiento de Thammakiti *et al.* (2004). La primera endoterma estuvo presente en todas las formulaciones (plastificadas y no plastificadas) y su energía asociada varió de $3,4 \pm 0,9$ J g⁻¹ en HTH-0Gli a $3,1 \pm 1,1$ J g⁻¹ en HTH-30-Gli. La segunda endoterma fue un evento de baja entalpía asociada y no se encontró en las muestras con plastificante, como puede observarse en la figura 4.1, con respecto a esta segunda endoterma, en la bibliografía consultada no hay una atribución clara a una transición en alguno de los polímeros levadura. La técnica MDSC permitió reconocer eventos superpuestos en HTH-0Gli (transición vítrea y endoterma), lo que remarca la utilidad de esta función.

Figura 4.1 Termogramas MDSC de las muestras HTH sin plastificante y diferentes cantidades de glicerol agregadas, en la sección superior se muestran las señales de flujo de calor reversible y en la parte inferior, las señales de flujo de calor no reversible



En las películas poliméricas, se cree que las moléculas de plastificante reducen el número y la fuerza de atracción entre las cadenas de polímeros, para aumentar la flexibilidad del sistema (Lieberman y Gilbert, 1973). Es importante tener en cuenta que el agua de hidratación de una película también actúa como plastificante y las películas se vuelven más frágiles en condiciones de baja hidratación (Coupland *et al.*, 2000). El estudio de los cambios en la transición vítrea (T_g) para explicar el efecto de las moléculas plastificantes en el comportamiento de las películas fue realizado previamente por varios autores (Kristo *et al.*, 2008; Mali *et al.*, 2006; Gontard y Ring, 1996). Es importante conocer la temperatura a la que se produce el cambio entre el estado vítreo y el gomoso para proponer una aplicación correcta del material, así como conocer la compatibilidad entre el plastificante y el polímero o la mezcla de polímeros utilizados y el efecto de cantidad de plastificante añadido. Si se usa una cantidad muy grande o muy pequeña de plastificante, la barrera al vapor de agua y/o las

propiedades mecánicas de la película podrían fallar con respecto a la aplicación seleccionada (McHugh y Krochta, 1994). Si la cantidad es demasiado grande, se puede dificultar la separación de la película del soporte donde se realizó la evaporación del agua, o también, el plastificante puede ser exudado luego de la obtención de las películas por haberse superado el límite de miscibilidad.

4.2.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de las muestras mostró un perfil de degradación múltiple con diferentes zonas de degradación, como se observa en la figura 4.2. En esta figura se describen el peso (%) y la función derivada del peso con respecto a la temperatura (% °C⁻¹). La primera zona de pérdida de peso, hasta 140 °C, se atribuyó a la evaporación del agua y la pérdida de moléculas de bajo peso. La segunda zona, de 140 °C a 225 °C, corresponde al comienzo de la degradación parcial del glicerol y de las proteínas (más cerca del extremo superior del rango de temperaturas). En el caso de las proteínas, la degradación fue analizada en mayor detalle a través de espectroscopía de infrarrojo (sección 4.3). Guerrero *et al.*, (2010) obtuvieron resultados similares en películas hechas a partir de aislados de proteína de soja y reportaron una degradación sustancial del material a más de 180 °C. En esta segunda zona, hay al menos dos eventos diferentes, el primero con la temperatura de pico en 175 °C y el segundo caso a 211 °C. Si bien a primera vista parece que estas temperaturas tienden a disminuir con la adición de plastificante, no hubo diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, la intensidad y la magnitud del segundo máximo de velocidad se vieron afectados por la presencia de glicerol, lo que muestra la influencia del plastificante en esta zona de transición. Se realizó una prueba adicional (datos no mostrados) sobre glicerol puro utilizado para plastificar las películas y el perfil TGA mostró la temperatura de degradación inicial a 152 °C y el centro a 247 °C, estos datos fueron consistentes con los descritos en la literatura (Arrieta *et al.*, 2013). Retomando la descripción, la degradación del glicerol comienza en la segunda zona de degradación y continúa en la tercera zona. La tercera zona de degradación de 224 °C a 359 °C, con la temperatura media de pico a 309 °C, se atribuyó a la degradación por pirólisis de β -glucano y a la descomposición masiva de proteínas y otros compuestos orgánicos (Novák *et al.*, 2012; Roca *et al.* 2012; Rudnik *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013). Finalmente,

después de 359 °C comienza la última zona, con dos eventos más que completan la degradación térmica de las muestras. El residuo final a 600 °C se vio lógicamente afectado por la presencia y la cantidad de glicerol agregado. Los residuos de carbono disminuyeron de $28,1 \pm 1,0\%$ a $18,6 \pm 0,9\%$ para muestras con 0% y 30% de glicerol respectivamente. La tabla 4.1 muestra los parámetros obtenidos a partir de curvas TGA como T_{90} y la temperatura media de degradación correspondientes a las zonas de degradación 2 y 3 y los residuos finales a 600 °C. La presencia de glicerol afectó a T_{90} y disminuyó 50 °C para las muestras plastificadas HTH-20Gli o HTH-30Gli. La plastificación de la película expone a las cadenas de polímeros aún más a la degradación térmica.

A partir de estos resultados, el procesamiento de la levadura con glicerol podría ser llevado a cabo hasta 150 °C sin ninguna degradación sustancial en los polímeros que lo componen. Otros autores han informado la utilización de temperaturas inferiores a 150 °C para obtener películas por soplado de caseinato de sodio, utilizando un extrusor de doble tornillo en rotación conjunta (Belyamani *et al.*, 2014). La elección de la temperatura depende también del tiempo de exposición del material.

Las proteínas y los polisacáridos se caracterizan porque las temperaturas a las que pueden ser procesados antes de degradarse son más bajas que las de muchos polímeros sintéticos. Dado que la mayoría de las técnicas industriales de procesamiento requieren que el material fluya para ser trabajado, las temperaturas seleccionadas para trabajar proteínas y polisacáridos suelen estar cercanas al límite de degradación. La característica termoplástica de algunos de estos materiales aparece a temperaturas cercanas a su degradación, lo que dificulta su procesamiento y reprocesamiento. Esta característica ha limitado la aplicación industrial de los polímeros en envases y el paso de los desarrollos alcanzados a baja escala en los laboratorios a la producción industrial. Hernández-Izquierdo y Krochta (2008) realizaron una revisión del procesamiento industrial de proteínas, el método más difundido entre los trabajos de investigación es el de moldeo por compresión, probablemente debido al equipamiento necesario a diferencia del utilizado para extrusión, que requiere una inversión mayor. Las temperaturas elegidas en diferentes casos fueron 150 °C para proteínas de soja (Cunningham *et al.*, 2000), 140 °C para proteínas de suero de leche (Sothornvit *et al.*, 2007), mientras que, para gluten de trigo,

Pommet *et al.* (2005) utilizaron un programa de temperaturas y la temperatura más alta fue de 130 °C. Por el lado de los polisacáridos, López *et al.* (2014) seleccionaron una temperatura de 140 °C para el moldeo por compresión de almidón termoplástico e incluyeron diferentes cantidades de quitosano a modo de refuerzo. Mendes *et al.* (2018) seleccionaron un perfil de temperaturas del tornillo de 120 – 140 °C para la extrusión de almidón termoplástico, mientras que para el procesamiento de quitosano las temperaturas fueron más bajas, entre 90 y 110 °C. Estas temperaturas son más bajas que las normales utilizadas para polímeros sintéticos, no debe olvidarse que los polímeros naturales son procesados por equipos preparados para polímeros sintéticos. Es de esperar que aquellos que mejor se adapten a las condiciones de procesamiento de los polímeros sintéticos sean los de mejor inserción.

Figura 4.2 Curvas de degradación térmica de muestras HTH con diferentes porcentajes de glicerol y la derivada del peso con respecto a las temperaturas obtenidas del análisis en TGA.

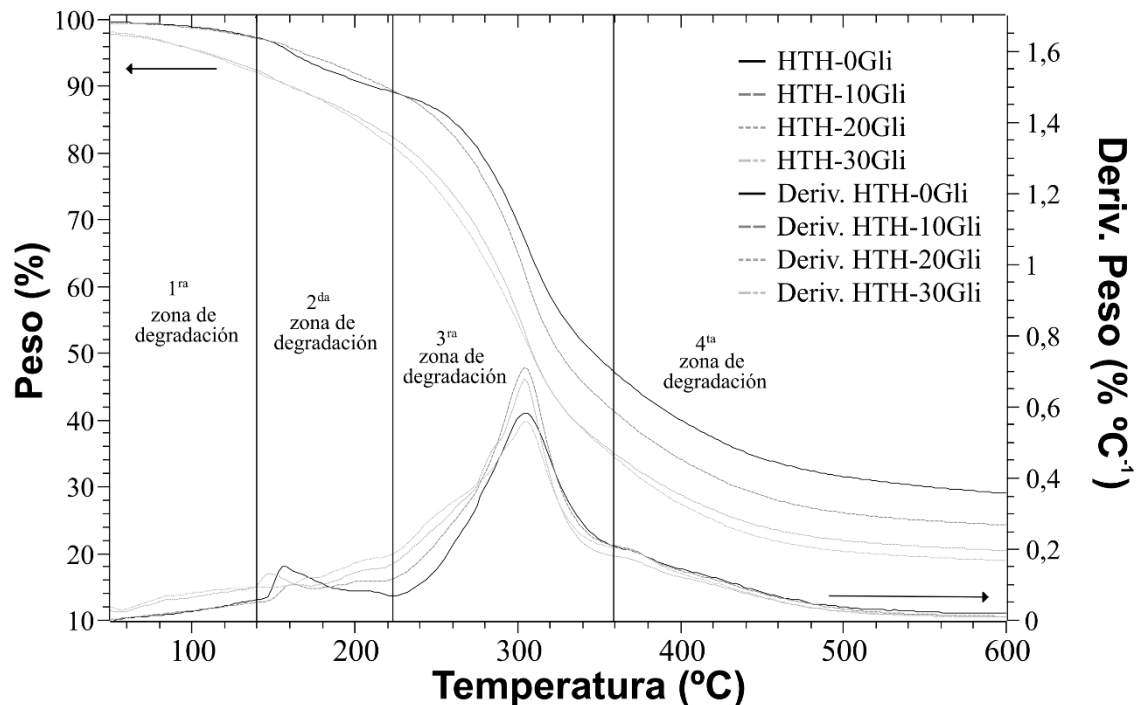


Tabla 4.1 Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de degradación (TGA) de las películas HTH en el rango de 30 a 600 °C

Muestra y cantidad de glicerol (%)	Temperatura de pico					
	T ₉₀ (°C)	2 ^{da} zona de degradación				Residuo final a 600 °C (%)
					T _{pico2} Máx. velocidad de descomp. (°C min ⁻¹)	
		T _{pico1} (°C)	T _{pico2} (°C)	3 ^{ra} zona T _{pico} (°C)		
HTH-0Gli	196,4 ± 13,3 ^a	168,8 ± 11,6 ^a	212,4 ± 4,5 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	307,9 ± 2,6 ^a	27,9 ± 0,9 ^a
HTH-10Gli	208,2 ± 15,8 ^a	174,3 ± 14,0 ^a	208,8 ± 4,4 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	306,8 ± 6,4 ^a	25,6 ± 2,1 ^a
HTH-20Gli	150,0 ± 23,3 ^b	173,8 ± 21,9 ^a	208,0 ± 3,8 ^a	0,15 ± 0,02 ^b	306,5 ± 2,7 ^a	20,6 ± 0,5 ^b
HTH-30Gli	147,5 ± 12,2 ^b	183,6 ± 12,0 ^a	215,2 ± 8,0 ^a	0,20 ± 0,02 ^c	312,8 ± 6,2 ^a	19,2 ± 1,3 ^b

Las zonas de degradación corresponden a las indicadas en la figura 4.2. Letras diferentes en cada columna indican una diferencia estadística significativa ($P < 0,05$).

4.3 Espectroscopía en infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

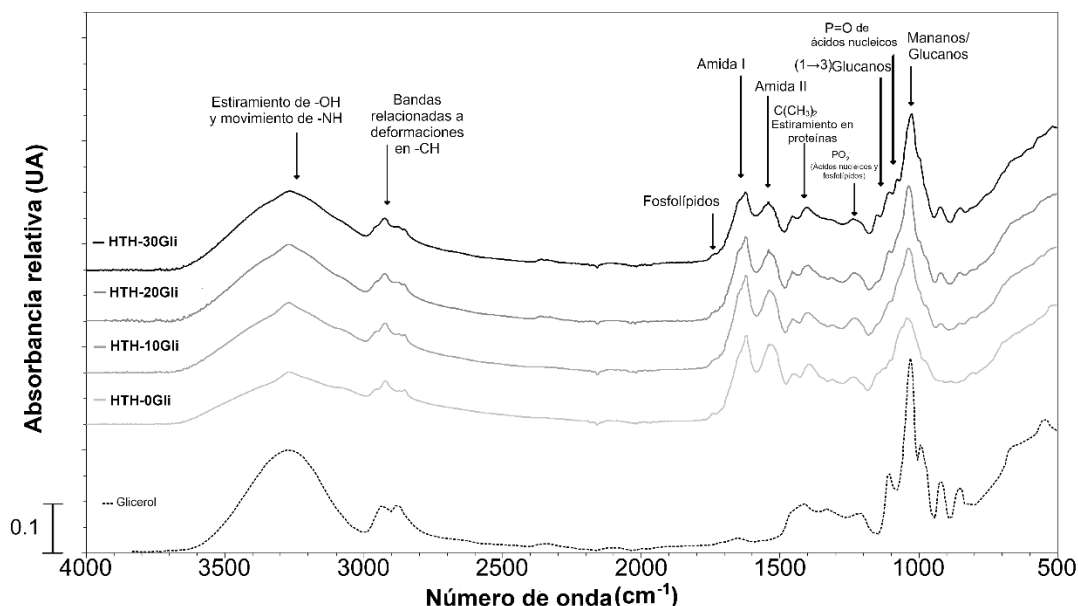
En la figura 4.3, se muestran los espectros obtenidos de las películas HTH y las bandas típicas donde se produce la influencia del glicerol. Las bandas de absorción de los compuestos que integran la biomasa de *S. cerevisiae* están bien descritas y se correspondieron con los informes previos de otros autores (Burattini *et al.*, 2008; Padmavathy *et al.*, 2003; Galichet *et al.*, 2001; Šandula *et al.*, 1999). Los espectros mostraron picos característicos relacionados con proteínas como las bandas amida, así como de ácidos nucleicos y glucanos. El espectro de una macromolécula con una gran variedad de grupos funcionales o

una mezcla de compuestos puede ser muy complejo para su interpretación y la atribución de cada banda es una tarea difícil. Padmavathy *et al.* (2003) dividieron el espectro infrarrojo de la levadura nativa en cuatro zonas para su mejor comprensión. Estos autores identificaron una primera región relacionada con los grupos funcionales –OH y –NH ($3800\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). Luego, una zona relacionada con las proteínas, que incluye a las bandas amida I, II y otras ($1650\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$), una tercera zona estrecha ($1290\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) correspondiente a los ácidos nucleicos y una cuarta zona ($1180\text{-}790\text{ cm}^{-1}$) con mayoría de bandas relacionadas a carbohidratos. Si bien esta aproximación permite un abordaje más sencillo del espectro, no deja de ser una simplificación, ya que existen múltiples compuestos cuyos grupos funcionales absorben dentro de estos rangos y no fueron discriminados. En particular, en las películas HTH, independientemente del contenido de glicerol, la banda observada a 3271 cm^{-1} se debe a la flexión de los grupos hidroxilo y las bandas a 2922 cm^{-1} y 2852 cm^{-1} corresponden a vibraciones en el carbono α directamente unido al hidroxilo. En esa misma zona pueden aparecer movimientos asociados a las insaturaciones de fosfolípidos y ácidos grasos insaturados. En la región proteica se destacan cuatro bandas: 1622 cm^{-1} , 1541 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} y 1398 cm^{-1} . La banda amida I (1622 cm^{-1}) se debe al estiramiento del enlace C=O, mientras que la banda amida II tiene una importante contribución de la flexión del enlace N-H del nitrógeno del enlace peptídico y una contribución menor de la flexión del enlace C-N.

Varios investigadores describieron la banda de absorción a 1230 cm^{-1} (Burattini *et al.*, 2008; Padmavathy *et al.*, 2003; Galichet *et al.* 2001) y la atribuyeron al estiramiento asimétrico del PO_2^- a partir de ácidos nucleicos y fosfolípidos. La presencia de fosfolípidos también fue evidenciada en la banda de absorción a 1750 cm^{-1} . Numerosas bandas próximas a 1000 cm^{-1} están relacionadas con la presencia de piranosa, glucanos o mananos (920 cm^{-1} , 995 cm^{-1} , 1031 cm^{-1} , 1103 cm^{-1} , 1147 cm^{-1}) (Salman *et al.*, 2010, Šandula *et al.*, 1999). La banda ancha y de gran intensidad observada en 1031 cm^{-1} corresponde a las contribuciones de mananos y glucanos (Burattini *et al.*, 2008). Muchos autores han informado un pico a 1080 cm^{-1} relacionado con el estiramiento simétrico en grupos de fosfato en ácidos nucleicos (Salman *et al.*,

2010). Sin embargo, la intensidad de este pico probablemente se superpone con el pico a 1076 cm^{-1} debido a enlaces en los polisacáridos (β -glucano).

Figura 4.3 Espectros de FT-IR de las películas HTH y la influencia de la cantidad de glicerol incorporado



Las flechas marcan las bandas principales de los espectros de las películas HTH.

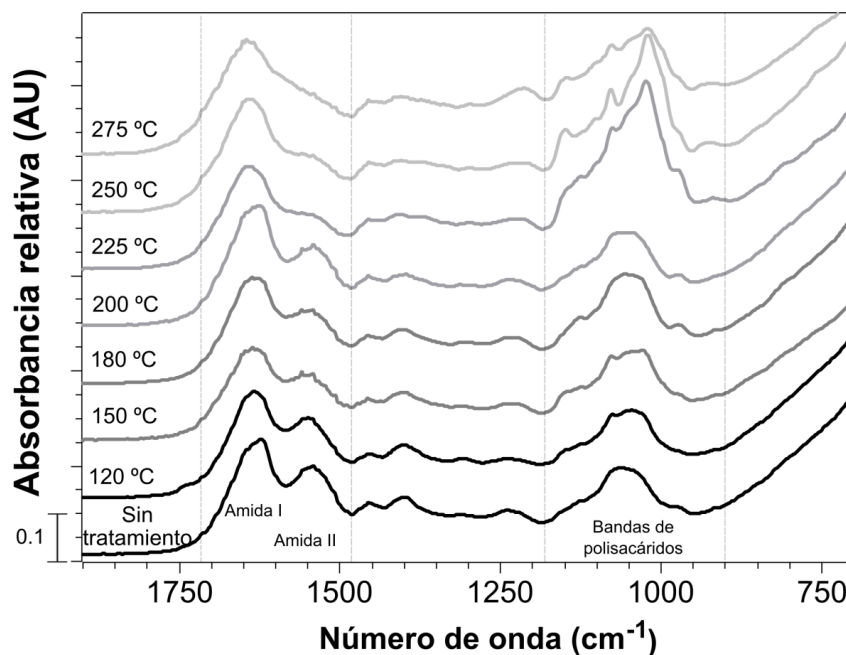
El glicerol influyó en varias bandas del espectro de absorción en infrarrojo de la biomasa de levadura. En la figura 4.3, se muestran los espectros obtenidos de muestras con y sin glicerol agregado, el espectro de glicerol se proporciona a modo de comparación. Como se esperaba, las bandas a 3265 cm^{-1} , 2877 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} , 1107 cm^{-1} , 1031 cm^{-1} , 986 cm^{-1} , 921 cm^{-1} y 850 cm^{-1} aumentaron su intensidad con cantidades crecientes de glicerol, porque el plastificante tiene una absorbancia significativa en estos números de onda. En el caso de la banda centrada a 1031 cm^{-1} , cuando se añadió glicerol el aumento fue notorio y se produjo un ligero movimiento del máximo de absorción hacia menores longitudes de onda, mientras que la banda amida II (1456 cm^{-1}) disminuyó su intensidad con el plastificante; este comportamiento podría atribuirse a la sensibilidad al establecimiento de puentes de hidrógeno de este grupo funcional (Gao *et al.*, 2006).

Se evaluaron los residuos de una película HTH-0Ggli obtenidos después del tratamiento térmico (en ensayo TGA) con interrupción a diferentes temperaturas,

se llevó a cabo mediante ATR-FTIR, para comprender cómo ocurre la degradación térmica de las macromoléculas que constituyen la película de levadura durante el ensayo.

No se observaron cambios apreciables en los residuos obtenidos después de calentar la muestra hasta 120, 150, 180 y 200 °C (figura 4.4). Esto significa que cuando se calientan las muestras hasta 200 °C, los eventos de degradación ocurridos en TGA pueden corresponder a una degradación parcial de proteínas que involucra residuos de la cadena lateral y no a la ruptura de la unión peptídica (Kasarda y Black, 1968). Sin embargo, de 225 °C a 275 °C se observaron varios cambios en los espectros, como la gradual desaparición de la banda amida II. Al mismo tiempo, la banda correspondiente a los polisacáridos a 1031 cm^{-1} aumentó su intensidad a temperaturas de 225 °C a 250 °C, y se observó una clara separación de las bandas a 1031 y 1076 cm^{-1} . Dado que los mananos están unidos a proteínas naturalmente (formando mananoproteínas) y la degradación de los polisacáridos fue incipiente a 250 °C, los cambios observados en los espectros son esperables de acuerdo a la naturaleza y distribución de los compuestos.

Figura 4.4. Espectros FT-IR de muestras sin glicerol (HTH-0Gli) degradadas térmicamente por TGA hasta diferentes temperaturas



Estos resultados están en concordancia con otros resultados de películas elaboradas a partir de materiales biodegradables tales como las proteínas de la

leche y la gelatina (Barreto *et al.*, 2003). En esos estudios, se informó que a más de 200 °C se produjo una importante degradación térmica de la amida, disminuyendo la intensidad relativa entre las bandas amida I y II. Debido a que la degradación de la banda de la amida II implica la liberación de amoníaco de la muestra, los mismos autores observaron las bandas de absorción de amoníaco a 930, 970 y 3335 cm⁻¹ en la salida de los gases de TGA con un dispositivo que permitía el posterior análisis de los mismos en un equipo de espectroscopía en infrarrojo.

4.4 Evaluación de las propiedades mecánicas

La incorporación del plastificante resultó en reducciones sustanciales en los valores de módulo elástico y en los de resistencia a la tracción, como se muestran en la tabla 4.2. Este resultado demostró claramente el rol del plastificante a nivel molecular a medida que se produjeron cambios en el espaciado entre las moléculas, se vieron disminuidas las interacciones de corto alcance (hidrofóbicas) entre proteína – proteína, glucano - proteína o glucano – glucano, entre otros, permitiendo una mayor movilidad. Esta mayor capacidad de movimiento, resultó macroscópicamente en una mayor deformación a ruptura, en un menor módulo y un comportamiento de plástico deformable, característicos del estado amorfo goma, las curvas esfuerzo - deformación presentaron regiones elásticas y plásticas con características de plástico flexible o dúctil sin formación de cuello. En la figura 4.5 se muestra la flexibilidad de las películas plastificadas (figura 4.5A) y también se muestra que son translúcidas (figura 4.5B).

Tabla 4.2 Propiedades mecánicas de las películas plastificadas

Muestra y cantidad de glicerol (%)	Módulo elástico (MPa)	Deformación a ruptura (%)	Resistencia a la tracción (MPa)
HTH-10Gli	88 ± 7 ^a	7,0 ± 1,8 ^a	3,1 ± 0,3 ^a
HTH-20Gli	31 ± 4 ^b	12,1 ± 2,1 ^b	1,4 ± 0,1 ^b
HTH-30Gli	9 ± 2 ^c	11,0 ± 1,5 ^b	0,7 ± 0,1 ^c

Letras diferentes en cada columna indican una diferencia estadísticamente significativa (P <0,05).

Los valores obtenidos en el módulo elástico y en el esfuerzo máximo fueron similares a los informados en películas preparadas a partir de aislado de proteína de soja con cantidades significativamente más altas de glicerol (Guerrero *et al.*, 2010). En este trabajo, los autores también observaron una disminución en la resistencia a la tracción y el módulo elástico con la adición de plastificante. En contraste con los resultados de este trabajo, las películas de proteína de soja tuvieron un mejor desempeño con respecto a la deformación a ruptura.

Figura 4.5 Fotografías de películas HTH con plastificante: A) flexibilidad y B) Transparencia de la película



Ciannamea *et al.* (2014) informaron que las películas preparadas a partir de concentrado de proteína de soja con gran cantidad de glicerol (30 - 50%) alcanzaron una deformación a ruptura de 15-20%. Por otra parte, Novák *et al.* (2012) informaron que películas producidas con β -glucano purificado de levadura y 25% p/p de glicerol alcanzaron un módulo elástico varias veces mayor (712 ± 31 MPa) que el módulo informado en este trabajo. La deformación a la rotura ($14,16 \pm 1,11\%$) fue similar en el polímero purificado respecto de las películas de biomasa de levadura. Este resultado trae a consideración si es necesario realizar los pasos de purificación para extraer un componente o un grupo de componentes. La respuesta no es sencilla, ya que depende mayormente de la aplicación. Es posible que al recuperar el β -glucano se gane

en transparencia y en módulo, pero al descartar la otra fracción se pierde una fracción valiosa que también puede formar películas.

4.5 Características de la influencia del plastificante en la hidratación de las películas

Una función clave de los materiales de envasado, incluidas las películas obtenidas a partir de biopolímeros en ese grupo, es reducir el intercambio de agua entre los alimentos y el medio ambiente, en particular reducir la deshidratación de alimentos húmedos, así como la hidratación de alimentos secos. Las propiedades de barrera de una película al vapor de agua dependen tanto del coeficiente de difusión como de la solubilidad del agua en la película (McHugh y Krochta, 1994). La cinética de la sorción de agua permite obtener información sobre la movilidad del agua en la película a través de la determinación de la velocidad de hidratación y las isotermas de sorción de agua son una forma de caracterizar la solubilidad del agua en las películas.

4.5.1 Cinética de la sorción de agua

La figura 4.6A muestra la cinética de la absorción de agua al 90% HR para películas con diferentes porcentajes de glicerol (0, 10, 20, 30% p/p m.s.). En la tabla 4.3 se informan los parámetros obtenidos de los ajustes de los datos experimentales con el modelo Pilosof-Boquet-Bartholomai. Se encontró que la incorporación de glicerol en las películas produce un incremento en h_{∞} , la hidratación en equilibrio al 90 % HR, y una disminución en la constante cinética de velocidad, K . La inclusión de una sustancia hidrofílica facilita la interacción con las moléculas de agua por la disponibilidad de grupos hidroxilo. Por otro lado, la velocidad a la que el proceso de hidratación alcanza el equilibrio disminuye cuando aumenta el contenido de glicerol. Esto puede deberse al hecho de que una mayor cantidad de moléculas de agua se deben acomodar en la matriz polimérica, lo que aumenta el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

4.5.2 Isotermas de sorción de agua

Las isotermas de sorción de las películas con diferentes porcentajes de glicerol (0, 10, 20, 30 % p/p m.s.) se muestran en la figura 4.6B. La tabla 4.4 muestra los parámetros obtenidos al ajustar los datos experimentales con la ecuación del

modelo GAB. Es posible ver en la figura 4.6B que la incorporación de glicerol en las muestras produjo un aumento en la cantidad de agua de hidratación sin modificar la forma de las isothermas. En todas las isothermas de sorción se pueden ver dos regiones distintas. Por una parte, la humedad de equilibrio aumentó levemente con la actividad del agua hasta 0,6 y a partir de él se produjo un fuerte aumento de la humedad de equilibrio de las películas estudiadas. Esta forma de isoterma de sorción sugiere una hidratación en forma de multicapa, con una pequeña monocapa de hidratación. De esta manera, la mayor parte del agua de hidratación es agua móvil y no está fuertemente ligada a la película. Los resultados de la tabla 4.4 muestran que el parámetro N no fue alterado por la presencia de glicerol, mientras que c y k aumentaron con la cantidad de glicerol en la película.

La forma y el contenido de agua en la isoterma de la película sin glicerol de la figura 4.6B fue similar a otras películas sin plastificante como las películas basadas en celulosa (Chinnan y Park, 1995), almidón (Bertuzzi *et al.*, 2007), hidroxipropilmetilcelulosa (Pastor Navarro, 2010), proteínas miofibrilares (Cuq, *et al.*, 1997a) y películas basadas en caseinato de sodio (Kristo *et al.*, 2008).

Tabla 4.3 Características de hidratación de las películas plastificadas con glicerol

Muestra y porcentaje de glicerol (%)	h_{∞} (g H ₂ O por g m.s.)	B (día)	$K=1/(h_{\infty}B)$ (g m.s. por g H ₂ O por día)	R^2
HTH-0Gli	$0,49 \pm 0,01^a$	$1,0 \pm 0,1^a$	$2,0 \pm 0,2^a$	0,9977
HTH-10Gli	$0,57 \pm 0,01^b$	$1,2 \pm 0,1^{ab}$	$1,5 \pm 0,1^b$	0,9978
HTH-20Gli	$0,68 \pm 0,02^c$	$1,5 \pm 0,2^b$	$1,0 \pm 0,1^c$	0,9929
HTH-30Gli	$0,79 \pm 0,02^d$	$1,6 \pm 0,2^b$	$0,8 \pm 0,1^c$	0,9924

Letras diferentes en cada columna indican una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Tabla 4.4 Parámetros del modelo GAB obtenidos de las curvas de hidratación de películas con y sin glicerol incorporado

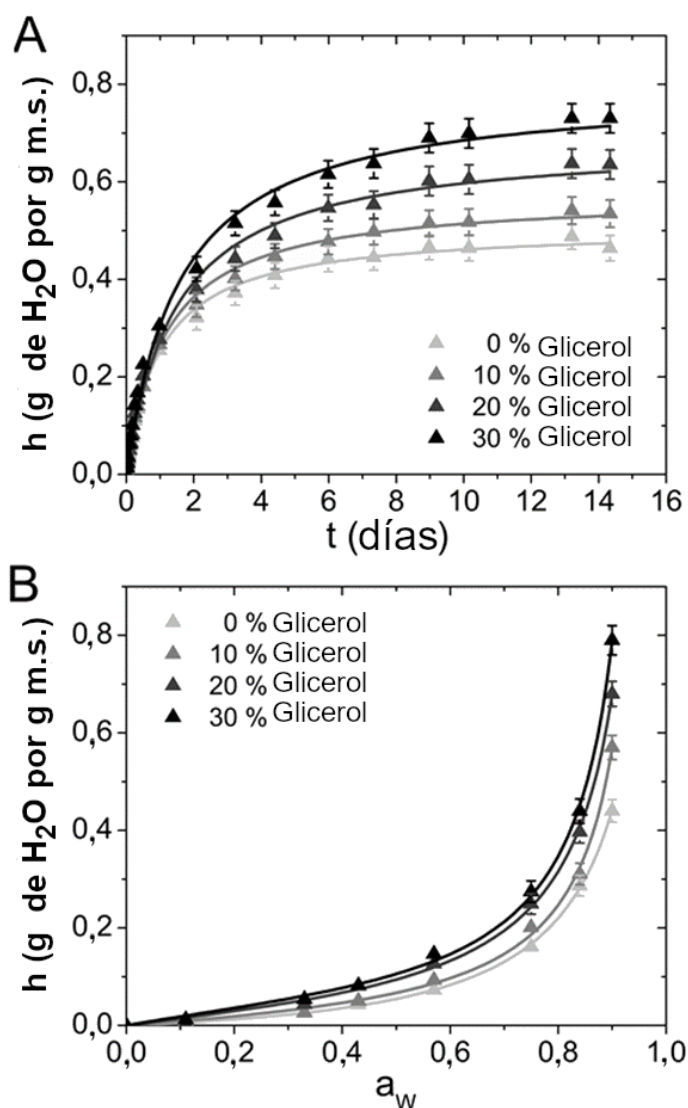
Muestra	N (g H ₂ O por g m.s.)	c	k	R^2
HTH-0Gli	$0,08 \pm 0,01^a$	$0,7 \pm 0,1^a$	$0,97 \pm 0,01^a$	0,9993
HTH-10Gli	$0,07 \pm 0,01^a$	$0,8 \pm 0,2^a$	$0,99 \pm 0,01^a$	0,9992
HTH-20Gli	$0,07 \pm 0,01^a$	$2,0 \pm 0,7^b$	$1,01 \pm 0,01^{ab}$	0,9982
HTH-30Gli	$0,07 \pm 0,01^a$	$2,6 \pm 0,9^b$	$1,02 \pm 0,01^b$	0,9985

Letras diferentes en cada columna indican una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

El glicerol aumentó la cantidad de agua de hidratación sin modificar la forma de las isothermas (figura 4.5B) como también se observó en películas de almidón de yuca (Mali *et al.*, 2006) y en las películas de proteína de suero (Mali *et al.*, 2000). Sin embargo, en estas películas, el parámetro del modelo GAB, N , aumentó y c , disminuyó con el aumento de la concentración de glicerol, mientras que k fue independiente del contenido de glicerol. El parámetro k aumentó inicialmente cuando se agregó glicerol a la película de almidón de yuca y, a partir de ahí, fue independiente del contenido de glicerol (Mali *et al.*, 2006).

Los resultados sugieren que, en la película basada en levaduras, la presencia de glicerol aumenta la fuerza de la unión del agua a la monocapa sin alterar el número de sitios de unión primarios, y aumenta la capacidad de la unión del agua a la multicapa.

Figura 4.6 Curvas de hidratación para películas de levadura con diferente contenido de glicerol: A) Cinética de sorción de agua a 90% HR y B) Isotermas de sorción de agua.



De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de hidratación, como en los ensayos mecánicos y de degradación térmica, este material podría procesarse industrialmente a temperaturas por debajo de 150 °C y utilizarse para proteger productos alimenticios grasos y/o de bajo contenido en agua, como frutas secas, así como en otras aplicaciones no alimentarias. De hecho, algunas aplicaciones pueden referirse a su uso en la protección temporal de polvos poco higroscópicos.

4.6 Conclusiones del capítulo IV

Los biopolímeros de fuentes agroindustriales interactúan en gran medida con el agua y sus propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua están lejos de

las correspondientes a los polímeros sintéticos. Algunas modificaciones son necesarias para mejorar su rendimiento y aplicarlas como empaque de alimentos.

Dado que la aplicabilidad o potencialidad de estas películas novedosas basadas en biomasa de levadura depende de sus características, se llevó a cabo una caracterización completa que cubrió aspectos relevantes como las propiedades térmicas, mecánicas y de hidratación, analizando cómo fueron influenciadas por la inclusión de glicerol. El aumento en el contenido de plastificante disminuyó el módulo elástico y la resistencia a la tracción, pero aumentó ligeramente la deformación a ruptura. Por otra parte, la incorporación de plastificante aumentó la cantidad de agua ganada por hidratación y también tuvo un impacto en la degradación térmica: por lo tanto, la selección de la cantidad de plastificante a incorporar comprende un compromiso en todas las características, mientras unas mejoran, otras empeoran. En este trabajo se seleccionará un valor intermedio entre 20 y 30%, 25% como compromiso entre hidratación, las propiedades mecánicas y la manipulabilidad necesaria para los diferentes ensayos a realizar.

En el siguiente capítulo se analizará más en detalle el comportamiento de las películas con el agua, tanto su hidratación como su capacidad de barrera al vapor de agua.

Capítulo V: ¿Cómo se transfiere el vapor de agua a través de la película?

5.1 Introducción

El análisis de las interacciones entre la película y las moléculas de agua tiene una gran importancia en el procesamiento del material y en sus potenciales aplicaciones. Por ejemplo, es necesario saber si la película puede aplicarse como una barrera eficaz para evitar la hidratación o deshidratación del alimento, según corresponda. Dependiendo de la aplicación final donde se utilizará el recubrimiento o la película, en ciertos casos puede ser necesaria una muy baja permeabilidad al vapor de agua (Özden y Bayindirli, 2002). La interacción con el agua es uno de los puntos débiles de los polisacáridos y las proteínas que, generalmente, no producen películas con buena capacidad de barrera al vapor de agua. Sin embargo, en algunos casos, las películas pueden actuar como agente de sacrificio perdiendo en primer lugar su propia humedad y preservando la humedad del alimento, o bien tomando humedad del alimento cuando el mismo debe permanecer seco, extendiendo su vida útil (Plotto *et al.*, 2004).

El estudio de las características del transporte de agua a través de películas es esencial para una mejor comprensión y optimización de la función protectora requerida en estas películas (Kester y Fennema, 1986). El agua de hidratación afecta las principales propiedades estructurales y funcionales de las películas hidrofílicas (Cuq *et al.*, 1997b) porque el agua actúa como plastificante al insertarse entre las cadenas de polímeros, espaciándolas, disminuyendo la temperatura de transición vítrea (T_g) y mejorando la flexibilidad como se describió en el capítulo IV.

El agua de hidratación desempeña un papel fundamental en el transporte de materia a través de películas (Koelsch, 1994; Kester y Fennema, 1986) y se considera que la transferencia a través de películas poliméricas se realiza en un proceso de cuatro pasos (si no se produce a través de poros). El modelo difusional simple propone las siguientes etapas: (i) adsorción de vapor de agua sobre la superficie de la matriz polimérica; (ii) solubilización del vapor de agua en la matriz polimérica; (iii) difusión de vapor de agua a través de la matriz; y (iv) desorción de vapor de agua de la otra superficie de la película (Roy *et al.*, 2000; Debeaufort *et al.*, 1994). La permeabilidad al vapor de agua en estos materiales

depende de la hidratación o solubilidad del vapor de agua en la película, así como de su movilidad dentro de la misma (Roy *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 1985). Características tales como la estructura química, la polaridad, el grado de cristalinidad, la densidad, el grado de reticulación, el peso molecular y la polimerización, así como la presencia de otros plastificantes, son factores que afectan la permeabilidad de los polímeros en general, ya que influyen en la hidratación, el grado de movilidad molecular y la difusión en el material (Molyneux, 2001; McHugh *et al.*, 1994; Kester y Fennema, 1984).

Las películas basadas en biomasa de levadura representan un buen modelo para el estudio de películas hidrofílicas y su interacción con el agua porque están formadas básicamente por polisacáridos y proteínas (Delgado *et al.*, 2016). Las películas obtenidas a partir de biomasa de levadura poseen isothermas de sorción con un ligero aumento en el contenido de agua para valores bajos de a_w y un aumento significativo para $a_w > 0,6$ (Peltzer *et al.*, 2017, Delgado *et al.*, 2016) como se comentó en el capítulo IV. La mayor parte del agua de hidratación es agua móvil, no fuertemente unida a la matriz polimérica, debido a la estructura de red tridimensional hidrofílica (tipo gel) de la película.

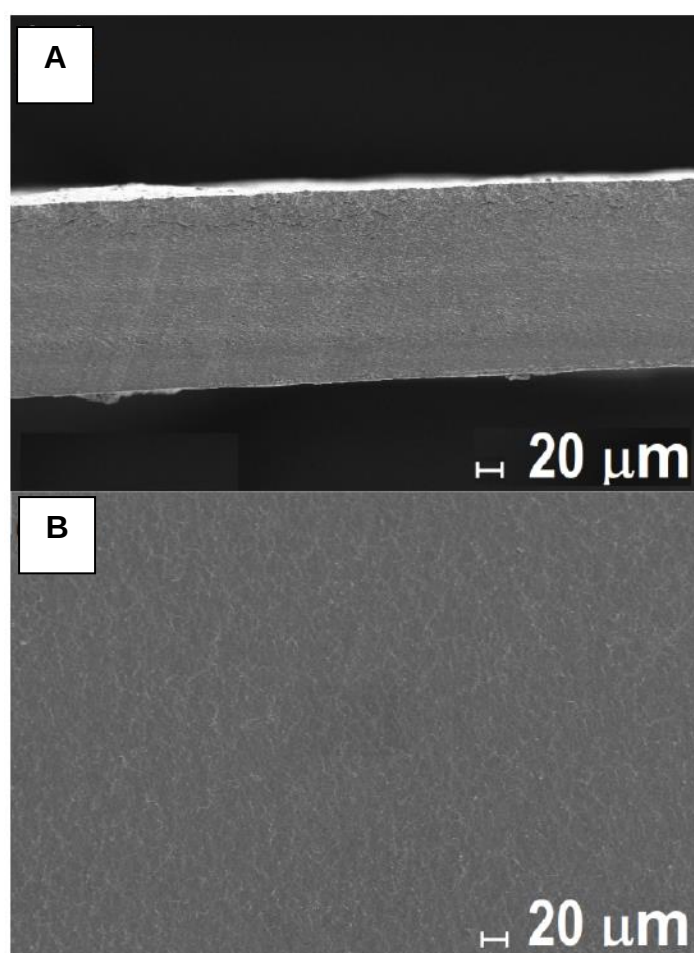
El mecanismo por el cual las moléculas de agua se transportan a través de películas biopoliméricas es un fenómeno complejo que aún no se comprende bien, especialmente por la fuerte dependencia del coeficiente de permeabilidad con el espesor de la película (Hu *et al.*, 2001; Cuq *et al.*, 1997a; Gennadios *et al.*, 1994a; McHugh *et al.*, 1993) y el contenido de plastificante (Nazan Turhan y Şahbaz, 2004; Sothornvit, *et al.*, 2001; Cuq *et al.*, 1997a; Gennadios *et al.*, 1994b). Las descripciones y los resultados de los ensayos disponibles en la bibliografía que chocan con la idealidad de la ley de Fick, adjudican este comportamiento a diferentes causas, entre las principales están los problemas en la metodología experimental, pensada para películas hidrofóbicas y a cambios que suceden en la película durante el transporte. El objetivo de este capítulo es contribuir a la explicación de estos aspectos que hasta el momento no fueron completamente aclarados (Koester *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que el coeficiente de permeabilidad se considera como la contribución de la solubilidad del vapor de agua en la película y la difusión del permeante en la matriz, el trabajo se centró en determinar cómo estas características físico-

químicas son afectadas individualmente por cambios en el espesor de la película y el contenido de plastificante.

5.2 Caracterización microestructural de las películas

Las micrografías mostradas en la figura 5.1 permitieron observar la microestructura de las películas. Las imágenes obtenidas de muestras plastificadas y no plastificadas fueron similares.

Figura 5.1 Micrografías SEM de: A) la sección transversal y B) de la superficie de una película HTH no plastificada (El aumento utilizado fue de 500×)



La figura 5.1A muestra la imagen de la sección transversal obtenida de la película no plastificada en la que se observó una matriz continua y homogénea, sin aglomerados, poros, fallas o perforaciones. En la imagen de la superficie de la película (figura 5.1B) no se distinguen partículas celulares y se ve que las estructuras originales de la pared celular de la levadura parecen haberse perdido

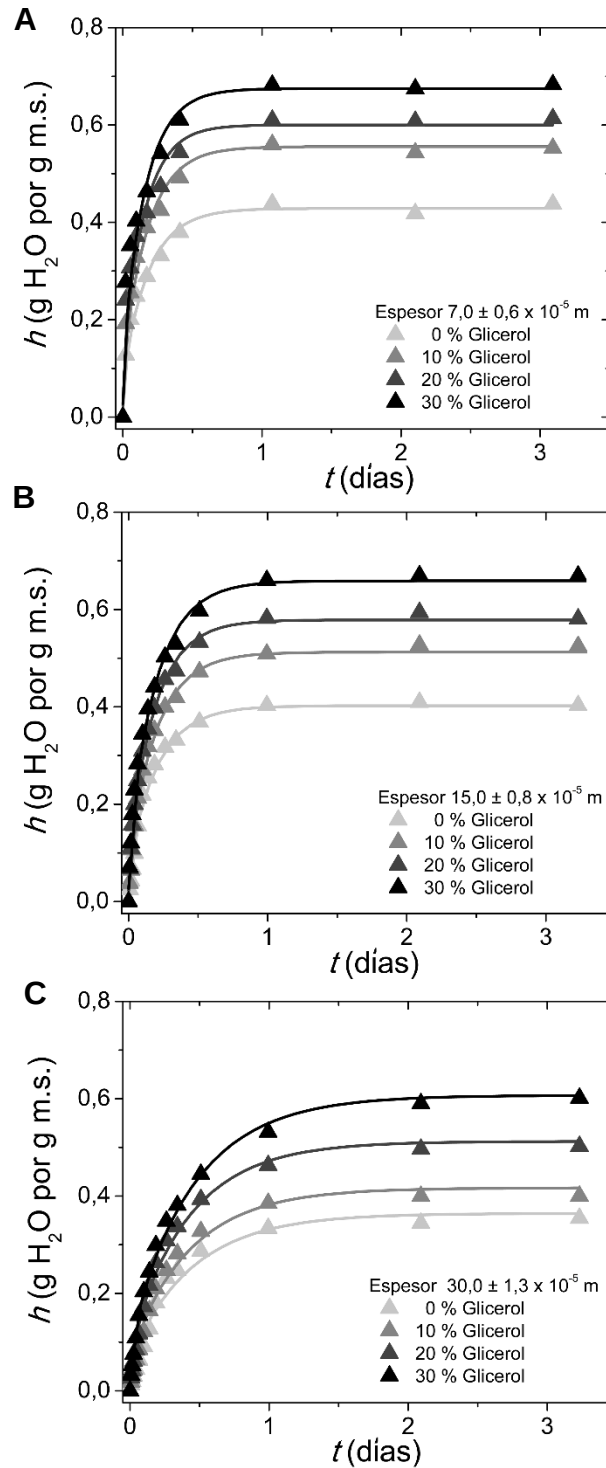
por el proceso de homogeneización. Estas imágenes están de acuerdo con que el transporte de agua en las películas basadas en la biomasa de la levadura no se produce a través de poros, sino mediante el mecanismo de absorción-difusión-desorción, como proponen la mayoría de los autores para películas preparadas a partir de proteínas, polisacáridos o mezclas de éstos (Roy *et al.*, 2000; Debeaufort *et al.*, 1994).

5.3 Efecto del glicerol en la cinética de sorción

La figura 5.2 muestra los gráficos que representan la cinética de sorción de agua al 90% HR de películas con contenido de glicerol de 0, 10, 20, 30% p / p m.s. según los diferentes espesores estudiados.

Las curvas que conectan los datos experimentales en la figura 5.2 son los mejores ajustes que se obtuvieron utilizando la ecuación 2.4 (modelo de Crank). La tabla 5.1 muestra los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales. Los datos de cinética de la figura 5.2 muestran claramente que, para todos los espesores estudiados, el agua de hidratación aumentó cuando se incrementó el contenido de glicerol en las películas. Como se puede ver en la figura 5.2 y la tabla 5.1, la incorporación de glicerol produjo un aumento en el valor h , el contenido de agua en equilibrio a 90% HR.

Figura 5.2 Cinética de sorción de agua a 90% HR (24 °C) de películas con contenido de glicerol de $\triangle$ 0, $\blacktriangle$ 10, $\blacktriangle$ 20 y $\blacktriangle$ 30% p/p m.s: A) Películas de $7,0 \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$ m de espesor, B) Películas de $15,0 \pm 0,8 \cdot 10^{-5}$ m de espesor y C) Películas de $30,0 \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$ m de espesor.



Los datos experimentales se ajustaron con la ecuación 2.2. Los mejores parámetros de ajuste se dan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 Valores de los parámetros D_w^i ($10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), D_w^{eff} ($10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), h_∞ (g de H_2O por g m.s.), k y n , según lo determinado por el mejor ajuste de la cinética de sorción de agua de los experimentos a 90% HR, mostrados en la figura 5.2.

Espesor (L)	% Contenido de glicerol	Modelo STL	Modelo de Crank				Modelo KP		
		D_w^i	D_w^{eff}	h_∞	S_w	R^2	k	n	R^2
$7,0 \pm 0,6$ (10^{-5} m)	0	$6,1 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,2$	$0,43 \pm 0,02$	182 ± 10	0,991	$1,6 \pm 0,1$	$0,42 \pm 0,02$	0,998
	10	$6,2 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,2$	$0,56 \pm 0,03$	267 ± 11	0,991	$1,3 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,03$	0,998
	20	$6,7 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,3$	$0,60 \pm 0,03$	306 ± 14	0,990	$1,2 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,02$	0,999
	30	$6,6 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,3$	$0,68 \pm 0,04$	368 ± 19	0,990	$1,0 \pm 0,1$	$0,24 \pm 0,01$	0,999
$15,0 \pm 0,8$ (10^{-5} m)	0	21 ± 1	$5,0 \pm 0,4$	$0,40 \pm 0,02$	153 ± 11	0,992	$4,3 \pm 0,3$	$0,89 \pm 0,03$	0,998
	10	21 ± 2	$5,1 \pm 0,3$	$0,51 \pm 0,02$	216 ± 10	0,991	$2,4 \pm 0,2$	$0,67 \pm 0,03$	0,992
	20	22 ± 2	$5,4 \pm 0,2$	$0,58 \pm 0,02$	251 ± 11	0,995	$1,8 \pm 0,1$	$0,53 \pm 0,02$	0,997
	30	21 ± 2	$5,1 \pm 0,2$	$0,66 \pm 0,02$	310 ± 11	0,994	$1,7 \pm 0,1$	$0,52 \pm 0,02$	0,994
$30,0 \pm 1,3$ (10^{-5} m)	0	41 ± 1	$9,3 \pm 0,9$	$0,36 \pm 0,01$	132 ± 11	0,990	$2,2 \pm 0,1$	$0,93 \pm 0,03$	0,997
	10	42 ± 2	$9,6 \pm 0,9$	$0,42 \pm 0,02$	157 ± 11	0,991	$1,7 \pm 0,1$	$0,75 \pm 0,03$	0,995
	20	43 ± 2	$9,9 \pm 0,8$	$0,51 \pm 0,02$	209 ± 12	0,994	$1,6 \pm 0,1$	$0,70 \pm 0,03$	0,994
	30	42 ± 3	$9,1 \pm 0,8$	$0,61 \pm 0,02$	262 ± 13	0,991	$1,4 \pm 0,1$	$0,64 \pm 0,02$	0,995

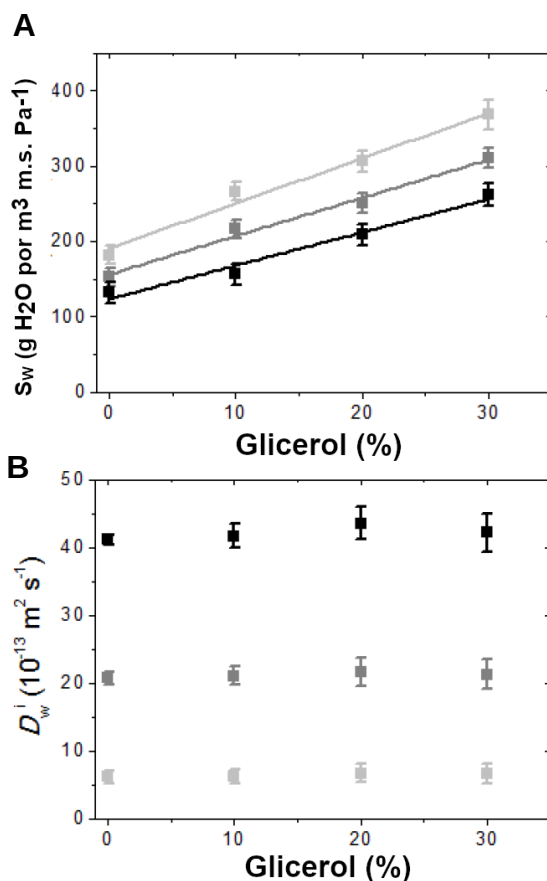
Los parámetros se ajustaron utilizando diferentes modelos: Intervalo de tiempo corto (STL) (ecuación 2.7), Crank (Fick) (ecuación 2.4) y Korsmeyer y Peppas (KP) (ecuación 2.8). S_w ($\text{g m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$) se calculó a partir de la ecuación 2.5 utilizando h_∞ obtenido del modelo de Crank.

Es interesante observar que el agua y el glicerol son plastificantes que producen cambios en la movilidad de las cadenas poliméricas, pero no lo hacen de la misma manera. Otros autores han observado la diferencia entre el agua y el glicerol a través del estudio de la difusión de fluoresceína en películas de iota-carragenina. Karbowiak *et al.* (2006) observaron que el coeficiente de difusión está más influenciado por el agua que por el glicerol y detectaron en particular, que la difusión es independiente del contenido de glicerol por debajo del 31% p/p de plastificante.

A partir de los valores de h_∞ y la ecuación 2.5, se obtuvo la solubilidad del agua en la matriz a 90% HR (S_w). Las figuras 5.3 a y b muestran S_w y D_w^i

respectivamente, ambas en función del contenido de glicerol en películas de diferentes espesores.

Figura 5.3 Dependencia de los parámetros S_w y D_w^j con la concentración de glicerol en las películas de espesor $\blacksquare 7,0 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ m, $\blacksquare 15 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ m, y $\blacksquare 30 \pm 1,3 \times 10^{-5}$ m: A) gráfico de S_w como función del % de glicerol y B) gráfico de D_w^j como función del % de glicerol



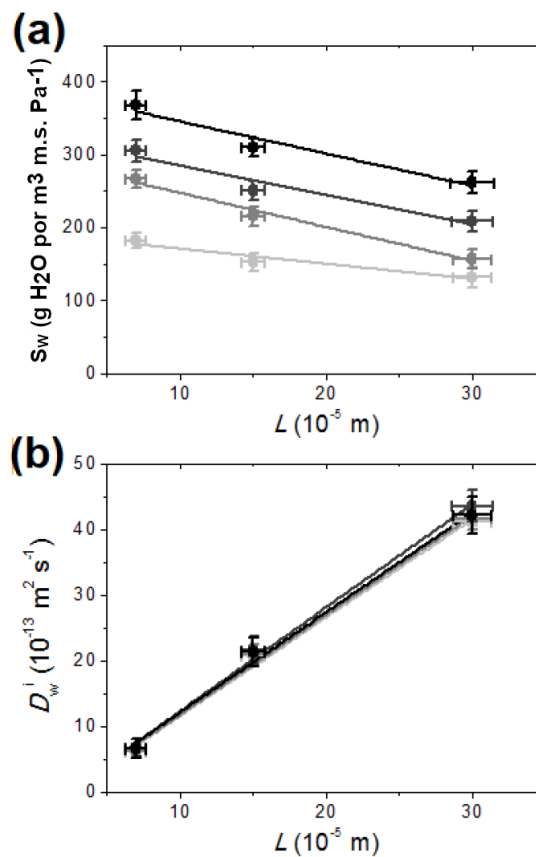
En la figura 5.3 es posible ver que, en cada espesor estudiado, S_w aumentó linealmente con la cantidad de glicerol en la película. Por otro lado, el contenido de glicerol no causó ningún cambio estadísticamente significativo en D_w^j .

5.4 Efecto del espesor

El efecto del espesor en las propiedades de hidratación de las películas es evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 5.3 A y B. Para cubrir un rango amplio, se seleccionaron los espesores de películas de $7 \cdot 10^{-5}$ m, $15 \cdot 10^{-5}$ m y $30 \cdot 10^{-5}$ m. Para una mejor comprensión del efecto del espesor, la

solubilidad al vapor de agua y el coeficiente de difusividad inicial se graficaron como función de espesor en las figuras 5.4 A y B, mostrando S_w y D_w^i respectivamente, para películas con un contenido de glicerol del 0, 10, 20 y 30% p/p m.s.

Figura 5.4. Dependencia de S_w y D_w^i con el espesor (L) de las películas con diferente contenido de glicerol ●0, ●10, ●20, y ●30 % p/p m.s.: A) gráfico de S_w como una función de L y B) gráfico de D_w^i como una función de L



Como se muestra en las figuras 5.4 A y B, S_w y D_w^i se vieron afectados de manera diferente por el espesor de la película. La figura 5.4A muestra que, para todos los contenidos de glicerol considerados, S_w disminuyó linealmente cuando aumentó el espesor. Como se informó en la tabla 5.1, h_∞ disminuyó cuando se incrementó el espesor. Estos valores pueden resultar contraintuitivos, ya que la solubilidad del agua en la película debería ser una característica dependiente de la composición. Los resultados sugieren un papel importante de los efectos de superficie en la sorción de agua, lo que podría tener su explicación en que los valores de S_w se dan por unidad de gramo de materia seca, considerando el

volumen total de la película. Sin embargo, en el espesor más pequeño el gramo incluye un área superficial mayor que el mismo gramo de espesores más grandes.

Con respecto al coeficiente de difusión del vapor de agua, la tabla 5.1 mostró que ambos valores, D_w^{eff} y D_w^j , aumentaron con el incremento del espesor de la película. En la figura 5.4B se ve claramente que D_w^j aumentó linealmente con el espesor, las líneas rectas para todos los contenidos de glicerol estudiados son prácticamente iguales y reafirman que la difusión de agua en la película no se ve alterada por la presencia de plastificante.

Otros autores han sugerido que cuando se reduce el espesor, las capas límite entre la membrana y el gas/vapor aumentan su relevancia en el proceso de transporte, afectando a la permeabilidad como coeficiente fenomenológico (Hwang y Kammermeyer, 1974). En este trabajo se observó, a diferencia de lo anterior, que la disminución del coeficiente difusivo produce la disminución global del coeficiente de permeabilidad en las películas.

Por otro lado, se ha observado que la velocidad de evaporación del solvente durante la formación de la película está implicada en la estructura de la matriz formada a partir de los polímeros (Campos *et al.*, 2011). En el método de *casting*, se pueden formar diferentes estructuras en películas de diferente espesor debido a que la constitución de la película se produce más rápidamente en películas más delgadas ya que la cantidad de agua a evaporar es menor. Una mayor velocidad de evaporación disminuye el tiempo disponible para la interdifusión y el reacomodamiento de las cadenas poliméricas. Un menor tiempo de evaporación conlleva una estructura menos ordenada y por lo tanto menos resistente y más permeable.

Comparando la influencia del espesor en los valores de S_w y D_w^j mostrados en las figuras 5.4 A y B respectivamente, es posible observar que la disminución total de S_w en todo el rango de espesor estudiado es de 1,5 veces, mientras que el incremento total de D_w es alrededor de 6,6 veces. Esto demuestra que el efecto del espesor es más importante en el coeficiente D_w^j que en S_w .

5.5 Tipo de difusión del agua a través de la película

La tabla 5.1 muestra los valores del exponente difusional n , parámetro que se utiliza en el estudio de la liberación de compuestos de interés farmacéutico en

matrices poliméricas para evaluar si el proceso es o no fickiano. Los valores de n se obtuvieron ajustando los datos de cinética experimental con el modelo de Korsmeyer & Peppas (KP) descrito anteriormente (ecuación 2.5). Los resultados demostraron que se observó un comportamiento cuasi-fickiano ($n < 0,5$) para las películas más delgadas ($7 \cdot 10^{-5}$ m), convirtiéndose en un comportamiento no fickiano o anómalo ($0,5 < n < 1$) en el caso de las muestras más gruesas ($15 \cdot 10^{-5}$ m y $30 \cdot 10^{-5}$ m). Comparando a igual valor de espesor, n disminuye con la incorporación de glicerol. El transporte de las moléculas de agua por el modelo fickiano ocurre en una situación en la que el proceso de difusión es mucho más lento que la relajación del polímero, por lo que la difusión se convierte en el fenómeno controlante del proceso de transferencia (Karimi, 2011; Rogers, 1985; Alfrey *et al.* 1966). La movilidad de las cadenas de polímeros se ve fuertemente afectada por la presencia de agua y otros plastificantes. En una situación opuesta, cuando el transporte de agua ocurre controlado por la relajación del polímero, el frente de humectación se mueve en una concentración de equilibrio constante y puede establecerse, en algunos casos, un corte brusco entre zonas con diferentes T_g (generalmente zonas vítreas y gomosas), también puede producirse una diferencia en la permeabilidad, aun sin un corte brusco, entre zonas gomosas, de acuerdo a su contenido de agua. Se le suma a esto que el agua, al ingresar en la película, puede producir un efecto de hinchamiento (denominado en inglés *swelling*) (Hu *et al.*, 2001). Como se puede ver en la tabla 5.1, a igual espesor con un aumento en la concentración de plastificante, el transporte se volvió hacia el comportamiento fickiano (n disminuyó) porque el plastificante aumentó la movilidad del polímero y por ende, la velocidad de relajación (Cao *et al.*, 2009; Sothornvit *et al.*, 2001). Cuando se incorporó el glicerol, la transferencia se volvió gradualmente fickiana (en términos estrictos, adecuadamente descrita por la ley de Fick) y esto se informó claramente en la tabla 5.1, al seguir el valor de n de películas con $15 \cdot 10^{-5}$ m y $30 \cdot 10^{-5}$ m de espesor. En películas con $7 \cdot 10^{-5}$ m de espesor, se observó comportamiento cuasi-fickiano y se acentuó cuando se incrementó el contenido de glicerol. La tabla 5.1 también mostró que, a un contenido de glicerol dado, el índice n aumentó con el incremento del espesor, separándose del comportamiento fickiano. Esto puede deberse a diferencias estructurales en las películas de diferentes espesores producidos durante el *casting* y a zonas con diferente

plastificación debido al contenido de agua como describe el modelo de transporte propuesto por *Takeru Higuchi* (Paul, 2011). El modelo de Korsmeyer-Peppas es orientador respecto del comportamiento fickiano, el mismo se basa en el modelo STL en el que el tiempo se eleva a la potencia 0,5; que define estrictamente el comportamiento ideal. El resultado de n , en el caso de las películas de levadura, es un llamado de atención para la aplicación de los modelos fickianos, aunque existen trabajos en los cuales aplicaron modelos derivados de la ley de Fick, en un rango de valores de n más amplio. Teniendo en cuenta esto, se ha decidido continuar adelante en la determinación de coeficientes fenomenológicos que se fundamentan en un comportamiento ideal (siguiendo la ley de Fick) a modo de comparación, sabiendo que los valores pueden estar afectados por causas no contempladas originalmente al proponer las ecuaciones. Es por esto que los valores de los coeficientes que se muestran en este capítulo se consideran aparentes.

5.6 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua es una medida de la facilidad con que el mismo puede penetrar una película (Rogers, 1985). La permeabilidad al vapor de agua P_w se obtuvo a través de dos vías, el experimento realizado con las celdas de permeabilidad y a través del producto de la difusividad y la solubilidad, por el cálculo con la ecuación 2.9, derivada de una combinación de las leyes de Fick y Henry (Kester y Fennema, 1989). En los experimentos de permeabilidad, la adsorción ocurre en el lado de la película expuesta al 90% HR y la desorción en el otro lado, expuesto a 10% HR (24 °C). Con el fin de comparar el valor experimental P_w^{exp} con $P_w = S_w D_w$, se utilizaron los valores de S_w y D_w^j obtenidos de los experimentos cinéticos de hidratación realizados a 90% HR. D_w^j se determinó teniendo en cuenta la difusión de agua en la película durante el período inicial de sorción (primeras doce horas en los experimentos). La razón del uso de D_w^j radica en que representa el proceso de difusión en el intervalo de tiempo en el que se determina el flujo en estado estacionario, durante la prueba de permeabilidad realizada con el método de la copa.

5.6.1 Efecto del glicerol y comparación entre la permeabilidad ASTM-E96 y la obtenida por el producto de la difusividad y la solubilidad

La figura 5.5A muestra el flujo de agua J_w a través de la película y la figura 5.5B la permeabilidad experimental P_w^{exp} , en función del contenido de glicerol, para películas de los diferentes espesores de 7.10^{-5} m, 15.10^{-5} m, y 30.10^{-5} m.

Tanto J_w como P_w^{exp} aumentaron linealmente con el incremento del contenido de glicerol en la película. Al igual que en este caso, también se observó una relación lineal entre la permeabilidad y el contenido de glicerol en las películas a base de almidón de maíz con alto contenido de amilosa (Bertuzzi *et al.*, 2007). El aumento de la permeabilidad al vapor de agua debido al glicerol se observó en diferentes películas de naturaleza hidrofílica, por ejemplo, celulosa, β -lactoglobulina o proteínas miofibrilares (Natanya *et al.*, 2008, Sothornvit *et al.*, 2001; Cuq *et al.*, 1997b).

Figura 5.5 Dependencia de J_w , P_w^{exp} y $P_w = S_w.D_w^j$ con la concentración de glicerol en películas de diferente espesor $\blacksquare 7 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ m, $\blacksquare 15 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ m, y $\blacksquare 30 \pm 1,3 \times 10^{-5}$ m: A) gráfico de J_w en función del % de glicerol, B) gráfico de P_w^{exp} en función del % de glicerol y C) gráfico de $P_w = S_w.D_w^j$ en función del % de glicerol.

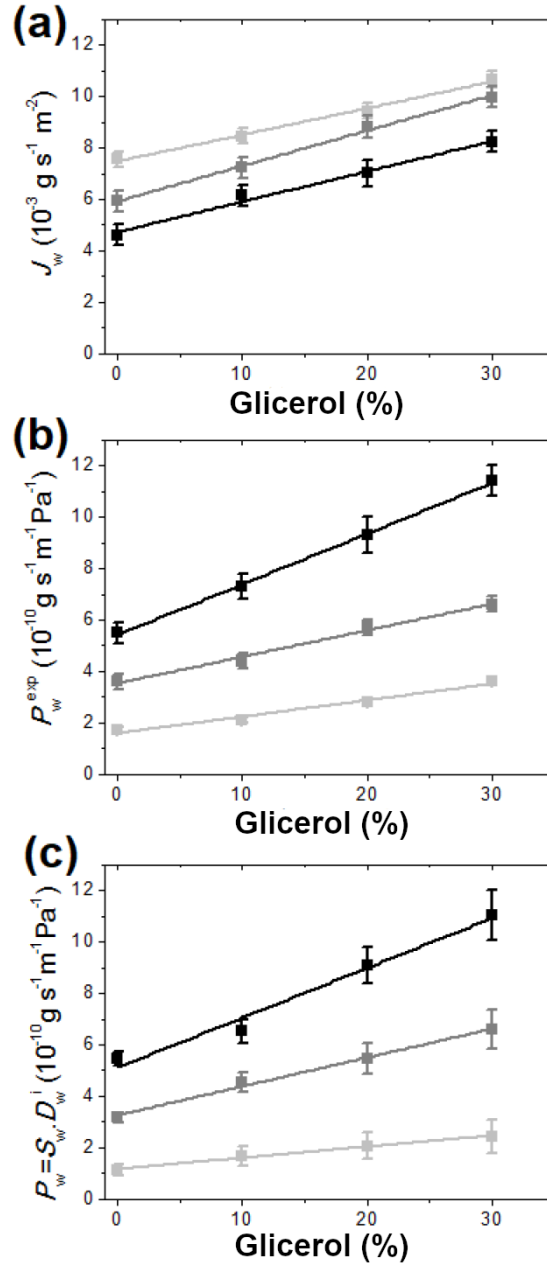


Tabla 5.2 Valores experimentales del flujo de vapor de agua J_w ($10^{-3} \text{ g s}^{-1}\text{m}^{-2}$), y la comparación de la permeabilidad experimental al vapor de agua P_w^{exp} ($10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) y la permeabilidad al vapor de agua obtenida de la cinética de absorción de agua experimentos $P_w = S_w \cdot D_w^j$ ($10^{-10} \text{ g s}^{-1}\text{m}^{-1}\text{Pa}^{-1}$).

Espesor (L)	Contenido de glicerol (%)	Cinética de sorción de agua	Permeabilidad ASTM E96	
		$P_w = S_w \cdot D_w^j$	J_w	P_w^{exp}
$7,0 \pm 0,6$ (10^{-5} m)	0	$1,1 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1$
	10	$1,7 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,1$
	20	$2,0 \pm 0,5$	$9,4 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,1$
	30	$2,4 \pm 0,7$	$10,7 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,1$
$15,0 \pm 0,8$ (10^{-5} m)	0	$3,2 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$
	10	$4,6 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,3$
	20	$5,4 \pm 0,6$	$8,9 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,3$
	30	$6,6 \pm 0,7$	$10,0 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,3$
$30,0 \pm 1,3$ (10^{-5} m)	0	$5,4 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,4$
	10	$6,5 \pm 4,5$	$6,1 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,5$
	20	$9,1 \pm 0,7$	$7,0 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,6$
	30	$11,0 \pm 0,9$	$8,2 \pm 0,4$	$11,4 \pm 0,5$

La figura 5.5C muestra los valores de $P_w = S_w D_w^j$ en función del contenido de glicerol. Como es posible ver en la tabla 5.2, y al mismo tiempo comparando la figura 5.5 B y C, los valores de ambas permeabilidades, P_w^{exp} y P_w se correspondieron considerando los errores experimentales asociados a una y otra técnica. La correspondencia de los valores permite estudiar el efecto del glicerol en la permeabilidad de una manera más completa, mediante un enfoque distinto, sopesando que el plastificante podría afectar tanto a S_w y como a D_w^j de diferente manera.

Al observar de nuevo la figura 5.3A, se puede recordar que, para un espesor dado, S_w aumentó linealmente con la cantidad de glicerol, mientras que, como se muestra en la figura 5.3B, D_w^j no se vio afectado por el contenido de plastificante agregado. Esto sugiere que el crecimiento lineal de la permeabilidad

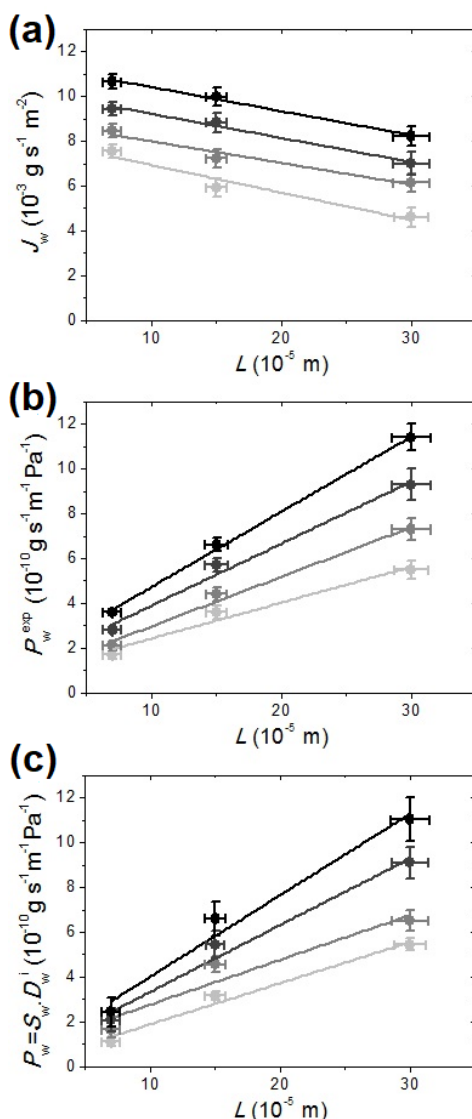
al vapor de agua debido a la adición de glicerol está dado sólo por el aumento de la solubilidad del vapor de agua en la película.

5.6.2 Efecto del espesor y comparación entre la permeabilidad del método ASTM-E96 y la obtenida del producto de la solubilidad y la difusividad

El efecto del espesor en el flujo de agua J_w a través de la película, y en la permeabilidad experimental P_w^{exp} es evidente a partir de los resultados mostrados en las figuras 5.5A y B, respectivamente. Para facilitar la comprensión del efecto del espesor, se han graficado J_w y P_w^{exp} como funciones del espesor en las figuras 5.6 A y B, respectivamente, para películas con 0, 10, 20 y 30 % p/p m.s. de contenido de glicerol. Al observar estas gráficas se ve como J_w y P_w^{exp} fueron afectados por el espesor de la película de diferentes maneras.

La figura 5.6A muestra que el flujo de vapor de agua, J_w , disminuyó linealmente cuando aumentó el espesor, pero la disminución del primero fue menor que la magnitud del incremento del segundo, lo que significa un aumento en el coeficiente de permeabilidad. Al igual que en este caso, se observó un comportamiento similar en películas preparadas con proteínas miofibrilares (Cuq *et al.*, 1997b). El efecto del espesor sobre el flujo es un resultado de gran contundencia y que puede resultar contraintuitivo.

Figura 5.6 Dependencia de J_w , P_w^{exp} y $P_w = S_w.D_w^i$ con el espesor L de películas con contenido de glicerol de $\bullet$ 0, $\bullet$ 10, $\bullet$ 20 y $\bullet$ 30% p/p m.s.: A) gráfico de J_w como función de L , B) gráfico de P_w^{exp} como función de L y C) gráfico de $P_w = S_w.D_w^i$ como función de L



Por otro lado, la figura 5.6B muestra que, para un contenido de glicerol dado, P_w^{exp} aumentó linealmente con el incremento de espesor. También se observó un comportamiento lineal similar de P_w^{exp} con el espesor en las películas miofibrilares basadas en proteínas y en películas de almidón de maíz con alto contenido de amilosa (Bertuzzi *et al.*, 2007) por citar sólo algunos ejemplos.

En una película polimérica ideal, la permeabilidad al vapor de agua es independiente del espesor de la película (Jasse *et al.*, 1994). Para los polímeros ideales homogéneos, la ley de Fick requiere que el flujo de vapor de agua, bajo un gradiente de presión de vapor de agua dado, varíe de forma inversamente

proporcional con el espesor de la película (Hauser y McLaren, 1948). Cuando se calcula el coeficiente de permeabilidad a través de la ecuación 2.11, se vuelve independiente del espesor L . Otros autores han mostrado que, para las películas poliméricas hidrofílicas, la permeabilidad al vapor de agua aumenta cuando el espesor de la película aumenta (Park y Chinnan, 1995; McHugh *et al.*, 1993). Algunos trabajos describen este comportamiento anómalo en películas delgadas de espesores inferiores a $6 \cdot 10^{-5}$ m (Pavlath y Orts, 2009). Sin embargo, en películas de almidón se observó el mismo comportamiento con espesores por encima de este nivel (Mali *et al.*, 2006). La razón de esta desviación está claramente relacionada con la naturaleza hidrofílica de la matriz polimérica, aunque no hay una respuesta certera sobre el rol de los aspectos microscópicos de la matriz en los cambios en el coeficiente de permeabilidad.

En las películas hidrofílicas, el gradiente de contenido de agua intensifica las diferencias en la movilidad de las cadenas de polímeros y en la solubilidad del agua a lo largo del espesor de la película. Estas razones coinciden con las diferencias encontradas en las secciones 5.3 y 5.4 en el coeficiente de difusión. Hubo una evolución de la explicación de este fenómeno en el tiempo: varias décadas atrás Hauser y McLaren (1948) atribuyeron el efecto del espesor sobre la permeabilidad al vapor de agua en películas de celulosa a diferentes estructuras formadas en cada uno de los espesores. Más adelante, McHugh *et al.* (1993) y Gennadios *et al.* (1994) propusieron algunas correcciones en los cálculos propuestos por la norma ASTM-E96 para medir la permeabilidad en materiales altamente hidrofílicos. Dichas modificaciones se basaron en que, en varios casos, se subestima el peso de la resistencia de la capa estacionaria de aire que está debajo de la película y que la subestimación cambia en función del espesor de la película. Esto conduce a errores en la determinación de la permeabilidad.

Otra explicación del efecto del espesor pone en foco el hinchamiento (*swelling*) de la película, que puede ocurrir debido a la absorción de agua durante la transferencia del vapor (Banker, 1966). Dicho hinchamiento se produce en el lado de la película en contacto con la atmósfera de mayor humedad y afecta sólo a una parte delgada de la película. La proporción de tal hinchazón podría ser menor a medida que la película se vuelve más gruesa. Por lo tanto, en películas más delgadas donde la proporción del hinchamiento se vuelve notable, el

movimiento del agua podría retardarse disminuyendo la difusividad y la permeabilidad. En todo caso, la base de este comportamiento es la fuerte interacción entre el permeante y la película.

El efecto del espesor y de la afinidad entre el permeante (gases) y la matriz se observó también en materiales hidrófobos. Se observó una fuerte dependencia de la permeabilidad al CO₂ y He con el espesor en membranas de polidimetilsiloxano (Firpo *et al.*, 2015). Los investigadores concluyeron que el efecto del espesor sobre la permeabilidad de CO₂ y He fue importante en el rango de $2 \cdot 10^{-7}$ m a $5 \cdot 10^{-5}$ m y fue independiente de éste, según lo propuesto por Fick, por encima de $5 \cdot 10^{-5}$ m.

El modelado del transporte de agua a través de películas hidrofílicas es extremadamente complejo debido a que las isothermas de sorción de agua no son lineales, de las cuales depende S_w y por la dependencia del coeficiente de difusión respecto al contenido de agua de la película. Los datos experimentales mostraron la excelente correspondencia entre las dos metodologías estudiadas para determinar la permeabilidad al vapor de agua, $P_w = S_w D_w^j$ y P_w^{exp} . La independencia de los experimentos realizados y la cantidad de ensayos realizados permite confiar en que esto no es una simple correlación. La determinación de la permeabilidad a través del producto solubilidad y difusividad permite estudiar el efecto del espesor en el coeficiente de permeabilidad, separando el efecto en S_w y D_w^j . Como se muestra en las figuras 5.4 A y B, S_w y D_w^j poseen un comportamiento opuesto, aunque el incremento de D_w^j es superior a la disminución de S_w con el espesor. Por lo tanto, el aumento global de la permeabilidad con el espesor se debe a la magnitud del aumento de D_w^j con el espesor.

Los efectos del contenido de glicerol y el espesor en la permeabilidad al vapor de agua de las películas se encontraron no sólo a través de la metodología experimental tradicional, sino también a través de una permeabilidad obtenida como producto del valor de S_w y el valor de D_w^j , diferente a la del método de la ASTM E96. Esto afirma que estos comportamientos no ideales, no se deben a un error en la metodología experimental que debe corregirse con considerandos en la resistencia del aire, subestimaciones o sobreestimaciones de la fuerza impulsora por caso, sino a un comportamiento de la película debido a su fuerte

interacción con el agua y el glicerol y a los cambios que produce el agua en ella al ingresar en la misma.

5.7 Estudio del efecto de la humedad relativa (presión de vapor de agua) y el espesor en la permeabilidad

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió realizar un segundo análisis de la permeabilidad al vapor de agua planteando un diseño experimental en el que la fuerza impulsora fuera partida en intervalos más pequeños de humedad relativa (presión de vapor de agua) y con diferentes espesores de películas. Este diseño permitió conocer con mayor grado de detalle la influencia de la fuerza impulsora para el flujo de vapor de agua a través de la película y el efecto combinado, a su vez, del espesor.

En la tabla 5.3 se observan los resultados de los ensayos realizados con diferentes espesores y a diferentes gradientes de vapor de agua. En la primera columna se puede ver la diferencia de presión de vapor efectiva en pascales, para cada grupo de experimentos, en la segunda el rango de a_w utilizado (h.r), y en la tercera columna, el espesor de las películas. Según las leyes de Fick y Henry, el flujo (J_w) está directamente relacionado con la diferencia de presión de vapor y el mismo se incrementa en la misma magnitud que esta diferencia. En contraste, en las películas de levadura no se observó esta situación, ya que el flujo no se incrementó en la misma magnitud que el aumento en la diferencia de presión de vapor. Por otro lado, si se compara la dependencia del flujo con el espesor (L), la ley de Fick establece que, si el espesor aumenta, el flujo disminuye en la misma magnitud, ya que siguen una relación inversamente proporcional. En este estudio se observó que, si bien el flujo y el espesor siguen una relación inversamente proporcional, la magnitud del aumento en el espesor de la película no es igual a la magnitud de la disminución en el flujo. Ambas situaciones explican el comportamiento del coeficiente de permeabilidad con el espesor y la diferencia de presiones parciales entre las caras de la película.

Si se focaliza la atención en la presión de vapor entre las caras de la película, se observan claras diferencias entre gradientes a altas y bajas humedades relativas (HR). A un espesor fijo, la permeabilidad (P_w) disminuye a medida que disminuye la fuerza impulsora (presión de vapor). Sin embargo, si el gradiente involucra HRs altas, P_w aumenta respecto a un gradiente a HRs bajas, a pesar

de que la fuerza impulsora sea mayor. Esto demuestra que la influencia del agua sobre la película es importante y, como indica la isoterma de sorción (Figura 5.7) a mayor humedad, la cantidad de agua incorporada en la película es notablemente mayor.

Si se atiende al espesor de la película, el coeficiente de permeabilidad es menor en el espesor más pequeño estudiado ($7,5 \cdot 10^{-5}$ m) y mayor en el espesor más grande ($30 \cdot 10^{-5}$ m). Si tomamos el mayor gradiente estudiado (10% - 90%), en las películas de mayor espesor P_w puede ser entre 3 y 4 veces mayor al obtenido en las películas de espesor más pequeño. Esta relación se reduce a 2 veces en gradientes de humedades relativas más bajas, como 10% – 57% y 33% – 57%. Como ya se mencionó, la dependencia del coeficiente de permeabilidad con la humedad relativa es fuerte, en particular, si hay HRs altas involucradas, el coeficiente es mayor. Aun así, se mantiene la situación de que, a mayor espesor, mayor permeabilidad. En un gradiente de 57% – 90% las permeabilidades obtenidas fueron 4,6, 10,6 y 21,5 ($\times 10^{-10}$ g s⁻¹ m⁻¹ Pa⁻¹) para los espesores 7,5, 15 y 30 ($\times 10^{-5}$ m) respectivamente. En el gradiente de 10% - 90% las permeabilidades fueron de 1,2, 2,1 y 2,5 ($\times 10^{-10}$ g s⁻¹ m⁻¹ Pa⁻¹) para los espesores 7,5, 15 y 30 ($\times 10^{-5}$ m) respectivamente.

En la tabla 5.3 también se muestran los resultados del coeficiente de difusión instantáneo (D_w^{ins}) y de la solubilidad instantánea del vapor de agua en la película (S_w^{ins}). En cuanto a la solubilidad del vapor de agua en la película, se observó una clara tendencia de aumento junto con la humedad relativa. Dado que la solubilidad instantánea involucra el rango puntual de HRs en estudio y la hidratación en equilibrio para cada situación de humedad (ecuación 2.12), se trata de una solubilidad distinta de la solubilidad del vapor de agua en toda la película (S_w) como se explicó en el capítulo II. Por otro lado, a menor espesor, mayor S_w^{ins} , lo que muestra la relevancia de los “efectos de superficie” en la película ya explicados en la sección 5.4.

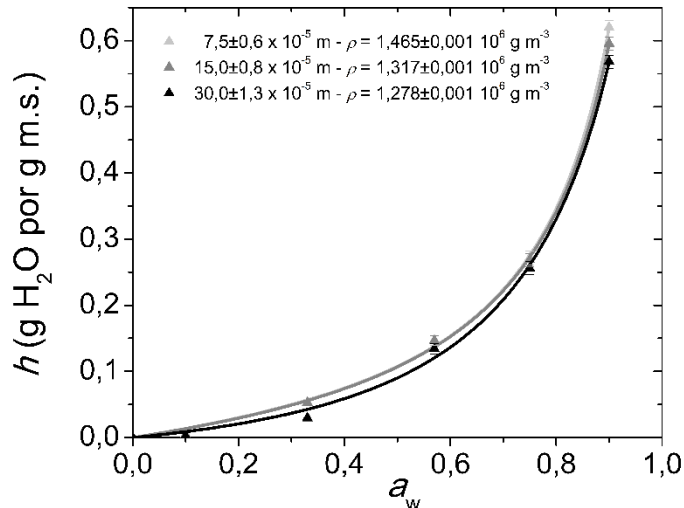
A diferencia del comportamiento de S_w^{ins} , el coeficiente de difusión (D_w^{ins}) se incrementó hasta la humedad relativa del 75% y, a 90% este valor descendió, dando un indicio de cierto efecto negativo del contenido de agua en la película y en su difusión.

Tabla 5.3 Resultados de los ensayos realizados a diferentes gradientes de vapor de agua y espesores

p_{w2} p_{w1} (Pa)	Rango de HR (HR ₁ -HR ₂)	L (10 ⁻⁵ m)	J_w (10 ⁻³ g s ⁻¹ m ⁻²)	P_w (10 ⁻¹⁰ g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)	S_w^{ins} (g m ⁻³ Pa ⁻¹)	D_w^{ins} (10 ⁻¹³ m ² s ⁻¹)
2111	10%-90%	7,5	10,5±0,3	2,9±0,1	419±13	6,9±0,4
		15	8,9±0,3	6,0±0,1	368±10	16±1
		30	7,8±0,2	11,1±0,3	343±9	32±2
1716	10%-75%	7,5	5,2±0,2	2,0±0,1	228±7	8,8±0,7
		15	4,0±0,2	3,5±0,1	203±6	17±1
		30	3,0±0,2	5,6±0,2	189±4	30±2
1240	10%-57%	7,5	2,3±0,1	1,2±0,1	168±4	7,1±0,8
		15	1,6±0,1	2,1±0,1	152±4	13±1
		30	1,1±0,1	2,5±0,1	136±4	18±1
607	10%-33%	7,5	0,42±0,02	0,47±0,02	117±3	4,0±0,3
		15	0,36±0,02	0,85±0,04	106±3	8,0±0,6
		30	0,24±0,02	1,2±0,1	84±3	14±2
396	75%-90%	7,5	4,2±0,1	6,8±0,1	1253±35	5,4±0,3
		15	4,0±0,1	15,0±0,1	1085±33	14±1
		30	3,4±0,1	27,7±0,3	1008 ± 30	27±1
871	57%-90%	7,5	7,3±0,2	4,6±0,1	779±21	5,9±0,3
		15	6,6±0,2	10,6±0,1	678±17	16±1
		30	5,8±0,1	21,5 ± 0,1	636±15	34±2
1504	33%-90%	7,5	9,7±0,3	3,6±0,1	542 ± 12	6,6±0,3
		15	8,4±0,2	7,8±0,1	475 ± 10	17,0±1
		30	6,9±0,2	14,8±0,2	447 ± 10	34±2
475	57%-75%	7,5	3,5±0,1	4,9±0,1	384±9	13±1
		15	3,0±0,1	8,9±0,2	338±8	26±2
		30	2,4±0,1	15,5±0,3	327±7	47±3
633	33%-57%	7,5	2,1±0,1	2,0±0,1	216±6	9,3±0,7
		15	1,3±0,1	3,0±0,1	195±5	15±1
		30	0,83±0,05	4,0±0,1	186± 5	22±2

Unidades: $[J_w]=10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, $[P_w]=10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, $[S_w]=\text{g m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$, $[D_w^{eff}]=10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

Figura 5.7 Isotermas de sorción de películas al 25% de glicerol con tres espesores diferentes, $7,5 \times 10^{-5}$, 15×10^{-5} y 30×10^{-5} m



Roy *et al.* (2000) publicaron un trabajo en el que se analizó la permeabilidad al vapor de agua de películas de gluten de trigo con espesores cercanos a los 80 μm a diferentes gradientes de vapor de agua. En esta parte del trabajo se ha seguido la misma metodología empleada por Roy *et al.* (2000), se determinó el coeficiente difusivo como el cociente entre la permeabilidad y la solubilidad del agua en la película. En las películas de gluten de trigo se encontró que la permeabilidad al vapor de agua se incrementó de gran manera en los gradientes de humedades relativas más altas. En ese caso, el cambio se produjo desde $3,8 \cdot 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para un gradiente de humedad relativa 0,00 – 11,15% a $4,1 \cdot 10^{-7} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para el gradiente de 75,35 – 84,32% (25 °C), un cambio en la permeabilidad que implica cuatro órdenes de magnitud. Estos autores explicaron que este cambio se debió al incremento conjunto de la solubilidad del agua en la película y del coeficiente difusivo, tal como se observa en las películas de levadura.

El estudio de esta sección ratifica que los motivos que producen este particular comportamiento radican en la fuerte interacción entre el agua y la película. El ingreso de agua cambia las características de la matriz, plastifica en diferente grado y modifica la temperatura de transición vítrea que es un reflejo de la facilidad de movimiento molecular de las cadenas poliméricas. Al mismo tiempo, la relación entre el contenido de agua en equilibrio en las películas y la humedad relativa de la atmósfera circundante (Figura 5.7) no es lineal como

indica la ley de Henry, sino una curva muy pronunciada que da un salto importante en la hidratación después de $a_w = 0,6$ (60% HR). Estas son las razones de las características no ideales del transporte de vapor de agua a través de las películas hidrofílicas.

5.8 Conclusiones del capítulo V

En este capítulo se estudió el efecto del espesor de la película y la adición de plastificante en la hidratación, la difusión de agua y la permeabilidad al vapor de agua en películas basadas en biomasa de levadura procurando la mayor profundidad posible en el estudio.

El efecto del espesor en el proceso de permeabilidad fue significativo y se demostró mediante dos experimentos diferentes: el método experimental del estándar ASTM-E96 y un método cinético alternativo. Ambos métodos dieron valores similares para el coeficiente de permeabilidad. El análisis a través del método cinético permitió explicar con mayor detalle el efecto del espesor y el plastificante en el coeficiente de permeabilidad. Para llegar a este acuerdo, en el cálculo de la permeabilidad al vapor de agua, se debe considerar el coeficiente de difusión inicial D_w^i , ya que está relacionado con condiciones similares a las utilizadas en los experimentos de permeabilidad realizados en las celdas.

El glicerol incorporado como plastificante incrementó la permeabilidad al vapor de agua porque afectó la solubilidad del vapor de agua en la matriz, pero no modificó el coeficiente de difusión. A diferencia del plastificante, el cambio en el espesor afectó de diferente manera al coeficiente de difusión y a la solubilidad. Con los experimentos se demostró que la causa principal de la disminución de la permeabilidad, cuando se reduce el espesor, se debe al descenso notable del coeficiente de difusión.

También se mostró la dependencia del coeficiente de permeabilidad respecto de la presión parcial del vapor de agua y que esta dependencia está causada por la afinidad entre el vapor de agua y la película. El agua es plastificante de la película y los cambios en el estado amorfo, dentro del estado gomoso, significan un cambio en la movilidad molecular y su capacidad de barrera al vapor de agua.

Aunque resulte paradójico, el efecto del espesor en películas hidrofílicas, produce como resultado, en un determinado rango de espesor, que “menos sea

más", ya que una membrana más delgada presenta un menor coeficiente de permeabilidad que una más gruesa, siendo en términos aparentes, una mejor barrera contra el vapor de agua.

Capítulo VI: Efecto del pH de las dispersiones en las características de las películas de levadura

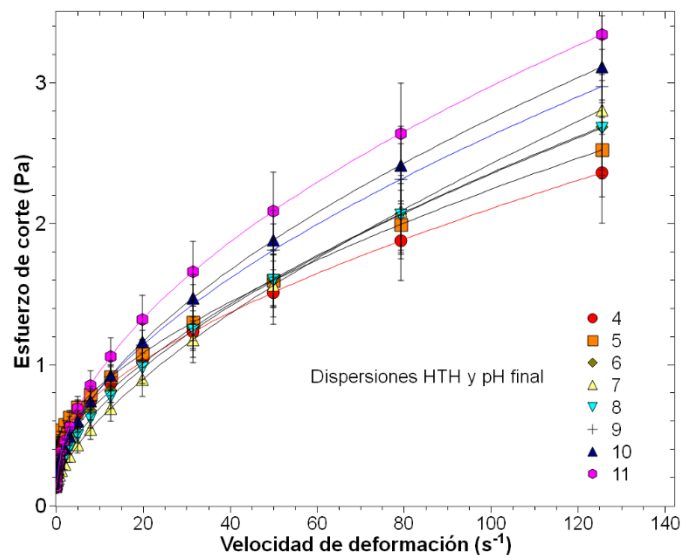
6.1 Introducción

Las características de las películas obtenidas de polímeros naturales, en general, están lejos de las correspondientes a los polímeros sintéticos producidos de recursos no renovables. Una de las razones de esta diferencia es la gran afinidad de los polímeros naturales con el agua, profundizada en el capítulo anterior para las películas de biomasa de levadura. En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para mejorar las características de las películas, con modificaciones que no sólo involucraron la disminución de la afinidad con el agua, sino también aquellas que buscaron mejorar principalmente el desempeño mecánico (Rouf y Kokini, 2018; Popović *et al.*, 2018). Como parte de estos esfuerzos, se han propuesto diferentes estudios exploratorios y modificaciones en los biopolímeros o mezclas de ellos para comprender mejor su formación y naturalmente, obtener mejores características (Plackett, 2011). El efecto del cambio en el pH de las dispersiones utilizadas para preparar películas se ha descrito previamente para películas de proteínas o polisacáridos (Wihodo y Moraru, 2013; Guerrero y de la Caba, 2010) pero no para películas de biomasa donde la interacción entre las macromoléculas constituyentes de las películas puede alterarse, modificando después las características macroscópicas de las películas. Las modificaciones del pH afectan las interacciones entre las cadenas de los polímeros, ya que, si el pH está cerca del punto isoelectrico de las proteínas, los enlaces hidrófobos y de hidrógeno aumentan ganando preponderancia en la estabilización del sistema. Mientras que la preponderancia de estas fuerzas cambia cuando el pH se aleja del punto isoelectrico (Gennadios *et al.*, 1993). El pH también afecta la solubilidad de ciertos compuestos que constituyen películas, a veces es necesario ajustar el pH para solubilizar polisacáridos y proteínas, lo que afecta también a la distribución y a las interacciones en las películas (Cazon *et al.*, 2017). En este capítulo se presentan los resultados de los ensayos realizados con películas obtenidas con dispersiones a diferentes pHs. Se propuso una caracterización completa y un análisis acerca de las causas de los cambios en las propiedades.

6.2 Influencia del pH en el comportamiento de flujo de las dispersiones

En los ensayos de comportamiento de flujo se observó una influencia fuerte del pH de la dispersión y todas las dispersiones, con 25% de glicerol, tuvieron un comportamiento no-newtoniano (figura 6.1). Si bien todas las curvas partían de esfuerzos de corte similares, conforme creció la velocidad de deformación, el esfuerzo de corte alcanzado fue gradualmente mayor, a medida que se incrementó el pH de las dispersiones. Mientras que el índice de flujo (n) disminuyó levemente, de $0,59 \pm 0,01$ (pH 4) a $0,54 \pm 0,02$ (pH 11), el índice de consistencia (K) se incrementó de $0,10 \pm 0,01 \text{ Pa s}^n$ (pH 4) a $0,19 \pm 0,05 \text{ Pa s}^n$ (pH 11), lo que explica el aumento punto a punto de la viscosidad aparente, ambos parámetros importantes del modelo de Herschel – Bulkley (ecuación 2.12). La raíz de este comportamiento podría deberse a los cambios que suceden en las muestras, la solubilización de una fracción de los β -glucanos y la solubilidad e interacciones entre las proteínas debido a su punto isoeléctrico. En las siguientes secciones se analizarán los efectos del pH de las dispersiones en las películas.

Figura 6.1 Comportamiento de las dispersiones de levadura a diferente pH en barridos de flujo

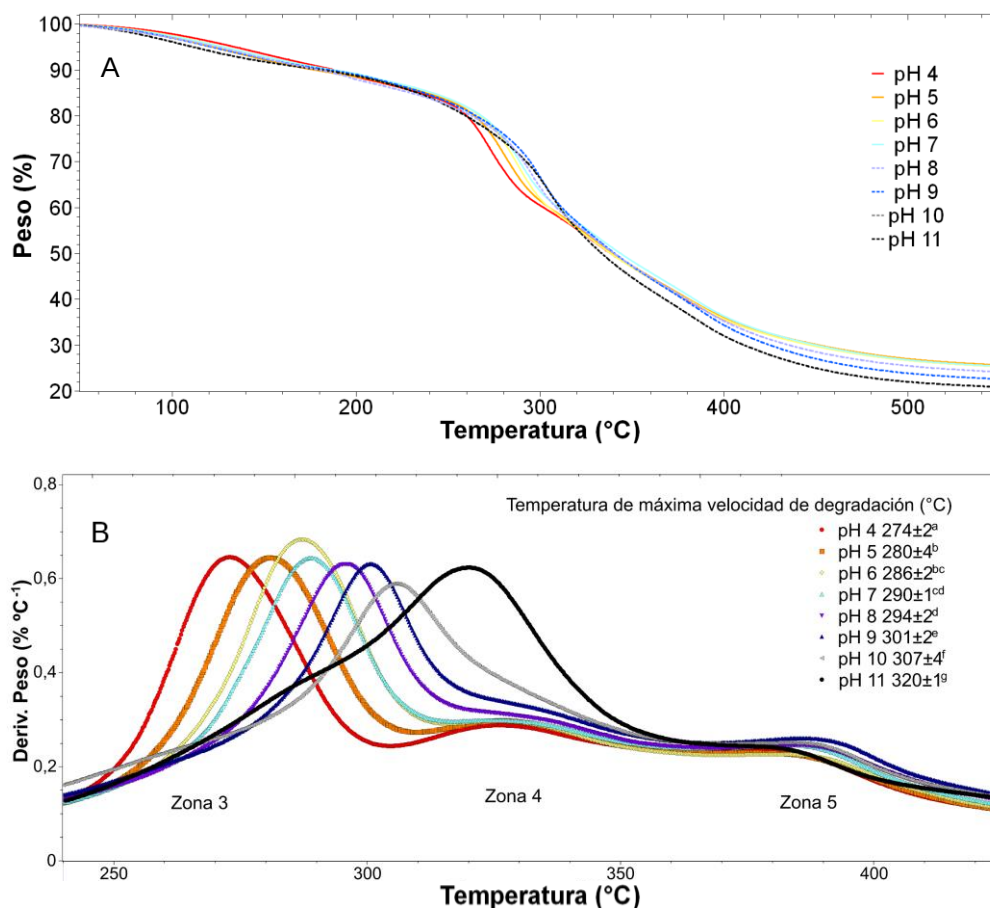


6.3 Degradación térmica de las películas

Los resultados de la degradación térmica se presentan en la figura 6.2, la pérdida de peso frente a la temperatura se muestra en la figura 6.2A y la derivada del peso con respecto a la temperatura en la figura 6.2B. En el capítulo IV, se

delimitaron cuatro intervalos de temperatura en el termograma completo para facilitar el análisis de la degradación (Delgado *et al.*, 2018). En este capítulo, las curvas se dividieron en cinco zonas de degradación. El primer rango de temperatura se atribuyó al igual que en el capítulo anterior a la eliminación de agua y compuestos de bajo peso molecular hasta 140 °C (Soares *et al.*, 2005). La segunda zona se delimitó hasta 225 °C, comprendió dos eventos que involucraron la degradación de glicerol y la degradación parcial de proteínas. La tercera zona se debió a la degradación de los polisacáridos y la cadena principal de proteínas y éstas significan la mayor pérdida de peso en el termograma.

Figura 6.2 Análisis termogravimétricos de las películas de levadura de pH 4 a 11: A) pérdida de peso en función de la temperatura y B) derivada del peso con respecto a la temperatura



A la derecha de la figura B, se muestran las temperaturas de la máxima velocidad de degradación a cada pH. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Como puede verse en la figura 6.2B, con respecto a la tercera zona, se produjeron cambios significativos en las temperaturas máximas de degradación (T_{max}) cuando se modificó el pH de las dispersiones. A medida que el pH se incrementó gradualmente, la T_{max} se movió paulatinamente de 274 °C (pH 4) a 320 °C (pH 11). Este movimiento de la temperatura de máxima, hace visible una cuarta zona de degradación, posterior a la tercera, hasta 360 °C y una quinta de terminación, luego de ésta. Estos cambios sugieren la formación de enlaces de alta energía, como interacciones no covalentes entre cadenas u otro mecanismo que requiere mayor energía para la ruptura de la cadena.

6.4 Propiedades mecánicas

En la tabla 6.1 se puede ver que, con la modificación del pH, el módulo elástico de las películas de levadura con 25% de glicerol varió entre 33 MPa y 42 MPa y la resistencia a la tracción aumentó significativamente de $1,5 \pm 0,4$ MPa a pH 4 a $2,5 \pm 0,6$ MPa a pH 11, así como la deformación a ruptura se incrementó de $7,6 \pm 2,3$ a $29,1 \pm 4,6\%$ en el mismo rango de pH. Algunos autores han reportado el efecto del pH de las dispersiones en películas provenientes de diferentes fuentes. Por ejemplo, Guerrero y de la Caba (2010) informaron un gran aumento de la deformación a ruptura con el aumento del pH en películas de proteínas de soja, desde 20% a pH 4,6 a 140% a pH 10. Un trabajo anterior también reportó un aumento en la deformación a ruptura producido por el pH en películas de proteínas de soja (Gennadios *et al.*, 1993). En este último estudio, los autores mostraron que en los pH ácidos (1-2), la resistencia a la tracción fue un 33% más baja en comparación con pHs más altos (pH 11), y la deformación a ruptura aumentó de 34% a 187% desde pH 1 ó 2 a 11, respectivamente. Sin embargo, tanto la resistencia a la tracción como la elongación (deformación) disminuyeron nuevamente a pH 12. Anker *et al.* (1999) también informaron mejoras en las propiedades mecánicas de películas de aislado de proteínas de suero de leche en pHs alcalinos. Este último trabajo, atribuyó las modificaciones en las propiedades mecánicas de las películas al punto isoeléctrico de las mismas y su relación con el pH de la dispersión filmogénica.

En las películas de levadura, la deformación a ruptura aumentó gradualmente con el pH hasta 30%, mientras que el módulo elástico no se vio afectado. Teniendo en cuenta los resultados de la degradación térmica (figura

6.2), este comportamiento podría deberse a cambios en los enlaces inter- e intramoleculares (la aparición o desaparición de enlaces intramoleculares pueden modificar el perfil del termograma por la gran energía que involucran). Algunas cadenas podrían tener mayor libertad de movimiento debido a una menor cantidad de enlaces, lo que explicaría una mayor deformación, aunque el módulo elástico se mantuvo en valores de 32 a 43 MPa, porque la energía total involucrada es la misma (menor número de enlaces, pero de mayor energía). Algunos de los enlaces formados a pH 11 (mayor deformación a ruptura) podrían reemplazar a otras interacciones establecidas a pH 4 (mismo módulo), Guerrero y de la Caba (2010) han sugerido que los enlaces disulfuro establecidos a pH alcalinos son responsables de las mejoras en las propiedades mecánicas de las películas aisladas de proteína de soja.

En el anexo II se pueden encontrar ejemplos de curvas esfuerzo – deformación seleccionadas de películas preparadas con cuatro dispersiones a pHs diferentes 4, 6, 9 y 11.

Tabla 6.1 Resultados de las pruebas de tracción uniaxial de películas de levadura con 25% de glicerol

Muestra	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a ruptura (%)
pH 4	35,7 ± 6,5 ^{ab}	1,5 ± 0,4 ^a	7,6 ± 2,3 ^a
pH 5	35,0 ± 7,1 ^{ab}	1,5 ± 0,7 ^a	8,5 ± 2,4 ^{ab}
pH 6	42,2 ± 10,3 ^a	2,2 ± 0,6 ^{bc}	11,4 ± 2,5 ^{bc}
pH 7	39,3 ± 5,1 ^{ab}	1,9 ± 0,5 ^{abc}	12,9 ± 2,3 ^c
pH 8	34,4 ± 7,4 ^{ab}	1,6 ± 0,3 ^{ab}	14,8 ± 2,1 ^c
pH 9	33,2 ± 7,1 ^b	1,8 ± 0,4 ^{ab}	15,0 ± 3,0 ^c
pH 10	32,8 ± 4,6 ^b	2,1 ± 0,6 ^{abc}	20,3 ± 5,2 ^d
pH 11	38,0 ± 8,3 ^{ab}	2,5 ± 0,6 ^c	29,1 ± 4,6 ^e

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la figura 6.3 se observa la buena manipulabilidad de una película preparada con una dispersión a pH 11 y 25% de glicerol.

Figura 6.3 Película de levadura preparada con una dispersión a pH 11 y 25 % de glicerol



6.5 Determinaciones de color y opacidad

Las películas basadas en biomasa de levadura tienen un color ámbar como otras películas reportadas en la bibliografía, especialmente las basadas en proteínas (Ortiz *et al.*, 2017; De Moraes *et al.*, 2013). Si bien las películas transparentes suelen ser más atractivas para su aplicación en envases, las películas translúcidas y/u opacas, se pueden usar cuando no se requiere la observación directa del producto o bien, en aquellos productos que deben protegerse de la luz (las proteínas absorben también luz ultravioleta). Las mediciones de color en películas con diferentes pHs se realizaron en la superficie inferior de la película, que estuvo en contacto con la placa de Petri durante la formación de la misma (superficie brillante), y en la superficie superior expuesta al aire durante el proceso de evaporación (superficie opaca) (Arrieta *et al.*, 2013), posiblemente afectada por la evaporación del disolvente y por la deposición de partículas ajenas (polvo) durante el secado. Se encontraron diferencias en el parámetro *L* (luminosidad) entre los lados opaco y brillante. Como se describe en la tabla 6.2, los valores del lado brillante son mayores que los del lado opaco. El pH también influyó en este parámetro y se han encontrado diferencias estadísticamente significativas con el aumento del pH en ambos lados de las películas: *L*

disminuyó hacia los pH alcalinos. Por otro lado, ambos parámetros *a* (escala de verde a rojo) y *b* (escala de azul a amarillo) aumentaron con el pH, y cambiaron a rojo y amarillo, respectivamente. Estos cambios causaron que el valor de ΔE con respecto a un patrón de color blanco también aumentara.

Tabla 6.2 Los valores *L*, *a*, *b* y la diferencia de color (ΔE) se determinaron a partir de las mediciones de color utilizando el espacio de color CIELab.

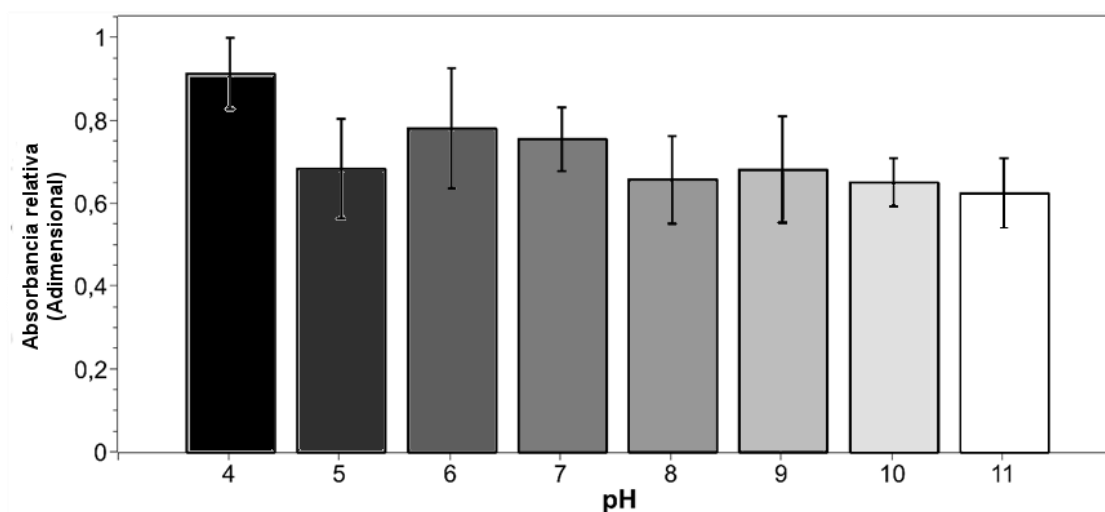
Muestra	Superficie opaca				Superficie brillante			
	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
pH 4	87,8±1,7 ^a	-1,6±0,4 ^a	22,7±2,3 ^a	23,1±2,8 ^a	91,0±1,1 ^a	-2,1±0,2 ^a	18,4±2,5 ^a	18,0±2,7 ^a
pH 5	88,4±2,2 ^a	-0,5±0,6 ^b	20,5±2,8 ^a	21,0±3,4 ^a	91,4±0,8 ^a	-1,2±0,1 ^c	17,0±1,7 ^a	16,5±1,9 ^a
pH 6	84,9±2,2 ^b	0,6±0,5 ^c	25,9±3,4 ^b	27,3±4,0 ^b	90,7±1,2 ^a	-1,4±0,3 ^{bc}	19,4±3,5 ^{ab}	19,0±3,6 ^{ab}
pH 7	84,7±1,7 ^b	0,6±0,4 ^c	25,2±2,8 ^b	26,7±3,2 ^b	90,6±1,3 ^a	-1,0±0,8 ^c	19,4±3,6 ^{ab}	19,0±3,8 ^{ab}
pH 8	83,5±1,6 ^{ab}	0,9±0,6 ^c	26,1±1,8 ^b	28,2±2,1 ^b	89,2±1,2 ^b	-1,2±0,2 ^{bc}	21,8±2,8 ^{bc}	21,8±3,0 ^{bc}
pH 9	82,1±1,6 ^{cd}	1,1±0,4 ^c	26,8±2,1 ^{bc}	29,5±2,5 ^{bc}	88,9±1,3 ^{bc}	-1,2±0,2 ^{bc}	22,5±3,1 ^c	22,6±3,3 ^c
pH 10	80,6±2,5 ^d	1,0±0,8 ^c	28,7±2,5 ^{cd}	31,9±3,4 ^{cd}	88,2±1,4 ^{bc}	-1,5±0,3 ^b	24,2±3,0 ^{cd}	24,3±3,3 ^{cd}
pH 11	80,6±2,0 ^d	0,6±0,6 ^c	30,6±1,9 ^d	33,5±2,6 ^d	87,9±1,4 ^c	-1,0±0,2 ^a	26,5±3,0 ^d	26,6±3,2 ^d

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La opacidad se evaluó en cada pH y el aumento del pH redujo la opacidad normalizada (figura 6.4). Aunque las desviaciones estándar obtenidas fueron altas, la comparación de pH extremos (4 y 11) mostró una clara disminución en los valores de opacidad de las películas con el aumento del pH. Cao *et al.* (2007) informaron diferencias en la opacidad cuando se modificó el pH de las mezclas de aislados de proteína de gelatina y soja. A pH 6, la opacidad fue máxima y luego se redujo a pH alcalinos. Estos autores atribuyeron este cambio a las partículas insolubles de proteína presentes a pH 6 y solubilizadas a pH 8, 8,5 y 9. Algunos β -glucanos y mananos son solubles en pH alcalinos (Wagner *et al.*, 2008) y esta solubilización podría contribuir a reducir opacidad, pero es probable

que otros efectos influyan en esta reducción, ya que la opacidad disminuye gradualmente a partir del pH 6, donde aún no se logró la solubilización de los β -glucanos.

Figura 6.4 Opacidad relativa (lectura de 400 a 800 nm) de películas de levadura preparadas con dispersiones a diferentes pHs

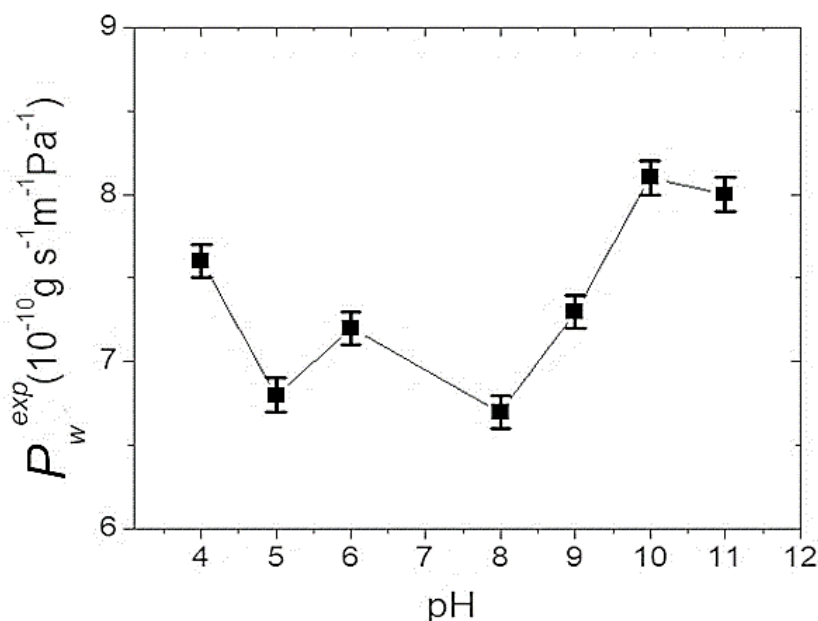


Los valores fueron normalizados por la mayor absorbancia en cada lote. Las barras de error indican la desviación estándar de cada muestra.

6.6 Determinación del coeficiente de permeabilidad al vapor de agua

El coeficiente de permeabilidad disminuyó desde pH 4 ($7,6 \pm 0,1 \cdot 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) a pH 8 ($6,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) y luego, se produjo un aumento importante de pH 8 a pH 11 ($8,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$). En la figura 6.5 se puede encontrar la descripción gráfica de este comportamiento. En películas obtenidas de aislado de proteína de soja, la permeabilidad al vapor de agua no se modificó en el rango de pH 6 a 12 y en películas de gluten de trigo tuvieron coeficientes de permeabilidad similares a pHs 4, 9, 10, 11 y 12, ambos resultados fueron informados por Gennadios *et al.* (1993). En los dos casos se observaron algunas diferencias por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas. Todas las películas de levadura estudiadas en este trabajo tuvieron coeficientes más bajos que las películas basadas en proteína de soja.

Figura 6.5 Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp}) determinada para películas de levadura a diferentes pH por el método de la norma ASTM E96.



Bosquez-Molina *et al.* (2010) prepararon películas con goma de mezquite, un exudado natural de polisacáridos formado por heteropolielectrolitos altamente ramificados de L-arabinosa, D-galactosa y proporciones minoritarias de 4-O-metil-D-glucuronato y L-ramnosa, glicerol, CaCl_2 y cera de candelilla. Los autores incorporaron CaCl_2 en diferentes cantidades utilizando la capacidad de interaccionar del Ca^{2+} con las cargas negativas de grupos carboxilo de los componentes de la goma. Encontraron que la rugosidad de superficie aumentó con la incorporación de calcio y que el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua disminuyó con la incorporación de hasta 0,3% de CaCl_2 y a partir de ahí, se incrementó. Ollé Resa *et al.* (2014) observaron algo similar en películas de almidón de mandioca, donde informaron un coeficiente de correlación de Pearson negativo para la relación entre el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua y la rugosidad de las películas. Estos autores propusieron que el aumento en la rugosidad podría disminuir la sorción del vapor de agua, primer paso del proceso de permeabilidad, que podría ser similar a lo que sucede con las películas de levadura. En la sección 6.7 se presentarán los valores de rugosidad obtenidos a través del microscopio de fuerza atómica.

6.7 Análisis de los espectros en infrarrojo de las películas

Los cambios en las interacciones de los grupos funcionales pueden afectar la libertad de movimiento de ciertos enlaces y estas modificaciones se reflejaron en cambios en la intensidad de la absorción o en el número de onda en el espectro infrarrojo. El análisis se basó en trabajos anteriores que identificaron grupos funcionales en la biomasa de levadura que fueron citados también en el capítulo IV (Novák *et al.*, 2012; Padmavathy *et al.*, 2003; Galichet, *et al.*, 2001). Al igual que en el capítulo IV se trabajó con regiones del espectro para realizar un análisis más sencillo del mismo: la primera región correspondiente a la vibración de los grupos funcionales de -OH y -NH ($2800\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$), una segunda región de absorción de proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos ($1800\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$), y una tercera con gran influencia de los sacáridos (mono, di, oligo y poli-) ($1180\text{-}780\text{ cm}^{-1}$).

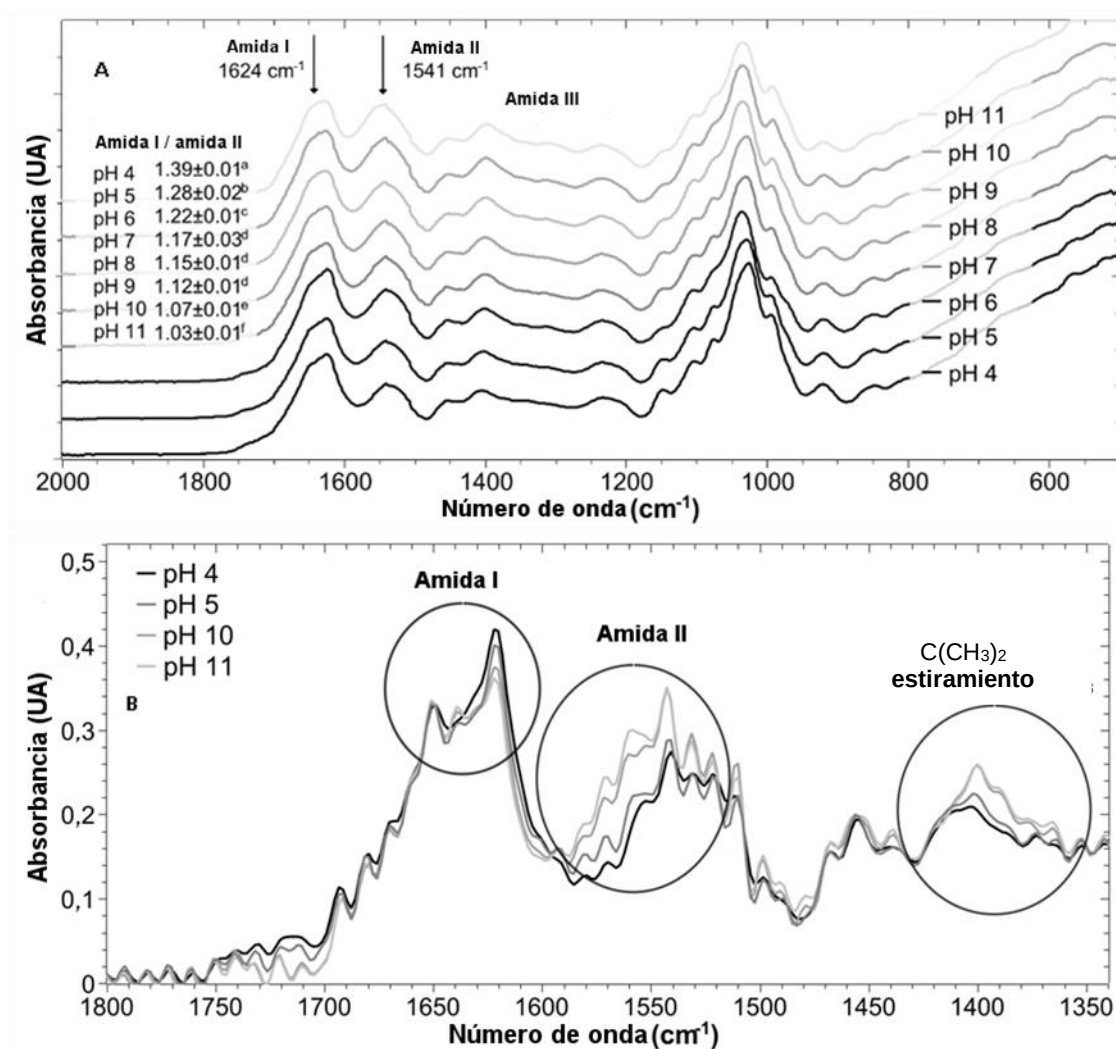
La figura 6.6A muestra los espectros obtenidos a diferentes pH, en los que se señalaron las principales bandas afectadas. Se observaron diferencias significativas en la relación entre las absorbancias de amida I y amida II, se obtuvo un valor de 1,39 a pH 4, mientras que a pH 6 esta relación fue de 1,22 y 1,03 a pH 11, como se indica en la figura 6.6A.

En la figura 6.6B se amplió la zona de las amidas para observar mejor los cambios. La modificación en las absorbancias reflejó el aumento o la disminución de la libertad para realizar movimientos en los enlaces de átomos/moléculas, como estiramiento o flexión, debido a las interacciones con otros grupos funcionales de la misma o de otra molécula (Barth, 2007). Los cambios en la banda amida I podrían reflejar también modificaciones estructurales en las proteínas. Para la determinación de estructuras en las proteínas suele utilizarse la banda amida I, ya que la banda amida II es menos sensible a los cambios en la estructura (Barth, 2007; Singh 2000).

La región alrededor de 1400 cm^{-1} incrementó su absorbancia a pHs más altos. Según trabajos anteriores, esta región es asociada al estiramiento en grupos $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ en proteínas y ácidos nucleicos (Shi *et al.*, 2010), así como hay contribuciones del $\text{N}(\text{CH}_3)$ en la cabeza de la fosfatidilcolina y a una deformación CH_3 en el ergosterol ($\sim 1387\text{ cm}^{-1}$) (Berterame *et al.*, 2016). Rahmelow *et al.*

(1998) publicaron un trabajo en el que se analizó la contribución de los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos en las absorbancias de la zona de las amidas I y II. Si bien el trabajo analiza aminoácidos y péptidos en solución, también observaron el incremento de amida II en pHs alcalinos respecto de la absorción de amida I.

Figura 6.6 Espectros de IR de las películas de biomasa de levadura: A) bandas relevantes en los espectros de IR y relación entre las absorbancias de amida I y amida II y B) la región (1800 - 1350 cm^{-1}) se amplió para observar mejor las diferencias en amida I, amida II y en la banda cercana a 1400 cm^{-1}



Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los autores señalaron dos explicaciones posibles, por un lado, el aumento de la absorbancia en la zona de amida II por la contribución del grupo $-\text{NH}_2$, favorecido

por la desprotonación en medio básico. Por otro lado, señalaron que la interacción electrostática entre los grupos $-\text{NH}_3^+$ y $-\text{COO}^-$ está desfavorecida, debido a que el grupo amino está desprotonado a pH básico y no tiene carga neta. Debido a esto, la vibración de deformación de $-\text{NH}_2$ en 1565 cm^{-1} podría incrementarse. No se observaron cambios directamente atribuibles a la formación de puentes disulfuro. En sistemas multicomponentes es difícil observar eventos que producen señales débiles y que, posiblemente, se superponen con otras bandas.

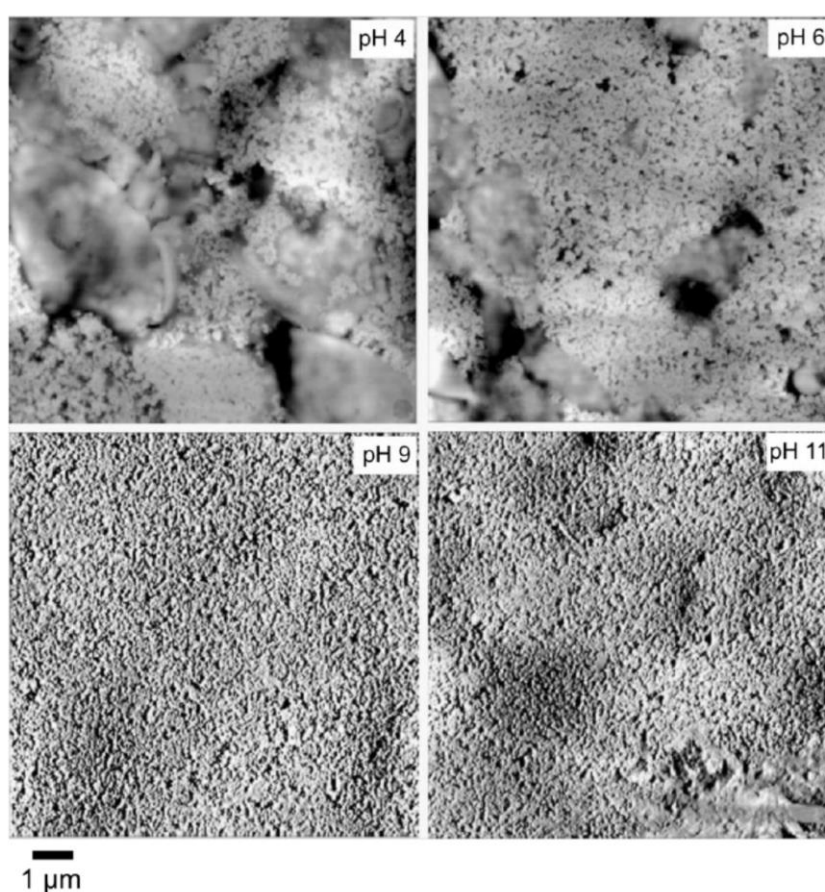
Según otros autores que analizaron los espectros infrarrojos de células de levadura, las bandas de absorción encontradas en la región de $794\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$ corresponden en mayor cantidad a los polisacáridos (Novák *et al.*, 2012; Galichet *et al.*, 2001), principalmente glucanos y mananos de la pared celular. La solubilización de una porción de los β -glucanos de pared podría mejorar su distribución en la película e incrementar las señales relacionadas a ellos en el espectro.

6.8 Microscopía de fuerza atómica y medición de la rugosidad superficial

Algunas pequeñas estructuras con un tamaño típico de $200\text{--}500\text{ nm}$, posiblemente debido a los agregados formados, se pueden ver en las imágenes obtenidas a través de microscopía de fuerza atómica (AFM) (figura 6.7). Estas imágenes mostraron que a medida que aumenta el pH, se obtuvo una topografía mucho más homogénea, ya que es posible observar algunos restos de la pared celular a pH 4 y pH 6. La afirmación se apoya también en los valores de rugosidad, que tendieron a disminuir en los pH alcalinos. A pH 6, S_a y S_q (rugosidad lineal y RMS) fueron $16,2\pm 1,7$ y $21,6\pm 3,7\text{ nm}$, respectivamente, mientras que a pH 11 fueron $12,0\pm 1,5$ y $15,2\pm 2,2\text{ nm}$. El pH afectó claramente la forma en que los polímeros interactuaron y modificó la solubilidad de ciertos componentes, como sucede con la solubilización de β -glucanos y mananos solubles, quizás éstas sean las causas de la disminución de la rugosidad. Esto podría contribuir también a la reducción de la opacidad ya observada en la sección 6.5 y en el aumento de la permeabilidad informado en la sección 6.6. En una superficie menos rugosa la trayectoria de la luz se altera menos, lo que aumenta la transmitancia y a continuación, la opacidad disminuye. Fabra *et al.* (2009) informaron que una disminución en la rugosidad de la superficie de las

películas de caseinato de sodio, con mezclas ácidas oleico-cera de abejas, estuvo bien correlacionada con el aumento de la transparencia de la película. Ellos explicaron que el aumento de la rugosidad de la superficie se debió a la formación de estructuras heterogéneas de proteínas con lípidos en la superficie durante la evaporación del solvente/dispersante.

Figura 6.7 Imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica (fase) a partir de superficies brillantes de muestras de películas obtenidas con pH 4, 6, 9 y 11

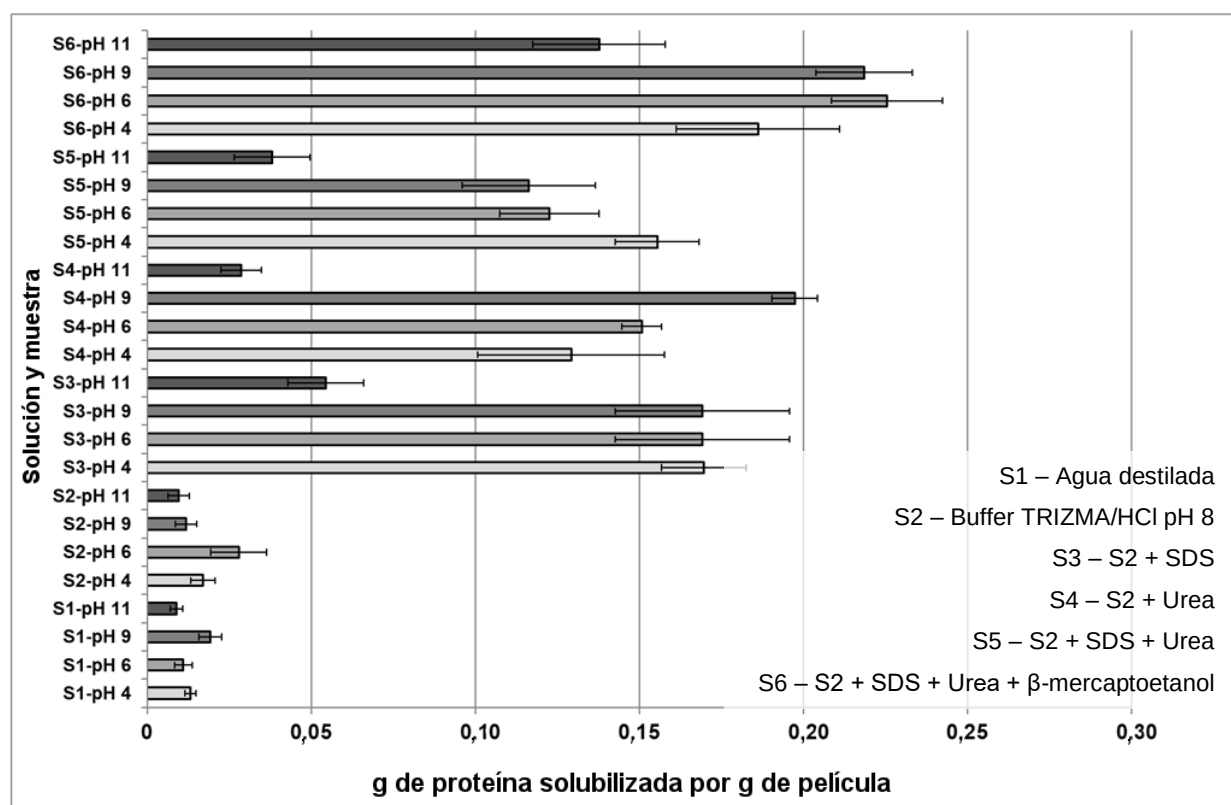


6.9 Solubilidad diferencial de las películas a distintos pHs en soluciones seleccionadas

De acuerdo con los resultados observados en la figura 6.8, las películas obtenidas a partir de dispersiones a pH 11 tuvieron menor solubilidad que las de pH 4, pH 6 y pH 9 en las seis soluciones estudiadas. El agua destilada (S1) utilizada a modo de control, posee una pequeña capacidad para disgregar las

películas, en comparación con las otras soluciones. S2 se formuló, como se informó en trabajos anteriores, para solubilizar proteínas preferentemente estabilizadas por interacciones electrostáticas, y la incorporación de SDS en S3 disgregó estructuras estabilizadas por interacciones hidrofóbicas.

Figura 6.8 Resultados de las determinaciones de proteína soluble mediante ensayos de Biuret en gramos de proteína solubilizada por gramo de película.



En la figura se proporciona una breve descripción de las soluciones utilizadas para disolver las películas.

Otros estudios han informado que las películas de proteínas o polisacáridos obtenidas por el método *casting* están particularmente estabilizadas por numerosas interacciones hidrofóbicas, mientras que otros métodos de procesamiento, como el moldeo por compresión o la extrusión, podrían beneficiar otros tipos de enlaces intermoleculares o intramoleculares, como los puentes disulfuro (Ciannamea *et al.*, 2014). Se obtuvo un salto en la solubilidad en S3 en comparación con las soluciones S1 y S2. En S4 se añadió urea a la solución base (S2) para facilitar la ruptura de los puentes de hidrógeno, y la solubilidad se incrementó para los pHs 4, 6 y 9. Cuando se agregaron juntos SDS

y urea en la solución S5, ya no hubo un incremento adicional de la solubilidad, con respecto a S4. Esto podría ser causado por una interacción negativa entre las moléculas que se solubilizaron, interfiriendo la solubilidad de una especie en la de las otras. La solución S6 incluyó 2-mercaptoetanol para disolver proteínas estabilizadas por puentes disulfuro y en este caso se alcanzó la mayor solubilidad para las muestras de pH 11.

Los pHs alcalinos podrían beneficiar las uniones intramoleculares, ya sea mediante enlaces disulfuro (que es lo que pretende medir la técnica de solubilidad diferencial) o por reticulación a través de la formación de enlaces isopeptídicos (Fennema, 1996). El entrecruzamiento entre cadenas de polímeros ya se exploró en otras formulaciones de películas con resultados positivos, las propiedades mecánicas dependen del grado de entrecruzamiento y la formación de estos enlaces se puede observar mediante diferentes técnicas, de manera indirecta, como TGA, donde los cambios de las temperaturas de degradación o la aparición de nuevos eventos son huellas comunes.

Algunos autores han observado que un reemplazo de los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas por los enlaces intramoleculares da como resultado un aumento en la deformación a ruptura (Ciannamea *et al.*, 2014). Ashby y Jones (2012) explicaron que las interacciones de corto alcance, los enlaces de Van der Waals, contribuyen a la rigidez de los polímeros por debajo de las transiciones vítreas, pero cuando los polímeros se calientan, los enlaces de Van der Waals se debilitan y el módulo elástico disminuye.

Sin embargo, los polímeros pueden permanecer en estado sólido debido a los enlaces cruzados entre las cadenas. Esta situación particular les confiere mayor libertad de movimiento y, por lo tanto, mayor deformación a ruptura.

La solubilidad diferencial ayudó a explicar con más detalle el comportamiento de las propiedades mecánicas de las películas obtenidas con diferentes pHs. De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que la energía total involucrada en las interacciones entre las cadenas fuera similar a diferentes pH, como se sugiere en los valores constantes del módulo elástico. Sin embargo, el tipo y la calidad de enlaces varió con el pH. Mientras que a pH más bajos hubo más enlaces intermoleculares de baja energía, como los enlaces por fuerzas de dispersión de London, las fuerzas de Debye o Keesom, a pHs alcalinos hubo más enlaces con gran energía como puentes disulfuro (enlaces

intramoleculares). Al mismo tiempo, es necesario considerar también el efecto de la repulsión electrostática a pHs alejados del punto isoeléctrico, que en muchos casos podría ser benéfico. Algunos autores informaron que las propiedades mecánicas de las películas de proteínas empeoran cerca del punto isoeléctrico, si las interacciones de tipo hidrofóbico y los puentes de hidrógeno son beneficiados cerca de este punto (Wihodo y Moraru, 2013).

En general, un alto grado de entrecruzamiento en las películas disminuye la deformación, mientras que el módulo elástico y la resistencia a la tracción aumentan. No obstante, este efecto depende del tipo de grupo funcional, el agente de entrecruzamiento y el grado de reacción alcanzado (Ashby y Jones, 2012). Chambi y Grosso (2006) estudiaron mezclas de caseína y gelatina con una gran mejora en la deformación a ruptura en la mezcla de 75:25 (caseína: gelatina) cuando se agregó transglutaminasa. Un entrecruzamiento muy suave podría tener un efecto favorable sobre la deformación a ruptura. El reemplazo de un gran número de enlaces de baja energía por un menor número de entrecruzamientos puede resultar en mayor libertad entre las cadenas, mayor deformación y probablemente, cambios en la degradación térmica. Los ensayos de solubilidad no pueden determinar la formación de isopéptidos de forma directa, pero algunos autores han informado de enlaces favorecidos a pH alcalinos en proteínas (Rombouts *et al.*, 2010; Schwass y Finley, 1984). El pH alcalino de las dispersiones también puede desmontar la estructura de la pared celular, solubilizando los β -glucanos y los mananos (Freimund *et al.*, 2003). Todos los efectos en proteínas y polisacáridos podrían actuar en combinación para obtener las diferencias sustanciales en las características de las películas. Si bien se ha intentado explorar los cambios en los polisacáridos mediante un método de solubilidad diferencial no fue posible encontrar un método de cuantificación espectrofotométrico sin la interferencia de las proteínas. Por otra parte, se planteó también analizar el efecto del pH de la solubilidad en los polisacáridos por una vía gravimétrica. En este caso, las interferencias que producían las proteínas o los componentes de las soluciones imposibilitaron esta vía.

6.10 Preparación de películas a través de moldeo por compresión

La metodología de producción de películas por evaporación de solvente (*casting*) es una técnica simple que permite la obtención de películas sin necesidad de mayor equipamiento y de manera relativamente sencilla. A escala laboratorio, es usual la necesidad de probar múltiples formulaciones de dispersiones para estudiar cambios o bien, seleccionar alguna de ellas para su posterior escalado a métodos de producción piloto o de mayor escala. Las cantidades de materiales que se necesitan para la producción de las películas por *casting* son pequeñas. Los métodos de producción industrial son diferentes, trabajan con grandes volúmenes, combinando la aplicación de presión y temperatura. Los métodos más difundidos son la extrusión y el moldeo por compresión. En estos métodos, el material a utilizar tiene un bajo contenido de agua, necesariamente debe fluir a altas temperaturas y no debe degradarse para que la preparación sea exitosa. De Graaf *et al.* (2003) mostraron que, en el caso del almidón termoplástico, es necesario un pequeño porcentaje de agua para facilitar el proceso (alrededor del 10%).

Para las películas biodegradables basadas en polímeros naturales, el paso de la escala de laboratorio a una escala piloto, y por qué no a una escala mayor, ha sido (y es) uno de los desafíos más importantes. Los polímeros naturales, con sus características hidrofílicas, deben adaptarse a métodos de procesamiento que no están pensados originalmente para ellos, sino para polímeros sintéticos, donde el material funde y fluye con facilidad, con buen margen de temperatura antes de su degradación térmica. Debido a la gran aplicación industrial de métodos como el moldeo, se decidió analizar la aplicabilidad de la biomasa de levadura para ser procesada por esta vía.

A partir de los resultados expuestos en las secciones anteriores, para el procesado mediante moldeo por compresión, se seleccionó la dispersión de levadura a pH 11 debido a su mayor estabilidad térmica y mejores propiedades mecánicas. Inicialmente el material de partida en polvo y 35% de glicerol se procesaron a 125 °C y a diferentes presiones, 1,5, 3 MPa y 4,5 MPa. El proceso consistió en 2 minutos de acondicionamiento a temperatura sin presión, 8 minutos de compresión y 3 minutos de enfriamiento antes de realizar el desmolde de la pieza.

Para la selección de las condiciones a utilizar en el proceso de preparación de películas por moldeo se consultaron trabajos realizados con polímeros de origen natural. Gurram *et al.* (2018) utilizaron biomasa fúngica, pectina y glicerol e informaron que utilizaron 1,33 MPa y 120 °C durante 10 min y Gouveia *et al.* (2019) emplearon esas condiciones para la preparación de películas a partir de pectina. Por su parte, Guerrero *et al.* (2011) utilizaron mayores valores de temperatura y presión para moldear películas de aislado de proteínas de soja y gelatina (10 MPa y 150 °C durante 2 min). En otro trabajo, en el que se utilizó *gluten meal* de maíz, las condiciones de moldeo seleccionadas fueron 1,4 MPa de presión aplicados durante 10 min con temperaturas entre 110 y 130 °C (Di Gioia y Guilbert, 1999). Hernández-Izquierdo y Krochta (2008) publicaron un trabajo de revisión sobre el procesamiento termoplástico de proteínas para la formación de películas y relevan diferentes procesamientos, siendo la temperatura el parámetro de mayor definición, el límite máximo se determina en función de la cercanía de la degradación. En el caso de polisacáridos, Ortega-Toro *et al.* (2014) utilizaron 160 °C y 3 MPa primero y luego aumentaron la presión a 13 MPa, con un tiempo total de 8 min de procesamiento para obtener películas moldeadas de almidón e hidroxipropilmetilcelulosa.

Tabla 6.3 Propiedades mecánicas de películas preparadas por moldeo bajo las condiciones iniciales (n=6)

Muestras	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a ruptura (%)
1,5 MPa - 125 °C (25% de glicerol)	14±2 ^a	0,6±0,1 ^a	8±2 ^a
1,5 MPa - 125 °C (35% de glicerol)	7±1 ^b	0,5±0,1 ^a	15±4 ^b

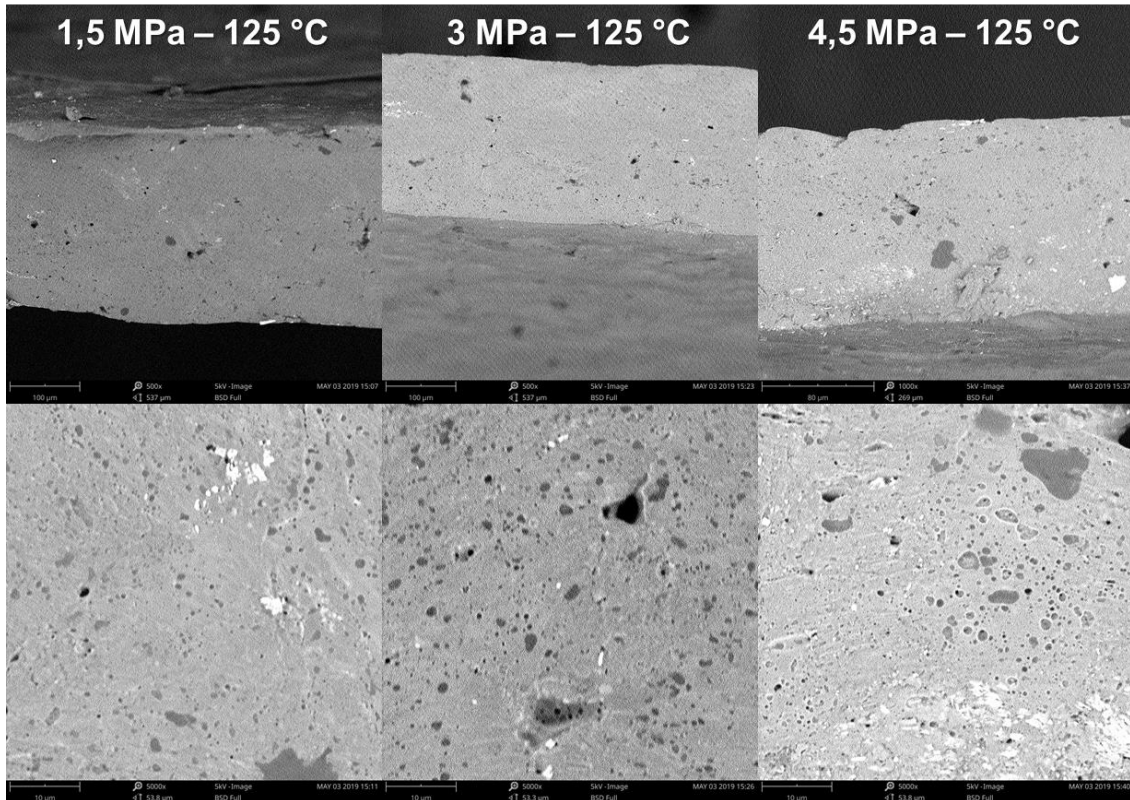
Letras diferentes en una misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa (p<0,05).

En las pruebas con polvo de levadura (pH 11) y 35% de glicerol, se observó que el material no fluyó lo suficiente, observando algunos defectos en las piezas moldeadas. Por otra parte, las películas exudaron plastificante, fácilmente

perceptible al tacto, lo que motivó a modificar la formulación prevista originalmente disminuyendo la cantidad de glicerol al 15% y al 25% en la siguiente etapa de procesamiento. Las películas obtenidas con 15% de glicerol no tuvieron una buena continuidad, por lo que no pudieron ensayarse en tracción uniaxial. Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas preparadas con 25% y 35% de glicerol se observan en la tabla 6.3. El módulo elástico de ambas formulaciones fue particularmente bajo, 50% menor al de las películas hechas por *casting* con el mismo porcentaje de plastificante (tabla 6.1). La deformación a ruptura también fue más baja respecto a las películas preparadas por *casting*.

En la figura 6.9 se muestran películas generadas a 125 °C a las tres presiones estudiadas (1,5, 3 y 4,5 MPa) con 25% de glicerol. En todas las imágenes tomadas fue posible observar poros y huecos en la estructura de las películas, lo que evidenció la falta de la fluidez del material para desplazarse y completar estos espacios. Al mismo tiempo se observaron zonas más oscuras en las imágenes que correspondieron a zonas de plastificante no integrado. Dado que estas zonas son un problema para el desempeño mecánico de las películas, deben ser corregidas en la formulación y procesamiento.

Figura 6.9 Imágenes de borde y superficie de películas preparadas a través de moldeo por compresión de polvo de levadura tratado y 25% de glicerol (5000×)

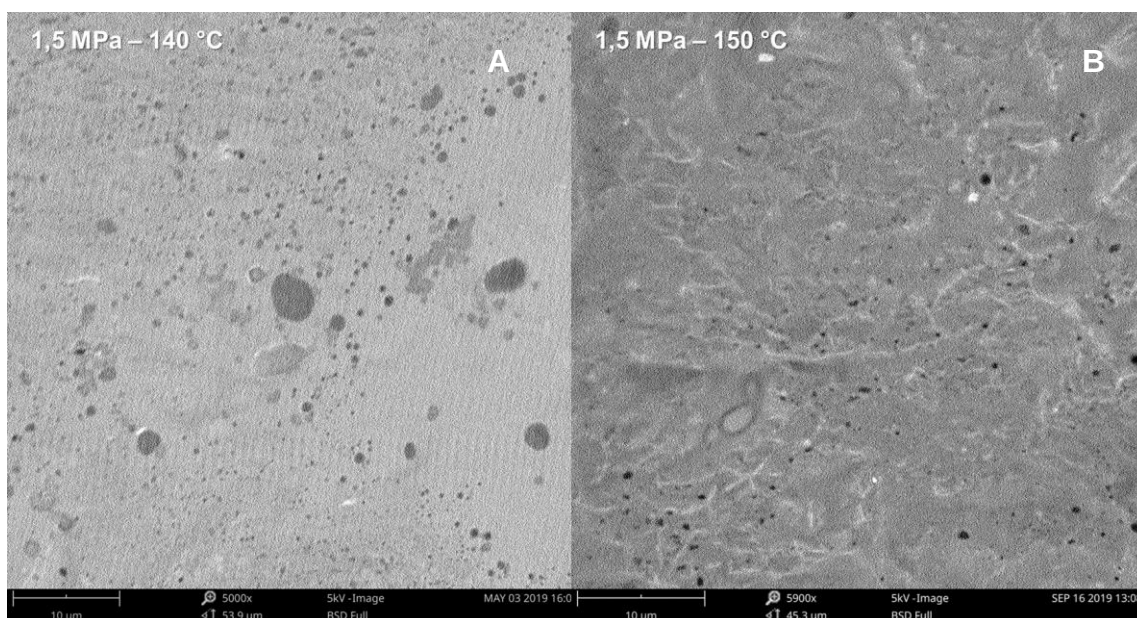


A raíz de estos resultados se modificaron las condiciones de procesamiento, se utilizó 1,5 MPa de presión y diferentes temperaturas (125, 140, 145 y 150 °C). Además, se modificó el tiempo de compresión a 10 minutos para cada temperatura (reemplazando la etapa de acondicionamiento de 2 minutos).

Dado que el módulo elástico, la resistencia a la tracción y la deformación a ruptura de las películas preparadas a presiones de 3 MPa y 4,5 MPa (datos no mostrados) fueron similares a los de las películas a 1,5 MPa se decidió continuar con la presión más baja en los ensayos en los que sólo se varió la temperatura. Se pudo observar que la presión no tuvo un efecto sustancial en la fluidez del material en las placas de compresión aún en muestras que fueron preparadas inicialmente con limitador. Sin embargo, se observó que la temperatura beneficiaba la homogeneidad de las películas facilitando la fluencia del material para ocupar los espacios del marco. No obstante, las películas preparadas con 25% de glicerol continuaron exudando plastificante. Este resultado no fue esperado, debido al buen rendimiento que había tenido este porcentaje de glicerol en las películas preparadas por *casting*. La causa de esto podría ser la forma de preparación del polvo y la mezcla insuficiente con el glicerol.

En la figura 6.10A se muestra la superficie de una película preparada con 1,5 MPa de presión y 140 °C de temperatura (15% de glicerol). Aún son visibles las zonas de plastificante no integrado. El incremento de temperatura mejoró el aspecto exterior de la película. La figura 6.10B corresponde a la superficie de una película preparada con 1,5 MPa y 150 °C (15% de glicerol). Aunque hubo una menor cantidad de poros, todavía estaban presentes. Para este segundo análisis sólo se seleccionaron las películas que fueron preparadas con 15% de glicerol, porque después de cierto tiempo las películas de 25% de glicerol también exudaron.

Figura 6.10 Imágenes de superficie y borde de películas producidas por moldeo a 140 y 150 °C: A) Superficie de una película con 15 % de glicerol a 1,5 MPa de presión y 140 °C (5000×) y B) Superficie de una película con 15 % de glicerol a 1,5 MPa de presión y 150 °C (5900×)



El aumento de temperatura mejoró el aspecto global de las películas. Los valores de las propiedades mecánicas de las películas preparadas a temperaturas más altas también fueron inferiores a las de las películas preparadas por *casting* (tabla 6.4). Estas películas no tuvieron una deformación a ruptura elevada, mientras que el módulo elástico y la resistencia a la tracción fueron bajos, parecidos a los de películas con mayor contenido de plastificante en *casting*. Si bien no se pueden observar en los resultados de la tabla 6.4, la continuidad y manipulabilidad de las películas obtenidas a temperaturas más altas fue de

calidad superior, con disminución de grietas y mejor integración del plastificante, tal como se ilustra en la figura 10.8. Rhim *et al.* (2006) prepararon películas a través de moldeo y *casting* de PLA, mientras que las moldeadas tuvieron un valor de módulo elástico muy elevado, las desarrolladas por *casting* tuvieron mayor resistencia a la tracción y deformación a ruptura. En ese caso, las diferencias pueden explicarse a través de las zonas amorfas y cristalinas de una y otra y, en el caso puntual de la deformación a ruptura, la gran diferencia entre el moldeo y el *casting* (3% y 203% de deformación, respectivamente) fue la presencia de solvente en las películas preparadas por el último método, remanente del proceso de evaporación, que actuó como plastificante. Ciannamea *et al.* (2014) realizaron películas con proteínas de soja y obtuvieron diferentes resultados, el moldeo por compresión produjo películas con mayor resistencia a la tracción y mayor deformación a ruptura que las producidas a través de *casting*. Los investigadores atribuyeron las diferencias al entrecruzamiento por puentes disulfuro y a la formación de agregados en las películas moldeadas.

Tabla 6.4 Propiedades mecánicas de películas preparadas manteniendo la presión a 1,5 MPa e incrementando la temperatura (n=6)

Muestras	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a ruptura (%)
1,5 MPa - 145 °C (15% de glicerol)	20 ± 4 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	8 ± 1 ^a
1,5 MPa - 150 °C (15% de glicerol)	21 ± 4 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	8 ± 2 ^a

No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El objetivo de las pruebas fue cumplido, analizar el desempeño de la biomasa de levadura bajo el moldeo por compresión. Respecto de la preparación futura de películas mediante este método, una serie de cuestiones deben tenerse en cuenta. En primer lugar, es necesario un método apropiado de secado, luego del tratamiento de la dispersión por la metodología homogeneización, tratamiento térmico y homogeneización, el secado por aspersion parece ser la mejor operación para la remoción del agua. En segundo término, se debe realizar una

mezcla intensa del plastificante con mezcladores de tipo tornillo. El polvo debe mezclarse con el plastificante utilizando esfuerzos de corte intensos, de modo de lograr los mejores resultados durante la compresión o el extrudado. Mejorando esto, es probable que el contenido de plastificante óptimo se encuentre entre el 15 y 25 % de glicerol y de esta manera se evitará el exudado de plastificante que se observó con 35% de plastificante y en los últimos casos, con 25% de glicerol.

La principal dificultad del paso de desarrollos de películas biodegradables a pequeña escala, o escala laboratorio, a métodos de procesamiento industrial es la disponibilidad de realizar pruebas en equipos que requieran baja cantidad de muestra, para analizar varias formulaciones, y al mismo tiempo sean similares a grandes equipos.

Parece un contrasentido la utilización de *casting* como paso previo a la preparación de placas por moldeo, siendo que esto se realiza con vistas a reemplazar el *casting* por ésta para el caso de películas gruesas. Dado que fue necesario retirar el agua de las dispersiones y no se disponía del equipo para realizar el secado por aspersión, que hubiera sido la metodología más adecuada, se decidió seguir esta otra metodología con el objetivo de realizar las pruebas por compresión. Por otra parte, el uso de una técnica como el secado por aspersión requería también de una puesta a punto que excede a los objetivos propuestos en la tesis. Está claro que la forma de procesamiento puede afectar el resultado del moldeo, no obstante, el objetivo de esta parte del trabajo fue proponer resultados preliminares que permitan abrir una discusión acerca de la factibilidad de procesamiento de la biomasa de levadura a través de esta vía.

6.11 Conclusiones del capítulo VI

El pH de las dispersiones formadoras de película de levadura produjo una notable modificación en la resistencia térmica del material estudiado, especialmente en la zona de degradación masiva de proteínas, mananos y β -glucanos, componentes mayoritarios de la biomasa celular. Además, el cambio en el pH hacia pHs alcalinos produjo un aumento significativo en la deformación nominal sin comprometer el módulo elástico o la resistencia, al contrario de lo que ocurre al incorporar un plastificante (capítulo IV).

Con respecto a la opacidad, a valores de pH más bajos se encontraron los valores más altos y esto podría estar relacionado con la solubilidad de una

fracción de los β -glucanos y los mananos a pH alcalinos y con la reducción de la rugosidad como se observó en AFM. Los ensayos de solubilidad diferencial de proteínas identificaron modificaciones en el tipo de enlaces establecidos en cada pH, las interacciones hidrófobas y los enlaces de hidrógeno fueron relevantes a pH 4, 6 y 9, mientras que los puentes de disulfuro (y posiblemente isopéptidos, no determinados por esta técnica) fueron relevantes a pH 11. El cambio en el tipo de enlaces y la consecuente libertad (o no) de las cadenas de polímeros influyeron en los efectos observados en las propiedades mecánicas, el comportamiento térmico, el color y la opacidad. Estos resultados ayudan a comprender cómo se formaron las películas y cómo afectó el pH a las interacciones entre las cadenas de polímeros. Los resultados sugirieron el uso de pHs alcalinos en las dispersiones para mejorar las propiedades mecánicas de las películas sin deteriorar otras características.

Con respecto a la preparación de películas a través de moldeo, la presión no fue una variable de peso. Por otro lado, el incremento de temperatura mejoró la integración del plastificante y la continuidad de las películas, aunque las propiedades mecánicas de las películas obtenidas por moldeo fueron inferiores a las de las películas obtenidas por *casting*. Considerando que la integración entre la biomasa y el glicerol se puede mejorar a través de un buen mezclado, el exudado observado en las películas con 35% y 25% de glicerol podría ser evitado, resultando también en una mejora de las propiedades mecánicas. Los resultados obtenidos, como la baja deformación a ruptura aún utilizando pH 11, sugirieron que las películas gruesas desarrolladas por este método serían más aplicables en envases rígidos, mejorando primero, el módulo elástico y la resistencia a la tracción con refuerzos como la celulosa.

Capítulo VII: Efecto de las fracciones de la levadura y el pH en las películas

7.1 Introducción

El efecto del cambio en el pH de las dispersiones utilizadas para preparar películas se ha descrito previamente en películas de proteínas o polisacáridos (Wihodo y Moraru, 2013; Guerrero y de la Caba, 2010) pero no para películas de biomasa de levadura, donde la interacción entre las macromoléculas constituyentes de las películas puede modificarse, obteniéndose películas con diferentes propiedades. Las modificaciones del pH afectaron las interacciones entre las cadenas de los polímeros, ya que cuando el pH estuvo cerca del punto isoeléctrico de las proteínas, los enlaces hidrófobos y de hidrógeno aumentaron y estas fuerzas cambiaron cuando el pH se alejó del punto isoeléctrico (Gennadios *et al.*, 1993). El pH también afectó la solubilidad de ciertos compuestos que constituyen películas, a veces es necesario ajustar el pH para solubilizar los polisacáridos y, por lo tanto, el pH final de la dispersión formadora de película afectó las propiedades físicas de las películas producidas como se informó en el capítulo anterior (Cazon *et al.*, 2017).

La biomasa de levadura puede considerarse como una mezcla compleja de polímeros, está formada por una fracción soluble correspondiente a varios compuestos en el citoplasma, compuesta por numerosas proteínas disponibles para formar películas, azúcares y compuestos de bajo peso que podrían plastificar las películas. Por otro lado, hay una fracción insoluble formada por la pared celular, principalmente β -glucanos y proteínas unidas a mananos. Esta fracción tiene muchas propiedades funcionales, y una de ellas es la capacidad de formar una matriz continua y resistente como se ha publicado (Peltzer *et al.*, 2018; Novák *et al.*, 2012). Una simple centrifugación puede separar las fracciones solubles e insolubles después de una ruptura adecuada de las células de levadura. Estas fracciones fueron caracterizadas previamente por Sceni *et al.* (2009) después de la ruptura de células de levadura en un molinillo de perlas de vidrio y centrifugarlas a $3.840 \times g$. En ese trabajo, los autores determinaron el contenido de proteína bruta y corregida en $45,1 \pm 3,5$ y $39,4 \pm 3,4$ g / 100 g de sobrenadante (base seca) y los carbohidratos totales fueron $11,8 \pm 0,9$ g / 100 g de sobrenadante. El contenido insoluble se enriqueció en polisacáridos

(77,4 ± 3,3 g / 100 g de pellet) y el contenido de proteína fue menor que en la fracción soluble (proteína corregida, 18,2 g / 100 g de pellet). De acuerdo a la misma publicación, la centrifugación a 22,100 ×g de una dispersión de células rotas produjo dos fracciones, la insoluble y la soluble, que representan el 64% y el 36% del peso seco, respectivamente. Algunas publicaciones y también patentes propusieron el uso de la pared celular de levadura para obtener β-glucanos como se ha mencionado en el capítulo III, eliminando otras fracciones de la biomasa de la levadura y utilizando β-glucanos para producir películas y recubrimientos. Sin embargo, es posible aprovechar toda la biomasa como se vio en los capítulos anteriores, pero surgen las preguntas, ¿contribuyen ambas fracciones (soluble e insoluble) de igual manera en la formación de la película? ¿Cómo se relacionan las propiedades de las películas con la composición de la dispersión? El presente capítulo se propone dar respuestas a estas preguntas.

7.2 Ensayos de tracción uniaxial

En el primer grupo de ensayos se seleccionó especialmente una cantidad baja de glicerol para estudiar películas con alto contenido de material soluble (mayor al 50% SOL), pero a pesar de esto no se pudieron obtener probetas de muestras de 0% INS - 100% SOL y 25% INS - 75% SOL. En la tabla 7.1 se informan los valores de las propiedades mecánicas obtenidas de la primera sección de ensayos.

Como se esperaba, el incremento del contenido insoluble (y la consecuente disminución del material soluble) aumentó el módulo elástico y la resistencia a la tracción, pero la deformación a ruptura disminuyó. Esto se debe probablemente a que los polisacáridos estructurales, como los β-glucanos y los mananos, reforzaron las películas y al mismo tiempo, los compuestos de bajo peso molecular plastificaron la matriz. La deformación a ruptura se benefició con el aumento del contenido soluble y se incrementó tres veces. La muestra control (64% INS – 36% SOL, de acuerdo a lo informado en la sección anterior), es decir, preparada con la biomasa de levadura no separada en sus fracciones, tuvo un comportamiento particular que no se pudo identificar exclusivamente con alguna de las formulaciones realizadas.

González *et al.* (2019a) realizaron mezclas de aislado de proteína de soja (SPI) y un galactomanano extraído de *Gleditsia triacanthos* (GM). La mezcla de

ambos polímeros en las proporciones SPI:GM 70:30 y SPI:GM 50:50 mostraron sinergia en el módulo elástico con valores mayores (8,3 y 7,1 MPa, respectivamente) que los valores de los polímeros obtenidos por separado (SPI: 5,5 MPa y GM: 1,6 MPa). El plastificante fue añadido al 50% p/p. La proteína tuvo mayor deformación a ruptura y menor resistencia a la tracción que el galactomanano. Un comportamiento similar en mezclas de proteínas y polisacáridos fue encontrado por Sartori *et al.* (2018) en mezclas de gluten de trigo y pectina. Las películas de gluten tuvieron mayor deformación a ruptura que las de pectina (82% y 7%, respectivamente), mientras que estas últimas tuvieron mayor módulo elástico y resistencia a la tracción. Los autores atribuyeron el mayor módulo elástico en la pectina al efecto electrostático con el Ca^{2+} . Cabe destacar que, en el caso del gluten, el glicerol añadido como plastificante fue menor (0,2% p/p) que la cantidad incorporada en las películas de pectina (1,5% p/p).

Tabla 7.1 Resultados de los ensayos de tracción uniaxial en películas con diferente composición en fracciones insoluble y soluble de levadura y 15% de glicerol

Muestras (15% de glicerol)	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a ruptura (%)
100% INS	169 ± 29 ^a	6,0 ± 1,3 ^a	6,6 ± 2,0 ^a
75% INS – 25% SOL	60 ± 7 ^b	3,4 ± 0,5 ^b	15,4 ± 1,9 ^b
50% INS – 50% SOL	38 ± 6 ^c	2,2 ± 0,4 ^c	21,6 ± 2,4 ^c
Control	65 ± 9	1,9 ± 0,1	8 ± 2

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas, p-valor <0,05.

A partir de esta situación se realizaron otros ensayos con un mayor contenido de glicerol (25%), la misma cantidad que se utilizó en el capítulo VI, para estudiar la

interacción entre el contenido de INS y SOL y el pH de la dispersión, y poder comparar con los resultados ya obtenidos en secciones anteriores.

En este segundo grupo de ensayos, se obtuvieron superficies de respuesta para identificar el efecto de cada variable y la interacción entre el contenido INS:SOL y el pH. No se pudieron obtener probetas de muestras con un contenido de material insoluble inferior al 50%, debido a que las películas con alto contenido de fracción soluble y glicerol se adhirieron a la placa. En la Tabla 7.2 se muestran los parámetros de las ecuaciones que describen las superficies de respuesta. Las figuras 7.1, 7.2 y 7.3 muestran las superficies de respuesta entre las variables estudiadas del módulo elásticos, resistencia a la tracción y deformación a ruptura, respectivamente. Las superficies de respuesta del módulo elástico (tabla 7.2 y figura 7.1) y la máxima resistencia a la tracción (tabla 7.2 y figura 7.2) se obtuvieron con valores de R^2 ajustados aceptables, 0,85 y 0,91, respectivamente para cada variable de respuesta. En el caso de la deformación a ruptura, el R^2 ajustado fue menos satisfactorio que en los otros casos. Como se puede observar en la figura 7.1 y en tabla 7.2 el módulo elástico fue muy influenciado por el contenido de insolubles. Tanto el término lineal como el término cuadrático tuvieron una gran significatividad en el modelo ($p < 0,001$). Una de las hipótesis sometidas a evaluación en este ensayo fue que los polisacáridos de pared otorgan resistencia a la estructura, ya que la matriz le transfiere la carga por su buena compatibilidad. Por otra parte, la otra hipótesis sometida a prueba fue que la fracción SOL disminuye sustancialmente el módulo elástico y la resistencia a la tracción, debido a la presencia de compuestos de bajo peso molecular que podrían plastificar la estructura y a la presencia de proteína.

Como se informó en el capítulo anterior, el pH no tuvo efecto en el módulo y, en este caso, la interacción con el contenido de fracción insoluble se descartó completamente (significatividad $p \geq 0,05$ del término X_1X_2 de la tabla 7.2), de acuerdo con los resultados de la superficie de respuesta (figura 7.1). En el caso de la resistencia a la tracción, la interacción y el término lineal del pH tuvieron un efecto significativo, al igual que la interacción entre el contenido de fracción insoluble y el pH (significatividad $p < 0,05$ de X_1X_2 en la tabla 7.2). La máxima resistencia a la tracción se encontró al 100% de contenido insoluble y a pH 11

(figura 7.2). El efecto del pH fue muy marcado a 100% INS y fue menor para contenidos de la fracción insoluble menores al 70%.

Tabla 7.2 Parámetros de los modelos de superficie de respuesta para tres características mecánicas: módulo elástico, resistencia a la tracción y deformación a ruptura

Parámetros de la superficie de respuesta (25% de glicerol)	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a ruptura (%)
Término	Estimado	Estimado	Estimado
X ₀ Intercepción	11,56 ± 1,62***	0,73 ± 0,10***	14,75 ± 1,96***
X ₁ Lineal contenido insoluble (%)	2,89 ± 0,48***	0,25 ± 0,03***	0,79 ± 0,58
X ₂ Lineal pH	1,13 ± 1,34	0,35 ± 0,08**	4,98 ± 1,61*
X ₁ X ₂ Interacción de ambos factores	0,05 ± 0,59	0,11 ± 0,03*	1,22 ± 0,71
X ₁ ² Cuadrático de contenido insoluble	1,41 ± 0,26***	0,10 ± 0,02***	0,91 ± 0,31*
X ₂ ² Cuadrático de pH	-1,40 ± 2,04	0,17 ± 0,12	3,47 ± 2,46
R ² múltiple	0,883	0,948	0,760
R ² ajustado	0,819	0,919	0,633
Falta de ajuste Pr(>F)	0,17	0,07	0,09

La codificación de la significatividad es la siguiente: ‘***’ $p < 0,001$; ‘**’ $p < 0,01$; ‘*’ $p < 0,05$. Los valores que no tienen asterisco/s no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

Figura 7.1 Superficie de respuesta del módulo elástico con respecto al contenido de fracción insoluble (% , complementaria de la fracción soluble) y el pH

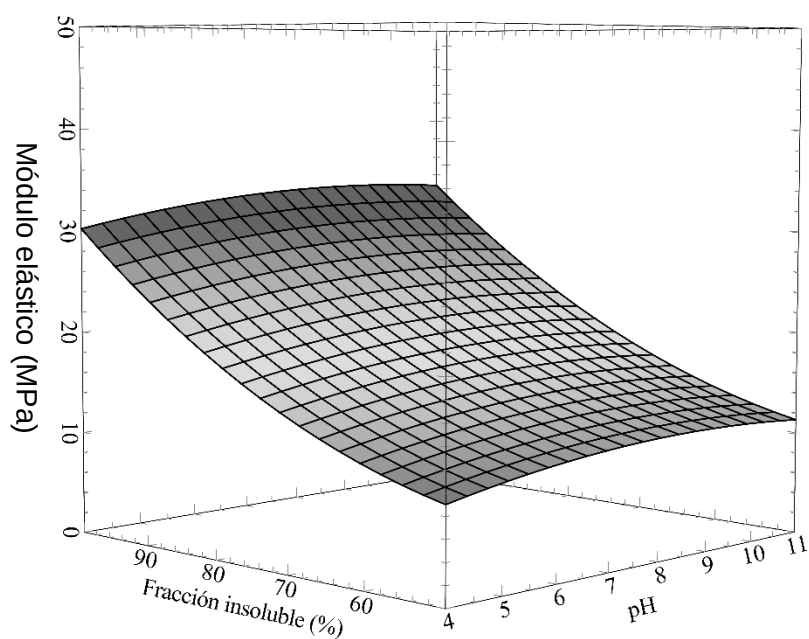


Figura 7.2 Superficie de respuesta de la resistencia a la tracción con respecto al contenido de fracción insoluble (% , complementaria de la fracción soluble) y el pH

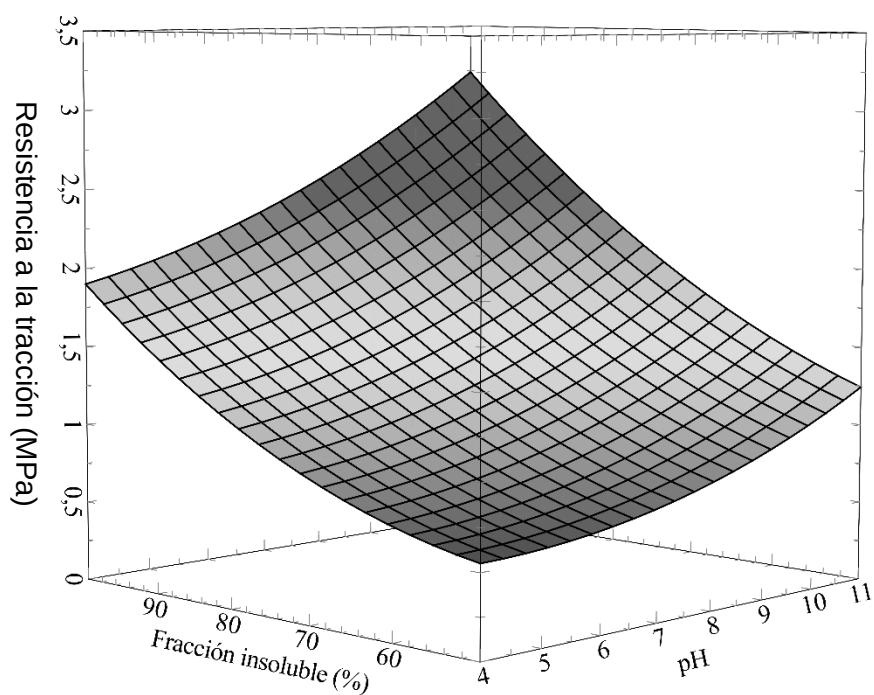
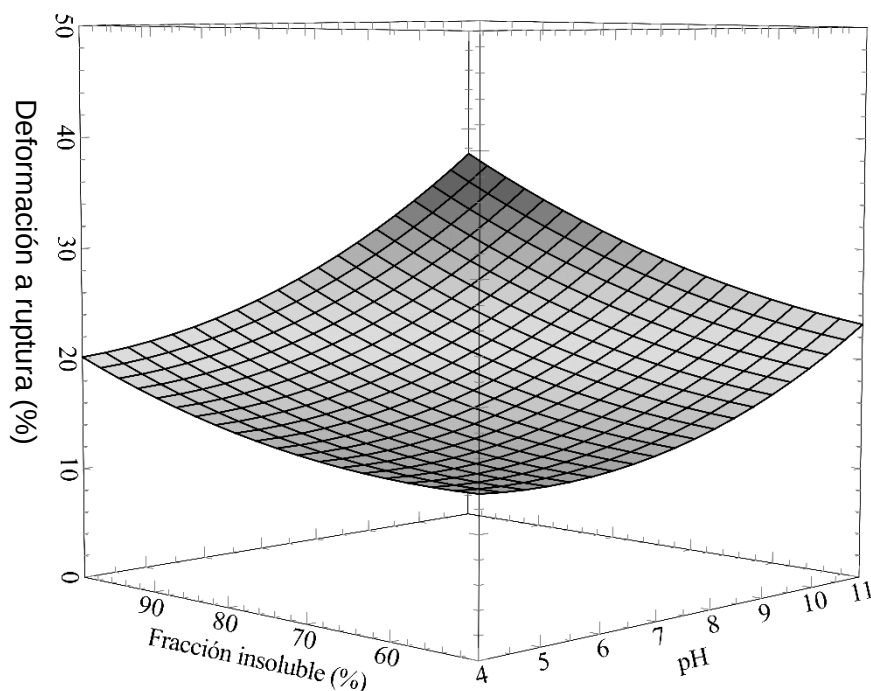


Figura 7.3 Superficie de respuesta de la deformación a ruptura con respecto al contenido de la fracción insoluble (%; complementaria de la fracción soluble) y el pH



Hamaguchi *et al.* (2007) realizaron películas con proteínas miofibrilares de la carne del pez *Makaira Mazara* y estudiaron la influencia del pH en las características mecánicas, la permeabilidad al vapor de agua y la transparencia. En cuanto a las características mecánicas, se evaluó un rango amplio de pH, desde 2 hasta 12. En los pHs cercanos al punto isoeléctrico no se pudieron solubilizar las proteínas por lo que tampoco se obtuvieron películas. Lejos del pH correspondiente al punto isoeléctrico, la deformación a ruptura se modificó ligeramente sin una marcada tendencia de ascenso o descenso. En el caso de los polisacáridos, por ejemplo, Sakkara *et al.* (2018) estudiaron el desarrollo de películas con mezclas de quitosano y almidón de maíz. Una vez formada la película, sometieron a las mismas a tratamiento alcalino en una solución de hidróxido de sodio 0,5 N (el quitosano es soluble en ácido). La resistencia a la tracción de estas películas disminuyó en las mezclas con mayor contenido de almidón luego del tratamiento con álcali. Sin embargo, la deformación a ruptura se incrementó en las mezclas luego del tratamiento alcalino, inclusive en el control de quitosano puro. Estos autores indicaron que si el tratamiento aplicado mejora la interacción entre ambas fracciones, se incrementa la deformación a

ruptura de las películas. Esto puede suceder también en las películas de biomasa de levadura cuando se produce la solubilización parcial de los β -glucanos a pHs alcalinos (mayores a 10) lo que incrementa la posibilidad de interaccionar con la proteína. Mientras otros β -glucanos que no son solubles, continuaron reforzando la película, ejerciendo su efecto sobre la resistencia de la misma.

En muchos casos las películas son preparadas a partir de proteínas o polisacáridos concentrados o aislados. Debe tenerse en cuenta si realmente es necesario concentrar o aislar y, si por buscar esto, no se está perdiendo un comportamiento sinérgico con el uso total de la biomasa o al menos no se afecta al polímero disminuyendo su capacidad potencial de formar películas.

Los valores de los módulos elásticos (desde 10 hasta 30 MPa) y las resistencias máximas a la tracción (desde 0,5 hasta 3 MPa) que se obtuvieron en las superficies de respuesta son menores que los valores informados en el capítulo VI (al mismo contenido de glicerol) para las películas en las que las fracciones no se separaron, es decir que fueron realizadas con la composición natural de la levadura. La diferencia entre ambos valores se debe probablemente a que, en el caso de las fracciones agregadas intencionalmente, la fracción soluble se sometió a una etapa previa de desnaturalización térmica y agregación durante la concentración. Este paso no se pudo omitir, ya que era necesaria una concentración para realizar la mezcla con la fracción insoluble y alcanzar una concentración final en la dispersión de 10% p/p. Cabe destacar que el tratamiento térmico aplicado durante la concentración de la fracción soluble se realizó en ausencia de la fracción insoluble, lo que favoreció las interacciones entre componentes sólo de la misma fracción. Luego, cuando las fracciones soluble e insoluble se mezclaron en las diferentes proporciones, las proteínas ya estaban agregadas y su interacción con los polisacáridos de la pared celular fueron menos promovidas que en el proceso convencional de producción. Estas interacciones entre proteínas – proteínas y proteínas – polisacáridos podrían mejorar sus propiedades mecánicas.

7.3 Características de hidratación y permeabilidad al vapor de agua

Como se puede ver en la tabla 7.3, la disminución en la fracción insoluble aumentó la absorción de agua en el equilibrio. Los mayores contenidos de fracción insoluble hicieron que los coeficientes de difusión, efectivos (D_w^{eff}) e

iniciales (D_w^i) aumentarían ligeramente. El pH parece no haber tenido efecto en el coeficiente de difusión. El aumento en la solubilidad del vapor de agua en la película generado por el enriquecimiento en la fracción soluble hizo que, a igual pH, aumentara la permeabilidad a través del valor de S_w . Se eligió esta prueba para conocer el efecto particular de la fracción SOL e INS sobre S_w y D_w^i (y la permeabilidad al vapor de agua) y la interacción de ambas fracciones con el pH. En el capítulo V se informó que la permeabilidad de las películas de levadura se encontró en el orden de $10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Estos resultados deben tenerse en cuenta al momento de proponer mejores estrategias para disminuir la permeabilidad al vapor de agua, y en este caso sería disminuir la fracción soluble. Otras alternativas son, la adición de nanopartículas para aumentar la trayectoria tortuosa podría contribuir a la disminución del coeficiente de difusión aparente (y a través de éste, la permeabilidad), mientras que las modificaciones químicas o físicas de la biomasa (totales o superficiales) podrían ser otro camino para disminuir la permeabilidad, desfavoreciendo los pasos de sorción y desorción, ya que los polímeros naturales tienen de por sí, una gran afinidad con el agua. Las modificaciones pueden ser, por ejemplo, el tratamiento con plasma o deposición química de vapor (De Albuquerque *et al.*, 2014, Bastos *et al.*, 2009), la derivatización con grupos funcionales hidrofóbicos (Niu *et al.*, 2019) o la incorporación de láminas de materiales hidrofóbicos (Slavutsky y Bertuzzi, 2016), entre otros.

Tabla 7.3 Hidratación de las películas obtenidas con mezclas de fracciones soluble e insoluble: Unidades de los parámetros, h_{∞} (g de H₂O por g m.s.), D_w^{eff} (10^{-13} m² s⁻¹), S_w ($g\ m^{-3}\ Pa^{-1}$) y D_w^i (10^{-13} m² s⁻¹)

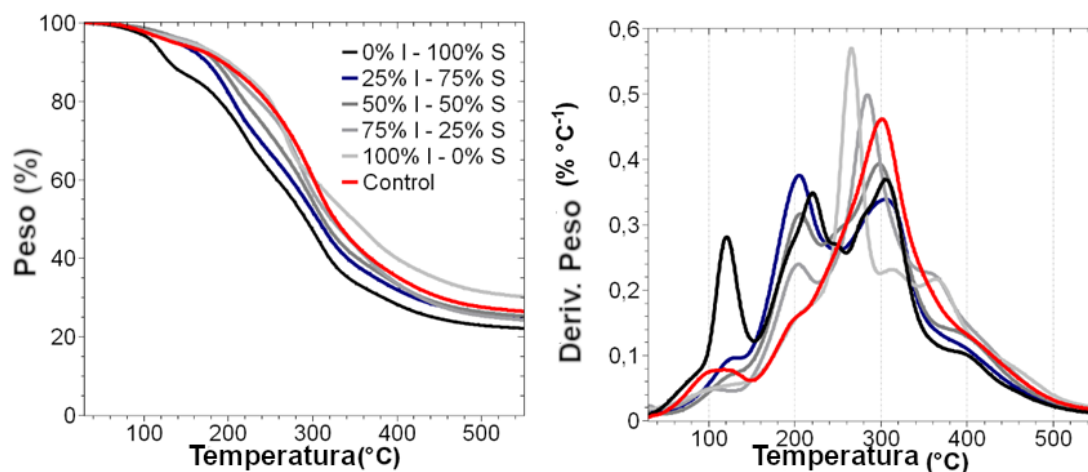
Muestra	Modelo Crank				Modelo STL		Permeabilidad al vapor de agua
	R^2	h_{∞}	S_w	D_w^{eff}	R^2	D_w^i	$P_w = S_w \cdot D_w^i$
100% SOL/0% INS pH 4	0,997	0,93 ± 0,01	534 ± 6	2,9 ± 0,1	0,989	18 ± 1	9,6 ± 0,5
100% SOL/0% INS pH 7,5	0,992	0,77 ± 0,02	440 ± 9	2,7 ± 0,2	0,992	16 ± 1	7,1 ± 0,3
100% SOL/0% INS pH11	0,993	0,94 ± 0,02	536 ± 10	2,6 ± 0,2	0,990	16 ± 1	8,8 ± 0,4
50% SOL/ 50% INS pH 4	0,995	0,75 ± 0,01	427 ± 6	3,0 ± 0,1	0,990	18 ± 1	7,6 ± 0,4
50% SOL/ 50% INS PH 7,5	0,992	0,72 ± 0,01	412 ± 8	2,8 ± 0,2	0,997	16 ± 1	6,7 ± 0,2
50% SOL/ 50% INS pH 11	0,993	0,81 ± 0,02	463 ± 9	2,7 ± 0,2	0,991	17 ± 1	7,8 ± 0,3
0% SOL/100% INS pH 4	0,995	0,59 ± 0,01	338 ± 5	3,2 ± 0,2	0,991	21 ± 1	7,0 ± 0,5
0% SOL/100% INS pH 7,5	0,992	0,55 ± 0,01	316 ± 6	3,2 ± 0,2	0,990	19 ± 1	6,0 ± 0,4
0% SOL/100% INS pH 11	0,994	0,65 ± 0,01	374 ± 6	3,0 ± 0,2	0,993	20 ± 1	7,7 ± 0,4

Los valores se obtuvieron de acuerdo al mejor ajuste de los datos experimentales de las cinéticas de sorción de agua a 90% HR. Los parámetros se ajustaron utilizando diferentes modelos: Intervalo de tiempo corto (STL) y el de Fick-Crank. S_w ($g\ m^{-3}\ Pa^{-1}$) se calculó utilizando h_{∞} obtenido del modelo de Crank. La permeabilidad al vapor de agua se obtuvo a través de $P_w = S_w \cdot D_w^i$ ($10^{-10}\ g\ s^{-1}\ m^{-1}\ Pa^{-1}$).

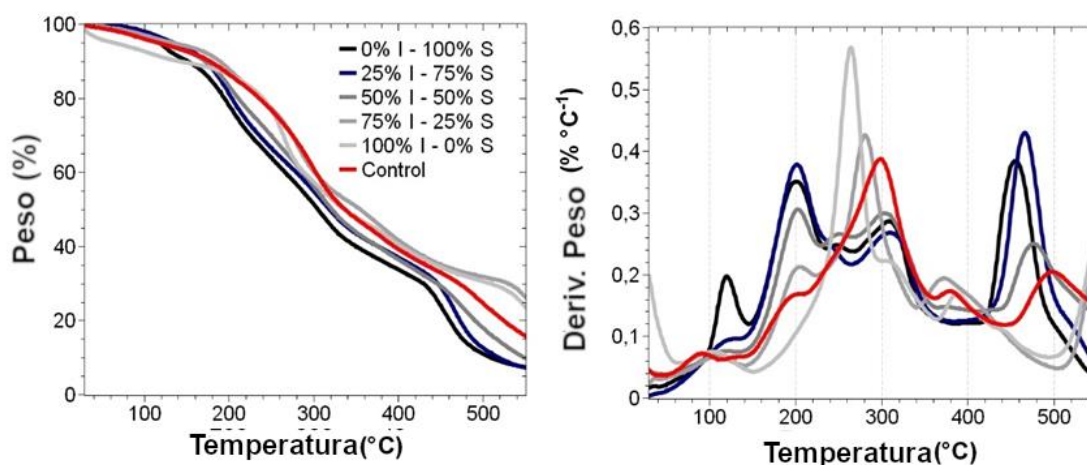
7.4 Efecto del contenido de fracciones soluble e insoluble sobre la degradación térmica

La degradación térmica tanto en aire como en nitrógeno, mostró un evento importante centrado a 120 °C en películas 100% SOL (figuras 7.4 y 7.5) que puede relacionarse con degradación y/o pérdida de compuestos de bajo peso molecular (Song *et al.*, 2013). El siguiente evento relevante se encontró a 200 °C, donde se pudo observar que, para cada una de las muestras, el contenido de fracción SOL aumentó la velocidad de degradación (mayor valor de la derivada) debido a la contribución de las proteínas. La máxima velocidad de degradación del 100% INS se movió a temperaturas más altas cuando se agregó la fracción SOL. Este máximo se movió de 265 a 305 °C en nitrógeno (Figura 7.4) y de 265 a 308 °C en aire (Figura 7.5) probablemente debido a la interacción entre ambas fracciones, soluble e insoluble. Después de 400 °C, en la degradación en aire apareció un evento adicional que no estuvo presente en la degradación en condiciones de nitrógeno. Este evento incrementó su temperatura de máxima velocidad de degradación con la incorporación de la fracción INS. Tanto en este evento de degradación, como en el cercano a 300 °C, la temperatura de máxima velocidad de degradación de la muestra control estuvo entre las de las muestras 50% INS - 50% SOL y 75% INS - 25% SOL, indicando una correlación fuerte entre la composición y las temperaturas de degradación de estos eventos, especialmente en la degradación en aire (figura 7.5).

Figura 7.4 Degradación térmica de las películas en condiciones de nitrógeno



En esta figura se refiere a la fracción insoluble como I y a la fracción soluble como S.

Figura 7.5 Degradación térmica de las películas en condiciones de aire

En esta figura se refiere a la fracción insoluble como *I* y a la fracción soluble como *S*.

7.5 Efecto de las fracciones soluble e insoluble y el pH en el color

De acuerdo con los resultados obtenidos en las mediciones de color, la diferencia de color total (ΔE) se vio significativamente afectada por el contenido de fracción insoluble y el pH como factores individuales, al mismo tiempo que la interacción entre ellos también fue estadísticamente significativa (tabla 7.4). Los mayores valores de ΔE fueron encontrados en las muestras 0% INS - 100% SOL. Los principales efectos de la incorporación de fracción INS fueron la disminución del valor de *L* (luminosidad) y el aumento de *a* (de verde a rojo). Considerando sólo el factor pH, los valores de *b* (de azul a amarillo) aumentaron a pH 11 y esto se observó en 100% INS - 0% SOL y 50% INS - 50% SOL. En la figura 7.6 se representan los colores obtenidos en promedio en cada grupo de ensayos, a partir de los parámetros *L*, *a* y *b* que fueron convertidos al espacio de color RGB utilizando el *software* del equipo de medición (Konica – Minolta, CR 400).

La solubilización de una fracción de los β -glucanos de la pared a pH mayor a 10 también puede tener influencia en el color y en la opacidad de las películas. Otros autores como Su *et al.* (2012) estudiaron películas de aislado de proteína de soja y carboximetilcelulosa y observaron que la incorporación de proteína aumentó el color amarillo (se midió en el espacio Hunter LAB y el parámetro *b* se incrementó en valores positivos). Hamaguchi *et al.* (2007) observaron la mayor transparencia de películas de proteínas miofibrilares de pescado a pHs donde se alcanzaba la mayor solubilidad de las proteínas, pHs externos alejados

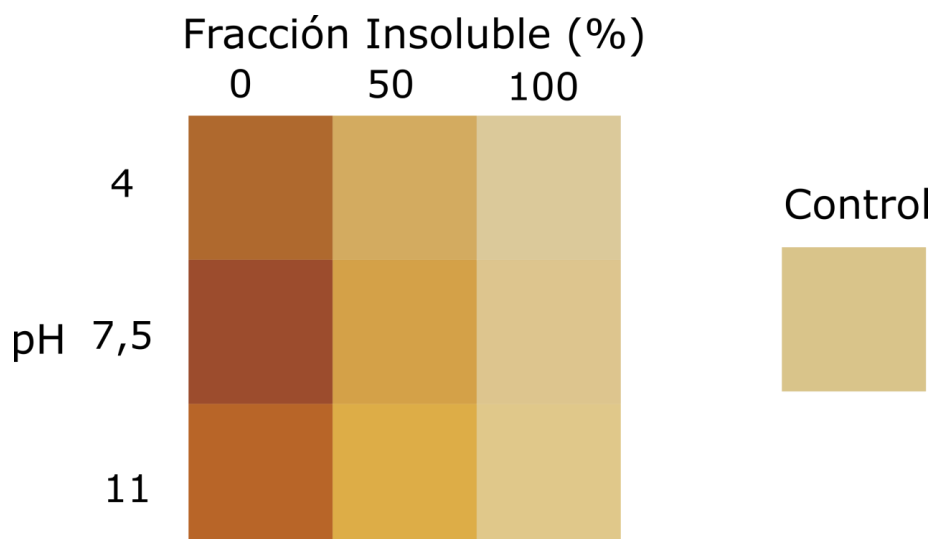
del rango de 4 a 7. Las mayores transparencias se encontraron en pHs 1 a 3 y 10 a 11.

Tabla 7.4 Parámetros y diferencia de color entre las muestras y el patrón de película a pH 6

Fracción Insoluble - Soluble (%)	pH	<i>L</i> (Opaco – Brillante)	<i>a</i> (Verde – Rojo)	<i>b</i> (Azul – Amarillo)	Diferencia total de color (ΔE)
100 INS - 0 SOL	4	81,2 $\pm$ 1,3 ^a	-1,0 $\pm$ 0,2 ^a	26,3 $\pm$ 1,9 ^a	6,4 $\pm$ 1,5 ^a
100 INS - 0 SOL	7,5	80,7 $\pm$ 1,1 ^a	-0,2 $\pm$ 0,3 ^b	30,4 $\pm$ 2,1 ^{ab}	1,9 $\pm$ 4,1 ^{ab}
100 INS - 0 SOL	11	81,3 $\pm$ 1,0 ^a	-1,3 $\pm$ 0,5 ^a	34,0 $\pm$ 1,9 ^b	2,6 $\pm$ 1,9 ^b
50 INS - 50 SOL	4	74,1 $\pm$ 2,1 ^b	3,5 $\pm$ 1,2 ^c	41,8 $\pm$ 2,4 ^c	15,4 $\pm$ 1,7 ^c
50 INS - 50 SOL	7,5	73,6 $\pm$ 3,0 ^b	5,5 $\pm$ 2,2 ^d	47,7 $\pm$ 4,3 ^{cd}	25,2 $\pm$ 2,1 ^d
50 INS - 50 SOL	11	73,3 $\pm$ 3,4 ^b	5,5 $\pm$ 2,9 ^d	57,5 $\pm$ 3,0 ^e	27,3 $\pm$ 3,0 ^d
0 INS - 100 SOL	4	46,7 $\pm$ 3,4 ^c	27,4 $\pm$ 1,6 ^e	40,9 $\pm$ 4,9 ^c	38,4 $\pm$ 3,1 ^e
0 INS - 100 SOL	7,5	51,2 $\pm$ 3,0 ^c	21,4 $\pm$ 1,8 ^f	44,0 $\pm$ 3,1 ^{cd}	43,0 $\pm$ 4,9 ^{ef}
0 INS - 100 SOL	11	52,2 $\pm$ 1,9 ^c	26,8 $\pm$ 1,1 ^e	48,9 $\pm$ 2,7 ^d	48,8 $\pm$ 5,1 ^f

Letras diferentes en la columna de diferencia de color indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 7.6 Representación gráfica del color en el espacio RGB de cada película, se incluye el color de las películas de biomasa sin separar a pH 6

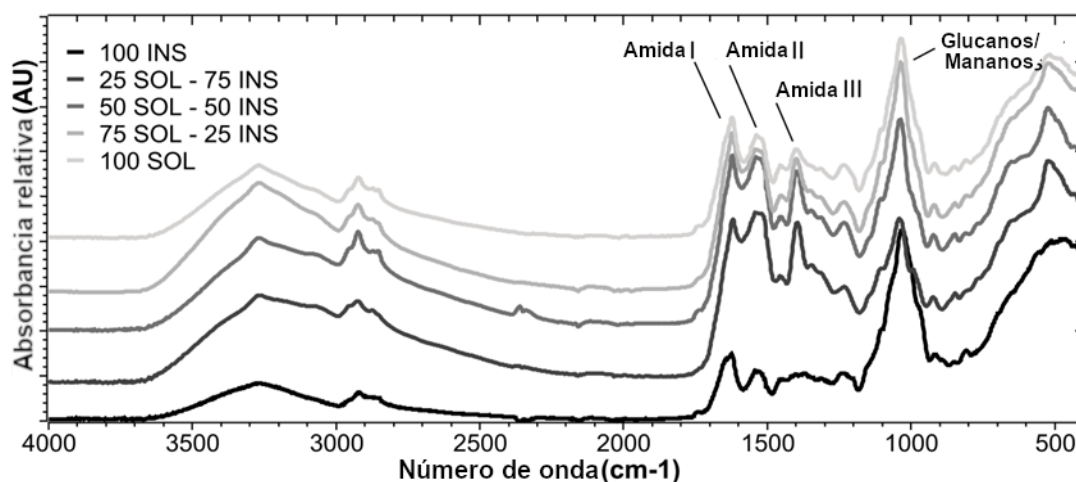


7.6 Espectroscopía en infrarrojo: relación entre bandas

Del espectro total obtenido en el espectrofotómetro IR, se extrajeron algunas relaciones de interés entre las bandas que podrían verse afectadas por la composición INS/SOL y el pH. En la figura 7.7 se pueden observar los cambios en las bandas debidos a la modificación de la composición de la biomasa utilizada a pH 6. La fracción INS está enriquecida en polisacáridos, sin embargo, también tiene una fracción de proteínas asociadas, por ejemplo, proteínas ligadas a los mananos. Cuanto mayor fue el contenido de material INS en la película, mayor fue la absorbancia de las bandas que están alrededor de 1000 cm^{-1} y las relacionadas con los polisacáridos. Al mismo tiempo, cuanto menor fue el contenido de la fracción SOL, menor fue la intensidad de las bandas amida I, II y III, entre otras relacionadas a proteínas. Se decidió analizar la relación entre las absorbancias de la banda amida I y la banda de 1031 cm^{-1} , una de las bandas más intensas del espectro total, estrechamente relacionada con el contenido de polisacáridos (Galichet *et al.*, 2001). La relación entre ambas bandas marcó el grado de efecto relativo del pH sobre las proteínas y los polisacáridos. De acuerdo los resultados, puede verse como la relación amida I – amida II en la fracción INS es más pareja, mientras que, en el caso del soluble, la absorbancia de amida I es superior a la de II. Cuando se analice el efecto del pH se verá el cociente de absorbancias entre amida I y II tiende a disminuir en dispersiones a

pH alcalino. El pH rompe el enlace álcali lábil y facilita la liberación de las proteínas de pared. Es posible proponer que cuando se trata de proteínas de citoplasma, la banda amida I tiende a una absorbancia mayor que amida II, mientras que en proteínas de pared, la relación es pareja.

Figura 7.7 Cambios en los espectros con la modificación del contenido de material soluble e insoluble.



Los análisis se hicieron en películas con 25% de glicerol y a pH 6.

La superficie de respuesta construida con la relación entre la banda amida I y la banda de 1031 cm^{-1} se observa en la figura 7.8 y los parámetros se pueden ver en la tabla 7.5. En la figura 7.8 (ver tabla 7.5 para los parámetros) se observa que la relación entre la banda amida I y la banda correspondiente a polisacáridos muestra una relación cuadrática, especialmente dependiente del contenido de fracción insoluble. El máximo de la relación se observó a pH 4 donde la absorbancia de la amida I fue máxima y la del polisacárido parecería ser mínima (lo que se observa al recorrer la curva de nivel a 100% de contenido de insoluble). El valor del cociente entre amida I y la banda relacionada a polisacáridos parece mantener una correlación inversa con la deformación a ruptura: cuanto mayor fue la relación del cociente en IR, menor fue la deformación obtenida. Además de la composición, la relación entre amida I y la banda a 1031 cm^{-1} fue afectada por la solubilización de una porción de los β -glucanos de pared, dispersándolos mejor en la película, lo que aumentó la intensidad de la banda 1031 cm^{-1} en IR y disminuyó dicha relación.

Por otro lado, se analizó la relación de absorbancia entre las bandas amida I y amida II. En este caso, se observó la influencia tanto del pH como del contenido de material SOL/INS, así como la interacción entre ambos factores a través de una superficie de respuesta (tabla 7.5 y figura 7.9). Los términos cuadráticos puros no fueron estadísticamente significativos, y la superficie se describió completamente mediante términos lineales y la interacción entre ambos factores.

Tabla 7.5 Relaciones entre las absorbancias de Amida I y Amida II y Amida I y la banda de 1031 cm⁻¹

Parámetros de la superficie de respuesta		Relación Amida I/ Amida II	Relación Amida I/ Banda 1031 cm ⁻¹
Término		Estimado	Estimado
X ₀	Intercepción	1,06 ± 0,02***	0,60 ± 0,02***
X ₁	Lineal contenido insoluble (%)	0,17 ± 0,01***	-0,08 ± 0,01***
X ₂	Lineal pH	-0,24 ± 0,01***	-0,04 ± 0,01**
X ₁ X ₂	Interacción de ambos factores	0,05 ± 0,01**	0,05 ± 0,01**
X ₁ ²	Cuadrático de contenido insoluble	0,03 ± 0,02	-0,08 ± 0,02**
X ₂ ²	Cuadrático de pH	0,01 ± 0,02	-0,02 ± 0,02
R ² múltiple		0,988	0,885
R ² ajustado		0,983	0,838
Falta de ajuste Pr(>F)		0,48	0,41

La codificación de la significatividad es la siguiente: ‘****’ $p < 0,001$; ‘***’ $p < 0,01$; ‘**’ $p < 0,05$). Los valores que no tienen asterisco/s no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

Cuando el contenido insoluble se acercó al 100% y a pH 4, se encontró el máximo en la relación entre la absorbancia de amida I y II. A pH 11, la relación disminuyó, siendo mínima a 0% de contenido INS. En el capítulo VI, se obtuvo que a pH 4 las interacciones hidrofóbicas (también los enlaces de hidrógeno) se beneficiaron y a pH alcalino se beneficiaron los enlaces disulfuro. Según otras investigaciones, como Friedman *et al.* (1984) mostraron que el contenido de lisinoalanina se incrementó a pHs mayores a 9 y un tratamiento térmico moderado de 70 °C en proteínas de soja. El cambio del pH puede modificar cómo las proteínas interaccionan, tal como se explicó en el capítulo VI, por ejemplo, a través de puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos, lo que sin dudas tendrá repercusiones en las características macroscópicas.

Figura 7.8 Superficie de respuesta de la relación entre las bandas Amida I y la banda 1031 cm^{-1} relacionada con los polisacáridos

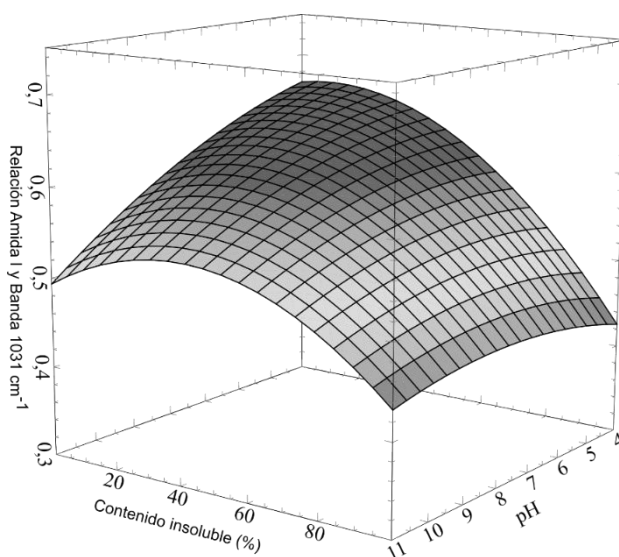
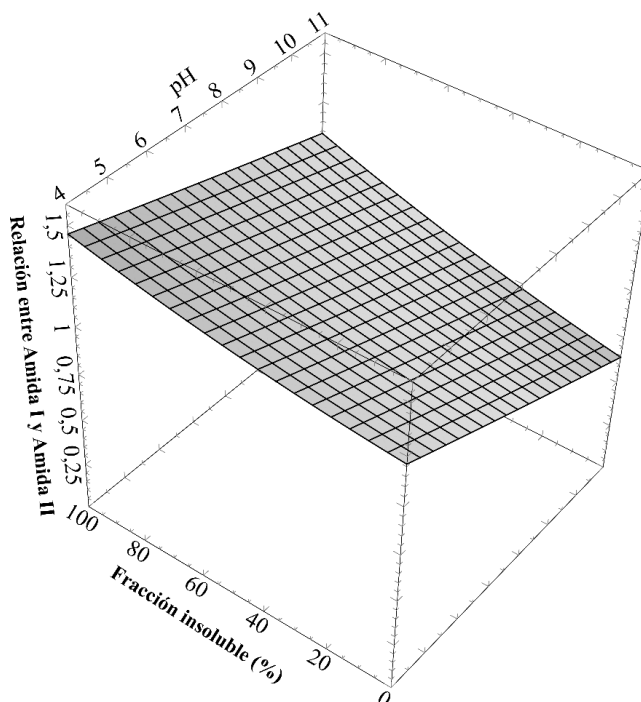


Figura 7.9 Superficie de respuesta obtenida de la relación entre las bandas Amida I y II, el contenido de material insoluble y el pH



7.7 Conclusiones del capítulo VII

Ambas fracciones son responsables de la formación de la película, la fracción insoluble contribuyó a incrementar el módulo elástico y la resistencia a la tracción, mientras que la fracción soluble incrementó la deformación a ruptura. El término de interacción (X_1X_2) entre el pH y el contenido de fracción insoluble no fue significativo para el módulo elástico y la deformación a ruptura y únicamente fue significativo para la resistencia a la tracción. La mayor deformación a ruptura se encontró a pH 11 y 100% INS, posiblemente debido a la solubilización de una de las fracciones de los β -glucanos, incrementando su dispersión en el material de la película y la posibilidad de interaccionar con otros polímeros. Las relaciones estudiadas en IR aportaron evidencia para entender las causas posibles de los cambios debidos a la composición y el pH en las películas, en particular, la selección de las relaciones amida I y amida II y amida I y 1031 cm^{-1} , fue una forma útil de concentrar la información de los espectros y facilitar la interpretación del efecto de la composición y el pH en los polisacáridos y las proteínas. El desempeño mecánico de una película en la que no fueron separadas las fracciones fue superior al de una película “formulada” a partir de

las fracciones INS y SOL en una proporción similar a la natural (65 INS – 35 SOL).

Tanto la fracción INS como la fracción SOL son muy afines al agua. Sin embargo, entre las dos, la de mayor afinidad es la fracción soluble: la mayor solubilidad de vapor de agua en la película se encontró con 100% SOL y pH 4, mientras que la menor solubilidad entre todos los puntos estudiados, se encontró en las películas con 100% INS. La incorporación de material soluble también afectó al color, tornando las películas a un color más amarronado, mientras que las de mayor contenido de fracción insoluble fueron de color más claro y su ΔE fue el menor entre las películas preparadas con fracciones INS y SOL (tomando como referencia una película preparada sin separar la biomasa en dos fracciones).

Capítulo VIII: Efecto de la incorporación de refuerzos en las películas

8.1 Introducción

El refuerzo de las películas tiene como objetivo mejorar el comportamiento mecánico para alcanzar una resistencia adecuada a los esfuerzos, especialmente incrementar el módulo elástico y la resistencia a la tracción. Las películas reforzadas son materiales compuestos, donde el refuerzo se elige por su resistencia (elevado módulo elástico, excelente resistencia a la tracción) y por su compatibilidad con el material de la película, que es la matriz. El desafío en estos materiales es lograr, a partir de la buena miscibilidad y compatibilidad, una buena adhesión interfacial entre ambos. En algunos casos, la reducción de tamaño (desde micropartículas a nanopartículas) incrementa la superficie de adhesión y puede ayudar a mejorar las propiedades mecánicas, manteniendo la misma proporción de carga.

Los refuerzos obtenidos de fuentes naturales se caracterizan por su gran capacidad de refuerzo, su baja densidad y su abundancia en la naturaleza (Dufresne y Castaño, 2017). En los polímeros sintéticos, la adhesión entre fibras naturales y la matriz no es la más adecuada, por lo que se utilizan estrategias para funcionalizar la superficie de la fibra y mejorar la interacción refuerzo – reforzado (Ngo, 2018). Cuando la matriz está compuesta por polímeros naturales, se espera que el refuerzo con fibras o micropartículas tenga un mejor resultado. Versino y García (2014) estudiaron el refuerzo de películas de almidón utilizando fibras de la pulpa de mandioca. La deformación a ruptura disminuyó significativamente, desde 248% (sin refuerzo) a 4% (3% de refuerzo), mientras que la resistencia a la tracción se incrementó desde $2,03 \pm 0,85$ MPa (sin refuerzo) a $21,92 \pm 1,88$ MPa (3% de refuerzo). En forma paralela al cambio en las propiedades mecánicas, algunos autores han reportado ligeros cambios en la permeabilidad al vapor de agua con la inclusión de nanopartículas, debido al camino tortuoso que éstas pueden producir (Nascimento *et al.*, 2016). En este capítulo se estudió el efecto de tres refuerzos diferentes en las características mecánicas de las películas, utilizando cáscara de arroz micronizada, nanofibras de celulosa de cáscara de arroz y nanocelulosa bacteriana. Se analizó también

la influencia de las nanofibras de arroz y la celulosa bacteriana en la permeabilidad al vapor de agua.

8.2 Refuerzo de películas con cáscara de arroz micronizada

8.2.1 Características de la cáscara de arroz micronizada

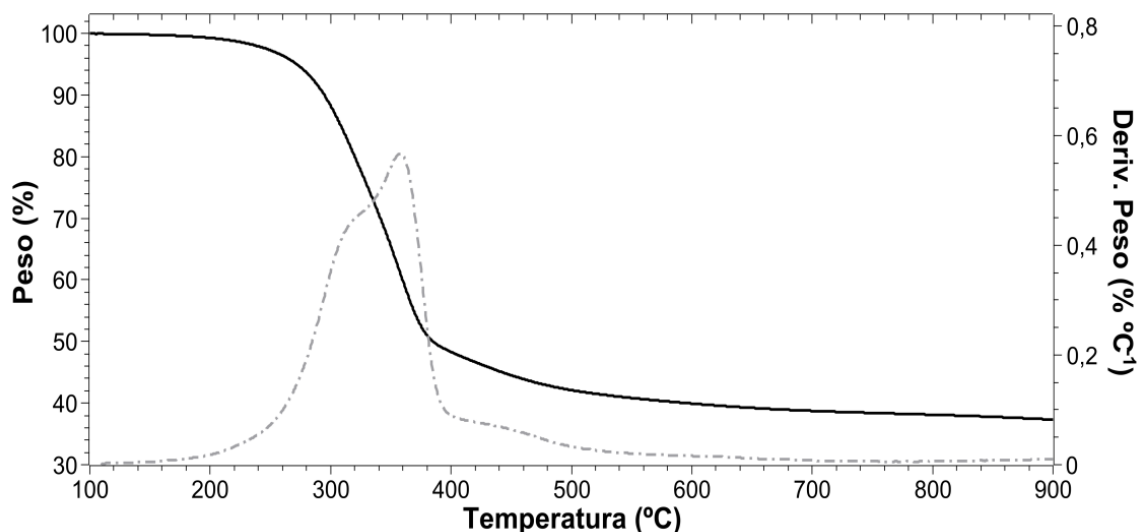
La cáscara de arroz micronizada (CAM) (figura 8.1) fue caracterizada respecto de su contenido de holocelulosa y α -celulosa, el contenido de holocelulosa fue determinado en 63,8% y el de α -celulosa en 45,3% respecto de la materia seca. Los solubles en alcohol – tolueno (denominados comúnmente *extractivos*) fueron 0,82%, y corresponden a ácidos grasos, resinas, azúcares, terpenos oligómeros, esteroides, entre otros. El contenido de lignina fue determinado sobre la muestra libre de extractivos en 35,0%. El informe se adjunta en el anexo III.

En los ensayos de degradación térmica (figura 8.2), se encontró que el inicio de la degradación masiva de CAM sucedió poco después de 240 °C, mientras que en la derivada del peso se observaron tres eventos con máximos a 320, 360 y 420 °C. García *et al.* (2016) y Pineda-Gómez *et al.* (2011) señalaron que los máximos corresponden a la degradación de hemicelulosas, celulosa y lignina, en ese orden. En el caso de la lignina, Pineda-Gómez *et al.* indicaron que la degradación de la lignina de cáscara de arroz comenzó a los 270 °C y se prolongó hasta 500 °C. Nascimento *et al.* (2016) obtuvieron termogramas similares sobre las cáscaras de arroz donde los eventos atribuidos a hemicelulosas y celulosa se informaron a 339 °C y 381 °C, respectivamente.

Figura 8.1 Fotografía de cáscara de arroz micronizada con tamaños de partículas menores a 125 μm



Figura 8.2 Termograma (TGA) de la cáscara de arroz micronizada en función de la temperatura (peso y derivada del peso con respecto a la temperatura)



8.2.2 Características de las películas reforzadas con cáscara de arroz micronizada (CAM)

El módulo elástico, la resistencia a la tracción y la deformación a ruptura de las películas no fueron afectados sustancialmente por la presencia de la fracción CAM. En la tabla 8.1 se pueden observar los valores obtenidos en los ensayos. No se observó un incremento del valor de módulo o resistencia, ni siquiera en las mayores concentraciones, que justificara la incorporación de CAM. Los módulos registrados estuvieron siempre entre 20 y 30 MPa y la resistencia a la tracción en torno a 1,5 MPa. La deformación a ruptura en estas películas osciló entre 11% y 13%. Estos resultados indicaron que la interacción entre las fibras y la matriz no fue completamente satisfactoria para las concentraciones estudiadas, es decir, no hubo una buena adhesión entre matriz y refuerzo en la interfase. Además, en algunas cantidades (por ejemplo, 1% de cáscara de arroz) pareciera que el refuerzo perjudicó el desempeño mecánico, esto puede deberse a que la interrupción de la matriz produce pequeñas grietas (microfracturas de la matriz) que facilitaron la ruptura. A partir de estos resultados se decidió reducir el tamaño de partículas. En la figura 8.3 se puede observar un corte transversal de una película con 2% de refuerzo de CAM. No se observaron poros ni fallas en

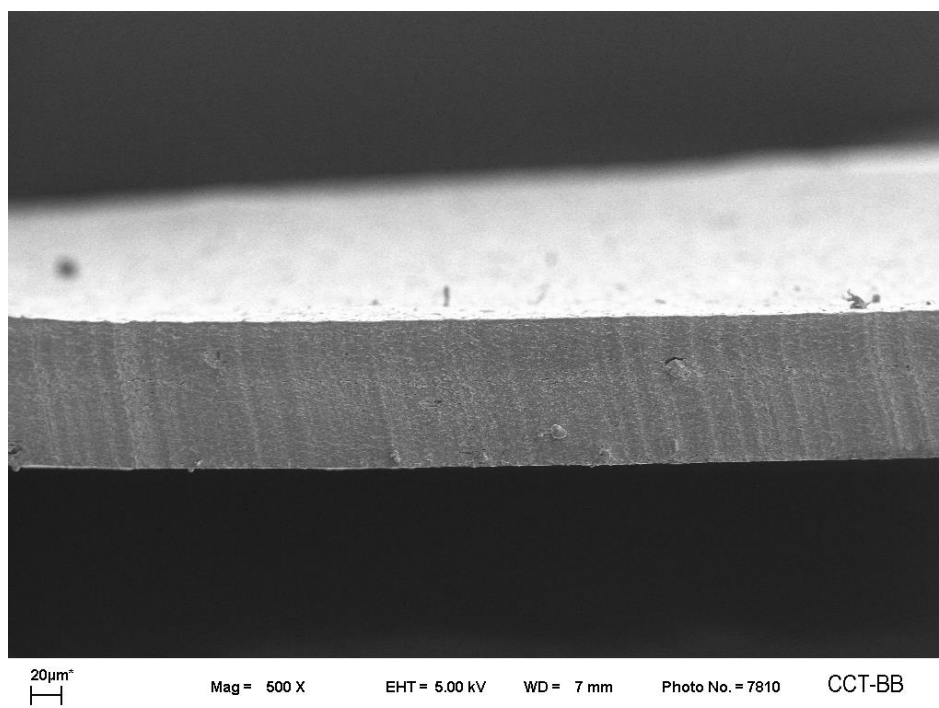
la matriz con el aumento utilizado y se observó una buena continuidad de la película.

Tabla 8.1 Propiedades mecánicas de películas con cáscaras de arroz micronizadas

Muestras (pH 6) Cantidad de refuerzo	Módulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a ruptura (%)
Sin refuerzo	30 ± 2^a	$1,8 \pm 0,2^a$	$12,8 \pm 0,8^a$
0,5%	26 ± 5^{ab}	$1,5 \pm 0,2^{ab}$	$11,1 \pm 1,5^a$
1,0%	23 ± 3^b	$1,2 \pm 0,1^b$	$11,8 \pm 1,8^a$
2,0%	26 ± 2^{ab}	$1,3 \pm 0,1^b$	$11,9 \pm 1,9^a$

Celdas que no comparten letras en una misma columna indican que hay diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$, $n=5$.

Figura 8.3 Vista de corte transversal de una película reforzada con 2% de cáscaras de arroz micronizadas (CAM) (500×)

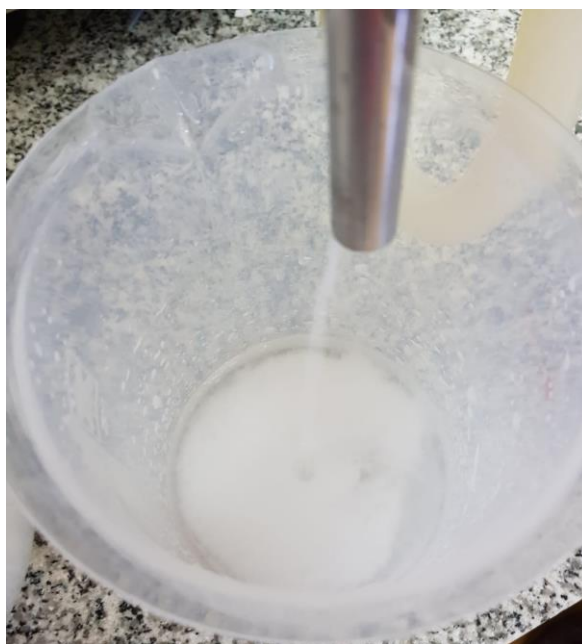


8.3 Refuerzo de películas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)

8.3.1 Características de las nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)

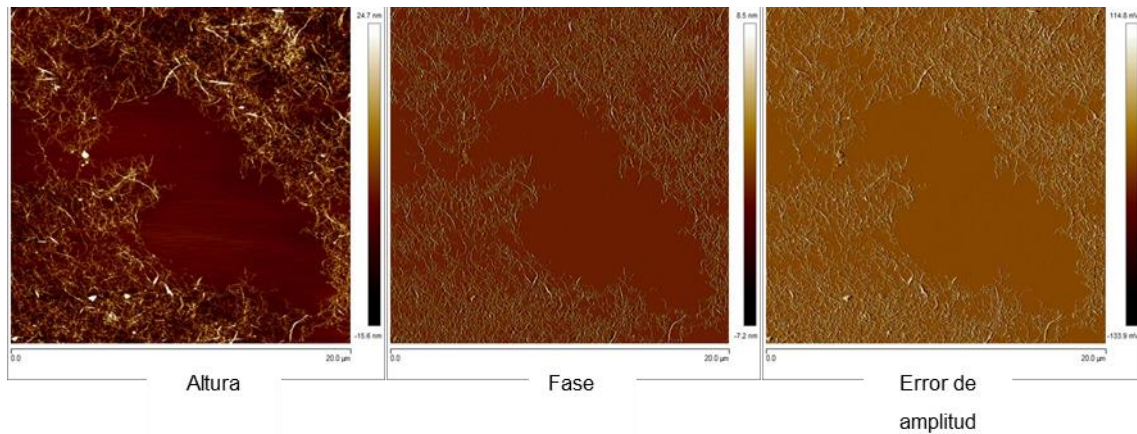
A partir de las cáscaras de arroz se obtuvieron nanofibras de celulosa (FA), luego de eliminar el contenido inorgánico (mayoritariamente sílice) y hemicelulosas y reduciendo drásticamente el tamaño de las partículas. En la figura 8.4 se puede observar la consistencia de la dispersión de nanofibras siendo desfibriladas en el homogeneizador.

Figura 8.4 Dispersión de nanofibras de celulosa de cáscara de arroz a la salida del homogeneizador a válvula



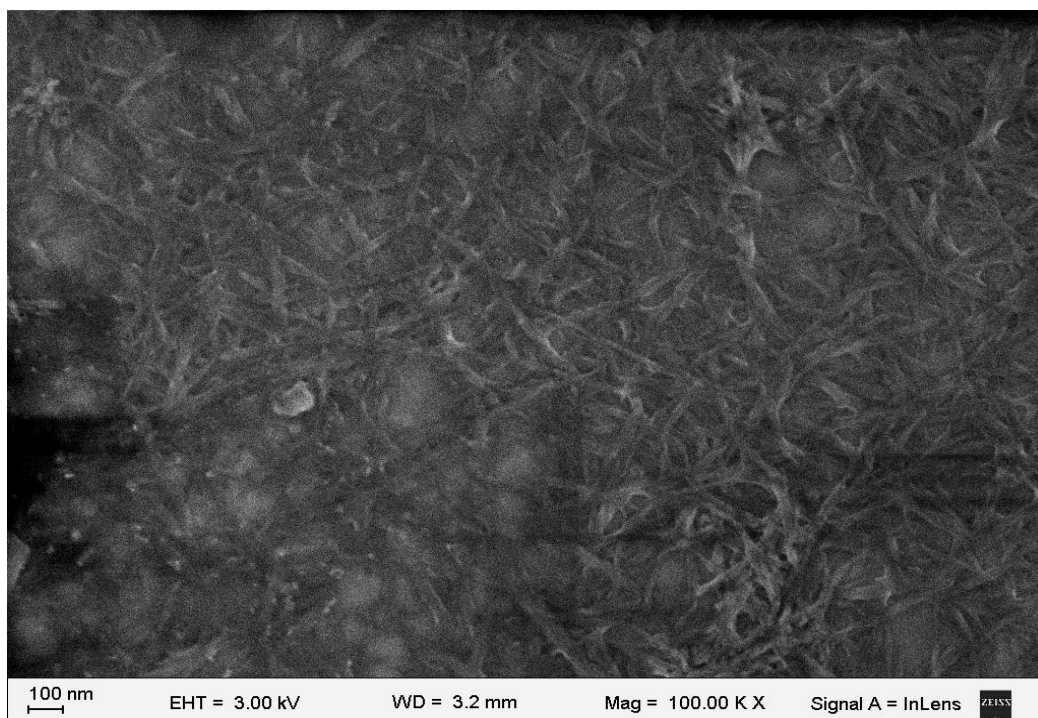
En la figura 8.5 se pueden observar las imágenes generadas por el microscopio de fuerza atómica, de acuerdo a las señales de altura, fase y error de amplitud a partir de una dispersión de nanofibras. La fracción FA fue observada al microscopio de fuerza atómica en dilución al 0,2% p/p. En la microscopía AFM se determinó a través de la medición de rugosidad un alto menor a 20 nm, con 1 a 4 micrones de largo en promedio.

Figura 8.5 Nanofibras obtenidas desde la cáscara de arroz vistas al microscopio de fuerza atómica



En la figura 8.6 se puede observar la micrografía SEM, a partir de la que se midió el tamaño de las fibras utilizando el programa *ImageJ*. Las partículas tuvieron un ancho de 39 ± 5 nm, calculado por 50 mediciones diferentes realizadas sobre las fibras de la imagen SEM. En ambas microscopías se vio el carácter nanométrico de las fibras obtenidas, cumpliendo con la definición de nanopartículas.

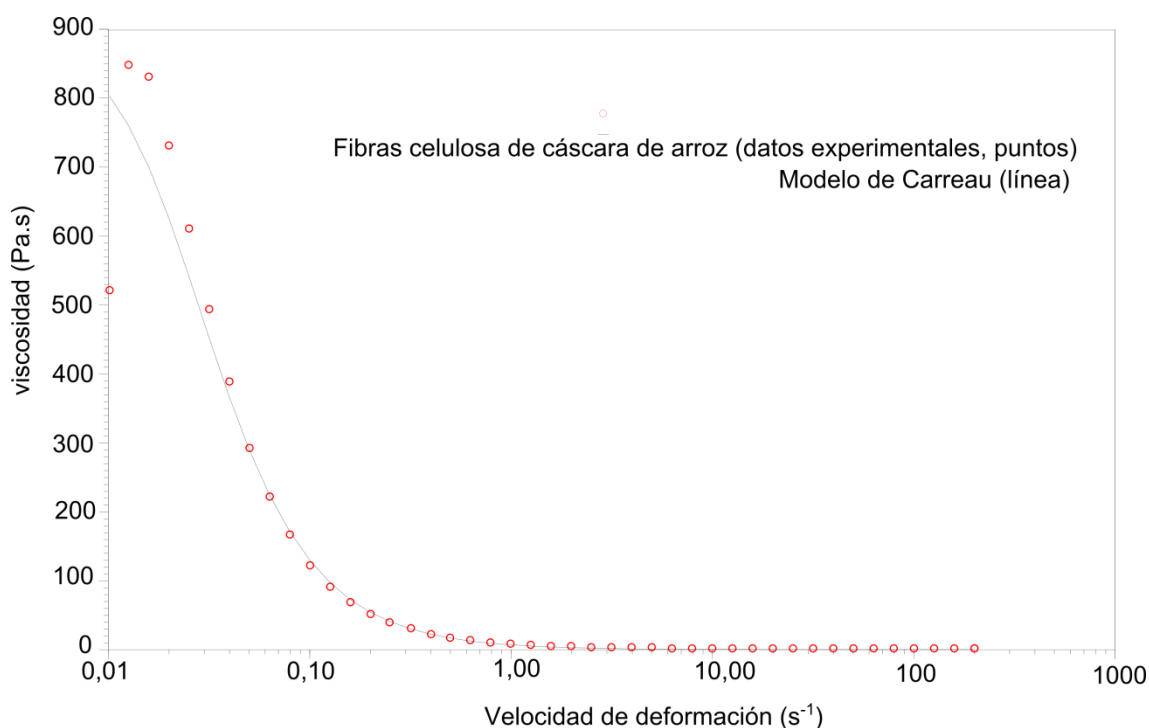
Figura 8.6 Micrografía de las nanofibras de cáscara arroz obtenida por microscopía electrónica de barrido (100.000×)



En cuanto al carácter reológico, las suspensiones de FA al 1% p/p tuvieron un comportamiento no newtoniano y se caracterizó este comportamiento para

garantizar una homogeneidad entre los lotes de nanofibras producidos. En la figura 8.7 se observa la curva de flujo de la suspensión de fibras de cáscara de arroz, que no pudo ser modelada a través de modelos clásicos como los de la ley de la potencia o Herschel – Bulkley. Por otra parte, modelos más complejos, que requieren la utilización de cuatro parámetros como el modelo de Carreau, no describen satisfactoriamente la primera parte de la curva, hasta $0,1 \text{ s}^{-1}$, donde primero se produce un rápido ascenso y luego un descenso de la viscosidad aparente. La falta de acuerdo entre los modelos y el comportamiento de las dispersiones especialmente en la parte de la curva que corresponde a bajas velocidades de deformación, puede ser atribuida a la formación de redes de nanofibras entrelazadas en forma compleja y a las interacciones coloidales repulsivas (Martoia *et al.*, 2016).

Figura 8.7 Comportamiento de la viscosidad aparente con respecto a la velocidad de deformación en las suspensiones de nanofibras de celulosa de cáscara de arroz

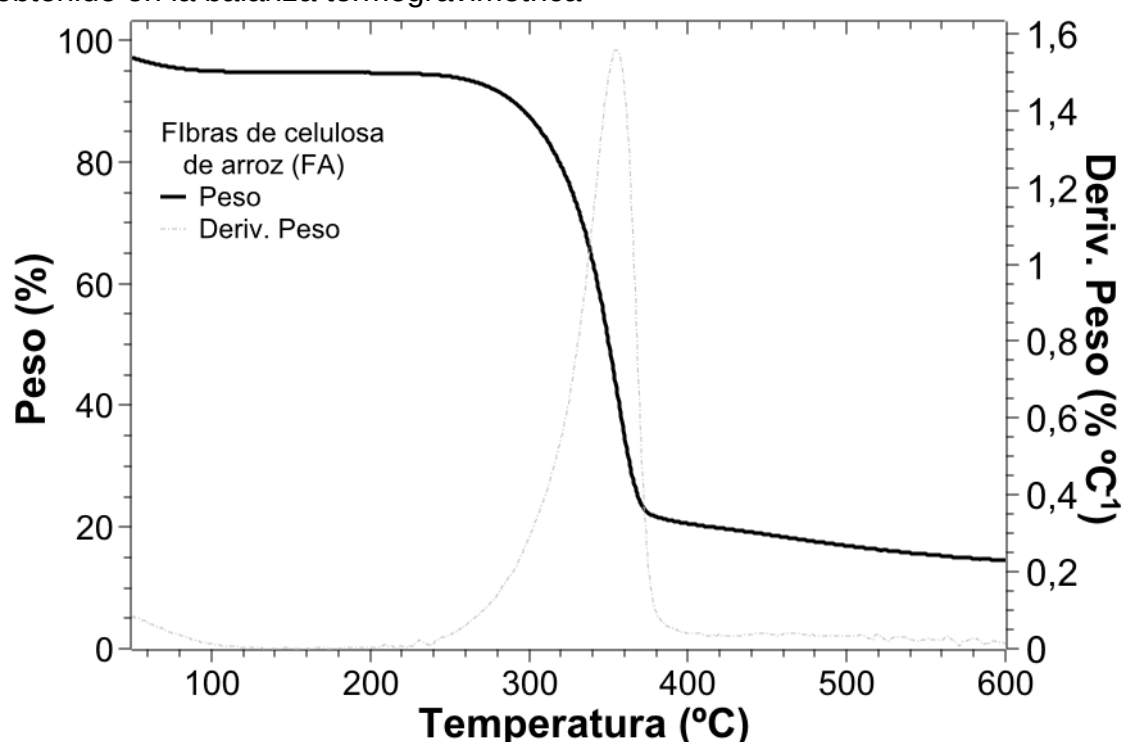


En los parámetros del modelo de Carreau se observó repetitividad en la viscosidad a deformación infinita ($0,3 \text{ Pa s}$) y en el índice de consistencia ($1,2$). Se tomaron estos dos parámetros como criterio de repetibilidad. En la figura 8.8

se observa la descomposición de la fracción FA con la temperatura. En la derivada se distingue el máximo a 355 °C, pero no se observaron eventos a 320 °C y a 420 °C, que de acuerdo con la bibliografía citada en la sección 8.2 (García *et al.* 2016; Pineda-Gómez *et al.*, 2011) correspondían a hemicelulosas y lignina, respectivamente.

La fracción FA se integró a la levadura en dispersión acuosa y la segunda homogeneización por alta presión se realizó en conjunto levadura y FA para facilitar la integración de ambas fracciones.

Figura 8.8 Gráfico del peso en función de la temperatura para las nanofibras FA obtenido en la balanza termogravimétrica

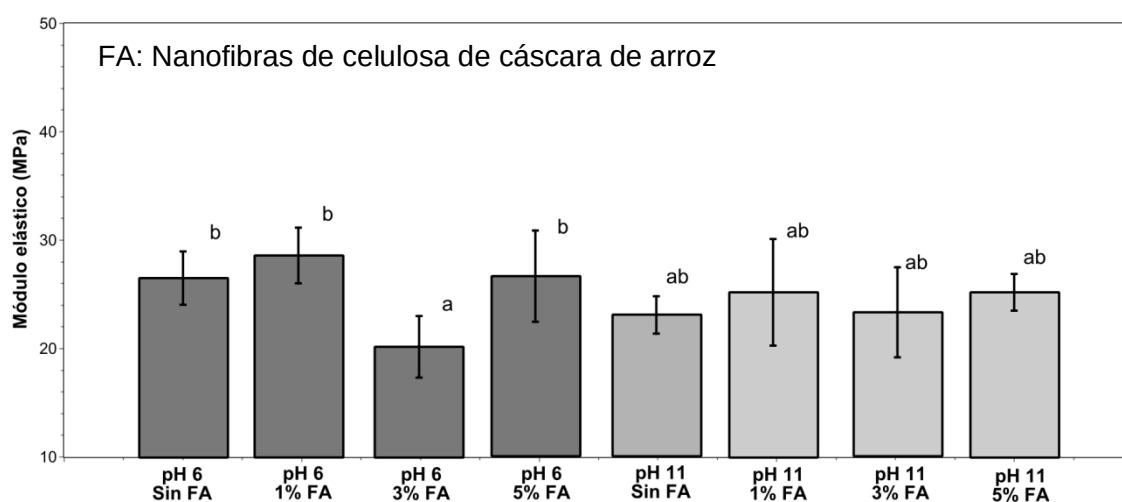


8.3.2 Características de las películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)

El módulo elástico y la resistencia a la tracción de las películas reforzadas con FA no mostraron una tendencia consolidada, sino que se observó un comportamiento oscilante (figuras 8.9 y 8.10) alrededor de 25 MPa. En el caso de la deformación a ruptura (figura 8.11), el incremento fue muy leve y estadísticamente significativo para el 5% de FA a pH 6. En las películas obtenidas con dispersiones a pH 11, las muestras tuvieron deformaciones a

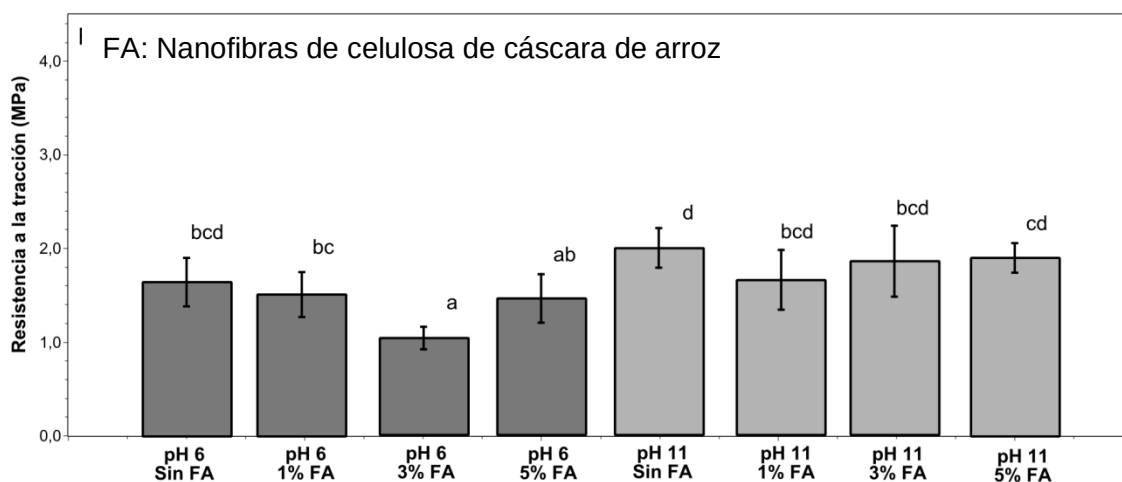
ruptura muy elevadas, a causa del pH, y similares para distintos grados de incorporación de FA, con sólo un pequeño descenso al 1%. En la tenacidad (figura 8.12), la incorporación de FA a las muestras a pH 6 y a pH 11 no tuvo un efecto estadísticamente significativo, a excepción de 1% donde la tenacidad disminuyó ligeramente, al igual que en la deformación a ruptura.

Figura 8.9 Módulo elástico de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)



Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n=8$.

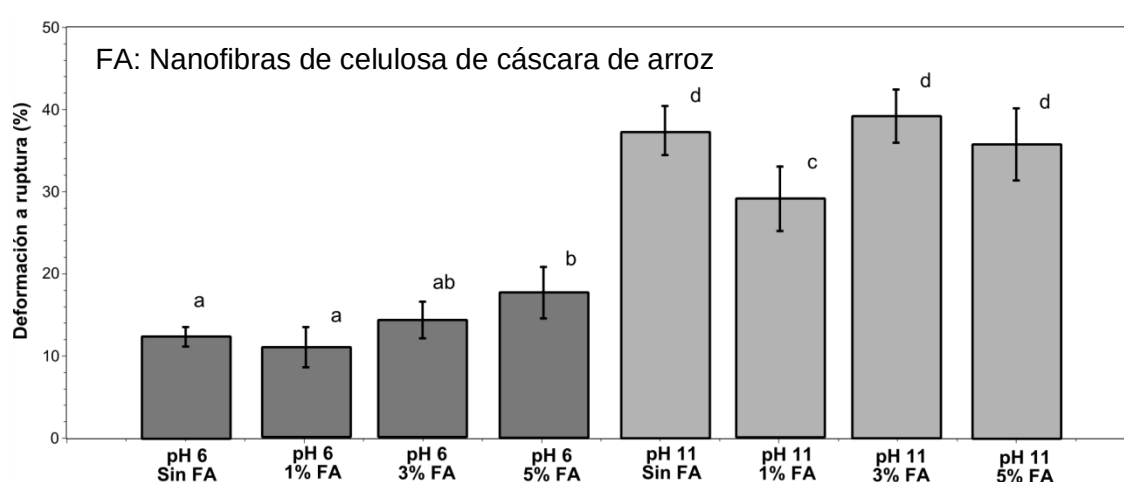
Figura 8.10 Resistencia a la tracción de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)



Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n=8$.

Fernandes *et al.* (2010) estudiaron la incorporación de celulosa de pulpa de madera nanofibrilada en películas de quitosano. En ese estudio se observó un gran incremento del módulo elástico, desde valores levemente superiores a 2000 MPa en muestras de quitosano de bajo peso molecular, sin ningún tipo de refuerzo, a valores cercanos a 3000 MPa con 5% de refuerzo (y estudiaron valores muy superiores, hasta 60% de refuerzo). No obstante, la deformación a ruptura cayó a valores cercanos a la mitad de la deformación sin refuerzo.

Figura 8.11 Deformación a ruptura de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)

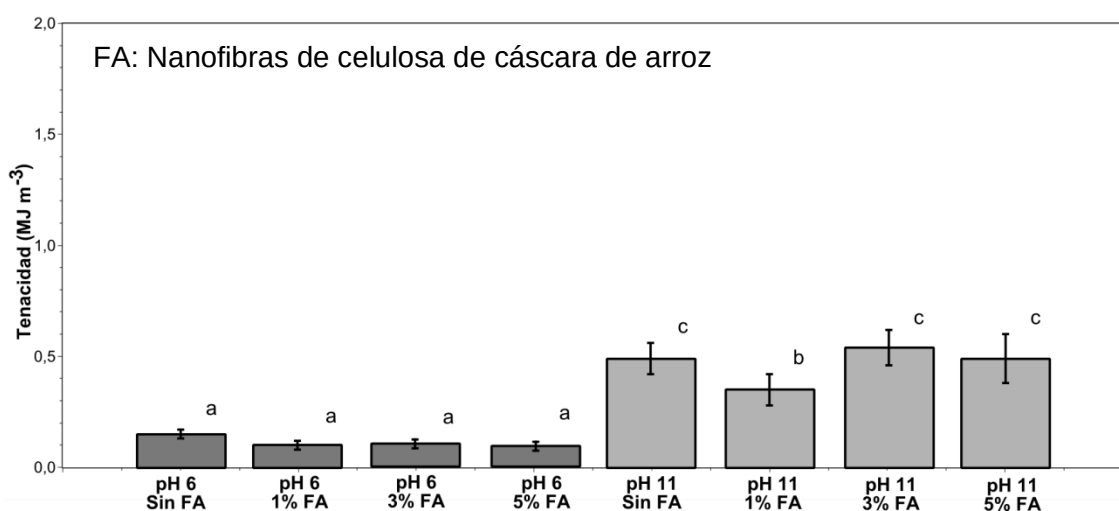


Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n=8$.

Nascimento *et al.* (2016) también utilizaron cáscaras micronizadas de arroz y nanofibras, obtenidas a partir de éstas, para reforzar películas de almidón. Las películas fueron obtenidas por extrusión, reforzadas en un porcentaje similar a los utilizados en esta tesis (2,5%). Las películas reforzadas con las cáscaras micronizadas no tuvieron cambios estadísticamente significativos en la deformación según lo indicado en la publicación. Sin embargo, en la resistencia a la tracción, la incorporación de cáscaras tuvo un efecto negativo, por su disminución de 21 a 8 MPa respecto de la muestra control. En las películas de almidón reforzadas con nanofibras, la resistencia a la tracción se mantuvo en un valor similar al de la muestra control. La deformación a ruptura aumentó desde 10%, en la muestra sin refuerzo, hasta 15% en las muestras con nanofibras.

Azeredo *et al.* (2009) prepararon películas con puré de mango reforzadas con fibras de celulosa de origen comercial. Las fibras de celulosa tuvieron una relación de aspecto de 11,5 (largo sobre ancho o diámetro), y un diámetro menor a 10 nm (el largo de las fibras fue más corto que en otros trabajos). Las fibras fueron incorporadas en las mismas cantidades utilizadas en este trabajo (0, 1, 3, 5%) y también en mayores (10, 18 y 36%) respecto de la base seca utilizada para la matriz. En ese trabajo, a pesar de encontrar diferencias estadísticamente significativas, la modificación del módulo elástico y de la deformación a ruptura no fue de gran magnitud hasta el 5% de refuerzo. La resistencia a la tracción se vio modificada y se incrementó al doble en ese intervalo de concentraciones de refuerzo. Por encima del 5% de refuerzo, el módulo y la resistencia a la tracción aumentaron de gran manera y la deformación cayó.

Figura 8.12 Tenacidad de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)



Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n=8$.

Dufresne (2017) publicó una revisión acerca del uso de nanomateriales de celulosa como refuerzo de compuestos poliméricos. En la revisión se citaron diferentes trabajos que evidencian que las nanofibras producen, a igual cantidad, un mejor refuerzo que los nanocristales y esto se debe a que la relación de aspecto en las fibras es muy superior que en los cristales (Bendahou *et al.*, 2010, Siqueira *et al.*, 2009). En este artículo, se explicó que las partículas con mayor

largo pueden formar zonas de enredos entre las fibras (*entanglements*, en inglés) y mejorar la conexión con otras nanopartículas a concentraciones más bajas que las partículas más cortas. De esta forma, se logra una red de refuerzo muy resistente. En cuanto a la relación de aspecto, en el artículo de revisión se mencionó un trabajo donde se obtuvieron nanofibras de celulosa de ancho similar, pero de diferente largo (283 y 520 nm) para reforzar poli(estireno-co-butil acrilato) (Favier *et al.*, 1995). La resistencia a la tracción alcanzada en las películas reforzadas con las fibras más largas fue mayor que las reforzadas con fibras cortas. Con respecto a los enredos entre las fibras, el autor subraya que los mismos son importantes y producen un rápido ascenso del módulo elástico y la resistencia a la tracción de las películas, pero por contraposición, la deformación a ruptura decrece.

La disminución del tamaño de las partículas utilizadas para el refuerzo incrementó la interfase disponible para la adhesión y mejoró las propiedades mecánicas entre polímeros compatibles. No obstante, de acuerdo a lo observado en la bibliografía, la cantidad incorporada aún fue menor a la necesaria para obtener incrementos en el módulo y en la resistencia a la tracción de las películas. En este trabajo, la incorporación de FA, en los niveles estudiados, sólo provocó un ligero incremento positivo de la deformación a ruptura a pH 6. Tal como sucedió en el trabajo de Nascimento *et al.* (2016), en el resto de las características mecánicas no se obtuvieron efectos sustanciales.

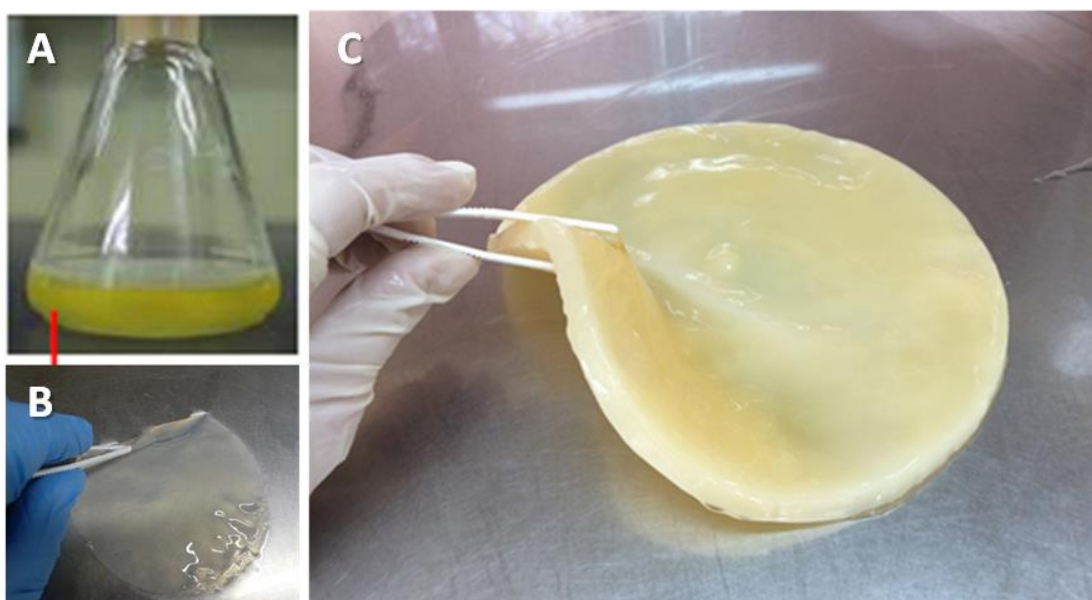
8.4 Refuerzo de películas con nanocelulosa bacteriana (BC)

8.4.1 Características de la nanocelulosa bacteriana (BC)

La nanocelulosa bacteriana (BC) utilizada en este capítulo fue provista por el grupo de Biotecnología y Biosíntesis del Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología. En el trabajo publicado por Cerrutti *et al.* (2016), los autores informaron que la nanocelulosa producida por *Gluconobacter xylinus*, luego de 5 días de crecimiento, tuvo un tamaño promedio de ancho de cinta de $32,3 \pm 6,7$ nm (promedio de 150 medidas). Mientras que las obtenidas luego de 21 días tuvieron un tamaño promedio de $29,1 \pm 6,2$ nm (promedio de 110 mediciones). En general, el espesor de la nanocelulosa producida por esta bacteria es 3 a 10 nm y tienen un largo de 1 a 9 μ m. A diferencia de las nanofibras de origen vegetal,

las de origen bacteriano son verdaderas cintas. Se ha informado que el grado de cristalinidad de la nanocelulosa bacteriana puede ser 10 a 15% más que el de la nanocelulosa de origen vegetal (Ioelovich, 2008). La BC utilizada en este trabajo fue obtenida en cultivo estático después de 21 días de crecimiento. En esta forma de cultivo se obtiene una película cuyo espesor depende de los días transcurridos (figura 8.13).

Figura 8.13 Nanocelulosa bacteriana (BC) obtenida por cultivo de la bacteria *Gluconobacter Xylinus*: A) cultivo de la bacteria en forma estática, B) película de BC formada después de 3 días y C) película de BC formada después de 21 días

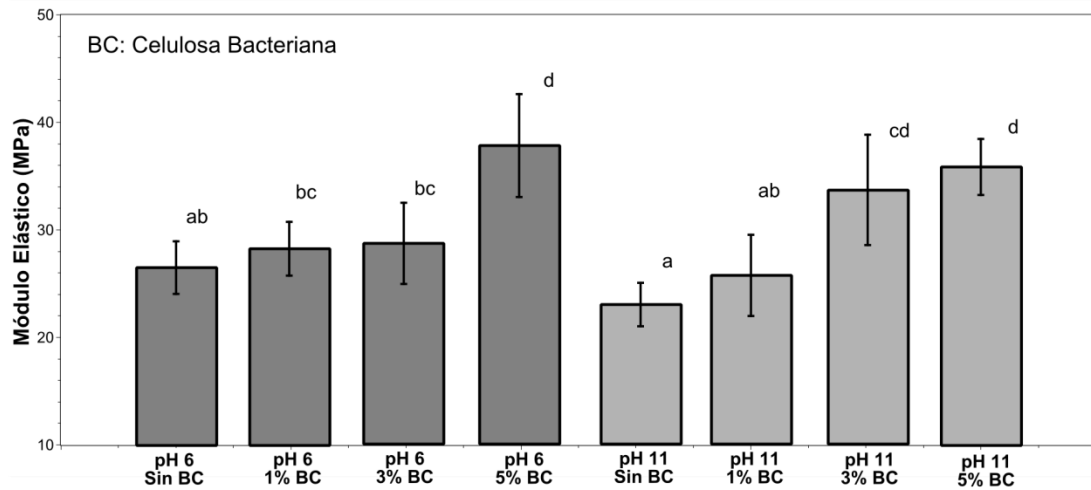


Fotografía gentilmente cedida por la Lic. Ema Cavallo (UBA) y el Grupo de Biotecnología y Materiales Biobasados (ITPN-UBA-CONICET)

8.4.2 Características de las películas reforzadas con nanocelulosa bacteriana (BC)

La nanocelulosa bacteriana produjo un incremento del módulo elástico como se puede observar en la figura 8.14, en particular, a pH 6. El incremento se produjo desde 27 a 29 MPa en las muestras sin nanocelulosa, 1 y 3%, hasta 38 MPa en el 5% de refuerzo. El comportamiento fue similar a pH 11, donde el aumento se observó claramente a partir de 3%. Este incremento en el módulo puede ser explicado a partir de la transferencia de carga de la matriz al refuerzo producto de una buena adhesión.

Figura 8.14 Módulo elástico de las películas reforzadas con nanocelulosa bacteriana (BC)



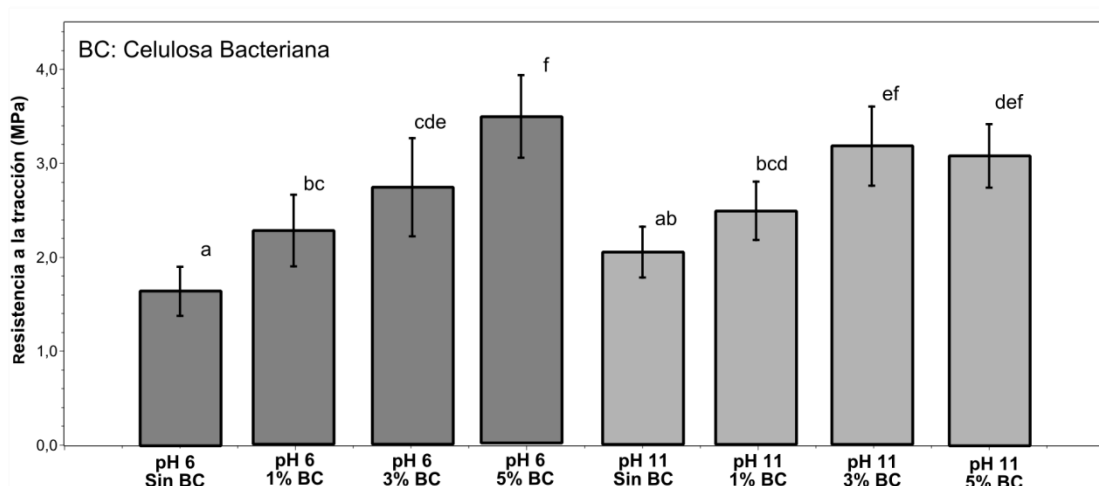
Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n=6$.

En el caso de la resistencia a la tracción (figura 8.15), la incorporación de BC produjo un aumento gradual de los valores, desde $1,6 \pm 0,3$ MPa (sin refuerzo) a $3,5 \pm 0,4$ MPa (5% de refuerzo) para pH 6 y $1,9 \pm 0,4$ MPa (sin refuerzo) a $3,1 \pm 0,3$ MPa (5% de refuerzo) para pH 11. Mientras que, en el caso de la deformación a ruptura, el comportamiento fue distinto (figura 8.16). En las películas obtenidas a pH 6, la incorporación de BC produjo un aumento muy claro de la deformación a ruptura. No es frecuente encontrar casos de incremento conjunto de la deformación, el módulo elástico y la resistencia a la tracción, es más frecuente encontrar el incremento del módulo y la resistencia con un descenso en la deformación a ruptura. En las películas a pH 11, la deformación a ruptura, superior en todos los casos a las películas de pH 6, no fue afectada por la presencia de nanocelulosa. Shabanpour *et al.* (2018) estudiaron el refuerzo de películas de proteína de pescado, incorporando 0, 2, 4 y 6% de BC. La deformación a ruptura disminuyó desde $94 \pm 3\%$ (sin refuerzo) hasta $88 \pm 3\%$ (6% de refuerzo) y la resistencia a la tracción aumentó desde $6,0 \pm 0,3$ MPa a $8,9 \pm 0,3$ MPa. Los autores atribuyeron la disminución en la deformación a ruptura a la reducción de la movilidad molecular y la “naturaleza rígida” del refuerzo. Lo cierto es que, si existe una buena adhesión entre matriz y refuerzo,

la deformación aumenta al menos hasta un determinado punto, en el cual, la fuerte adhesión perjudica a la deformación.

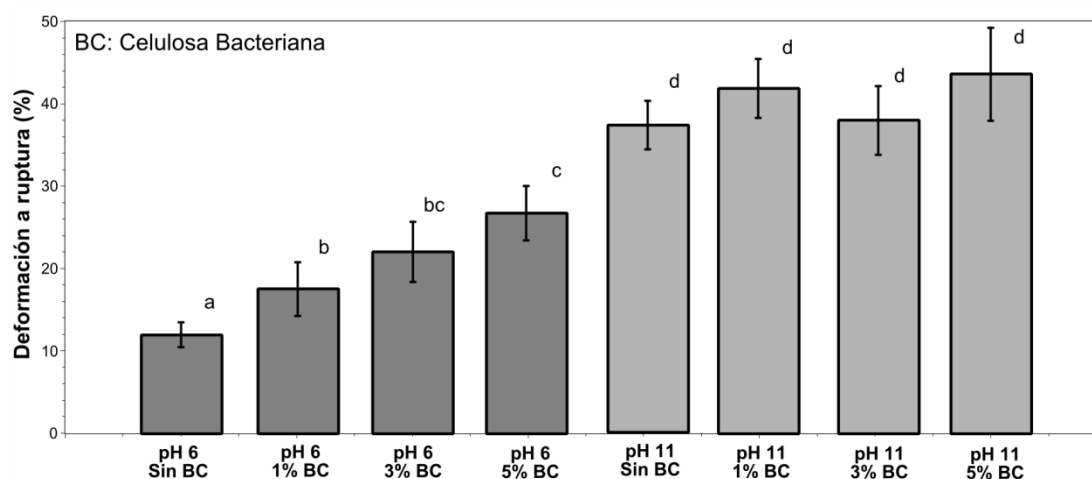
Wang *et al.* (2018) reforzaron películas de agar-agar con nanocelulosa bacteriana producida a partir de la bacteria *Gluconacetobacter hansenii*. Estos autores describieron que la deformación a la ruptura se incrementó a medida que aumentó la concentración de nanofibras hasta el 5%, pero al aumentar el contenido de estas fibras más allá del 10%, la deformación a ruptura disminuyó. Los autores atribuyeron el aumento inicial a la buena dispersión de la nanocelulosa en la matriz y luego, al superar el nivel de 5%, con los mayores porcentajes entorpecieron la movilidad debido a la cantidad de enlaces (puentes de hidrógeno) establecidos entre matriz y refuerzo. La incorporación de mayor cantidad de nanocelulosa bacteriana, sí modificó la resistencia a la tracción y el módulo elástico.

Figura 8.15 Resistencia a la tracción de películas con nanocelulosa bacteriana (BC)



Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n=6$.

Figura 8.16 Deformación a ruptura de películas con nanocelulosa bacteriana (BC)

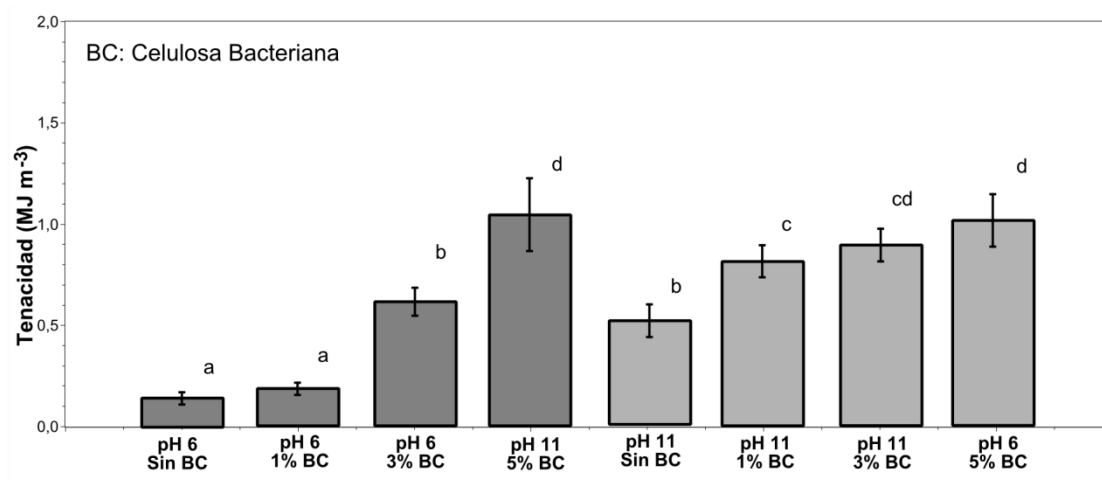


Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n = 6$.

Por otra parte, se observó que el pH tuvo un impacto sobre la deformación a ruptura mayor que el efecto de la BC. Una posible explicación podría ser que la levadura ya posee un refuerzo que proviene de la propia biomasa, la pared celular de levadura, que es disgregada por efecto de la presión, durante la homogeneización, y permanece insoluble en la dispersión, lo que ya fue explicado en el capítulo VI. Al modificar el pH hacia valores más altos se facilita la solubilización de una porción de los β -glucanos (aquellos solubles en álcali). Estas modificaciones, en forma conjunta con las que puede producir el pH sobre las proteínas, son las que producen el cambio global en las propiedades mecánicas.

En la figura 8.17 se muestran los resultados de la tenacidad de las películas con BC a pH 6 y 11. El comportamiento fue similar al de la deformación a ruptura a pH 6 y, en las películas preparadas con las dispersiones a pH 11, la tenacidad se incrementó también en forma gradual con cada porcentaje incorporado de BC. El incremento de la tenacidad fue una muestra de la mejora en la adhesión interfacial, dado que es necesaria mayor cantidad de energía para alcanzar la ruptura (Wagner y Lustiger, 2009).

Figura 8.17 Tenacidad de las películas reforzadas con nanocelulosa bacteriana (BC)



Las barras que no comparten al menos una letra tienen una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), $n=6$.

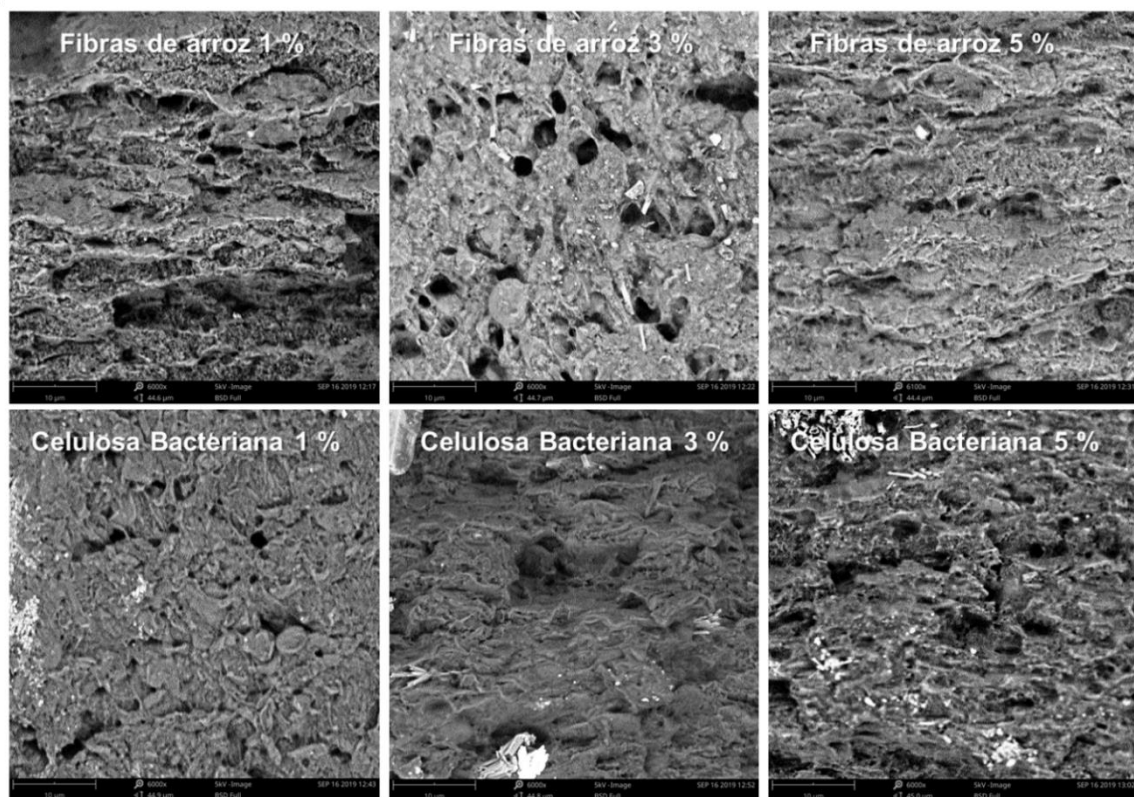
Como señaló Dufresne (2017), la formación de enredos entre las fibras puede afectar de manera significativa las propiedades de las películas, incrementando el módulo y la resistencia a la tracción y disminuyendo drásticamente la deformación a ruptura. No obstante, en este trabajo se encontró que con el agregado de BC, al mismo tiempo, el módulo, la resistencia a la tracción, la deformación y la tenacidad se incrementaron, haciendo improbable que la causa del aumento del módulo elástico y la resistencia a la tracción sea debida a los *entanglements*.

Es posible que la diferencia en los resultados entre la BC y la FA se deba a la diferencia en su relación de aspecto (precisamente en el largo) y en la superficie disponible para la adhesión, que pareciera ser mayor en la BC. Otra posibilidad es que, ambas fracciones, tengan diferencias en la disponibilidad de los grupos funcionales a interactuar con los polímeros de la biomasa de levadura. Si hay una menor disponibilidad de grupos funcionales, esto repercutiría negativamente en la adhesión entre refuerzo y matriz.

8.5 Aspecto de las secciones transversales de las películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz y de celulosa bacteriana

La figura 8.18 muestra secciones transversales de probetas que fueron ensayadas bajo tracción uniaxial tanto con FA como BC, para las 3 cantidades de refuerzo estudiadas. En las seis imágenes no se ve un material compuesto con distintos dominios, lo que hace suponer que las operaciones de mezcla y homogeneización fueron efectivas para desarmar grandes agregados de la celulosa. Las zonas donde se produjo el corte evidenciaron cierto desgarramiento en las muestras, particularmente en la muestra de 3% de nanofibras de arroz de la figura 8.17.

Figura 8.18 Imágenes de la superficie de fractura de las películas con refuerzo de fibras de cáscara de arroz y celulosa bacteriana (6000×)



8.6 Permeabilidad al vapor de agua de películas reforzadas

Existen diferentes casos en la bibliografía donde el refuerzo puede dificultar la transferencia de vapor de agua generando un camino tortuoso al pasaje del mismo. La mayoría de los investigadores utilizan nanocristales de celulosa,

aunque hay ciertos trabajos en donde se utilizan nanofibras de celulosa. En los resultados de los ensayos de permeabilidad al vapor de agua (tabla 8.2) no se observó una tendencia que permita identificar un efecto de BC o FA. El cambio en la permeabilidad al vapor de agua con la incorporación de los refuerzos fue pequeño si se compara con las permeabilidades al vapor de agua de polímeros sintéticos que suelen encontrarse en torno a $10^{-13} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Debido a que en el capítulo V se demostró el efecto del espesor sobre la permeabilidad, se trató de cuidar que éste fuera similar en todos los casos. En las películas de pH 11, tanto para FA como para BC, se observó el menor coeficiente de permeabilidad al 5% de refuerzo.

Tabla 8.2 Permeabilidad al vapor de agua de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA) y celulosa bacteriana (BC) a pH 6 y 11

Muestras	FA	FA	BC	BC
	pH 6 $P_w (\text{E}^{-10})$	pH 11 $P_w (\text{E}^{-10})$	pH 6 $P_w (\text{E}^{-10})$	pH 11 $P_w (\text{E}^{-10})$
Sin refuerzo	$7,2 \pm 0,1^a$	$7,0 \pm 0,1^a$	$6,9 \pm 0,1^a$	$8,1 \pm 0,2^a$
1% de refuerzo	$6,6 \pm 0,1^b$	$7,2 \pm 0,1^a$	$6,6 \pm 0,1^b$	$7,6 \pm 0,1^b$
3% de refuerzo	$6,5 \pm 0,1^b$	$7,3 \pm 0,1^a$	$6,6 \pm 0,1^b$	$7,3 \pm 0,1^c$
5% de refuerzo	$6,9 \pm 0,1^c$	$5,2 \pm 0,1^b$	$8,0 \pm 0,1^c$	$6,3 \pm 0,1^d$

Todos los valores de permeabilidad están dados en $\text{g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Savadekar y Mhaske (2012) reforzaron películas de almidón termoplástico con nanofibras de celulosa obtenidas de algodón. Si bien en el trabajo no se da una precisión acerca del tamaño de las nanofibras, se puede asumir que son fibras cortas con alto porcentaje de zonas cristalinas (Savadekar y Mhaske, 2012; Karande *et al.*, 2011). En las películas de almidón, el cambio en el flujo de vapor de agua fue abrupto, desde la incorporación de 0,1% de nanofibras, ocho veces inferior al informado para el almidón termoplástico sin refuerzo (se informó el flujo y no el coeficiente de permeabilidad, sin embargo, debido a la forma de cálculo

del coeficiente a partir del flujo, ambos deben estar relacionados en forma lineal directa).

Pereda *et al.* (2011) publicaron un trabajo donde reforzaron películas de caseinato de sodio con nanofibras de celulosa a partir de celulosa microcristalina. En ese trabajo se analizó el cambio en el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua con la incorporación de las nanofibras. El máximo coeficiente se alcanzó al 1% de refuerzo, mientras que al 3% el valor de permeabilidad disminuyó hasta un valor similar al de una película sin nanofibras. En ese trabajo los autores informaron que se produjo un aumento de la porosidad con la incorporación de las fibras, lo cual podría implicar un problema al calcular el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua por el método de la norma ASTM E96 (el transporte del vapor de agua debe realizarse exclusivamente a través de un mecanismo difusivo). En el trabajo de películas de caseinato se informó que con un 5% de refuerzo, la cantidad de poros (medidos sobre la superficie expuesta a la evaporación) alcanzó un 20%. En las películas de levadura, no se observaron poros con ambos refuerzos de nanopartículas.

Las diferencias entre FA y BC en la geometría, el largo y el grado de cristalinidad de ambas parecieran no haber tenido un gran impacto en la permeabilidad al vapor de agua, con FA se observó una leve disminución en el coeficiente de permeabilidad con el aumento de refuerzo, mientras que en el caso de BC al 5% y pH 6 hubo un ligero incremento y a pH 11, una pequeña disminución.

8.7 Conclusiones del capítulo VIII

El refuerzo de las películas con materiales nanométricos, obtenidos de diferentes fuentes de celulosa, fue propuesto con el objetivo de reforzar el material y lograr mejores propiedades mecánicas, en particular, el incremento del módulo elástico y de la resistencia a la tracción. Con la fracción CAM no se obtuvo un resultado satisfactorio, la fracción no modificó las características mecánicas en las cantidades incorporadas. Respecto de las otras fracciones, la fracción BC fue mucho más efectiva que la fracción FA para incrementar las características mecánicas de las películas. En la discusión propuesta en el capítulo se señaló que la diferencia entre los efectos de una y otra en las películas podría deberse a la longitud de las partículas, en su relación de aspecto y en la superficie

disponible para la adhesión. También podría deberse a la activación de la superficie, es decir, la disponibilidad de los grupos funcionales superficiales, en una y otra forma de celulosa, disponibles para interactuar con la biomasa de levadura. La tenacidad a ruptura que está relacionada con la energía de adhesión entre los componentes fue mayor en las películas con BC que en las reforzadas con FA (tanto a pH 6 como a pH 11). El aumento de la deformación y la tenacidad a ruptura obtenido a pH 6 por la BC fue opacado por el efecto del pH alcalino (pH 11), que ya en la película sin refuerzo incrementó la deformación a un nivel superior al de cualquier película reforzada con celulosa. En la permeabilidad al vapor de agua se observó una ligera disminución con ambas fracciones (FA y BC) al 5% de refuerzo.

En este trabajo no se observó un efecto negativo por formación de enredos entre las fibras de celulosa, pero a mayores concentraciones esto podría ser negativo para la deformación a ruptura. Los resultados obtenidos y presentados en este capítulo, donde las cuatro características mecánicas (módulo elástico, resistencia a la tracción, deformación y tenacidad a ruptura) se incrementaron con la incorporación de la carga, situación no tan habitual de acuerdo a la bibliografía consultada, fueron el reflejo de una buena dispersión y dispersión del refuerzo y por otro lado, una excelente adhesión del refuerzo con la matriz.

Capítulo IX: Características de películas con timol

9.1 Introducción

Una de las aplicaciones más prometedoras de las películas biodegradables es la protección de un alimento frente a la degradación. La protección del envase pasó de un rol pasivo a uno activo, en donde la película emite u absorbe sustancias que ayudan a evitar o disminuir la velocidad del deterioro. Entre las aplicaciones que requieren de películas emisoras, las más estudiadas son las antimicrobianas y las antioxidantes. La protección a la oxidación puede brindarse, por ejemplo, a través de la incorporación de sustancias antioxidantes a la película. Los compuestos más utilizados son los polifenoles, los organofosfatos y los tioésteres (Gómez-Estaca, 2014). El timol (2-isopropil-5-metilfenol) ha sido estudiado por diversos investigadores por su capacidad antimicrobiana y antioxidante. Se encontró que el timol tiene un potencial antioxidante más importante que el ácido cafeico ($IC_{50} = 17,89 \pm 2,09 \text{ mg ml}^{-1}$) pero es menos efectivo que el eugenol ($IC_{50} = 1,13 \pm 0,09 \text{ mg ml}^{-1}$). Cuanto menor es el IC_{50} , mayor es el poder antioxidante del compuesto. Varios investigadores incorporaron timol en sus películas como agente antioxidante y hallaron resultados interesantes. Por ejemplo, Ramos *et al.* (2014) evaluaron esta propiedad en películas de PLA y determinaron que las muestras poseían una actividad antioxidante importante (80% de inhibición de formación del radical DPPH $\cdot$ con 8% de timol en PLA). También Kavoosi *et al.* (2013) encontraron resultados prometedores con la incorporación del timol en películas de gelatina. Antes de evaluar la capacidad antioxidante del timol incorporado a las películas resulta necesario analizar la disponibilidad del mismo, es decir, la velocidad con la que migra hacia el alimento. En este capítulo se muestran los resultados de los análisis mecánicos y de color de las películas con timol, las cinéticas de liberación del activo en medios simulantes y la determinación de la capacidad antioxidante del timol en los extractos. Esta evaluación es necesaria para determinar la posibilidad de aplicación, así como proponer mejoras a su desempeño.

9.2 Extracción y recuperación del timol incorporado a las películas

La cantidad de timol remanente se cuantificó de manera indirecta, descontando la cantidad de timol recuperada en el solvente de extracción a la cantidad inicial de timol en la película. El contenido inicial de timol en cada película se determinó en forma teórica, utilizando el porcentaje incorporado en la dispersión de levadura. Para realizar el cálculo se consideró que la relación entre la biomasa de levadura y el timol se mantuvo constante durante todo el proceso, durante y luego del proceso de secado. En las tres muestras estudiadas, 6, 8 y 10 % de timol, la cantidad de compuesto retenido después del proceso de extracción fue similar (tabla 9.1). Una parte del timol se liberó rápidamente, mientras que otra fracción permaneció retenida en la película a razón de 0,4 g de timol por cada 10 g de película. Inicialmente podría pensarse que la célula actúa como material encapsulante, dado que es conocido el uso de la célula de *S. cerevisiae* para encapsular a modo de saco. Por ejemplo, se ha informado la encapsulación de curcumina (Paramera *et al.*, 2011) y resveratrol (Shi *et al.*, 2008). En esos trabajos el objetivo fue proteger los antioxidantes de agentes que pudieran provocar la pérdida de su actividad, como la luz y el aire (Pham-Hoang *et al.*, 2013). Sin embargo, en el caso de las películas de levadura, la situación sería diferente, luego de observar los resultados del capítulo III, la ruptura de las células a 125 MPa fue agresiva y la estructura de la pared se dañó de manera significativa.

Tabla 9.1 Resultados de la extracción de timol utilizando ultrasonido en películas de levadura con 6, 8 y 10 % de timol

Muestra	Cantidad de timol extraído (g)* cada 10 g de película	Cantidad de timol retenido (g)* cada 10 de película
6% timol	0,2 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a
8% timol	0,4 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,1 ^a
10% timol	0,7 ± 0,1 ^c	0,3 ± 0,1 ^a

Letras diferentes en una misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Para obtener los resultados de la tabla 9.1, la cuantificación del timol en los extractos se llevó a cabo utilizando una curva de calibración ($R^2=0,998$) realizada con estándares de timol a distintas concentraciones.

9.3 Características mecánicas de las películas con timol

Este ensayo se propuso para determinar si el timol incorporado como antioxidante, afecta o no el comportamiento mecánico. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de la varianza y una prueba de contrastes *post-hoc*. En la tabla 9.2 se resumen los resultados obtenidos. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$) entre las tres formulaciones con timol y la muestra control en la deformación a ruptura y en la resistencia a la tracción, es decir, el compuesto activo no afectó a las características mencionadas. El módulo elástico tampoco se vio afectado por el agregado del activo, aunque se observaron diferencias estadísticamente significativas puntualmente entre las muestras de 6% y 8% timol. Si bien el análisis estadístico señaló la diferencia, viéndolo globalmente la diferencia efectiva en el módulo es pequeña.

En otros sistemas, el timol se comportó como plastificante, ocupando posiciones entre las cadenas poliméricas, incrementando las distancias entre ellas y reduciendo los enlaces secundarios entre cadenas. Este comportamiento se reflejó en las propiedades mecánicas, disminuyendo la resistencia a la tracción y el módulo elástico e incrementando la máxima deformación posible. En el estudio realizado en las películas de gelatina por Kavoosi *et al.* (2013), el timol tuvo efecto plastificante. Este comportamiento se reflejó en las propiedades mecánicas, ya que la resistencia a la tracción y el módulo elástico disminuyeron y la deformación a ruptura se incrementó. En contraste, en un trabajo de Rojas-Graü *et al.* (2006), la incorporación de aceite esencial de orégano (del que el timol forma parte) y limón en películas preparadas con puré de manzana no modificó ninguna característica mecánica. En películas de quitosano modificadas con aceite de tomillo hasta 1,2% p/p todas las características mecánicas disminuyeron (módulo, resistencia y deformación a ruptura) a medida que se incrementó el porcentaje de timol (Altiok *et al.*, 2010).

La incorporación de timol a las formulaciones de películas de levaduras no aportó mejoras en la deformación. Tampoco debilitó a la película, manteniéndose

su resistencia. Por lo tanto, se puede concluir que la incorporación no modifica sustancialmente las características mecánicas del material.

Tabla 9.2 Características mecánicas de las películas con 15% de glicerol y diferente porcentaje de timol (6, 8 y 10%)

Muestra (15% glicerol)	Módulo Elástico (MPa)	Tensión máxima (MPa)	Deformación a ruptura (%)
Sin Timol	65 ± 9^{ab}	$1,9 \pm 0,1^a$	$5,0 \pm 1,3^a$
6% Timol	56 ± 4^a	$1,8 \pm 0,2^a$	$6,3 \pm 1,4^a$
8% Timol	67 ± 3^b	$2,3 \pm 0,3^a$	$5,4 \pm 1,3^a$
10% Timol	63 ± 4^{ab}	$1,6 \pm 0,3^a$	$5,6 \pm 1,8^a$

9.4 Efecto del timol sobre el color de las películas

El color de las muestras de 0, 6, 8 y 10% de timol fue medido utilizando el espacio CIELab y los resultados se observan en la tabla 9.3. La diferencia de color se obtuvo comparando los valores de las muestras con timol contra las muestras sin dicho aditivo. En todas las películas con timol se obtuvieron valores ligeramente menores del parámetro de luminosidad, L^* , que en el caso de la muestra tomada como control. La incorporación de timol generó un color levemente más rojo en las películas (aumento del valor a^*) y respecto del parámetro b^* , las formulaciones tomaron un color tendiente al amarillo (parámetro b^* positivo).

Tabla 9.3. Valores obtenidos de los parámetros L^* , a^* y b^* de la escala CIELab y la diferencia de color (ΔE) de las películas con timol con respecto a la muestra control

Muestra	L^*	a^*	b^*	ΔE
Sin timol	$77,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$	$22,8 \pm 0,3$	---
6% timol	$74,5 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,2$	$24,7 \pm 0,7$	5 ± 1^a
8% timol	$75,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$20,1 \pm 0,5$	4 ± 1^a
10% timol	$75,2 \pm 2,3$	$1,9 \pm 0,6$	24 ± 3	7 ± 1^b

Letras diferentes en la columna de ΔE indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

El parámetro ΔE permite evaluar si los cambios en el color son significativos al ojo humano o no. Si bien no hay un valor que reúna el consenso de todos los investigadores, se sostiene habitualmente que una diferencia ΔE menor a 2 ó 3 es ligeramente perceptible y las variaciones mayores pueden ser percibidas por observadores no entrenados. Se considera que a partir de un ΔE mayor a 5 se observan dos colores distintos (Mokrzycki y Tatol, 2011). La muestra de 10% de timol tiene la mayor diferencia de color y un observador podría percibir dos colores diferentes al compararla con una muestra sin timol. No obstante, la diferencia no debería modificar la aceptación de las películas desde el punto de vista del mismo, ya que ambas continúan siendo de color ámbar.

9.5 Migración en simulante acuoso

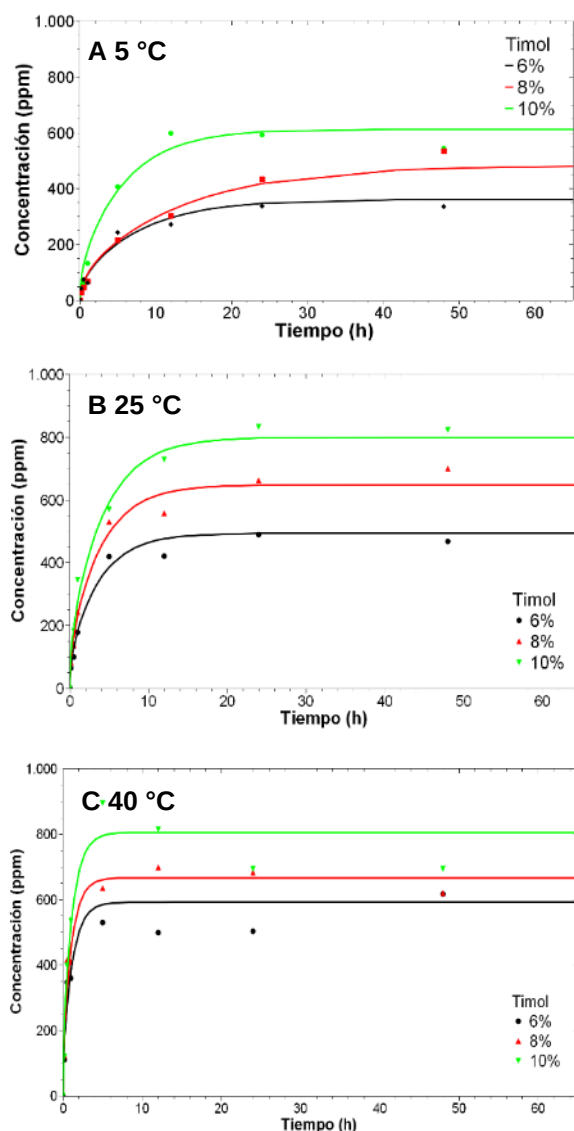
La determinación del valor del coeficiente α (ecuaciones 2.20 y 2.21) se realizó a través de un proceso iterativo por minimización de residuos. Este coeficiente representa la relación de la masa de timol en el simulante y en la película en equilibrio e indica de manera indirecta, la relación entre las resistencias involucradas en el proceso. En las muestras de 8% y 10% de timol, el valor de α con mejor ajuste fue 0,42, con R^2 de 0,97 y 0,98 para cada muestra, respectivamente. El valor obtenido indicó que las resistencias interna y de superficie fueron, en principio, significativas por igual para el proceso de migración. La concentración de timol en el equilibrio en el simulante (M_∞) fue determinada en 170 ppm para la muestra con 10% de timol y en 145 ppm para la de 8%. Sin embargo, en ambas muestras el ajuste completo del modelo condujo siempre a valores muy elevados del parámetro estadístico χ^2 , con un gran error asociado a la determinación del coeficiente. Los coeficientes de difusión aparentes se ubicaron entre $2 \cdot 10^{-8}$ a $4 \cdot 10^{-8} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$. Valores similares fueron informados en la bibliografía, siempre en casos donde la matriz que contiene el migrante interactúa fuertemente con el simulante que la rodea. Por ejemplo, el valor de D_{aparente} informado para la liberación de sorbato en películas de almidón en contacto con una solución a pH 3 fue $8,95 \cdot 10^{-8} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Flores *et al.*, 2007). La determinación del timol en el simulante acuoso se realizó exclusivamente por cromatografía de alta resolución, debido a que en el simulante se solubilizaron componentes que absorbían en una longitud de onda

similar a la del timol, lo que impidió la determinación por espectrofotometría. Es muy probable que, debido a la gran afinidad del simulante acuoso por la película de levadura, la solución haya ingresado a la matriz polimérica y haya provocado el hinchamiento de su estructura, desarmándola. Este efecto fue descrito por Del Nobile *et al.* (2008), cuando estudiaron la migración de timol en películas de zeína de maíz y describieron, mediante microscopía, el efecto del hinchamiento (*swelling*) causado por el simulante (agua) al ingresar a la película. Chung *et al.* (2001) describieron la transferencia de materia en un recubrimiento con parabenos y simulante 50% etanol - 50% agua. Ellos señalaron que la liberación del activo no se realizó de manera controlada debido a la desintegración de la película en esa solución, una situación similar a la observada en los resultados de películas de levadura y el simulante acuoso. La descripción del proceso de migración en este simulante no puede realizarse a través de modelos derivados de la ley de Fick. Las películas de levadura no son aptas para situaciones en contacto con medios acuosos. No obstante, esto no constituye un aspecto negativo en sí mismo, sino que es una descripción de las capacidades de la película. En algunas aplicaciones se necesitan envases que, en contacto con medios acuosos, se degraden para liberar su contenido, por lo que en estos casos puntuales no se trataría de un aspecto negativo sino positivo.

9.6 Migración en simulante graso

En la figura 9.1 se muestran las curvas de migración de timol en el simulante graso (etanol 95% v/v) para cada concentración de timol y a las distintas temperaturas estudiadas. En dichas figuras se muestran los puntos experimentales y la curva que modela dichos puntos.

Figura 9.1 Cinética de migración de timol en simulante graso (etanol 95% v/v) a distintas concentraciones de timol 6, 8, y 10% de timol a tres temperaturas A) 5 °C, B) 25 °C y C) 40 °C.



En este simulante, debido a la alta afinidad etanol – timol se consideró como hipótesis inicial que la resistencia superficial es despreciable, con un valor de α muy elevado. Debido a esta aproximación, la ecuación utilizada para la migración en simulante acuoso es simplificada por la ecuación 2.23, donde la única resistencia considerada es la correspondiente a la película.

El simulante graso solubilizó una mayor cantidad de timol que el agua y a diferencia del caso anterior, las probetas mantuvieron su integridad durante todo el ensayo.

Tabla 9.4 Coeficientes y valores obtenidos a partir del ajuste de las curvas de migración en simulante graso con un modelo para resistencia superficial despreciable

Temperatura (°C)	Muestra	M_{∞} (10 ² ppm)	$D_{aparente}$ (10 ⁻⁸ mm ² s ⁻¹)	$D_{inicial}$ (10 ⁻⁸ mm ² s ⁻¹)
4	6%	3,6 ± 0,2	6,3 ± 1,5	3,9 ± 0,7
	8%	4,8 ± 0,3	5,2 ± 1,2	2,3 ± 0,2
	10%	6,1 ± 0,3	9,2 ± 2,3	3,9 ± 0,8
25	6%	4,9 ± 0,2	13,0 ± 2,9	6,6 ± 0,5
	8%	6,5 ± 0,2	14,2 ± 2,6	7,4 ± 0,5
	10%	7,9 ± 0,2	14,8 ± 2,2	6,9 ± 0,9
40	6%	5,9 ± 0,5	52,3 ± 2,5	26,3 ± 6,5
	8%	6,7 ± 0,2	45,7 ± 9,7	22,2 ± 6,6
	10%	8,1 ± 0,4	49,2 ± 1,6	23,5 ± 4,9

En la tabla 9.4 se puede comprobar que, con el aumento de temperatura, se incrementó la cantidad de timol en el extracto. La explicación a este fenómeno puede deberse a dos efectos que sucedieron en paralelo. Por un lado, el incremento de la temperatura provocó un aumento en la movilidad molecular, que ocasionó una mayor facilidad de difusión del activo desde la película hacia la solución (Zhu *et al.*, 2006). Kuorwel *et al.* (2013) describieron el mismo efecto en la migración de timol en películas de almidón en contacto con el simulante graso. Estos autores observaron que los coeficientes difusivos fueron más altos a 35 °C, que a 25 °C y 15 °C. El otro aspecto a tener en cuenta es el aumento de la solubilidad del timol en el simulante, a medida que se incrementa la temperatura, que contribuye a desplazar el equilibrio hacia el lado del simulante. El modelo propuesto para estudiar la migración del timol en el simulante graso fue apropiado, confirmando que la resistencia que controla la transferencia se halla en la película. Es claro que el grado de interacción entre el activo, la película y el simulante, debido a la polaridad de cada uno de ellos, es un factor clave para la descripción del proceso de migración a través de la ley de Fick.

Por otro lado, se determinaron los porcentajes de timol presentes en los extractos de migración para cada punto estudiado. La liberación alcanzó un

porcentaje superior al 95% del timol incorporado a la película a las 12 horas para las muestras a 4 °C y a las 5 horas para las demás condiciones. La liberación del timol fue rápida, lejos de ser gradual. En la tabla 9.4 se muestran los coeficientes obtenidos por ajuste de los datos experimentales en la parte inicial ($D_{inicial}$) y en todo el proceso ($D_{aparente}$). Finalmente, los dos parámetros se incrementaron a medida que aumentó la temperatura, pero no se vieron afectados significativamente por la cantidad de timol en las muestras. La liberación rápida del timol es un aspecto negativo para la aplicación de las películas sobre alimentos. Debe tenerse en cuenta que en alimentos sólidos la liberación será más lenta y que de ser necesario, podría trabajarse con películas de múltiples capas o “multicapas”, con el objetivo de obstaculizar el transporte y prolongar la presencia del timol en el envase.

A partir de los coeficientes de difusión se obtuvieron las energías de activación del proceso, utilizando la ecuación de Arrhenius (tabla 9.5). Se observaron valores fluctuantes alrededor de 17 kJ mol⁻¹ en las tres muestras. El contenido de timol no influenció la cantidad de energía requerida para el proceso difusivo.

Ramos *et al.* (2012) informaron un coeficiente difusivo de $1,01 \pm 0,03 \cdot 10^{-8}$ mm² s⁻¹ para la liberación de timol en películas de polipropileno hacia el simulante graso a 40 °C. Este valor es un orden más bajo que los hallados en el presente trabajo en las mismas condiciones. En otras películas realizadas con compuestos de carácter hidrofóbico, se observó el mismo comportamiento, una liberación más lenta que la encontrada para las películas de levadura. La afinidad del activo con la película hace que sea más difícil la difusión hacia la superficie y su posterior liberación al simulante. Por ejemplo, la migración fue más lenta en películas de polietileno de baja densidad (LDPE), activos similares al timol y simulantes grasos (Cran *et al.*, 2010). Tawakkal *et al.* (2016) publicaron un coeficiente difusivo de $6 \cdot 10^{-7}$ mm² s⁻¹ para el timol que difunde a 40 °C en un medio simulante graso desde películas de ácido poliláctico (PLA). Este resultado coincide con los valores obtenidos en el presente trabajo y se observó un comportamiento similar por parte del migrante (timol) cuando se encontró en matrices hidrofílicas y en contacto con una solución de 95% etanol.

Tabla 9.5 Energía de activación del proceso de migración para cada película (6, 8 y 10 % de timol)

Muestra	E_a (kJ mol ⁻¹)
6% timol	15,9 ± 1,4
8% timol	19,5 ± 0,2
10% timol	14,8 ± 1,0

En la tabla 9.6 se informan los porcentajes de migración correspondientes a las muestras a 40 °C. Los mismos se acercan a valores cercanos al 100%, mientras que el porcentaje fue cercano a 90% para 25 °C y a 80% para la temperatura más baja. En este ensayo se obtuvieron valores muy cercanos al 100% de timol incorporado, a diferencia de la extracción de la sección 9.2, donde hacia el final de la misma quedó un porcentaje retenido. Los tiempos de liberación son muy cortos, debido al gran poder extractivo del simulante y al mismo tiempo, a la baja capacidad de la película de retener el timol. Después de las 5 horas, se retuvo 10% de timol. Y en las temperaturas más bajas, en el equilibrio permaneció una cantidad similar de timol, que podría actuar como reserva para prolongar la actividad antioxidante.

Tawakkal *et al.* (2016) ensayaron muestras de PLA con timol en simulante graso a diferentes temperaturas y también obtuvieron una liberación cercana al 100% del activo para temperaturas superiores a 30 °C.

La velocidad de liberación del antimicrobiano es un aspecto importante a considerar para que el material sea apto para la protección de un alimento. La difusión de los antioxidantes se debe mantener de manera tal que siempre haya timol activo presente, dado que la concentración del activo en la superficie del alimento debe estar siempre por encima de una concentración mínima para que ésta sea una barrera efectiva (Bastarrachea *et al.* 2010). La cantidad de activo que migra hacia el alimento debe cumplir con la reglamentación de envases alimentarios, por ejemplo, los límites de migración total. En el caso de envases con capacidad mayor o igual a 250 ml, esta migración no debe superar 50 mg/kg de simulante (GMC/Mercosur, 1996). Por estos motivos, existen estrategias para

modular la velocidad con la que se libera el activo, con el fin de alcanzar el efecto deseado y cumplir con las reglamentaciones. Estas estrategias podrían ser aplicadas en las películas de levadura debido a que la liberación es muy rápida en el simulante graso. La encapsulación de los activos es una forma de agregar una barrera adicional para que disminuya la liberación de un compuesto de interés. Li *et al.* (2018) propusieron incorporar al timol en complejos de inclusión (ciclodextrinas) en películas de gelatina y lograron de esa forma extender de 38 a 235 horas la migración total desde la matriz.

Tabla 9.6 Datos del proceso de migración en simulante graso a 40 °C

Tiempo (minutos)	% de Migración		
	6% Timol	8% Timol	10% timol
10	12 ± 2	12 ± 2	12 ± 1
30	16 ± 2	20 ± 1	19 ± 6
60	31 ± 3	31 ± 5	46 ± 5
300	98 ± 7	90 ± 10	90 ± 13
720	94 ± 5	93 ± 4	89 ± 2
1440	99 ± 1	92 ± 5	89 ± 1
2880	92 ± 2	~100	~100
7200	~100	97 ± 3	~100

También se lograron otros efectos interesantes, como el aumento de la dispersabilidad del compuesto en la preparación de gelatina, la reducción de las pérdidas por evaporación, inactivación por oxidación o calentamiento excesivo (Hill *et al.*, 2013) y disminuir la influencia del marcado *flavor* del timol, manteniendo las características sensoriales del alimento y pudiendo ser aplicado en una gama más amplia de productos. Si aun así no se alcanza a proteger el perfil sensorial del alimento, se ha propuesto la combinación de los activos con compuestos aromáticos comúnmente utilizados en la industria, como vainilla, frutilla, banana, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Por su parte, Mastromatteo *et al.* (2009) confirmaron que la velocidad de difusión del timol en películas de zeína de maíz hacia el medio externo podía controlarse a través del espesor de la película o mediante la conformación de envases bicapa o multicapa de distintas polaridades. En ambos casos, el camino

que debe recorrer el aditivo para pasar del envase a la interfase es mucho más largo y es por este motivo que el proceso se desfavorece.

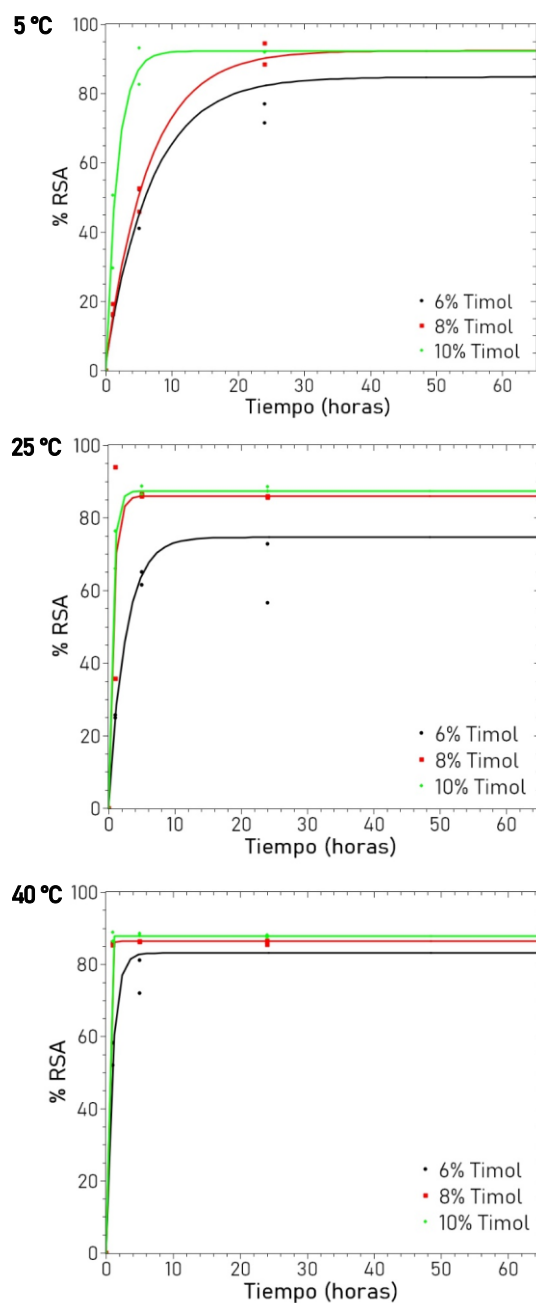
9.7 Capacidad antioxidante del timol liberado

El ensayo de capacidad antioxidante se basa en la reducción del radical en presencia de compuestos con potencial antioxidante. No está descripto con exactitud el mecanismo por el cual estos compuestos reducen al radical, aunque se ha propuesto que el catión radical se forma activamente por la presencia de compuestos donantes de átomos de hidrógeno o electrones (Nenadis *et al.*, 2004) como los compuestos fenólicos (Cerretani y Bendini, 2010). El radical ABTS^{•+} tiene coloración azul y posee una absorbancia máxima a 734 nm, mientras que cuando éste es reducido por la presencia de un antioxidante, se vuelve incoloro. Por lo tanto, cuanto mayor sea el poder antioxidante del compuesto a estudiar, mayor será el grado de decoloración de las muestras. El resultado final del ensayo variará de acuerdo a distintos parámetros, como la concentración del antioxidante y la duración de la reacción inhibitoria del catión radical, que se tienen en cuenta para determinar la actividad antioxidante.

Una sustancia será más antioxidante cuanto menor sea su IC₅₀, porque requiere menos cantidad de la misma para lograr evitar la oxidación (Zhu *et al.*, 2011). Conocer este parámetro es útil, para comparar la capacidad del timol de retardar o prevenir la oxidación respecto de otras moléculas, cuyas capacidades antioxidantes son ampliamente conocidas, como es el caso de los fenoles o polifenoles (Re *et al.*, 1999).

La actividad antioxidante del timol liberado por la película fue determinada para comprobar que la concentración liberada posee dicha actividad. El ensayo se llevó a cabo una vez calibrada la absorbancia de la solución B (0,702) a 734 nm y se midieron los extractos de migración provenientes del simulante graso. Los resultados mostraron un incremento en la capacidad antioxidante a lo largo del tiempo, que se condice con una mayor concentración de timol en el extracto. Las muestras con 10% de timol tuvieron la mayor decoloración para las condiciones estudiadas y por lo tanto una mayor actividad antioxidante. Al realizar los ensayos se controló también que el medio simulante no interfiriera en la determinación de la capacidad antioxidante (95% etanol), por lo tanto, la actividad observada se atribuye exclusivamente al timol.

Figura 9.2 Actividad de inhibición de radicales (*Radical Scavenging Activity*, RSA) del timol que migró desde la película hacia el simulante graso



Se muestran los datos experimentales para las tres concentraciones de timol (6, 8 y 10%) y tres temperaturas (5, 25 y 40 °C). Las curvas corresponden al mejor ajuste posible con una función exponencial simple.

Debido a la buena correspondencia entre la medición de la actividad antioxidante y la cuantificación de la migración, se puede proponer la medición de la primera

como alternativa al estudio de migración. De esta manera además de cuantificar de manera indirecta a la sustancia migrada, se conoce también directamente su poder antioxidante.

La actividad inhibitoria de radicales (RSA) en función del tiempo para cada temperatura estudiada puede ser observada en la figura 9.2. En las tres temperaturas, la máxima RSA que se alcanzó fue cercana a 90%. El efecto de la temperatura en la liberación del timol puede ser observado en el gráfico de RSA, ya que disminuyó el tiempo necesario para alcanzar la máxima actividad. Este nivel de RSA es un resultado muy positivo ya que, si bien el timol es rápidamente liberado al medio, la actividad que tiene el mismo para la inhibición de promotores de oxidación es muy fuerte y perdura en el tiempo.

Se realizó una comparación del IC₅₀ obtenido en este trabajo con lo informado en la bibliografía y se encontró una concordancia con el valor publicado en el trabajo de Badanai *et al.* (2015). La concentración de timol requerida para disminuir al 50% (IC₅₀) la absorbancia máxima (0,714) obtenida fue $1,68 \pm 0,06 \text{ mg ml}^{-1}$ mientras que en el trabajo consultado fue $1,39 \text{ mg ml}^{-1}$. Las condiciones del ensayo realizado en el trabajo de Badanai *et al.* (2015) son comparables a las utilizadas en este trabajo.

Altiook *et al.* (2010) probaron las propiedades de películas de quitosano con aceite de tomillo (formado principalmente por timol y carvacrol) para posibles aplicaciones en la curación de heridas. Pudieron comprobar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los activos en la piel a partir de la migración de los mismos. De esta manera puede obtenerse un doble beneficio por la incorporación del aceite de tomillo.

Se ha comprobado que existe una relación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad de protección de la oxidación en infusiones de plantas medicinales (Huang *et al.*, 2011; Katalinic *et al.*, 2006). Se sabe que a medida que aumentan los anillos de carbono en la molécula y el número de grupos -OH unidos a ellos, el poder antioxidante se incrementa (Kim *et al.*, 2004). La naturaleza antioxidante del timol se debe a su habilidad en la neutralización de radicales, en la descomposición de peróxidos y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Ramos *et al.*, 2014). Tiene la capacidad de donar átomos de hidrógeno a radicales peroxilo para producir especies estabilizadas y, en

consecuencia, obstaculizar la propagación de la rancidez oxidativa en alimentos de carácter lipídico (Mastelić *et al.*, 2008).

Las películas de levadura con timol podrían utilizarse en contacto con alimentos para retardar la oxidación de alimentos. Así, mediante la liberación continua del timol durante almacenamiento y distribución, las mismas podrían prolongar la vida útil de los alimentos al evitar cambios de color de pigmentos y disminuir la autooxidación de lípidos, que son causas importantes de deterioro, afectando tanto a la calidad nutricional como la sensorial (Manzanarez-López *et al.*, 2011).

9.8 Conclusiones del capítulo IX

De acuerdo a los ensayos de migración realizados, se observó que la polaridad del migrante, la matriz y el alimento o simulante, son factores cruciales al momento de estudiar fenómenos difusivos y determinan en mayor medida su aplicación tecnológica. Las muestras de películas de levadura no soportaron el contacto con el simulante acuoso, las películas en principio no son aplicables para fines que involucren el contacto con productos acuosos, salvo que sea desable el colapso de su estructura para dosificar un determinado compuesto en contacto con un medio acuoso. Por ejemplo, las cápsulas blandas, preparadas habitualmente a base de gelatina, liberan su contenido en el tracto digestivo.

En el simulante graso las probetas no sufrieron alteraciones y la liberación del timol se efectuó rápidamente. La disponibilidad del timol con una actividad RSA de 80 % a 25 °C de temperatura, se alcanzó a partir de las 5 horas en las muestras de 8 y 10 % de timol, lo que significó una alta disponibilidad de timol en el medio lipofílico. La migración de timol podría ser disminuida utilizando barreras adicionales, como multilaminados, para prologar su permanencia en la película. No obstante, es importante destacar que el timol hallado en los extractos de migración poseía una alta actividad para la protección de sustancias susceptibles de oxidación. A temperaturas más bajas, la película de levadura tuvo la capacidad de retener una parte del timol incorporado. Es factible la aplicabilidad de las películas de levadura con activo para extender la vida útil de alimentos o de los principios activos de carácter lipídico, pero no para productos acuosos por el colapso de la estructura.

Capítulo X: Películas de levadura residual cervecera

10.1 Introducción

La reutilización y puesta en valor de las corrientes residuales de las plantas de producción de alimentos han sido y son parte de los desafíos más importantes de la ingeniería alimentaria, de manera de contribuir a una producción más limpia, disminuir los costos de tratamiento de las corrientes con gran demanda química y bioquímica de oxígeno y revalorizar los desechos, a través de su uso en aplicaciones de interés tecnológico. Como en otras disciplinas, se habla de producción verde cuando los materiales utilizados son amigables con el medio ambiente, cuando los efluentes son adecuadamente tratados y minimizados y el impacto global de la producción y la explotación de recursos es sostenible en el tiempo y en el ambiente (Anastas y Zimmermann, 2007). En el caso de la industria cervecera, la biomasa residual del proceso de fermentación está compuesta mayormente por células de levaduras, restos de lúpulo, de la cebada malteada y de los adjuntos cerveceros utilizados en la producción.

Los productores cerveceros pueden reutilizar, en promedio, 3 a 5 veces la levadura para realizar la fermentación. El límite de reutilización es de 8 a 10 veces y no es posible reutilizar el fermento por más ciclos debido a que las cepas de levadura se degeneran y la producción de etanol no alcanza los niveles deseados. Al mismo tiempo, los productos secundarios producidos por las levaduras después de varios ciclos de reúso pueden no ser los deseados inicialmente, afectando el aroma y el sabor del producto (Loviso y Libkind, 2018). La levadura residual se obtiene de la planta de producción como un efluente con 12-18% de materia seca luego de la fermentación, proceso que se extiende de 1 a 2 semanas, dependiendo del tipo de cerveza a producir y la levadura que se utiliza. La levadura residual seca se utiliza en la alimentación de animales rumiantes con un previo desamargado (Suárez-Machín y Guevara-Rodríguez, 2017; Ferreira *et al.*, 2010) y también se ha propuesto para la dieta de peces (Oliva-Teles y Gonçalves, 2001). El vertido en desagües solo puede realizarse con un tratamiento previo debido a la gran cantidad de materia orgánica en el efluente. Es por esto que, frente al auge de producciones artesanales y los elevados volúmenes de producción industrial, los estudios tendientes a la promoción de nuevas aplicaciones del residuo son de gran relevancia. En este

capítulo se describirá el uso de levadura residual cervecera, a la luz de los resultados obtenidos anteriormente para la levadura panadera.

En este capítulo describirá la preparación y se informarán los resultados de la caracterización de películas a partir de levadura residual cervecera.

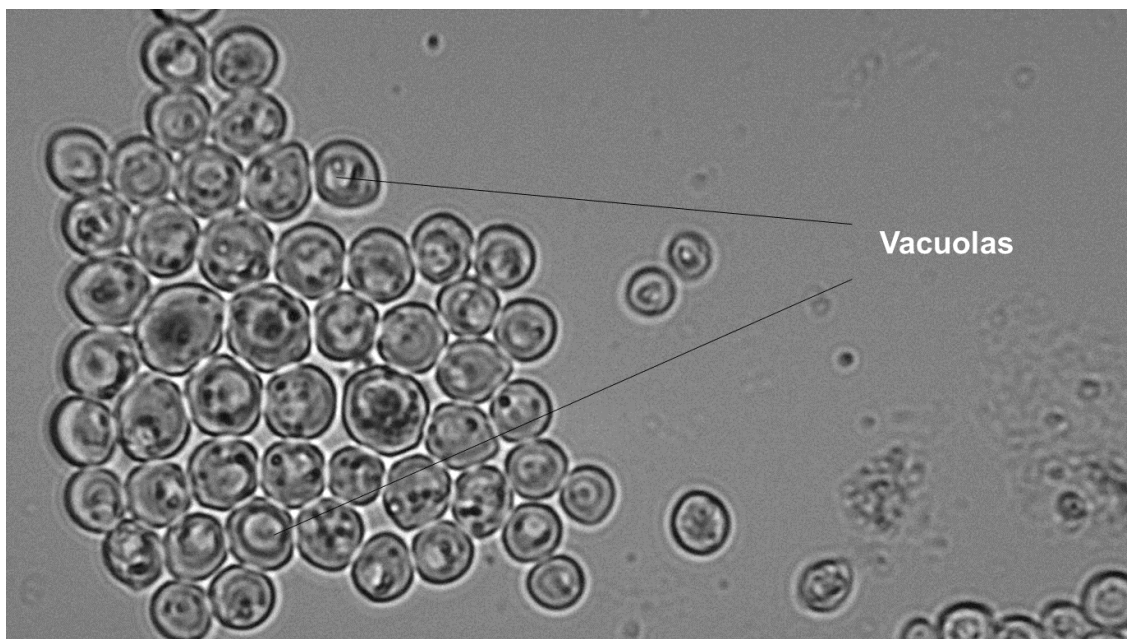
10.2 Análisis de la levadura residual antes de la preparación de películas

Luego de la recepción de la levadura residual, la misma fue almacenada en condiciones de refrigeración hasta poder procesarla, usualmente de 4 a 5 días después de recibida. Se realizaron determinaciones de proteínas e hidratos de carbono libres en el sobrenadante de centrifugación con el objetivo de analizar la presencia de compuestos acompañantes que podrían actuar como plastificantes, así como de proteínas libres, que podrían ser un indicador indirecto de la conservación de la integridad celular. La cantidad de hidratos de carbono en el sobrenadante fue $44 \pm 2 \text{ g l}^{-1}$, mientras que la cantidad de proteína disuelta fue $1,05 \pm 0,06 \text{ g l}^{-1}$. La conservación de la levadura es clave para obtener películas de biomasa de buena calidad, las proteínas son componentes importantes en la formación de la película, tal como se observó en los resultados de los capítulos III, VI y VII. Incluso las enzimas liberadas luego de la ruptura, con el tiempo suficiente, podrían afectar significativamente la estructura de la pared celular, fragmentándola de manera negativa para la producción de películas. Luego de 7 días de congelación, sin ningún tipo de aditivo protector más que los carbohidratos del medio con el que proviene la levadura, la cantidad de proteína en el sobrenadante pasó a 8 g l^{-1} . Dado que la congelación puede lesionar las células, liberándose contenido citoplasmático, entre ellas enzimas, no sería adecuado realizar esto sino procesar la levadura lo antes posible.

Algunas patentes y estudios promovieron el uso de fracciones levadura de cerveza residual para la producción de películas y recubrimientos (Kasai *et al.*, 2001 y Kirin Beer Kabushiki Kaisha, 2002). En estas propuestas, se propuso la eliminación del material soluble intracelular y la utilización exclusiva de la pared celular para preparar las películas. Los propietarios de la patente y los investigadores argumentaron que el material intracelular no es capaz de formar películas e incluso, que dificulta su formación. Si la levadura residual se encuentra muy lisada y con plena actividad enzimática, al tener un grado elevado

de hidrólisis las proteínas pierden la capacidad de formar la red necesaria para la formación de películas.

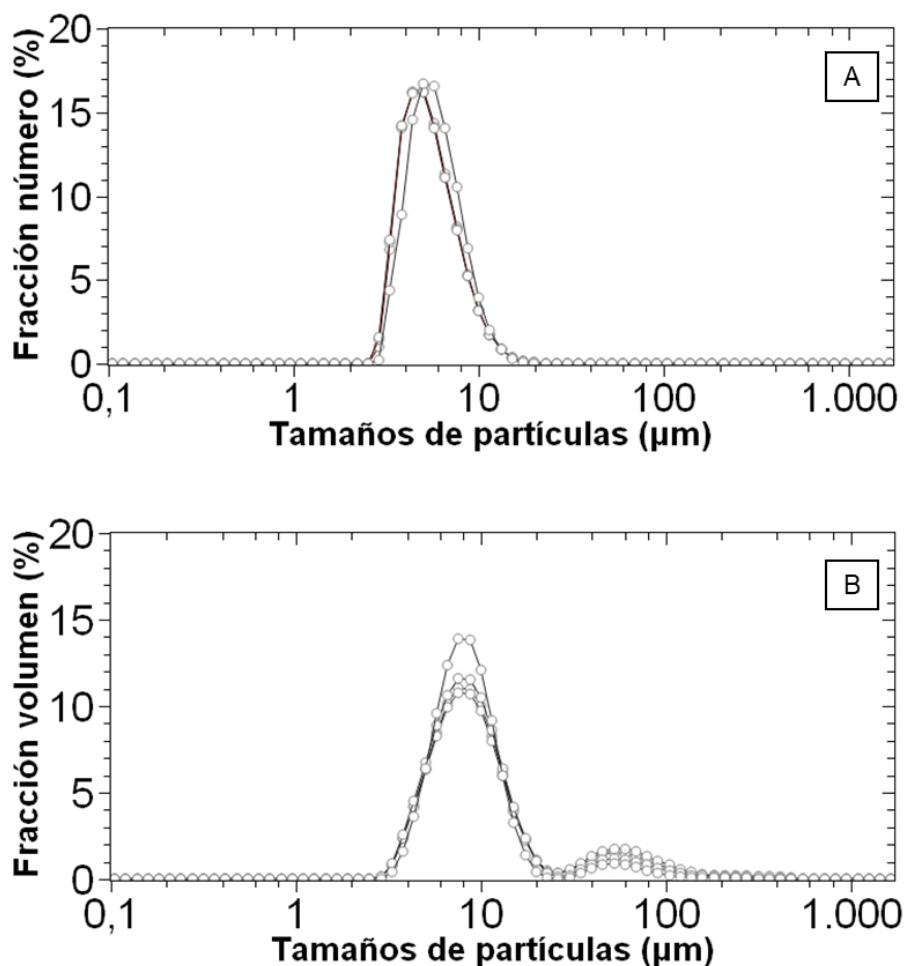
Figura 10.1 Células de levadura vistas al microscopio óptico (400×)



La densidad del sobrenadante (mosto remanente), luego de centrifugar la levadura cervecera, fue de 1016 kg m^{-3} debido a una buena cantidad de compuestos en solución. Las levaduras residuales provenían de mostos con densidades superiores a 1070 kg m^{-3} . La diferencia entre ambas densidades se debió a la atenuación que produjo la levadura para la producción de alcohol durante la fermentación. En la figura 10.1 se observan células de levadura *S. cerevisiae* residuales del proceso de fermentación de la cerveza. Estas células fueron analizadas utilizando un equipo de dispersión estática de la luz. Los tamaños promedio de las poblaciones principales en fracciones número y volumen fueron mayores a los informados en el capítulo III para levadura panadera (figura 10.2). Mientras que el diámetro promedio $D[4,3]$ informado previamente para la levadura panadera fue $5,5 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{m}$, en el caso de la levadura residual fue $15,4 \pm 3,4 \text{ }\mu\text{m}$ (con la población atribuida a levaduras centrada en $8 \text{ }\mu\text{m}$). Es probable que la diferencia se deba a los estadios de crecimiento de unas y otras células. Volviendo a la figura 10.1, la población de células de levadura residual muestra células grandes con vacuolas de reserva que ocupan gran espacio, lo que es habitual en células maduras (Chan y

Marshall, 2014). El desarrollo de las células puede modificar la composición de las mismas, alterando la relación de polisacáridos, proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Saksinchai *et al.* (2001) analizaron la composición de levaduras *Saccharomyces uvarum* (cervecera) y *Saccharomyces cerevisiae* (panadera) y encontraron un mayor contenido de ácidos nucleicos y de hidratos de carbono (informados como glucosa) en la levadura residual de cerveza.

Figura 10.2 Distribuciones de tamaños de partículas de dispersiones de levaduras residuales: A) distribución en fracción de número de partículas respecto del total y B) distribución en fracción de volumen de partículas respecto del total



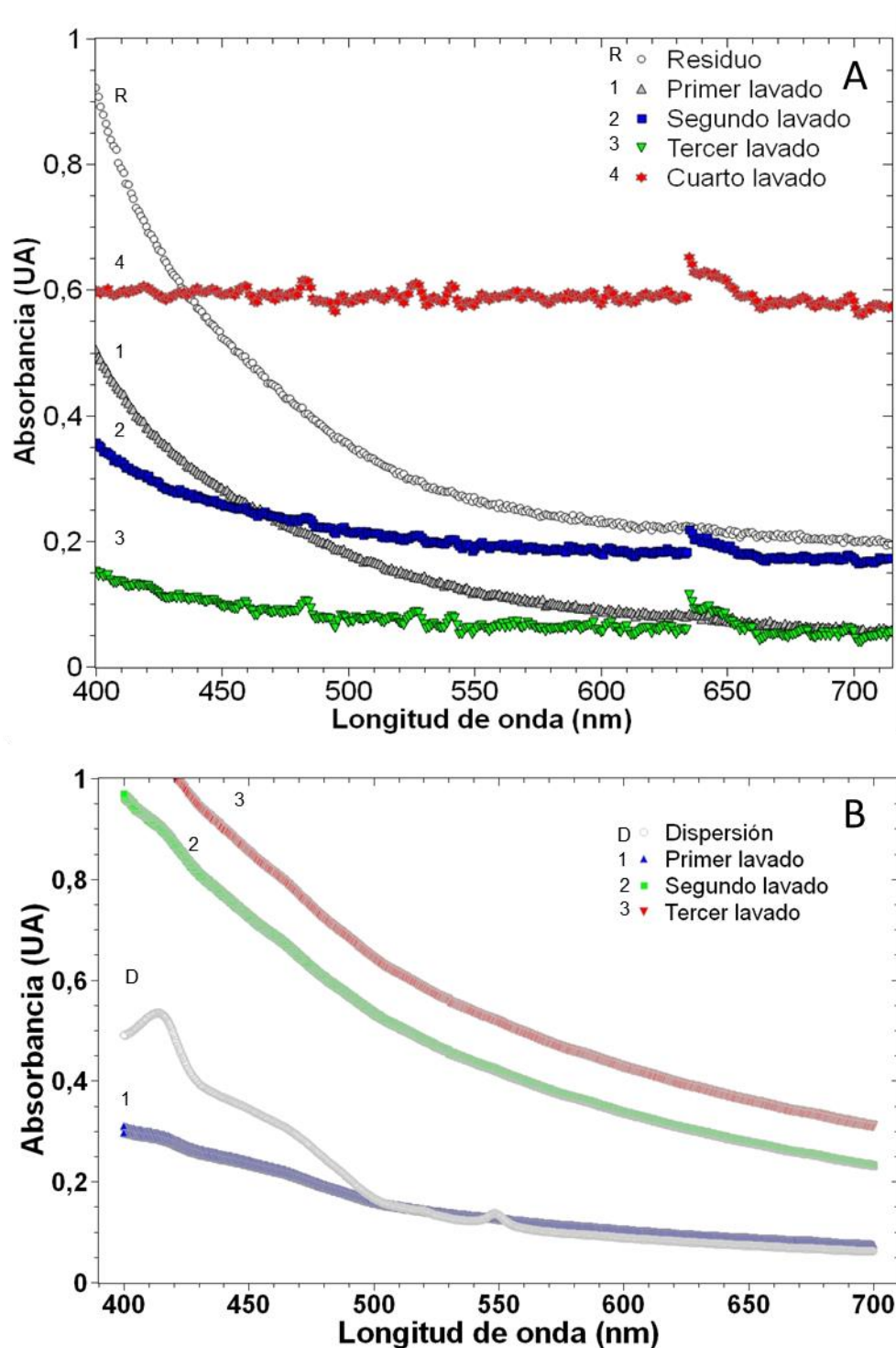
Las diferentes líneas en cada figura corresponden los triplicados realizados.

En la figura 10.2 se observa que las distribuciones se encuentran centradas en 4 μm, en el caso de la distribución en fracción número (figura 10.2A), y en el caso

de la distribución en fracción volumen (figura 10.2B) se observan dos poblaciones, una centrada a 8 μm y otra de mayor tamaño, centrada a 55 μm . Se utilizó ultrasonido de baja potencia, disponible en el equipo de medición de tamaños de partículas (20% de amplitud, 35W), para comprobar si la población de mayor tamaño correspondía a agregados, que pueden ser disgregados con la aplicación de ultrasonido. No obstante, la población de mayor tamaño continuó presente. Esta población podría corresponder a pequeños restos de granos, lúpulo, presentes en el medio de crecimiento de las levaduras que fueron arrastrados y no removidos. Aún así, la población atribuible a las levaduras, es de mayor tamaño que la de levadura panadera informada en el capítulo III.

Como se puede ver, comparando los sobrenadantes iniciales de las dispersiones tal cual de levadura panadera y cervecera (dispersión y residuo, en cada una), estas últimas tuvieron mayor absorbancia en el rango de longitudes de onda analizado (figuras 10.3 A y B). Los lavados de la levadura residual son importantes a la hora de disminuir el color del sobrenadante. La determinación de la cantidad de lavados a realizar se hizo a través de la absorbancia total. Con el tercer lavado se alcanzó el nivel más bajo de absorbancia en el sobrenadante de la levadura residual (figura 10.3A), después de este lavado la absorbancia se incrementó, probablemente debido a la hidratación y a la ruptura de células. Un número mayor de lavados de la levadura residual no trajo aparejado ningún beneficio adicional por sobre la eliminación de los restos del mosto, incluso podría producir la pérdida de compuestos citoplasmáticos, dado el aumento de turbidez observado en el cuarto lavado. Es por esto que la cantidad de lavados a realizar se fijó al mínimo necesario. En el caso de la levadura panadera (figura 10.3B) con el primer lavado se alcanzó el nivel más bajo de absorbancia y luego de esto, la absorbancia se incrementó.

Figura 10.3 Gráficas de la absorbancia en función de la longitud de onda del sobrenadante de cada lavado de: A) levadura residual y B) levadura panadera



10.3 Color de las películas preparadas con levadura residual

El color de la levadura residual fue muy diferente de la levadura panadera desde su recepción. Si bien los lavados son efectivos para eliminar la mayoría de los

restos del mosto cervecero, como cebada malteada y lúpulo, no tienen un efecto sustancial en la disminución del color de la levadura residual. Las películas realizadas con la levadura residual lavada tres veces tuvieron un aspecto amarronado, a pesar de seleccionar levaduras de las variedades *Honey* y *Golden* que son de las variedades más claras. La figura 10.4 muestra el color de las películas de levadura residual y en la figura 10.5 se observa un análisis de componentes principales realizado con las coordenadas L^* , a^* y b^* de la escala CIELab. Los puntos en la figura representan a cada una de las muestras y el *biplot* incluye la dirección de cada una de las coordenadas.

Figura 10.4 Fotografía de las películas obtenidas en las placas a partir de levadura residual: A) películas en placas de Petri y B) película despegada de la placa



Figura 10.5 Gráfica *biplot* del análisis de componentes principales (*L*, *a* y *b*) de color de muestras de películas de levaduras panaderas y residual cervecera

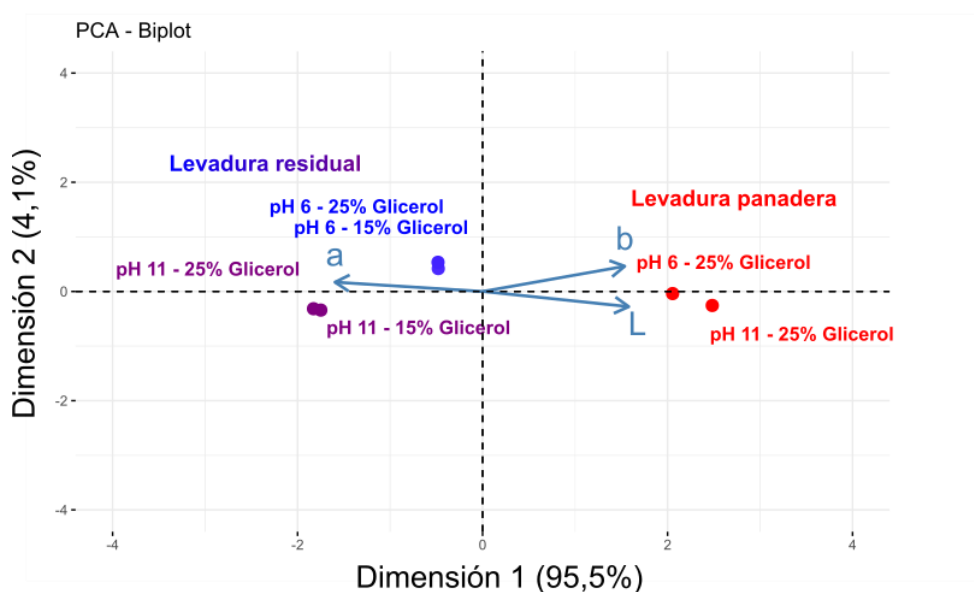


Tabla 10.1 Valores de la escala de color CIELab para las películas de levadura residual. La diferencia de color ΔE está dada en función de la distancia geométrica con los valores de la muestra de levadura panadera

Muestra (Lado opaco)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	ΔE
Lev. panadera pH6 25% de Glicerol	84,9 ± 1,0 ^a	0,4 ± 0,2 ^a	25,3 ± 2,1 ^a	---
Lev. residual pH 6 15% Glicerol	75,1 ± 3,1 ^b	4,2 ± 1,5 ^b	34,1 ± 4,0 ^{bc}	10,2 ± 4,5 ^a
Lev. residual pH 6 25% Glicerol	78,2 ± 3,0 ^b	3,0 ± 1,3 ^{ab}	30,4 ± 4,5 ^{ab}	7,0 ± 3,0 ^a
Lev. panadera pH11 25% de Glicerol (comparación)	80,6 ± 2,0	0,6 ± 0,6	30,6 ± 1,9	---
Lev. residual pH 11 15% Glicerol	58,4 ± 2,3 ^d	12,5 ± 1,4 ^c	42,5 ± 0,3 ^d	28,6 ± 2,2 ^b
Lev. residual pH 11 25% Glicerol	68,0 ± 3,5 ^c	6,9 ± 2,0 ^d	39,3 ± 2,8 ^{cd}	18,3 ± 4,7 ^c

Letras diferentes en una misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa, $P < 0,05$.

Se observa con facilidad que las muestras se distinguen según su origen, levadura panadera o residual, y dentro de cada uno de estos grupos, el pH produce también un efecto significativo. El efecto del glicerol no es tan marcado como el del pH. En la tabla 10.1 se observan los valores de los parámetros L^* , a^* y b^* de cada una de las muestras. Los valores de ΔE corresponden a la distancia geométrica con respecto de la levadura panadera a pH 6 a 25% de glicerol, que es la condición de la que se partió en capítulos previos. Se puede observar una diferencia evidente en el color de la residual respecto a la panadera tanto a pH 6 como a 11, siendo a pH 11 el cambio más intenso. En general, existe cierta preferencia a que las películas utilizadas para el envasado de alimentos sean translúcidas, para que no afecten la observación del producto. Aunque, como se comentó en el capítulo VII, esto depende también de si el alimento debe ser protegido de la exposición a la luz o no. Existen diferentes ejemplos en la bibliografía de producción de películas con color ámbar o amarronado, sin que esto implique un detrimento a su aplicación. Las películas producidas con proteínas generalmente van desde las transparentes, pasando por un pálido amarillo hasta un color marrón intenso (Sobral *et al.* 2008). Aunque también los polisacáridos pueden dar películas muy amarronadas como las mostradas por De Moraes *et al.* (2013) en un trabajo donde obtuvieron películas de almidón de mandioca a través de *tape-casting*. El color de las películas no es una limitación sino en muchos casos una característica favorable: se han publicado diversos trabajos en los que el cambio de color de la película se utiliza como indicador del cambio de pH (Musso *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2014).

10.4 Degradación térmica, hidratación y características mecánicas de películas de levadura residual

En los ensayos de degradación térmica (figura 10.6) no se observaron grandes diferencias con los valores obtenidos en el capítulo III para películas de levadura panadera. La mayor velocidad de degradación se registró cerca de los 300 °C y la pérdida de peso hasta 300 °C fue muy similar a la de las otras películas. Esto implica que la temperatura de procesamiento por técnicas tales como extrusión o moldeo por compresión debería ser la misma recomendada para levadura panadera, cerca de 150 °C, (las T_{90} fueron desde 163 °C a 15% glicerol hasta

141 °C a 35%). Al igual que en las películas de levadura panadera la pérdida de peso inicial corresponde mayoritariamente a la evaporación de agua.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados de tracción uniaxial (tabla 10.2), el análisis de varianzas mostró que el módulo elástico y la resistencia a la tracción de las películas de levadura residual fueron afectadas en forma estadísticamente significativa solo por el contenido de glicerol, mientras que, en el caso de la deformación a ruptura, tanto el pH como el contenido de glicerol produjeron efectos estadísticamente significativos ($P < 0,05$). Ambos resultados apoyaron a los resultados obtenidos en los capítulos previos, donde el pH no modificó el módulo elástico ni la resistencia a la tracción y sí modificó de manera sustancial la deformación a ruptura. El módulo elástico y la resistencia a la tracción de las películas con 15% de glicerol fueron similares a las de 25% de glicerol, pero de levadura panadera. El efecto del pH fue muy importante en la deformación a ruptura, tal como fue informado en el capítulo VI, en ambos niveles de glicerol estudiados. En la tabla 10.2 se incluyeron los resultados informados en el capítulo VI para facilitar la comparación.

Figura 10.6 Gráfico de la pérdida de peso y su derivada respecto de la temperatura de películas preparadas con levadura residual

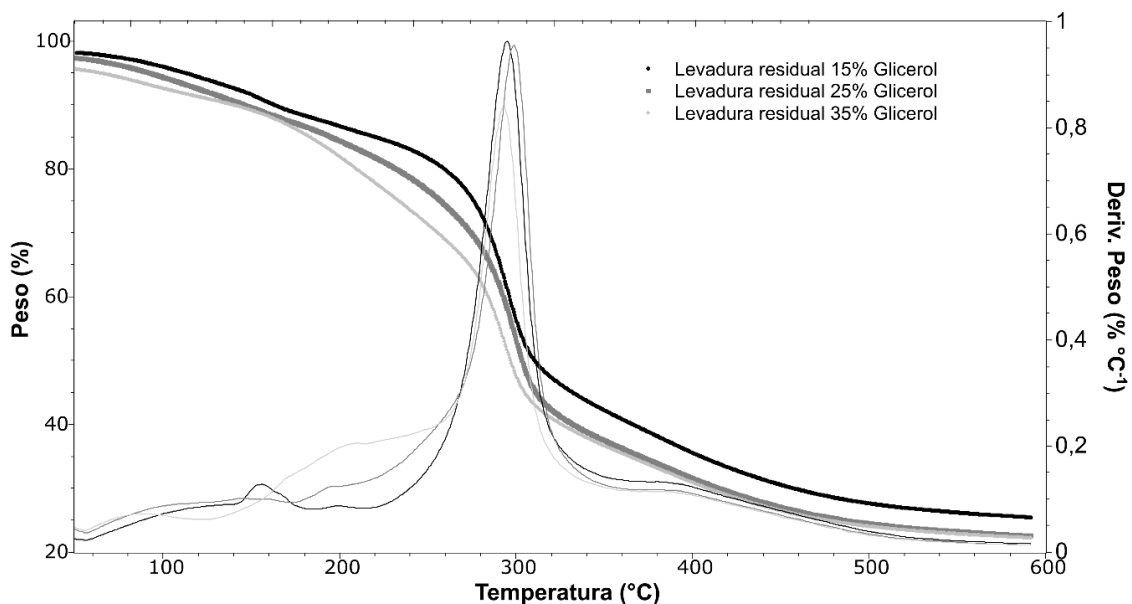


Tabla 10.2 Propiedades mecánicas de películas preparadas con levadura residual

Muestras	Modulo elástico (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Deformación a ruptura (%)
pH 6 - 15% Glicerol	40 ± 3^a	$1,8 \pm 0,2^a$	9 ± 2^a
pH 6 - 25% Glicerol	12 ± 1^b	$0,9 \pm 0,1^b$	25 ± 3^b
pH 11 - 15% Glicerol	38 ± 4^a	$1,9 \pm 0,1^a$	21 ± 3^b
pH 11 - 25% Glicerol	11 ± 1^b	$0,8 \pm 0,1^b$	36 ± 4^c
(Panadera) pH 6 – 25% glicerol*	$42,2 \pm 10,3$	$2,2 \pm 0,6$	$11,4 \pm 2,5$
(Panadera) pH 11 – 25% glicerol*	$38,0 \pm 8,3$	$2,5 \pm 0,6$	$29,1 \pm 4,6$

**Se incluyen a modo de comparación los resultados de películas de levadura panadera a pH 6 y 11 informados en el capítulo VI. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).*

Las propiedades mecánicas de las películas preparadas con levadura residual fueron diferentes a las de levadura panadera, probablemente por la presencia de compuestos de bajo peso molecular que acompañan a la levadura que proviene de la cerveza. A pesar de realizar los lavados correspondientes para retirar los compuestos, los resultados indican que existe cierto grado de plastificación adicional por sobre el que ofrece el glicerol incorporado, debido a la comparación de los resultados de la tabla 10.2 con los obtenidos en las películas de levadura panadera en los capítulos IV y VI. Al momento de realizar estos ensayos se probó una cantidad mayor de glicerol, que resultó en exudado y gran absorción de agua, dificultando la preparación de las muestras para los diferentes ensayos, por lo que se descartó el uso de glicerol por encima del 25%. En las cinéticas de hidratación que se realizaron con las muestras preparadas con levadura cervecera a pH 11 con 25% de glicerol se alcanzó una hidratación máxima (h_{∞}) $0,72 \pm 0,01$ (g de agua/g m.s.). La cantidad de agua incorporada en la película de levadura residual fue superior a la incorporada en películas con levadura panadera, incluso en aquellas a las que se agregó 30% de glicerol, en el capítulo V se informó $0,66$ g de agua/g m.s.

En el caso de utilizar levadura residual, el grado de plastificación adicional puede ser considerado como un aspecto positivo, disminuyendo la cantidad de glicerol a incorporar. No obstante, debe ser tenido en cuenta que este grado de plastificación adicional trae aparejado también una mayor afinidad al agua, lo que de no considerarse al momento de plastificar puede perjudicar la característica como barrera (al vapor de agua) y al mismo tiempo, el comportamiento mecánico.

10.5 Conclusiones del capítulo X

De acuerdo a los resultados, es posible utilizar la levadura residual para producir películas, y como fue encontrado para la levadura panadera, el pH alcalino en las dispersiones tiene un efecto positivo en la deformación a ruptura, sin modificar la resistencia a la tracción o el módulo elástico. El color de las películas es más oscuro y no se puede disminuir a través de los lavados de la levadura. Dado que la levadura residual estuvo acompañada de compuestos plastificantes, fue necesaria una reducción del glicerol incorporado, respecto del porcentaje utilizado en las películas de levadura panadera. Esta reducción debe ser tenida en cuenta si se piensa en la aplicación de las películas.

Capítulo XI: Conclusiones generales y aplicaciones potenciales de las películas de levadura

Los resultados informados en la presente tesis permiten confirmar que es posible obtener películas a partir de biomasa de levadura. Esta afirmación fue complementada y reforzada por la extensa caracterización posterior al análisis de las dispersiones para la producción de películas. La dispersión de células de levadura procesada por homogeneización, tratamiento térmico y homogeneización tuvo el mejor desempeño para la producción de películas. Es importante destacar el hecho de que no es necesario extraer un compuesto particular para producir películas de buena calidad.

Las películas presentadas en la tesis poseen características mecánicas, térmicas y de hidratación similares a las producidas a partir de compuestos aislados o concentrados de fuentes naturales, poseen color ámbar (levadura panadera) o marrón oscuro (levadura residual) con cierto grado de transparencia. La principal ventaja de la producción de películas de levaduras es el uso completo de la biomasa, ya sea de origen panadero o residual de cerveza. Los puntos débiles son compartidos, en general, por las películas de polímeros naturales que son muy afines al agua, lo que las hace poco recomendables para aplicaciones que requieran exposición a atmósferas muy húmedas o muy secas, debido a que la fluctuación en la humedad ambiente altera rápidamente el contenido de agua en las películas y puede provocar la ruptura de las mismas.

El glicerol fue un plastificante adecuado para las películas de biomasa de levadura. Incrementó la deformación a ruptura y disminuyó el módulo elástico y la resistencia a la tracción. Por otra parte, incrementó la hidratación de las películas y la permeabilidad al vapor de agua. La elección del contenido de plastificante a incorporar comprendió un compromiso entre las diferentes características. En las películas con levadura panadera se seleccionó 25% de glicerol, mientras que en las preparadas con levadura residual fue necesario un contenido de glicerol menor (15%) debido al aporte de compuestos de bajo peso molecular acompañantes en el residuo.

En referencia al comportamiento como barrera al vapor de agua, el trabajo aportó evidencia acerca de la dependencia del coeficiente de permeabilidad con el espesor de la película y de la falta de relación del método de la norma ASTM-

E96 con este fenómeno, ya que el mismo efecto fue observado también a través de la determinación indirecta del coeficiente de permeabilidad. Se observó una excelente correspondencia entre el producto del coeficiente de difusión inicial y la solubilidad del vapor de agua en la película con el coeficiente de permeabilidad experimental. Efectivamente el efecto no ideal está relacionado con la fuerte interacción entre la película y el vapor de agua y no con la forma de medición.

El pH 11 de las dispersiones incrementó la deformación a ruptura de las películas, muy por encima de lo que se alcanzó con las preparadas a pH 6. Una combinación de ambas permitió incrementar ligeramente el módulo elástico y la resistencia a la tracción con la máxima deformación a ruptura posible. El pH afectó las interacciones entre las proteínas, como se encontró en el ensayo de solubilidad diferencial del capítulo VI, y al mismo tiempo, rompió los enlaces alcali lábiles de la pared y solubilizó parcialmente los β -glucanos. A partir de los experimentos realizados es posible concluir que estas situaciones tienen efecto en forma conjunta en la deformación a ruptura.

Las películas preparadas con combinaciones de las fracciones soluble e insoluble no tuvieron un mejor desempeño que la biomasa no separada, tanto en su calidad de barreras al vapor de agua, como en los ensayos mecánicos y en la degradación térmica. Cada fracción aporta características diferentes a las películas, que correctamente formuladas, pueden nutrirse de características positivas de ambas. La fracción soluble aportó compuestos de bajo peso molecular que plastificaron el sistema, incrementaron la permeabilidad al vapor de agua y disminuyeron el módulo elástico y la resistencia a la tracción, también aporta proteínas que favorecen la formación de la película. La fracción insoluble aportó compuestos que incrementaron el módulo elástico y la resistencia a la tracción. En cuanto a la deformación a ruptura, la misma se incrementó con la fracción insoluble por la solubilización de β -glucanos a pH 11 (el incremento no fue gradual sino abrupto). De las dos fracciones, la insoluble tuvo el menor grado de hidratación en el equilibrio. A partir de los resultados, se puede concluir que no es necesario separar la biomasa para obtener películas con un comportamiento apropiado.

Cabe destacar que de los dos tipos de nanofibras de celulosa estudiados, de cáscara de arroz y la nanocelulosa bacteriana, solo ésta última mejoró las características mecánicas. La incorporación de nanofibras, en particular la

nanocelulosa bacteriana, produjo un aumento del módulo elástico y de la resistencia a la tracción, sin detrimento de la deformación a ruptura en el rango de concentraciones explorado. El efecto del pH fue superior al efecto positivo que provocó la incorporación de nanocelulosa bacteriana en la deformación a ruptura. La tenacidad a ruptura siguió un comportamiento muy similar al de la deformación a ruptura y en las películas a pH 11, donde el efecto de la BC sobre la deformación a ruptura había quedado opacado por el pH alcalino, también se incrementó de manera gradual y de manera estadísticamente significativa. En muchas películas es habitual que el refuerzo incremente el módulo y la resistencia a la tracción, pero que al mismo tiempo disminuya la deformación a ruptura. Con ambas nanopartículas hubo una ligera disminución del coeficiente de permeabilidad al vapor de agua, excepto a pH 6 y 5% de refuerzo de BC, donde se incrementó ligeramente. Aprovechando el incremento de las tres características mecánicas, podría intentarse la producción a través de la técnica de *tape-casting*, una técnica que permite la producción de películas a mayor escala, para la protección física de alimentos y otros productos. Esta técnica de *tape-casting* permite la producción de una lámina en forma continua, para obtener finalmente un rollo del material. Aunque se trate de una aplicación un poco lejana para los resultados de esta tesis, el rollo de material podría ser bien aplicado en ciertas extensiones, como se requiere en los plásticos para agricultura.

Las películas de levadura pueden incorporar timol como antioxidante para formar un sistema activo. El timol liberado mostró un porcentaje de RSA superior al 80% en las tres temperaturas estudiadas, mostrando la gran actividad del compuesto. No obstante, la liberación del mismo en el medio simulante graso fue demasiado rápida, por lo que se aconseja utilizar una estrategia de multicapas para disminuir la velocidad de liberación del activo y mantener una reserva del mismo en la película a lo largo del tiempo. Las películas pueden ser aplicadas en alimentos grasos, pero no en alimentos de alta humedad debido al colapso de la estructura de las películas.

Los resultados permitieron verificar la hipótesis de trabajo, tanto la levadura panadera como la levadura residual cervecera son fuentes posibles de biopolímeros para la producción de películas. De acuerdo a la aplicación a la que se oriente la película podrían ser necesarias ciertas modificaciones que mejoren

su desempeño. Los datos, ensayos y conclusiones de esta tesis proveen un panorama amplio para la selección de las mejores condiciones.

En la tabla 11.1 se entrega un resumen de aplicaciones potenciales de las películas, sobre la base de los resultados de esta tesis. Algunas de las aplicaciones potenciales requieren de un desarrollo mucho más profundo que las primeras líneas que pueden proporcionar esta tesis. Otras aplicaciones posibles son ideas que permanecen en el colectivo de quienes trabajan en materiales biodegradables en esta época. Por eso, pueden parecer a primera vista más factibles.

Las películas podrían ser aplicadas, por ejemplo, para proteger los cultivos con plásticos de manera tal de limitar la evaporación de la humedad del suelo y mantener cierta temperatura, disminuir el crecimiento de malezas, ordenar los cultivos y obtener cosechas más limpias. La práctica se denomina habitualmente acolchado o *mulching*. Se utiliza polietileno de baja densidad que luego de cumplir su objetivo debe ser recolectado. Anteriormente esta práctica era realizada con hojas secas, pero podría ser realizado con películas cobertoras de origen biodegradable, que luego de cierto tiempo pueden abonar el suelo si es que además son compostables. Al mismo tiempo, podrían integrarse con compuestos no tóxicos que limiten el crecimiento de especies perjudiciales para la planta y faciliten o entreguen ciertos nutrientes para su desarrollo. Dado que el costo de producción y la derivación de potenciales alimentos a otro tipo de aplicaciones podrían ser limitaciones para la aplicación de polímeros naturales, la utilización de residuos de industrias alimentarias podría ser una alternativa más viable.

En la misma línea de la agricultura, no debe perderse de vista que existen prácticas agrícolas antiguas que, renovadas por los desarrollos en el uso racional de la energía, el agua, los espacios, han cobrado vigor en diferentes partes del mundo. Es posible que, de continuar su desarrollo en el futuro, los cultivos hidropónicos necesiten materiales degradables para la entrega de nutrientes, que contribuyan al desarrollo de la planta. Las películas biodegradables podrían ser de gran utilidad también para este fin.

Por otro lado, las películas podrían ser útiles en la protección de alimentos o productos de origen lipídico y su dosificación. En este trabajo se ha probado que las películas pueden incorporar antioxidantes y liberarlos en matrices

hidrofóbicas. Las levaduras han sido bien vistas como encapsulantes naturales de aromas y colorantes en diferentes trabajos de la bibliografía y podrían tener una buena aplicación para ello. De ser necesario puede ajustarse la presión de ruptura a una menor presión para conservar la estructura de saco de la pared celular y disponer también de ella para la protección del activo.

Respecto de su uso en cápsulas, podrían contener productos de baja humedad y/o de alto contenido de lípidos. Si se utilizara para contener probióticos, podrían emplearse como material de cápsula para reemplazar la gelatina, especialmente en aquellos grupos que no aceptan los productos de origen animal. La levadura podría actuar además de cubierta protectora, como alimento de los probióticos, es decir, como prebiótico. Esta aplicación se adecuaría muy bien para compuestos con sabor amargo, no requiriendo en ese caso el desamargado de la levadura antes de la elaboración de la cubierta, pero si se trata de productos sin sabor o de sabor agradable es necesario un proceso de desamargado para cubrir y contribuir en este caso a una mayor aceptación del producto por parte de los consumidores.

Si bien no se trata de envases en sí mismas, otras aplicaciones posibles para las películas comprenden el uso para la liberación de compuestos de aplicación tópica o fármacos de vía oral. Las películas se podrían utilizar en el tratamiento de heridas, aprovechando la característica de los β -glucanos de favorecer la recuperación y regeneración de las heridas. Para la aplicación de estas películas se recomienda utilizar la menor cantidad de plastificante que asegure una buena manipulabilidad de las películas, buena deformación a ruptura y al mismo tiempo, la menor hidratación posible. En orden de cumplir con estas condiciones, podrían aplicarse películas preparadas con la fracción insoluble y explorarse de ser necesaria la modificación del pH de las dispersiones a 11 para ser aplicadas sobre la piel. Por otro lado, las películas de levadura se podrían aplicar para la entrega de fármacos por vía oral en pacientes que no pueden deglutir píldoras, de manera de facilitar la administración. Al igual que en otras aplicaciones, podría ser necesario el desamargado y en este caso, el colapso de la película por hidratación podría ser deseable, por lo que la incorporación de glicerol no sería un problema.

Las películas preparadas por moldeo no tuvieron una gran deformación a ruptura. Aunque los resultados propuestos en este trabajo evidencian la

necesidad de profundizar en la optimización de la obtención de películas por esta vía, podría considerarse la producción de contenedores rígidos, así como también utensilios y vajilla, a través de la combinación con las cáscaras de arroz (en una proporción mayor a la estudiada en este trabajo) para lograr un mayor módulo elástico y una mayor resistencia a la tracción a bajo costo. Existen varios ejemplos de producción de vajilla a partir de polímeros naturales, por ejemplo, en Chile (BioGusto), Alemania (Leaf Republic), Perú (Qapac Runa), Colombia (LifePack), Israel (Jolybar Ecojo), entre otros, así como de material para empacado de productos en general (Ecovative, Estados Unidos). La Agencia Ambiental Noruega publicó un informe en el que realiza una revisión de las aplicaciones actuales de plásticos biodegradables en las que se lista la vajilla para alimentación (Norwegian Environment Agency, 2018). Para estas aplicaciones de corto tiempo podrían ser necesarias modificaciones superficiales de bajo costo que repelan las gotas de agua, como la superhidrofobicidad. El desafío es que esta condición sea alcanzada también con materiales biodegradables.

Las aplicaciones propuestas constituyen un punto de partida para nuevos trabajos. Las aplicaciones comerciales dependen, no solo de la viabilidad técnica de las mismas, sino también de aspectos comerciales y de los contextos sociales. Aun así, son soluciones posibles a diversos problemas presentes en la sociedad con los que se pretende contribuir desde los resultados de esta tesis.

Tabla 11.1 Aplicaciones potenciales de películas de biomasa de levadura

Aplicaciones	Películas posibles	Comentarios	Antecedentes
Cápsulas para contener probióticos: Reemplazo de la gelatina de origen animal y suministro de prebiótico.	Películas HTH de levadura panadera con 20-25% de glicerol. Películas HTH de levadura residual con 15% de glicerol.	El secado de las películas se debe realizar a baja temperatura para evitar la disminución de la viabilidad del probiótico y es necesario analizar que el probiótico esté viable al llegar al intestino. Se debe evitar la exposición a condiciones de alta humedad relativa. El porcentaje de glicerol se puede reducir en las películas de levadura residual cervecera por el contenido de azúcares. En caso de necesitar que la cápsula sea apta para celíacos se debe utilizar levadura panadera. En los países en los que está permitido realizar cerveza con maíz, también podría utilizarse levadura residual, evitando la contaminación cruzada con fuentes TACC.	<i>Kanmani y Lim, 2013.</i> Películas de pululano y almidón con probióticos. <i>Tapia et al., 2007.</i> Películas con alginato y pululano con bifidobacterias.
Cápsulas para aceites de chía, pescado: Reemplazo de la gelatina de origen animal.	Películas HTH con 20-25% de glicerol y 8% de timol. El aceite también podría encontrarse en forma de emulsión en la película.	La actividad RSA% al 8% de timol fue similar a la obtenida al 10% y superior al 90% en condiciones de refrigeración del simulante etanol, por lo que la actividad antioxidante estaría garantizada. Debería estudiarse la reducción del timol para evitar el sabor invasivo del mismo en el producto. Se debe evitar la exposición a condiciones de alta humedad relativa. Se debería analizar también la necesidad de desamargar la levadura para mejorar la aceptabilidad sensorial del producto.	<i>Bao et al. (2009).</i> Películas de gelatina con nanopartículas de quitosano con polifenoles de té.
Películas para envasado de margarinas y mantecas.	Películas HTH con 20-25% de glicerol y 8% de timol.	Al tratarse de un alimento sólido el coeficiente de difusión debería ser más bajo y la velocidad de migración será más lenta. Debería estudiarse la reducción del timol para evitar el sabor invasivo del mismo en el producto y además para cumplir con los límites de migración total del código alimentario. Al mismo tiempo se debe analizar la calidad de barrera a la luz UV y al oxígeno de las películas. Se deberá evitar la exposición a condiciones de alta humedad relativa.	<i>Dyshlyuk et al., (2018),</i> Patente. Aplicación de una película biodegradable para la protección de manteca.
Películas para tratamiento de heridas	Películas con fracción insoluble 25% de glicerol (analizar si es necesaria la aplicación pH 11).	Se aprovecha la característica de los β -glucanos de favorecer la recuperación de la piel y se elimina fracción soluble para disminuir la hidratación (Se debe profundizar en estudios que certifiquen esta capacidad). Podrían incorporarse agentes activos que contribuyan a la recuperación de las heridas.	<i>Kofuji et al. (2010).</i> Películas de complejo β -glucano – quitosano para la recuperación de heridas en animales.

Aplicaciones	Películas posibles	Comentarios	Antecedentes
Películas para siembra y protección de cultivos.	Películas HTH con 20-25% de glicerol (pH 11) y 5% de Nanocelulosa Bacteriana.	Dado que la aplicación en la tierra mediante una máquina somete a la película a esfuerzos de tracción, se recomienda la formulación con mayor módulo, resistencia a la tracción y deformación a ruptura. Se deberían profundizar los ensayos de desintegración en tierra y compostabilidad de las películas.	Ma et al. (2016). Películas a partir de residuos de fermentación del ácido cítrico.
Envases rígidos: contenedores y vajilla descartable.	Películas moldeadas por compresión con 15% de glicerol (reforzar con fibras o cáscaras muy por encima de los valores usados en esta tesis para incrementar el módulo elástico y la resistencia a la tracción).	Dado que la aplicación no requiere de gran deformación a ruptura y requiere de gran resistencia y módulo se recomienda la preparación a través de moldeo por compresión, pero incorporando carga en mayores niveles que esta tesis (cáscaras de arroz micronizadas, por ejemplo). Se deben profundizar los estudios en esta línea. El porcentaje de glicerol podría reducirse de acuerdo a los resultados de estos estudios.	BioGusto (Chile). LifePack (Colombia).
Envases rígidos: cajas para productos congelados.	Películas moldeadas por compresión con 15% de glicerol (reforzar con fibras o cáscaras muy por encima de los valores usados en esta tesis para incrementar el módulo elástico y la resistencia a la tracción).	Al igual que en la aplicación anterior se recomienda la preparación a través de moldeo por compresión, pero incorporando carga en mayores niveles que esta tesis (cáscaras de arroz micronizadas, por ejemplo). Dado que la exposición al agua podría debilitar la estructura, pero la misma es por corto tiempo hasta la congelación, se podría profundizar en la superhidrofobización de la superficie.	Ecovative (Estados Unidos)
Dosificación de productos.	Películas HTH con 20-25% de glicerol.	Se debe analizar la biodisponibilidad del compuesto a entregar por vía oral. Es posible que sea necesario el desamargado para mejorar la aceptabilidad sensorial.	Takeuchi et al. (2013). Películas para dosificación oral con hidroxipropilmetilcelulosa con acetaminofeno (paracetamol).

Referencias bibliográficas

Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Medicale*, 24(2), e51-e56.

Afonso, C. R., Hirano, R. S., Gaspar, A. L., Chagas, E. G. L., Carvalho, R. A., Silva, F. V., & Yoshida, C. M. P. (2019). Biodegradable antioxidant chitosan films useful as an anti-aging skin mask. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 1262-1273.

Alfrey, T., Gurnee, E. F., & Lloyd, W. G. (1966). Diffusion in glassy polymers. In *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* (Vol. 12, No. 1, pp. 249-261). New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

Ali, E., Sultana, S., Hamid, S. B. A., Hossain, M., Yehya, W. A., Kader, A., & Bhargava, S. K. (2018). Gelatin controversies in food, pharmaceuticals, and personal care products: Authentication methods, current status, and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(9), 1495-1511.

Altioğlu D., Altioğlu E., & Tihminlioglu F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21, 2227–36.

Anastas, P., & Zimmerman, J., (2003). Peer reviewed: design through the 12 principles of green engineering. *Environmental Science & Technology*, 37, 94A - 101A.

Anastas, P., & Zimmerman, J. (2007). Design through the 12 principles of green engineering. *IEEE Engineering Management Review*, 3(35), 16.

Anker, M., Stading, M., & Hermansson, A. M. (1999). Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents, and glass transition temperatures of whey protein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 1878-1886. <https://doi.org/10.1021/jf981115d>

Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., Garrigós, M. C., & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002>

Arvanitoyannis, I., Kotsanopoulos, K., (2014). Migration phenomenon in food packaging. Food–package interactions, mechanisms, types of migrants, testing and relative legislation—a review. *Food Bioprocess Technology*. 7 (1), 21–36.

Ashby M. & Jones, D. (2012). *The physical basis of Young's modulus*. En: Engineering Materials I: An Introduction to Properties, Applications, and Design (pp. 83-93). Waltham, MA, USA: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64288-4>

Ashter, S. A. (2016). *Introduction to Bioplastics Engineering*. William Andrew. Oxford.

ASTM (2016). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Standard designation E96M-16. In Annual book of ASTM standards. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials. https://doi.org/10.1520/E0096_E0096M-16

ASTM (2018). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designation D 882-18. In Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. <https://doi.org/10.1520/D0882-18>

Ayazi-Shamlou, P., Siddiqi, S. F., & Titchener-Hooker, N. J. (1995). A physical model of high-pressure disruption of bakers' yeast cells. *Chemical Engineering Science*, 50(9), 1383-1391.

Azeredo, H. M., Mattoso, L. H. C., Wood, D., Williams, T. G., Avena-Bustillos, R. J., & McHugh, T. H. (2009). Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *Journal of food science*, 74(5), N31-N35.

Badanai, J., Silva, C., Martins, D., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2015). Ability of scavenging free radicals and preventing lipid peroxidation of some phenols and ascorbic acid. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(8), 34-41.

Balaguer, M. P., Cerisuelo, J. P., Gavara, R., & Hernandez-Muñoz, P. (2013). Mass transport properties of gliadin films: Effect of cross-linking degree, relative humidity, and temperature. *Journal of Membrane Science*, 428, 380-392.

Banker, G. S. (1966). Film coating theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(1), 81-89.

Bao, S., Xu, S., & Wang, Z. (2009). Antioxidant activity and properties of gelatin films incorporated with tea polyphenol-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(15), 2692-2700.

Barreto, P. L. M., Pires, A. T. N., & Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*. [http://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00267-7](http://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00267-7)

Barriga, J. A., Cooper, D. G., Idziak, E. S., & Cameron, D. R. (1999). Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1-2), 96-102.

Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(9), 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>

Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S. S., & Powers, J. (2010). Release kinetics of nisin from biodegradable poly (butylene adipate-co-terephthalate) films into water. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 93-101.

Bastos, D. C., Santos, A. E., da Silva, M. L., & Simão, R. A. (2009). Hydrophobic corn starch thermoplastic films produced by plasma treatment. *Ultramicroscopy*, 109(8), 1089-1093.

Bello, S. (2014, abril 20). Why Sustainability Matters to a CFO. The Economist. Disponible en: <https://eiuperspectives.economist.com/sustainability/why-sustainability-matters-cfo>.

- Belyamani, I., Prochazka, F., & Assezat, G. (2014). Production and characterization of sodium caseinate edible films made by blown-film extrusion. *Journal of Food Engineering*, 121, 39–47. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.019>
- Bendahou, A., Kaddami, H., & Dufresne, A. (2010). Investigation on the effect of cellulosic nanoparticles' morphology on the properties of natural rubber based nanocomposites. *European Polymer Journal*, 46(4), 609-620.
- Berterame, N. M., Porro, D., Ami, D., & Branduardi, P. (2016). Protein aggregation and membrane lipid modifications under lactic acid stress in wild type and OPI1 deleted *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microbial cell factories*, 15(1), 39.
- Bertuzzi, M. A., Castro Vidaurre, E. F., Armada, M. & Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch-based films. *Journal of Food Engineering*, 80, 972–978.
- Bhunja, K., Sablani, S. S., Tang, J., & Rasco, B. (2013). Migration of chemical compounds from packaging polymers during microwave, conventional heat treatment, and storage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 523-545.
- Boholm, M., & Arvidsson, R. (2016). A definition framework for the terms nanomaterial and nanoparticle. *NanoEthics*, 10(1), 25-40.
- Borchani, C., Fonteyn, F., Jamin, G., Paquot, M., Blecker, C., & Thonart, P. (2014). Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). *Food Chemistry*, 163, 108-113.
- Bosquez-Molina, E., Tomás, S. A., & Rodríguez-Huezo, M. E. (2010). Influence of CaCl₂ on the water vapor permeability and the surface morphology of mesquite gum based edible films. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1419-1425.
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16(1), 1-9.
- Brindle, L. P., & Krochta, J. M. (2008). Physical properties of whey protein–hydroxypropylmethylcellulose blend edible films. *Journal of Food Science*, 73(9), E446-E454.
- Brookman, J. S. G. (1974). Mechanism of cell disintegration in a high pressure homogenizer. *Biotechnology and Bioengineering*, 16,371–383.
- Browning, B. L. (1967). *Methods of Wood Chemistry*. Vol. II, Cap. 19 II, B-Método 3b. Wiley, Nueva York.
- Burattini, E., Cavagna, M., Dell'Anna, R., Campeggi, F. M., Monti, F., Rossi, F., & Torriani, S. (2008). A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vibrational Spectroscopy*, 47(2), 139-147.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

- Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Kawarska, A., Stasiak-Róžańska, L., Gientka, I., & Majewska, E. (2014). Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β -glucan isolation. *Molecules*, 19(12), 20941-20961.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833-848.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184.
- Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2019). Protein-based films: Advances in the development of biomaterials applicable to food packaging. *Food Engineering Reviews*, 11(2), 78-92.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875.
- Canellas, E., Aznar, M., Nerín, C., & Mercea, P. (2010). Partition and diffusion of volatile compounds from acrylic adhesives used for food packaging multilayers manufacturing. *Journal of Materials Chemistry*, 20(24), 5100-5109.
- Caner, C., Vergano, P. J., & Wiles, J. L. (1998). Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science*, 63(6), 1049-1053.
- Cao, N., Fu, Y., & He, J. (2007). Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 575-584. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.001>
- Cao, N., Yang, X., Fu, Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*. 23, 729-735.
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(3-4), 417-422.
- Cazon, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- Cerretani, L., & Bendini, A. (2010). Rapid assays to evaluate the antioxidant capacity of phenols in virgin olive oil. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 625-635). Academic Press.
- Cerrutti, P., Roldán, P., García, R. M., Galvagno, M. A., Vázquez, A., & Foresti, M. L. (2016). Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(14).
- Chambi, H., & Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39(4), 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.009>

Chan, G. C., Chan, W. K. & Sze, D. M. (2009). The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2(25), 1-11.

Chan, Y. H. M., & Marshall, W. F. (2014). Organelle size scaling of the budding yeast vacuole is tuned by membrane trafficking rates. *Biophysical Journal*, 106(9), 1986-1996.

Chaudhari, R. D., Stenson, J. D., Overton, T. W., & Thomas, C. R. (2012). Effect of bud scars on the mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Chemical Engineering Science*, 84, 188-196.

Chaudhary, D. S., Adhikari, B. P., & Kasapis, S. (2011). Glass-transition behaviour of plasticized starch biopolymer system—A modified Gordon–Taylor approach. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 114-121.

Chinga-Carrasco, G. (2011). Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: the morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. *Nanoscale Research Letters*, 6(1), 417.

Chinnan, M. S., & Park, H. J. (1995). Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. *Journal of Food Process Engineering*, 18(4), 417–429. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4530.1995.tb00375.x>

Chinthapalli, R., Skoczinski, P., Carus, M., Baltus, W., de Guzman, D., Käß, H., Raschka, A., & Ravenstijn, J. (2019). Biobased Building Blocks and Polymers—Global Capacities, Production and Trends, 2018–2023. Michael Carus, *nova-Institut GmbH*, Hürth, Germany. pp. 1-16.

Chung, D., Papadakis, S. E., & Yam, K. L. (2001). Release of propyl paraben from a polymer coating into water and food simulating solvents for antimicrobial packaging applications. *Journal of Food Processing and Preservation*, 25(1), 71-87.

Chung, D., Papadakis, S. E., & Yam, K. L. (2002). Simple models for assessing migration from food-packaging films. *Food Additives & Contaminants*, 19(6), 611-617.

Ciannamea, E. M., Stefani, P. M., & Ruseckaite, R. A. (2014). Physical and mechanical properties of compression molded and solution casting soybean protein concentrate based films. *Food Hydrocolloids*, 38, 193-204. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.013>

Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 1162-1169.

Coughlan, K., Shaw, N. B., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2004). Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *Journal of Food Science*, 69(6), E271-E275.

Coupland, J. N., Shaw, N. B., Monahan, F. J., Dolores O’Riordan, E., & O’Sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43(1), 25–30. [http://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00129-6](http://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00129-6)

Cran, M. J., Rupika, L. A., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2010). Release of naturally derived antimicrobial agents from LDPE films. *Journal of Food Science*, 75(2), 126-133.

- Crank, J. (1975). The mathematics of diffusion. Oxford Clarendon Press: Oxford.
- Cunningham, P., Ogale, A. A., Dawson, P. L., & Acton, J. C. (2000). Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *Journal of Food Science*, 65(4), 668-671.
- Cuq, B.; Gontard, N.; Aymard, C.; Guilbert, S. (1997a) Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. *Polymer Gels and Networks*, 5, 1-15.
- Cuq, B.; Gontard, N.; Cuq, J. -L.; Guilbert, S. (1997b). Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films as Affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, 622-626.
- Currie, J. A., Dunnill, P., & Lilly, M. D. (1972). Release of protein from Bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial agitator mill. *Biotechnology and Bioengineering*, 14, 725–736
- Davoodi, M., Kavoosi, G., & Shakeri, R. (2017). Preparation and characterization of potato starch-thymol dispersion and film as potential antioxidant and antibacterial materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 173-179.
- De Albuquerque, M. D., Bastos, D. C., & Simão, R. A. (2014). Surface modification of starch films by plasma. In *Macromolecular Symposia* 343:1, 96-101.
- De Graaf, R. A., Karman, A. P., & Janssen, L. P. (2003). Material properties and glass transition temperatures of different thermoplastic starches after extrusion processing. *Starch-Stärke*, 55(2), 80-86.
- De Moraes, J. O., Scheibe, A. S., Sereno, A., & Laurindo, J. B. (2013). Scale-up of the production of cassava starch-based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 800-808. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.009>
- Debeaufort, F.; Voilley, A.; Meares, P. (1994). Water vapor permeability and diffusivity through methylcellulose edible films. *Journal of Membrane Science*, 91, 125-133.
- Del Nobile, M. A., Conte, A., Incoronato, A. L., & Panza, O. (2008). Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 57-63.
- Delgado, J. F., Sceni, P., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2016). Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 83–91. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.002>
- Deters, D., Müller, U., & Homberger, H. (1976). Breakage of yeast cells: Large scale isolation of yeast mitochondria with a continuous-flow disintegrator. *Analytical Biochemistry*, 70, 263–267
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 31(11), 2327-2335.

- Di Gioia, L., & Guilbert, S. (1999). Corn protein-based thermoplastic resins: effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1254-1261.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2018). InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Domenek, S., Feuilloley, P., Gratraud, J., Morel, M. H., & Guilbert, S. (2004). Biodegradability of wheat gluten based bioplastics. *Chemosphere*, 54(4), 551-559.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 50-356.
- Dufresne, A. (2017). Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 29, 1-8.
- Dufresne, A., & Castaño, J. (2017). Polysaccharide nanomaterial reinforced starch nanocomposites: A review. *Starch-Stärke*, 69(1-2), 1500307.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- Dyshlyuk, S., Dolganyuk, V. F., Asyakina, L. K., & Prosekov, A. Y. (2018). Composition for producing biodegradable polymer film based on natural materials. Rusia. Patente N°2693776. Servicio Federal para la Propiedad Intelectual (Rusia).
- Eim, V. S., Rosselló, C., Femenia, A. & Simal, S. (2011). Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of carrot. *International Journal of Food Engineering*, 7(3), 1-18.
- Eichhorn, S. J., Dufresne, A., Aranguren, M. M., Capadona, J. R., Rowan, S. J., Weder, C., & Veigel, S. (2010). Review: current international research into cellulose nanofibres and composites. *Journal of Materials Science*, 45, 1-33.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841.
- Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. *Journal of Functional Foods*, 18, 811-819.
- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). Edible films and coatings for food applications (Vol. 9). New York, NY, USA: Springer.
- Esa, F., Tasirin, S. M., & Rahman, N. A. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119.
- Espitia, P. J. P., Du, W. X., de Jesús Avena-Bustillos, R., Soares, N. D. F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties-A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287-296.
- European Bioplastics (2018). Global Production Capacities of Bioplastics 2018–2023. Report. European Bioplastics. Available online: <https://www.european-bioplastics.org/wp->

[content/uploads/2016/02/Report_Bioplastics-Market-Data_2018.pdf/](content/uploads/2016/02/Report_Bioplastics-Market-Data_2018.pdf/) (Último acceso 27 de Octubre de 2018).

Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 676-683. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.04.015>

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2018). Seguimiento del Mercado del arroz para 2018. Ed. XXI, vol. 1, abril de 2018. Disponible a octubre de 2019: <http://www.fao.org/3/I9243ES/i9243es.pdf>

Favier, V., Canova, G. R., Cavaillé, J. Y., Chanzy, H., Dufresne, A., & Gauthier, C. (1995). Nanocomposite materials from latex and cellulose whiskers. *Polymers for Advanced Technologies*, 6(5), 351-355.

Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry*. Tercera edición. New York: Marcel Decker, vol. 1.

Fernandes, S. C., Freire, C. S., Silvestre, A. J., Neto, C. P., Gandini, A., Berglund, L. A., & Salmén, L. (2010). Transparent chitosan films reinforced with a high content of nanofibrillated cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 394-401.

Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Tavarela, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeasts biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2), 77-84.

Firpo, G.; Angeli, E.; Repetto, L.; Valbusa, U. (2015). Permeability thickness dependence of polydimethylsiloxane (PDMS) membranes. *Journal of Membrane Science*, 481, 1-8.

Fleet, G. H., & Manners, D. J. (1976). Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 94(1), 180-192.

Flores, S., Conte, A., Campos, C., Gerschenson, L., & Del Nobile, M. (2007). Mass transport properties of tapioca-based active edible films. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 580-586.

Fortunati, E., Rinaldi, S., Peltzer, M., Bloise, N., Visai, L., Armentano, I., Jimenez, A., Latterini, L. & Kenny, J. M. (2014). Nano-biocomposite films with modified cellulose nanocrystals and synthesized silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 101, 1122-1133.

Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O. & Dutler, H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1, 3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 159-171.

Friedman, M., Gumbmann, M. R., & Masters, P. M. (1984). Protein-alkali reactions: chemistry, toxicology, and nutritional consequences. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety* (pp. 367-412). Springer, Boston, MA.

Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, & Manfait, A. (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), 179–86. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10601.x>

- Gao, C., Stading, M., Wellner, N., Parker, M. L., Noel, T. R., Mills, E. C., & Belton, P. S. (2006). Plasticization of a protein-based film by glycerol: a spectroscopic, mechanical, and thermal study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4611-4616.
- García, D. P., Caraschi, J. C., & Ventrone, G. (2016). Decomposição térmica de pellets de madeira por TGA. *Holos*, 1, 327-339.
- García-García, G., Stone, J., & Rahimifard, S. (2019). Opportunities for waste valorisation in the food industry—A case study with four UK food manufacturers. *Journal of Cleaner Production*, 211, 1339-1356.
- Garrido, T., Leceta, I., Cabeza, S., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2016). Tailoring soy protein film properties by selecting casting or compression as processing methods. *European Polymer Journal*, 85, 499-507.
- Gemili, S., Yemencioğlu, A., & Altinkaya, S. A. (2010). Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 325-332.
- Gennadios, A., Weller, C., & Testin, R. (1993) Modification of Physical and Barrier Properties of Edible Wheat Gluten-Based Films. *Cereal Chemistry*, 70(4), 426-429.
- Gennadios, A.; Brandenburg, A. H.; Park, J. W.; Weller, C. L.; Testin, R. F. (1994b). Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. *Industrial Crops and Products*, 2, 189-195.
- Gennadios, A.; Weller, C. L.; Gooding, C. H. (1994a) Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.
- GMC/MERCOSUR (1996). Res. 40/96 Reglamento técnico Mercosur sobre disposiciones para envases, revestimientos, utensilios, tapas y equipamientos metálicos en contacto con alimentos. Buenos Aires, Argentina.
- GMC/MERCOSUR (2010). Res. 32/10 Reglamento técnico Mercosur sobre migración en materiales, envases y equipamientos plásticos destinados a estar en contacto con alimentos. Buenos Aires, Argentina.
- Gómez-Cívicos, J. I. (2008). Ingeniería Verde: Doce principios para la sostenibilidad. *Ingeniería Química*, (458), 168-175.
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 35(1), 42-51.
- Gontard, N. (1991). Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten. 174 f. Thèse (Docteur en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire – Science des Aliments) – Université Montpellier.

Gontard, N., & Ring, S. (1996). Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3474-3478.

Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J. L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190-195.

González, A., Barrera, G. N., Galimberti, P. I., Ribotta, P. D., & Igarzabal, C. I. A. (2019a). Development of edible films prepared by soy protein and the galactomannan fraction extracted from *Gleditsia triacanthos* (Fabaceae) seed. *Food Hydrocolloids*, 105227.

González, A., Gastelú, G., Barrera, G. N., Ribotta, P. D., & Igarzabal, C. I. Á. (2019b). Preparation and characterization of soy protein films reinforced with cellulose nanofibers obtained from soybean by-products. *Food Hydrocolloids*, 89, 758-764.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751-766.

Gouveia, T. I., Biernacki, K., Castro, M. C., Gonçalves, M. P., & Souza, H. K. (2019). A new approach to develop biodegradable films based on thermoplastic pectin. *Food Hydrocolloids*, 105175.

Guerrero, P., & de la Caba, K. (2010). Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 261-269. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.008>

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(1), 145–151. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.039>

Guerrero, P., Stefani, P. M., Ruseckaite, R. A., & de la Caba, K. (2011). Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 65-72.

Guggenheim, E. A. (1966). Applications of statistical mechanics. Oxford: Claredon Press, pp.186–206.

Gurram, R., Souza Filho, P. F., Taherzadeh, M. J., & Zamani, A. (2018). A solvent-free approach for production of films from pectin and fungal biomass. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(11), 4282-4292.

Gutiérrez, J., Bourke, P., Lonchamp, J., & Barry-Ryan, C. (2009). Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 195-202.

Hamaguchi, P. Y., WuYin, W., & Tanaka, M. (2007). Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of Blue marlin (*Makaira mazara*). *Food Chemistry*, 100(3), 914-920.

- Han, J. H. (2014). Edible films and coatings: a review. In *Innovations in Food Packaging* (pp. 213-255). Academic Press.
- Hauser, P. M.; McLaren, A. D. (1948). Permeation through and Sorption of Water Vapor by High Polymers. *Industrial & Engineering Chemistry*, 40, 112-117.
- Heim, A., Kamionowska, U., & Solecki, M. (2007). The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 121-128.
- Hernández-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation—a review. *Journal of Food Science*, 73(2), R30-R39.
- Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, T.M., (2013). Characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon barks, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science & Technology*, 51, 86–93.
- Hu, V. Topolaraev, A. Hiltner, E. Baer, (2001). Measurement of water vapor transmission rate in highly permeable films. *Journal Applied Polymer Science*. 81, 1624-1633.
- Huang, C. C., Wang, H. F., Chen, C. H., Chen, Y. J., & Yih, K. H. (2011). A study of four antioxidant activities and major chemical component analyses of twenty-five commonly used essential oils. *Journal of Cosmetic Science*, 62(4), 393-404.
- Hwang, S. T., & Kammermeyer, K. Effect of Thickness on Permeability. In *Permeability of Plastic Films and Coatings*; Hopfenberg, H. B. Ed.; Springer: US, Boston, MA, 1974; pp 197-205.
- Ioelovich, M. (2008). Cellulose as a nanostructured polymer: a short review. *BioResources*, 3(4), 1403-1418.
- Jara, F. L., & Pilosof, A. M. (2009). Glass transition temperature of protein/polysaccharide co-dried mixtures as affected by the extent and morphology of phase separation. *Thermochimica Acta*, 487(1), 65-73.
- Jasse, B.; Seuvre, A. M.; Mathlouthi, M. (1994). Permeability and structure in polymeric packaging materials. In *Food Packaging and Preservation*; Mathlouthi, M. Ed.; Springer: US, Boston, MA; pp 1-22.
- Jeevahan, J., & Chandrasekaran, M. (2019). Nanoedible films for food packaging: a review. *Journal of Materials Science*, 1-29.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2058-2076.
- Johar, N., Ahmad, I., & Dufresne, A. (2012). Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 93-99.
- Jones, D. R., & Ashby, M. F. (2005). *Engineering materials 2: an introduction to microstructures, processing and design*. Elsevier.
- Jurado, P., Mutuberría, J. F., Oliver, N., Charadia, R., Brül, S. P., & García, M. C. (2003). Diseño de un proceso de aprovechamiento integral de residuos agroindustriales. En: Jornadas SAM/CONAMET (pp. 1-4).

- Kalita, E., Nath, B. K., Deb, P., Agan, F., Islam, M. R., & Saikia, K. (2015). High quality fluorescent cellulose nanofibers from endemic rice husk: isolation and characterization. *Carbohydrate polymers*, 122, 308-313.
- Kanmani, P., & Lim, S. T. (2013). Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food Chemistry*, 141(2), 1041-1049.
- Karande, V. S., Bharimalla, A. K., Hadge, G. B., Mhaske, S. T., & Vigneshwaran, N. (2011). Nanofibrillation of cotton fibers by disc refiner and its characterization. *Fibers and Polymers*, 12(3), 399.
- Karbowiak, T.; Hervet, H.; Léger, L.; Champion, D.; Debeaufort, F.; Voilley, A. (2006). Effect of Plasticizers (Water and Glycerol) on the Diffusion of a Small Molecule in Iota-Carrageenan Biopolymer Films for Edible Coating Application. *Biomacromolecules*, 7, 2011-2019.
- Kargarzadeh, H., Johar, N., & Ahmad, I. (2017). Starch biocomposite film reinforced by multiscale rice husk fiber. *Composites Science and Technology*, 151, 147-155.
- Karimi, M. (2011). Diffusion in Polymer Solids and Solutions. En: Mass Transfer in Chemical Engineering Processes; Markoš, J., Ed.; InTech, 17-40.
- Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z. G., & Mavragani-Tsipidou, P. (1998). Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1111-1115.
- Kasai, T., & Eguchi, T. (2009). *U.S. Patent No. 7,541,037*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kasai, T., Eguchi, T., Ishiwaki, N., Kaneshige, J., Ozeki, T. & Yuasa, H. (2000). Application of acid-treated yeast cell wall (AYC) as a pharmaceutical additive, I: AYC as a novel coating material. *International Journal of Pharmaceutics*, 204:53–59.
- Kasarda, D. D., & Black, D. R. (1968). Thermal degradation of proteins studied by mass spectrometry. *Biopolymers*, 6(7), 1001-1004.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4), 550-557.
- Kavoosi, G., Dadfar, S. M. M., & Purford, A. M. (2013). Mechanical, physical, antioxidant, and antimicrobial properties of gelatin films incorporated with thymol for potential use as nano wound dressing. *Journal of Food Science*, 78(2), E244-E250.
- Keshavaz-Moore, E. K., Hoare, M., & Dunnill, P. (1990). Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanism. *Enzyme and Microbial Technology*, 12(10), 764-770.
- Kester, J. & Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: A review, *Food Technology*, 40 47–59.
- Kester, J.; Fennema, O. (1989). An edible film of lipids and cellulose ethers: barrier properties to moisture vapor transmission and structural evaluation. *Journal of Food Science*. 54, 1383-1389.

Kim D., Lee CY. (2004) Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:4, 253-273

Kinsella, J. E. (1986). Functional properties from yeast nucleoprotein for uses. Methods for isolation. In: Knorr D (Ed.), *Food Biochemistry*, New York: Marcel Dekker, pp. 363-391.

Kirin Beer Kabushiki Kaisha (2002). Film coating material. WO2002/072722.

Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185-202.

Koelsch, C. (1994). Edible water vapor barriers: properties and promise. *Trends in Food Science & Technology*, 5(3), 76-81.

Koester, S.; Roghmans, F.; Wessling, M. (2015). Water vapor permeance: The interplay of feed and permeate activity. *Journal of Membrane Science*, 485, 69-78.

Kofuji, K., Huang, Y., Tsubaki, K., Kokido, F., Nishikawa, K., Isobe, T., & Murata, Y. (2010). Preparation and evaluation of a novel wound dressing sheet comprised of β -glucan–chitosan complex. *Reactive and Functional Polymers*, 70(10), 784-789.

Kokoszka, S., Debeaufort, F., Hambleton, A., Lenart, A., & Voilley, A. (2010). Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 503-510.

Korsmeyer, R. W.; Peppas, N. A. (1981). Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water-soluble drugs. *Journal of Membrane Science*, 9, 211-227.

Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Kookos, I. K., Papanikolaou, S., Kwan, T. S., & Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587-2627.

Kozlowski, L. P. (2016). Proteome-pl: proteome isoelectric point database. *Nucleic acids research*, 45(D1), D1112-D1116. Base disponible en: <http://isoelectricpointdb.org/>

Krauskopf, L. G., & Godwin, A. (2005). En PVC Handbook; Wilkes, C. E., Summers, JW, Daniels, CA, Eds. Carl Hanser: Munich.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., & Chaudhry, Q. (2010). A complementary definition of nanomaterial. *Nano today*, 5(3), 165-168.

Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373–386. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.003>

Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2013). Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 432-438.

Kwiatkowski, S., & Kwiatkowski, S. E. (2012). Capítulo 2: Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) glucan polysaccharides-occurrence, separation and application in food, feed and health industries. En: *The Complex World of Polysaccharides*, IntechOpen, 47-70.

Larotonda, F. D. S.; Matsui, K. N.; Sobral, P. J. A.; Laurindo, J. B. (2005). Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. *Journal of Food Engineering*. 71, 394-402.

Lenth, R. V. (2009). Response-Surface Methods in R, Using rsm. *Journal of Statistical Software*, 32(7), 1-17. URL <http://www.jstatsoft.org/v32/i07/>.

Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 317-343.

Levine, H. & Slade, L. (1988). Water as plasticizer: physic-chemical aspects of low moisture polymeric system. In: Felix Frank (Ed). *Water Science Reviews*, Vol 3. Cambridge University Press, pp. 79-185.

Li, M., Zhang, F., Liu, Z., Guo, X., Wu, Q., & Qiao, L. (2018). Controlled Release System by Active Gelatin Film Incorporated with β -Cyclodextrin-Thymol Inclusion Complexes. *Food and Bioprocess Technology*, 11(9), 1-8.

Lieberman, E. R., & Gilbert, S. G. (1973). Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture, and plasticizer content. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, 41(1), 33-43. <http://doi.org/10.1002/polc.5070410106>

Liu, D., Ding, L., Sun, J., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 181-192.

Liu, D., Zeng, X. A., Sun, D. W., & Han, Z. (2013). Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 132-137.

Liu, L., Liu, L., Liu, C. K., Fishman, M. L., & Hicks, K. B. (2007). Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2349-2355.

López, O., García, M. A., Villar, M. A., Gentili, A., Rodríguez, M. S., & Albertengo, L. (2014). Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 106-115

Lourdin, D., Coignard, L., Bizot, H., & Colonna, P. (1997). Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymer*, 38(21), 5401-5406.

Loviso, C. L., & Libkind, D. (2018). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: Esters. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436-44.

Ma, Z., Ma, Y., Qin, L., Liu, J., & Su, H. (2016). Preparation and characteristics of biodegradable mulching films based on fermentation industry wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 111, 54-61.

Malho, J. M (2015). Bioinspired materials. Dissertation Thesis. VTT Science 81, Finlandia

Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2004). Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 129–135. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.01.004>

Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2006). Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 75(4), 453–460. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.04.031>

Mansaray, K. G., & Ghaly, A. E. (1998). Thermal degradation of rice husks in nitrogen atmosphere. *Bioresource Technology*, 65(1-2), 13-20.

Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R., & Peralta, E. (2011). Release of [alpha]-Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 508-517.

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414.

Marin, D. C., Vecchio, A., Ludueña, L. N., Fasce, D., Alvarez, V. A., & Stefani, P. M. (2015). Revalorization of rice husk waste as a source of cellulose and silica. *Fibers and Polymers*, 16(2), 285-293.

Martoia, F., Dumont, P. J. J., Orgéas, L., Belgacem, M. N., & Putaux, J. L. (2016). Micro-mechanics of electrostatically stabilized suspensions of cellulose nanofibrils under steady state shear flow. *Soft Matter*, 12(6), 1721-1735.

Mastelic, J., Jerkovic, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivancić-Baće, I., Smrečki, V., Žarković, N., Brčić-Kostić, K., Vikić-Topić, D., & Müller, N. (2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 3989-3996.

Mastromatteo, M., Barbuzzi, G., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2009). Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 222-227.

Mauri, A. N., & Añón, M. C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1064-1072. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2457>

Mayer, J. M., & Elion, G. R. (1994). *U.S. Patent No. 5,288,318*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Maynard, A. D. (2011). Don't define nanomaterials. *Nature*, 475(7354), 31.

McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R.; Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *Journal of Food Science*, 58, 899-903.

McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(3), 307–312. <http://doi.org/10.1007/BF02638058>

Mehyar, G. F., & Han, J. H. (2004). Physical and mechanical properties of high-amylose rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. *Journal of Food Science*, 69(9), E449-E454.

Mendes, J. F., Paschoalin, R. T., Carmona, V. B., Neto, A. R. S., Marques, A. C. P., Marconcini, J. M., Mattoso L.H.C., Medeiros, E.S., & Oliveira, J. E. (2016). Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. *Carbohydrate Polymers*, 137, 452-458.

Mihindukulasuriya, S. D. F., & Lim, L. T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 40(2), 149-167.

Mokrzycki, W. S., & Tatol, M. (2011). Colour difference ΔE - A survey. *Machine Graphics and Vision*, 20(4), 383-411.

Molyneux, P. (2001). "Transition-site" model for the permeation of gases and vapors through compact films of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 79, 981-1024.

Montoya, Ú., Zuluaga, R., Castro, C., Vélez, L., & Gañán, P. (2019). Starch and Starch/Bacterial Nanocellulose Films as Alternatives for the Management of Minimally Processed Mangoes. *Starch-Stärke*, 71(5-6), 1800120.

Moreira de Melo, K., dos Santos, T. F., da Silva Santos, C. M., da Fonseca, R. T., de Lucena, N. D., de Medeiros, J. I., & de Aquino, M. S. (2019). Study of the reuse potential of the sisal fibers powder as a particulate material in polymer composites. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(5), 4019-4025.

Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271-282.

Mukhopadhyay, A. K. (2004). *Industrial chemical cresols and downstream derivatives*. Nueva York, CRC Press.

Müller, C. M. O.; Yamashita, F.; Laurindo, J. B. (2008). Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, 72, 82-87.

- Murrieta-Martínez, C. L., Soto-Valdez, H., Pacheco-Aguilar, R., Torres-Arreola, W., Rodríguez-Felix, F., & Márquez Ríos, E. (2018). Edible protein films: Sources and behavior. *Packaging Technology and Science*, 31(3), 113-122.
- Musso, Y. S., Salgado, P. R., & Mauri, A. N. (2016). Gelatin based films capable of modifying its color against environmental pH changes. *Food Hydrocolloids*, 61, 523-530.
- Nascimento, P., Marim, R., Carvalho, G., & Mali, S. (2016). Nanocellulose produced from rice hulls and its effect on the properties of biodegradable starch films. *Materials Research*, 19(1), 167-174.
- Nascimento, T. A., Calado, V., & Carvalho, C. W. P. (2012). Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. *Food Research International*, 49(1), 588-595.
- Natanya, M.; Hansen, L.; Plackett, D. (2008) Sustainable films and coatings from hemicelluloses: A review. *Biomacromolecules*, 9, 1493-1505.
- Nazan Turhan, K.; Şahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, 61, 459-466.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674.
- Nerin, C., (2012). Essential oils in active packaging. In: Valgimigli, L. (Ed.), *Essential Oils and Natural Food Additives: Composition, Applications, Antioxidant and Antimicrobial Properties*. Nova Science, New York, USA, pp. 397–412.
- Ngo, Tri-Dung (2018). Natural Fibers for Sustainable Bio-Composites. *Natural and Artificial Fiber-Reinforced Composites as Renewable Sources*, 3:107-126.
- Nguyen, T. H., Fleet, G. H., & Rogers, P. L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(2), 206-212.
- Niu, B., Shao, P., Chen, H., & Sun, P. (2019). Structural and physiochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation. *Carbohydrate polymers*, 208, 276-284.
- Norwegian Environment Agency (2018). Bio-based and biodegradable plastics. An Assessment of the value chain for bio-based and biodegradable plastics in Norway. Publicación digital. Eunomia – Mepex. Disponible a octubre de 2019 en: <https://www.eunomia.co.uk/reports-tools/bio-based-and-biodegradable-plastics-norway/>
- Novák, M., Synytsya, A., Gedeon, O., Slepíčka, P., Procházka, V., Synytsya, A., Blahovec, J., Hejlova, A., & Čopíková, J. (2012). Yeast β (1-3),(1-6)-d-glucan films: preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2496-2504.
- Ohring, M. (1995). *Engineering materials science*. Elsevier.

Oliva-Teles, A., & Gonçalves, P. (2001). Partial replacement of fishmeal by brewers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 202(3-4), 269-278.

Ollé Resa, C. P., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2014). Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 281-287.

Ortega-Toro, R.; Jiménez Marco, A.; Talens Oliag, P.; Chiralt A. (2014). Properties of starch hydroxypropyl methylcellulose based films obtained by compression molding. *Carbohydrate Polymers*, 109, 155-165. doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.059.

Ortiz, C. M., de Moraes, J. O., Vicente, A. R., Laurindo, J. B., & Mauri, A. N. (2017). Scale-up of the production of soy (*Glycine max* L.) protein films using tape casting: Formulation of film-forming suspension and drying conditions. *Food Hydrocolloids*, 66, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.029>

Otero, M. A., Wagner, J. R., Vasallo, M. C., Añón, M.C., García, L. & Jiménez, J. C. (2002). Thermal denaturation kinetics of yeast proteins in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Food Science and Technology International*, 8, 163–167.

Otero, M. A., Wagner, J. R., Vasallo, M. C., García, L. & Añón, M. C. (2000). Thermal behavior and hydration properties of yeast protein from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Food Chemistry*, 69, 161–165.

Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H. M., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H., & McHugh, T. H. (2017). Recent advances on edible films based on fruits and vegetables—a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151-1169.

Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Begin, A., & Holley, R. A. (2000). Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, 65(5), 768-773.

Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5598-5605.

Özden, Ç.; Bayindirli, L. (2002). Effects of combinational use of controlled atmosphere, cold storage and edible coating applications on shelf life and quality attributes of green peppers. *European Food Research and Technology*. 214, 320-326.

Pacheco, M. T. B. & Sgarbieri, V. C. (1998). Hydrophylic and rheological properties of brewer's yeast protein concentrates. *Journal of Food Science*, 63, 238-243.

Padmavathy, V., Vasudevan, P., & Dhingra, S. (2003). Thermal and spectroscopic studies on sorption of nickel(II) ion on protonated baker's yeast. *Chemosphere*, 52(10), 1807–1817. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00222-4](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00222-4)

Palazolo, G. G., Sobral, P. A., & Wagner, J. R. (2011). Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 398-409.

Paramera, E. I., Konteles, S. J., & Karathanos, V. T. (2011). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 125(3), 892–902.

Park, B. S., Choi, W. S., Kim, J. H., Kim, K. H., & Lee, S. E. (2005). Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(1), 80-84.

Park, H. J.; Chinnan, M. S. (1995). Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *Journal of Food Engineering*, 25, 497-507.

Pastor Navarro, C. (2010). Recubrimientos comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa: Caracterización y aplicación. PhD Thesis. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/handle/10251/8534>. Accessed 29.12.15

Paul, D. R. (2011). Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 418(1), 13-17.

Paul, F., Morin, A. & Monsan, P. (1986). Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 4(2), 245-259.

Pavlath, A. E.; Orts, W. Edible Films and Coatings: Why, What, and How? In *Edible Films and Coatings for Food Applications*; Embuscado, M., Huber, K. C., Eds.; Springer: New York, 2009; pp 1-23.

Pearson, D., Park, C., & Hespenheide, E. (2012, septiembre 12). Sustainability: Why CFOs are driving savings and strategy. Deloitte Insights. Disponible en: <https://www2.deloitte.com/us/en/insights/topics/social-impact/sustainability-why-cfos-are-driving-savings-and-strategy.html>

Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pineda, E. A. G. (2009). Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7499–7504.

Peltzer, M. A., Salvay, A. G., Delgado, J. F., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2018). Use of Residual Yeast Cell Wall for New Biobased Materials Production: Effect of Plasticization on Film Properties. *Food and Bioprocess Technology*, 11(11), 1995-2007.

Peltzer, M. A.; Salvay, A. G.; Delgado, J. F.; Wagner, J. R. (2017) Use of edible films and coatings for functional foods developments: A review. In *Functional foods sources, health effects and future perspectives*; Nelson, D. L., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: New York; pp. 1-26.

Pereda, M., Amica, G., Rácz, I., & Marcovich, N. E. (2011). Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *Journal of Food Engineering*, 103(1), 76-83.

Perumal, A. B., Sellamuthu, P. S., Nambiar, R. B., Sadiku, E. R., & Adeyeye, O. A. (2019). Biocomposite Reinforced with Nanocellulose for Packaging Applications. In *Green Biopolymers and their Nanocomposites* (pp. 83-123). Springer, Singapore.

Pham-Hoang, B. N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., & Waché, Y. (2013). Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(15), 6635–6645.

Pilosof, A. M. R., Boquet, R., & Bartholomai, G. B. (1985). Kinetics of Water Uptake by Food Powders. *Journal of Food Science*, 50(1), 278–279. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13334.x>

Pineda-Gómez, P. P., Bedoya-Hincapié, C. M., & Rivera, A. R. (2011). Estimación de los parámetros cinéticos y tiempo de vida de la cáscara de arroz y arcilla mediante la técnica de análisis termogravimétrico (TGA). *Dyna*, 78(165), 207-214.

Pinto, M., Coelho, E., Nunes, A., Brandão, T., & Coimbra, M. A. (2015). Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. *Carbohydrate Polymers*, 116, 215-222.

Plackett, D. (Ed.). (2011). *Biopolymers: new materials for sustainable films and coatings*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119994312>

Plastics Europe (2019). An analysis of european plastics production, demand and waste data. *Plastics—the facts*. Plastics Europe Deutschland e.V. and Messe Düsseldorf.

Plotto, A., Goodner, K. L., Baldwin, E. A., Bai, J., & Rattanapanone, N. (2004). Effect of polysaccharide coatings on quality of fresh cut mangoes (*Mangifera indica*). In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 117, pp. 382-388). Florida State Horticultural Society.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). *Antioxidants in Food: Practical Applications*. CRC Press.

Pommet, M., Redl, A., Guilbert, S., & Morel, M. H. (2005). Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 81-91.

Popović, S. Z., Lazić, V. L., Hromiš, N. M., Šuput, D. Z., & Bulut, S. N. (2018). Biopolymer Packaging Materials for Food Shelf-Life Prolongation. In *Biopolymers for Food Design* (pp. 223-277). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0.00008-6>

Puppo, M. C., & Añón, M. C. (1998). Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strength and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3583-3589.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rahmelow, K., Hübner, W., & Ackermann, T. (1998). Infrared absorbances of protein side chains. *Analytical biochemistry*, 257(1), 1-11.

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(3), 513-519.

Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2014). Development of novel nanobiocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chemistry*, 162, 149-155.

Rauscher, H., Roebben, G., Amenta, V., Boix, S. A., Calzolari, L., Emons, H., Gaillard, C., Gibson, N., Linsinger, T., Mech, A., Pesudo, L. Q., Rasmussen, K., Riego, J. Sokull-Klüttgen, B., & Stamm, H. L. (2014). Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term" nanomaterial. Part 1: Compilation of information concerning the experience with the definition. Joint Research Center Publications Office of the European Union. European Union.

Re, R., Pellegrini, N., Preteggente, A., Pannala, A., Yang, M., RiceEvans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 9, 121–137.

Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, 98(3), 404-419.

Rhim, J. W., Mohanty, A. K., Singh, S. P., & Ng, P. K. (2006). Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: Thermocompression versus solvent casting. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(6), 3736-3742.

Robertson, G. L. (2005). *Food packaging: principles and practice*. pp. 74 - 76. CRC Press.

Roca, C., Chagas, B., Farinha, I., Freitas, F., Mafra, L., Aguiar, F., Oliveira, R., Reis, M. A. M. (2012). Production of yeast chitin–glucan complex from biodiesel industry byproduct. *Process Biochemistry*, 47(11), 1670–1675. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.004>

Rocha Plácido Moore, G.; Martelli, S. M.; Gandolfo, C.; Do Amaral Sobral, P. J.; Borges Laurindo, J. (2006). Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. *Food Hydrocolloids* 20, 975-982.

Rogers, C. E. (1985). *Permeation of Gases and Vapours in Polymers*. Springer: Netherlands, Dordrecht.

Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., & McHugh, T. H. (2006). Mechanical, Barrier, and Antimicrobial Properties of Apple Puree Edible Films Containing Plant Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9262–9267.

Rombouts, I., Lagrain, B., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2010). β -Elimination reactions and formation of covalent cross-links in gliadin during heating at alkaline pH. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 362-367. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.06.006>

Rouf, T. B., & Kokini, J. L. (2018). Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. In *Bionanocomposites for Packaging Applications* (pp. 149-177). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67319-6_8

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.

Rudnik, E., Matuschek, G., Milanov, N., & Kettrup, A. (2006). Thermal stability and degradation of starch derivatives. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 85(2), 267-270.

Sakkara, S., Nataraj, D., Venkatesh, K., & Reddy, N. (2019). Influence of Alkali Treatment on the Physicochemical and Mechanical Properties of Starch Chitosan Films. *Starch-Stärke*, 71(3-4), 1800084.

Saksinchai, S., Supphantharika, M., & Verduyn, C. (2001). Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 307-316.

Salman, A., Tsrar, L., Pomerantz, A., Moreh, R., Mordechai, S., & Huleihel, M. (2010). FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy*, 24(3-4), 261-267. <http://doi.org/10.3233/SPE-2010-0448>

Salvay, A. G., Colombo, M. F. & Grigera, J. R. (2003). Hydration effects on the structural properties and haem-haem interactions in haemoglobin. *Physical Chemistry and Chemical Physics*, 5, 192-197.

Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., & Machová, E. (1999). Microbial (1→3)- β -d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 38(3), 247-253. [http://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00099-X](http://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00099-X)

Santipanichwong, R., & Supphantharika, M. (2009). Influence of different β -glucans on the physical and rheological properties of egg yolk stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1279-1287.

Sartori, T., Feltre, G., do Amaral Sobral, P. J., da Cunha, R. L., & Menegalli, F. C. (2018). Properties of films produced from blends of pectin and gluten. *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 221-229.

Savadekar, N. R., & Mhaske, S. T. (2012). Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 146-151.

Sceni, P., Palazolo, G. G., Vasallo, M. C., Puppo, M. C., Otero, M. A. & Wagner, J. R. (2009). Thermal and surface behavior of yeast protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1098-1106.

Schou, M., Longares, A., Montesinos-Herrero, C., Monahan, F. J., O'Riordan, D., & O'Sullivan, M. (2005). Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 605-610.

Schwass, D. E., & Finley, J. W. (1984). Heat and alkaline damage to proteins: racemization and lysinoalanine formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(6), 1377-1382. <https://doi.org/10.1021/jf00126a040>

Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644.

Shabanpour, B., Kazemi, M., Ojagh, S. M., & Pourashouri, P. (2018). Bacterial cellulose nanofibers as reinforce in edible fish myofibrillar protein nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 742-751.

Shankar, V. (1981). Influence of interfacial resistance on kinetics of sorption. *Polymer*, 22, 748-752.

Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Yang, H., & Ji, R. (2008). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2), 83-93.

Shi, G., Rao, L., Xie, Q., Li, J., Li, B., & Xiong, X. (2010). Characterization of yeast cells as a microencapsulation wall material by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 53(2), 289-295.

Shirasu, Y., Nakamura, T., & Wakabayashi, H. (2002). *U.S. Patent Application No. 09/781,444*.

Singh, B. R. (Ed.). (2000). Infrared analysis of peptides and proteins: principles and applications. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2000-0750>

Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2009). Cellulose whiskers versus microfibrils: influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. *Biomacromolecules*, 10(2), 425-432.

Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., & Dalla Rosa, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 634-643.

Slavutsky, A. M. & Bertuzzi, M. A. (2015). Formulation and characterisation of nanolaminated starch-based film. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 407-413.

Slavutsky, A. M., & Bertuzzi, M. A. (2016). Improvement of water barrier properties of starch films by lipid nanolamination. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 41-46.

Soares, R. M. D., Lima, A. M. F., Oliveira, R. V. B., Pires, A. T. N., & Soldi, V. (2005). Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. *Polymer Degradation and Stability*, 90(3), 449-454. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.007>

Sobral, P. D. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 423-432.

Sobral, P., Alvarado, J. de D., Zaritzky, N. E., Laurindo, J. B., Gómez-Guillén, C., Añón, M. C., Montero, P., Denavi, G., Molina Ortiz, S., Mauri, A., Pinotti, A., García, M., Martino, M. N., & Carvalho, R. (2008). Films based on biopolymer from conventional and non-conventional sources. In *Food engineering: Integrated approaches* (pp. 193-223). Springer, New York, NY.

Song, X., Zhou, C., Fu, F., Chen, Z., & Wu, Q. (2013). Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 43, 538-544.

Sothornvit, R., Olsen, C. W., McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (2007). Tensile properties of compression-molded whey protein sheets: determination of molding condition and glycerol-content effects and comparison with solution-cast films. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 855-860.

Sothornvit, R.; Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.

Souza, V. G. L., & Fernando, A. L. (2016). Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food—A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 8, 63-70.

Spiden, E. M., Scales, P. J., Kentish, S. E. & Martin, G. J. (2013). Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *Saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high-pressure homogenizer. *Biochemical Engineering Journal*, 70, 120-126.

Spiess, W. E. L., Wolf, W. F., (1983). *The results of the COST 90 project on water activity*. En: Jowitt, R. (Ed.) *Physical Properties of Foods*."; Applied Science Publishers, London, p.65-91.

Su, J. F., Huang, Z., Yuan, X. Y., Wang, X. Y., & Li, M. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 145-153. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.035>

Su, J. F., Yuan, X. Y., Huang, Z., Wang, X. Y., Lu, X. Z., Zhang, L. D., & Wang, S. B. (2012). Physicochemical properties of soy protein isolate/carboxymethyl cellulose blend films crosslinked by Maillard reactions: color, transparency and heat-sealing ability. *Materials Science and Engineering: C*, 32(1), 40-46.

Suárez-Machín, C., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2017). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de rumiantes. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(2), 21-30.

Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A., & Coma, V. (2005). Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3950-3957.

Takeuchi, H., Yamakawa, R., Nishimatsu, T., Takeuchi, Y., Hayakawa, K., & Maruyama, N. (2013). Design of rapidly disintegrating drug delivery films for oral doses with hydroxypropyl methylcellulose. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 23(5), 471-475.

Talón, E., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2019). Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. *LWT-Food Science & Technology*, 108290.

Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A., & Martín-Belloso, O. (2007). Alginate-and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, 72(4), E190-E196.

TAPPI 203 (2009). Alpha-, Beta- and Gamma-Cellulose in Pulp. Standard TAPPI T203 cm-09. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, USA.

TAPPI 204 (2017). Solvent Extractives of Wood and Pulp. Standard TAPPI T204 cm-17. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, USA.

TAPPI 222 (2006). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Standard TAPPI T222-om11. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, USA.

Tawakkal, I. S., Cran, M. J., & Bigger, S. W. (2016). Release of thymol from poly (lactic acid)-based antimicrobial films containing kenaf fibres as natural filler. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 629-637.

Thammakiti, S., Supphantharika, M., Phaesuwan, T., & Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(1), 21-29.

Thunwall, M., Kuthanova, V., Boldizar, A., & Rigdahl, M. (2008). Film blowing of thermoplastic starch. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 583-590.

Tsimidou, M., Papavergou, E., & Boskou, D. (1995). Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil. *Food Research International*, 28(4), 431-433.

UE (2009). Reglamento N°450/2009 de la Comisión sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos. Diario oficial de la Unión Europea. 30 de mayo de 2009. pp: 3-11.

UE (2011). Reglamento N°10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Diario oficial de la Unión Europea. 14 de enero de 2011. pp: 1-138.

Van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59(2), 304-322.

Vasallo, M. d C., Puppo, M. C., Palazolo, G. G., Otero, M. A., Beress, L., & Wagner, J. R. (2005). Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*: Surface and emulsifying properties. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 729-739.

Versino, F., & García, M. A. (2014). Cassava (*Manihot esculenta*) starch films reinforced with natural fibrous filler. *Industrial Crops and Products*, 58, 305-314.

Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254-263.

- Visakh, P. M., & Thomas, S. (2010). Preparation of bionanomaterials and their polymer nanocomposites from waste and biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 121-134.
- Wagner, H. D., & Lustiger, A. (2009). Optimized toughness of short fiber-based composites: the effect of fiber diameter. *Composites Science and Technology*, 69(7-8), 1323-1325.
- Wagner, J. R., Rambla, O., Miguel, A., & Legarreta, G. (2008). Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos. 1ed. Bernal, Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes.
- Wang, L., Auty, M. A., & Kerry, J. P. (2010). Physical assessment of composite biodegradable films manufactured using whey protein isolate, gelatin and sodium alginate. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 199-207.
- Wang, Y., Liu, A., Ye, R., Wang, W., & Li, X. (2015). Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin–calcium carbonate composite films. *Food Chemistry*, 166, 414-422.
- Wang, X., Guo, C., Hao, W., Ullah, N., Chen, L., Li, Z., & Feng, X. (2018). Development and characterization of agar-based edible films reinforced with nano-bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 722-730.
- White, D. G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D. D., McDermott, P. F. (2002). Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes & Infection*, 4, 405–412.
- Wierny, M., Coremberg, A., Costa, R., Trigo, E., & Regúnaga, M. (2015). Medición de la bioeconomía: cuantificación del caso argentino. *Bolsa de Cereales de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina*.
- Wihodo, M., & Moraru, C. I. (2013). Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *Journal of Food Engineering*, 114(3), 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.021>
- Wu, C., Chu, B., Kuang, L., Meng, B., Wang, X., & Tang, S. (2013). Synthesis of β -1,3 glucan esters showing nanosphere formation. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 807–12. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.056>.
- Xiu, A., Zhou, M., Zhu, B. & Zhang, J. (2011). Rheological properties of Salecan as a new source of thickening agent. *Food Hydrocolloids*, 25, 1719-1725.
- Yao, Y., Chen, S., & Chen, P. (2013). The effect of a graded interphase on the mechanism of stress transfer in a fiber-reinforced composite. *Mechanics of Materials*, 58, 35-54.
- Yoo, S., & Krochta, J. M. (2011). Whey protein–polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(14), 2628-2636.
- Yoshida, C. M., Maciel, V. B. V., Mendonça, M. E. D., & Franco, T. T. (2014). Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 83-89.

Yu, L., Dean, K., & Li, L. (2006). Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science*, 31(6), 576-602.

Zahran, H. E. D. M., & Abdelgaleil, S. A. (2011). Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(1), 46-51.

Zhu K-X., Lian C-X., Guo X-N., Peng W., Zhou H-M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* 126: 122–1126.

Zhu, Q., Shentu, B., Liu, Q., & Weng, Z. (2006). Swelling behavior of polyethyleniminecobalt complex in water. *European Polymer Journal*, 42,1417-1422.

Lista de ecuaciones

Ecuación 2.1 (Modelo Bioexponencial)	65
Ecuación 2.2 (Modelo de Guggenheim-Anderson-De Boer)	70
Ecuación 2.3 (Densidad de la película)	70
Ecuación 2.4 (Ecuación de Crank – Fick para difusión de vapor de agua en películas)	71
Ecuación 2.5 (Solubilidad del vapor de agua en la película)	71
Ecuación 2.6 (Modelo de Pilosof-Boquet-Bartholomai)	72
Ecuación 2.7 (Modelo de intervalo de tiempo corto, difusividad inicial)	72
Ecuación 2.8 (Modelo de Korsmeyer & Peppas)	72
Ecuación 2.9 (Definición de permeabilidad)	73
Ecuación 2.10 (Flujo de vapor de agua)	75
Ecuación 2.11 (Coeficiente experimental de permeabilidad al vapor de agua)	75
Ecuación 2.12 (Solubilidad efectiva del vapor de agua en la película)	76
Ecuación 2.13 (Modelo de Herschel – Bulkley)	78
Ecuación 2.14 (Diferencia de color total)	79
Ecuación 2.15 (Opacidad normalizada)	79
Ecuación 2.16 (Tenacidad)	88
Ecuación 2.17 (Modelo de Carreau)	90
Ecuación 2.18 (Balance de timol extraído y retenido)	92
Ecuación 2.19 (Porcentaje de migración)	92
Ecuación 2.20 (Coeficiente de difusión inicial para migración)	94
Ecuación 2.21 (Ecuación de Crank para resistencias superficial e interna relevantes en migración)	94
Ecuación 2.22 (Definición de α)	94
Ecuación 2.23 (Ecuación de Crank para resistencia superficial despreciable en migración)	95
Ecuación 2.24 (Ecuación de Arrhenius para el coeficiente de difusión)	95
Ecuación 2.25 (Porcentaje de RSA)	97

Lista de figuras

Figura 1.1 Distribución de la demanda de plásticos en la Unión Europea	26
Figura 1.2 Capacidad mundial de producción de plásticos basados en fuentes renovables en 2018 y proyección a 2023	26
Figura 1.3 Evolución de la producción global de plásticos basados en fuentes renovables desde 2017 a 2023 (desde 2019 son proyecciones)	27
Figura 1.4 Célula de levadura <i>S. cerevisiae</i> y descripción de organelas	33
Figura 1.5 Corte de la membrana y la pared celular de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	35
Figura 1.6 Representación de una válvula de homogeneización	40
Figura 1.7 Proceso simplificado de producción de películas por el método de <i>casting</i>	42
Figura 2.1 Proceso de producción de una película de levadura realizada por el método HTH (homogeneización, tratamiento térmico, homogeneización)	65
Figura 2.2 Celdas utilizadas para el ensayo de permeabilidad al vapor de agua	75
Figura 3.1 Efecto de la presión de homogeneización sobre la integridad de las células de levadura vistas al microscopio óptico (400×)	103
Figura 3.2 Termogramas obtenidos en calorimetría de barrido diferencial de dispersiones de levadura con y sin tratamiento de homogeneización a diferentes presiones	105
Figura 3.3 Comparación de las distribuciones de tamaños de partículas de dispersiones con diferentes tratamientos: A) distribución en % volumen y B) distribución en % número de muestras con diferentes tratamientos	107
Figura 3.4 Fotografías de la preparación de películas: A) dispersiones HTH en placa durante el secado y B) películas obtenidas una vez completado el secado	109
Figura 3.5 Curvas de hidratación para películas de levadura T, TH y HTH: A) Cinética de la hidratación a 90% HR (24 °C) y B) Isotermas de sorción de agua: isotermas de deshidratación e isotermas de hidratación	114
Figura 4.1 Termogramas MDSC de las muestras HTH sin plastificante y diferentes cantidades de glicerol agregadas, en la sección superior se muestran las señales de flujo de calor reversible y en la parte inferior, las señales de flujo de calor no reversible	119
Figura 4.2 Curvas de degradación térmica de muestras HTH con diferentes porcentajes de glicerol y la derivada del peso con respecto a las temperaturas obtenidas del análisis en TGA.	122
Figura 4.3 Espectros de FT-IR de las películas HTH y la influencia de la cantidad de glicerol incorporado	125
Figura 4.4. Espectros FT-IR de muestras sin glicerol (HTH-0Gli) degradadas térmicamente por TGA hasta diferentes temperaturas	126

Figura 4.5 Fotografías de películas HTH con plastificante: A) flexibilidad y B) Transparencia de la película	128
Figura 4.6 Curvas de hidratación para películas de levadura con diferente contenido de glicerol: A) Cinética de sorción de agua a 90% HR y B) Isotermas de sorción de agua. ..	132
Figura 5.1 Micrografías SEM de: A) la sección transversal y B) de la superficie de una película HTH no plastificada (El aumento utilizado fue de 500×)	137
Figura 5.2 Cinética de sorción de agua a 90% HR (24 °C) de películas con contenido de glicerol de 0, 10, 20 y 30% p/p m.s.: A) películas de $7,0 \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$ m de espesor, B) películas de $15,0 \pm 0,8 \cdot 10^{-5}$ m de espesor y C) películas de $30,0 \pm 1,3 \cdot 10^{-5}$ m de espesor.	139
Figura 5.3 Dependencia de los parámetros S_w y D_w^j con la concentración de glicerol en las películas de espesor $7,0 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ m, $15 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ m, y $30 \pm 1,3 \times 10^{-5}$ m: A) gráfico de S_w como función del % de glicerol y B) gráfico de D_w^j como función del % de glicerol	141
Figura 5.4. Dependencia de S_w y D_w^j con el espesor (L) de las películas con diferente contenido de glicerol 0, 10, 20, y 30 % p/p m.s.: A) gráfico de S_w como una función de L y B) gráfico de D_w^j como una función de L	142
Figura 5.5 Dependencia de J_w , P_w^{exp} y $P_w = S_w \cdot D_w^j$ con la concentración de glicerol en películas de diferente espesor $7 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ m, $15 \pm 0,8 \times 10^{-5}$ m, y $30 \pm 1,3 \times 10^{-5}$ m: A) gráfico de J_w en función del % de glicerol, B) gráfico de P_w^{exp} en función del % de glicerol y C) gráfico de $P_w = S_w \cdot D_w^j$ en función del % de glicerol.	147
Figura 5.6 Dependencia de J_w , P_w^{exp} y $P_w = S_w \cdot D_w^j$ con el espesor L de películas con contenido de glicerol de 0, 10, 20 y 30% p/p m.s.: A) gráfico de J_w como función de L , B) gráfico de P_w^{exp} como función de L y C) Gráfica de $P_w = S_w \cdot D_w^j$ como función de L	150
Figura 5.7 Isotermas de sorción de películas al 25% de glicerol con tres espesores diferentes, $7,5 \times 10^{-5}$, 15×10^{-5} y 30×10^{-5} m	156
Figura 6.1 Comportamiento de las dispersiones de levadura a diferente pH en barridos de flujo	160
Figura 6.2 Análisis termogravimétricos de las películas de levadura de pH 4 a 11: A) pérdida de peso en función de la temperatura y B) derivada del peso con respecto a la temperatura.....	161
Figura 6.3 Película de levadura preparada con una dispersión a pH 11 y 25 % de glicerol	164
Figura 6.4 Opacidad relativa (lectura de 400 a 800 nm) de películas de levadura preparadas con dispersiones a diferentes pHs.....	166
Figura 6.5 Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp}) determinada para películas de levadura a diferentes pH por el método de la norma ASTM E96.	167
Figura 6.6 Espectros de IR de las películas de biomasa de levadura: A) bandas relevantes en los espectros de IR y relación entre las absorbancias de amida I y amida II y B) la región ($1800 - 1350 \text{ cm}^{-1}$) se amplió para observar mejor las diferencias en amida I, amida II y en la banda cercana a 1400 cm^{-1}	169

Figura 6.7 Imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica (fase) a partir de superficies brillantes de muestras de películas obtenidas con pH 4, 6, 9 y 11.....	171
Figura 6.8 Resultados de las determinaciones de proteína soluble mediante ensayos de Biuret en gramos de proteína solubilizada por gramo de película.	172
Figura 6.9 Imágenes de borde y superficie de películas preparadas a través de moldeo por compresión de polvo de levadura tratado y 25% de glicerol (5000×).....	177
Figura 6.10 Imágenes de superficie y borde de películas producidas por moldeo a 140 y 150 °C: A) Superficie de una película con 15 % de glicerol a 1,5 MPa de presión y 140 °C (5000×) y B) Superficie de una película con 15 % de glicerol a 1,5 MPa de presión y 150 °C (5900×)	179
Figura 7.1 Superficie de respuesta del módulo elástico con respecto al contenido de fracción insoluble (% , complementaria de la fracción soluble) y el pH.....	188
Figura 7.2 Superficie de respuesta de la resistencia a la tracción con respecto al contenido de fracción insoluble (% , complementaria de la fracción soluble) y el pH.....	188
Figura 7.3 Superficie de respuesta de la deformación a ruptura con respecto al contenido de la fracción insoluble (% , complementaria de la fracción soluble) y el pH	189
Figura 7.4 Degradación térmica de las películas en condiciones de nitrógeno	193
Figura 7.5 Degradación térmica de las películas en condiciones de aire	194
Figura 7.6 Representación gráfica del color en el espacio RGB de cada película, se incluye el color de las películas de biomasa sin separar a pH 6	196
Figura 7.7 Cambios en los espectros con la modificación del contenido de material soluble e insoluble.....	197
Figura 7.8 Superficie de respuesta de la relación entre las bandas Amida I y la banda 1031 cm ⁻¹ relacionada con los polisacáridos	199
Figura 8.1 Fotografía de cáscara de arroz micronizada con tamaños de partículas menores a 125 µm.....	204
Figura 8.2 Termograma (TGA) de la cáscara de arroz micronizada en función de la temperatura (Peso y derivada del peso con respecto a la temperatura)	205
Figura 8.3 Vista de corte transversal de una película reforzada con 2% de cáscaras de arroz micronizadas (CAM) (500×)	206
Figura 8.4 Dispersión de nanofibras de celulosa de cáscara de arroz a la salida del homogeneizador a válvula	207
Figura 8.5 Nanofibras obtenidas desde la cáscara de arroz vistas al microscopio de fuerza atómica	208
Figura 8.6 Micrografía de las nanofibras de cáscara arroz obtenida por microscopía electrónica de barrido (100.000×).....	208

Figura 8.7 Comportamiento de la viscosidad aparente con respecto a la velocidad de deformación en las suspensiones de nanofibras de celulosa de cáscara de arroz	209
Figura 8.8 Gráfico del peso en función de la temperatura para las nanofibras FA obtenido en la balanza termogravimétrica	210
Figura 8.9 Módulo elástico de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)	211
Figura 8.10 Resistencia a la tracción de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)	211
Figura 8.11 Deformación a ruptura de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)	212
Figura 8.12 Tenacidad de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA)	213
Figura 8.13 Nanocelulosa bacteriana (BC) obtenida por cultivo de la bacteria <i>Gluconobacter Xylinus</i> : A) cultivo de la bacteria en forma estática, B) película de BC formada después de 3 días y C) película de BC formada después de 21 días	215
Figura 8.14 Módulo elástico de las películas reforzadas con nanocelulosa bacteriana (BC)	216
Figura 8.15 Resistencia a la tracción de películas con nanocelulosa bacteriana (BC)	217
Figura 8.16 Deformación a ruptura de películas con nanocelulosa bacteriana (BC)	218
Figura 8.17 Tenacidad de las películas reforzadas con nanocelulosa bacteriana (BC) ...	219
Figura 8.18 Imágenes de la superficie de fractura de las películas con refuerzo de fibras de cáscara de arroz y celulosa bacteriana (6000×)	220
Figura 9.1 Cinética de migración de timol en simulante graso (etanol 95% v/v) a distintas concentraciones de timol 6, 8, y 10% de timol a tres temperaturas A) 5 °C, B) 25 °C y C) 40 °C	231
Figura 9.2 Actividad de inhibición de radicales (<i>Radical Scavenging Activity</i> , RSA) del timol que migró desde la película hacia el simulante graso	237
Figura 10.1 Células de levadura vistas al microscopio óptico (400×)	243
Figura 10.2 Distribuciones de tamaños de partículas de dispersiones de levaduras residuales: A) distribución en fracción de número de partículas respecto del total y B) distribución en fracción de volumen de partículas respecto del total	244
Figura 10.3 Gráficas de la absorbancia en función de la longitud de onda del sobrenadante de cada lavado de: A) levadura residual y B) levadura panadera	246
Figura 10.4 Fotografía de las películas obtenidas en las placas a partir de levadura residual: A) películas en placas de Petri y B) película despegada de la placa	247
Figura 10.5 Gráfica <i>biplot</i> del análisis de componentes principales (<i>L</i> , <i>a</i> y <i>b</i>) de color de muestras de películas de levaduras panaderas y residual cervecera	248

Figura 10.6 Gráfico de la pérdida de peso y su derivada respecto de la temperatura de películas preparadas con levadura residual	250

Lista de tablas

Tabla 2.1 Diseño del experimento para obtener una superficie de respuesta de las características mecánicas	84
Tabla 2.2 Preparación de soluciones de timol para el trazado de curva de calibración ..	97
Tabla 2.3 Concentración de soluciones patrón de timol para el trazado de curva de calibración	97
Tabla 3.1 Parámetros de ajuste de la cinética de absorción de agua al 90% HR y los valores de los parámetros ajustados para las isotermas de sorción mostradas en las Figuras 3.5A y B, respectivamente.	112
Tabla 4.1 Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de degradación (TGA) de las películas HTH en el rango de 30 a 600 °C.....	123
Tabla 4.2 Propiedades mecánicas de las películas plastificadas	127
Tabla 4.3 Características de hidratación de las películas plastificadas con glicerol	130
Tabla 4.4 Parámetros del modelo GAB obtenidos de las curvas de hidratación de películas con y sin glicerol incorporado	131
Tabla 5.1 Valores de los parámetros D_w^j ($10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), D_w^{eff} ($10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), h_∞ (g de H ₂ O por g m.s.), k y n , según lo determinado por el mejor ajuste de la cinética de sorción de agua de los experimentos a 90% HR, mostrados en la figura 5.2.....	140
Tabla 5.2 Valores experimentales del flujo de vapor de agua J_w ($10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), y la comparación de la permeabilidad experimental al vapor de agua P_w^{exp} ($10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) y la permeabilidad al vapor de agua obtenida de la cinética de absorción de agua experimentos $P_w = S_w \cdot D_w^j$ ($10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$).	148
Tabla 5.3 Resultados de los ensayos realizados a diferentes gradientes de vapor de agua y espesores	155
Tabla 6.1 Resultados de las pruebas de tracción uniaxial de películas de levadura con 25% de glicerol.....	163
Tabla 6.2 Los valores L , a , b y la diferencia de color (ΔE) se determinaron a partir de las mediciones de color utilizando el espacio de color CIELab.	165
Tabla 6.3 Propiedades mecánicas de películas preparadas por moldeo bajo las condiciones iniciales.....	176
Tabla 6.4 Propiedades mecánicas de películas preparadas manteniendo la presión a 1,5 MPa e incrementando la temperatura	180
Tabla 7.1 Resultados de los ensayos de tracción uniaxial en películas con diferente composición en fracciones insoluble y soluble de levadura y 15% de glicerol	185
Tabla 7.2 Parámetros de los modelos de superficie de respuesta para tres características mecánicas: módulo elástico, resistencia a la tracción y deformación a ruptura.....	187

Tabla 7.3 Hidratación de las películas con mezclas de fracciones soluble e insoluble .	192
Tabla 7.4 Parámetros y diferencia de color entre las muestras y el patrón de película a pH 6	195
Tabla 7.5 Relaciones entre las absorbancias de Amida I y Amida II y Amida I y la banda de 1031 cm ⁻¹	198
Tabla 8.1 Propiedades mecánicas de películas con cáscaras de arroz micronizadas..	206
Tabla 8.2 Permeabilidad al vapor de agua de películas reforzadas con nanofibras de celulosa de cáscara de arroz (FA) y celulosa bacteriana (BC) a pH 6 y 11	221
Tabla 9.1 Resultados de la extracción de timol utilizando ultrasonido en películas de levadura con 6, 8 y 10 % de timol.....	226
Tabla 9.2 Características mecánicas de las películas con 15% de glicerol y diferente porcentaje de timol (6, 8 y 10%)	228
Tabla 9.3. Valores obtenidos de los parámetros L , a y b de la escala CIELab y la diferencia de color (ΔE) de las películas con timol con respecto a la muestra control ..	228
Tabla 9.4 Coeficientes y valores obtenidos a partir del ajuste de las curvas de migración en simulante graso con un modelo para resistencia superficial despreciable	232
Tabla 9.5 Energía de activación del proceso de migración para cada película (6, 8 y 10 % de timol)	234
Tabla 9.6 Datos del proceso de migración en simulante graso a 40 °C	235
Tabla 10.1 Valores de la escala de color CIELab para las películas de levadura residual. La diferencia de color ΔE está dada en función de la distancia geométrica con los valores de la muestra de levadura panadera.....	248
Tabla 10.2 Propiedades mecánicas de películas preparadas con levadura residual	251
Tabla 11.1 Aplicaciones potenciales de películas de biomasa de levadura.....	259

Anexo I

Doce principios de la ingeniería verde

Principio 1. Los diseñadores deben esforzarse por asegurar que todas las entradas y salidas de materia y energía sean tan inherentemente inocuas como sea posible.

Principio 2. Es mejor prevenir la contaminación que tratar o limpiar el residuo ya producido.

Principio 3. Las operaciones de separación y purificación deberían diseñarse para minimizar el consumo de energía y el uso de materiales.

Principio 4. Los productos, procesos y sistemas deberían diseñarse para la maximización de la eficiencia en el uso de materia, energía y espacio.

Principio 5. Los productos, procesos y sistemas deberían estar orientados hacia la “producción bajo demanda” (*output pulled*) más que hacia el “agotamiento de la alimentación” (*input pushed*).

Principio 6. La entropía y la complejidad inherentes deben ser consideradas como una inversión al elegir entre reutilizar, reciclar o rechazar como residuo final.

Principio 7. Diseñar para la durabilidad, no para la inmortalidad.

Principio 8. Satisfacer la necesidad, minimizar el exceso.

Principio 9. Minimizar la diversidad de materiales.

Principio 10. Cerrar los ciclos de materia y energía del proceso tanto como sea posible.

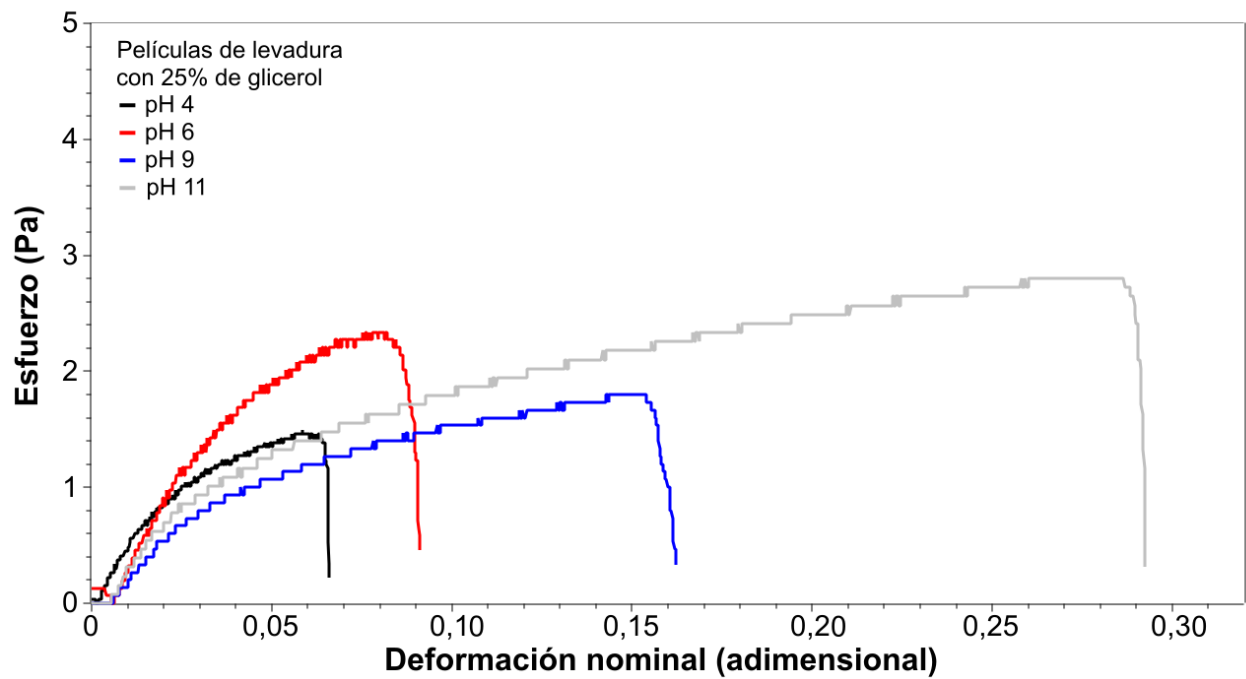
Principio 11. Diseñar para la reutilización de componentes tras el final de la vida útil del producto.

Principio 12. Las entradas de materia y energía deberían ser renovables.

Texto adaptado de la traducción de Gómez - Cívicos (2008) sobre la propuesta de Anastas y Zimmerman (2003).

Anexo II

Figura: Ejemplos de curvas esfuerzo – deformación que fueron analizadas en los ensayos de películas preparadas con dispersiones a distinto pH



Anexo III

Informe de Ensayo

OT N° 00228-00000278 Único
Página 1 de 2

Fecha de Informe: 13/06/2019

Solicitante

Razón Social UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Dirección Roque Sáenz Peña 352 (B1876BXD) Bernal, Provincia de Buenos Aires
Usuario Cecilia Porfiri

Elementos

1 (una) muestra sólida molida remitida por el usuario identificada como:

IDENTIFICACIÓN de	
CELULOSA Y PAPEL	USUARIO
A	CASCARA ARROZ 4092

Determinaciones requeridas

Holocelulosa
 α -Celulosa
Lignina insoluble en ácido
Solubles en alcohol-tolueno

Fecha de recepción

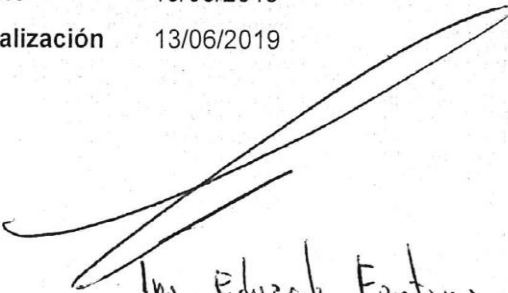
07/05/2019

Fecha de ensayo

Inicio 13/05/2019

Finalización 13/06/2019

ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL


Ing. Edgardo Fontana
Director Foresto Industrial

Metodología empleada

Holocelulosa

Methods of wood chemistry (B.L.
Browning) Vol II Cap. 19 II B- Método 3b

α -Celulosa

Norma Tappi 203 cm-09

Lignina insoluble en ácido

Norma Tappi 222 om-11

Solubles en alcohol-tolueno

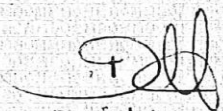
Norma Tappi 204 cm-17

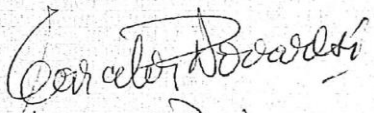
Resultados

MUESTRA \ ENSAYO	Solubles en alcohol-tolueno (% base muestra seca)	Holocelulosa (% base muestra seca)	α -Celulosa (% base muestra seca)	LIGNINA (% base muestra seca libre de extractivos)
CASCARA ARROZ 4092	0,82	63,8	45,3	35,0

Los resultados contenidos en el presente informe corresponden a las condiciones en las que se realizaron las mediciones y/o ensayos.

Fin del Informe


Daniel Lopez
Dto. Celulosa y Papel


MARCELO P. NOUARES
JEFE DE DEPTO. CELULOSA Y PAPEL

ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL

Abreviaturas

% RSA (Radical Scavenging Activity) Porcentaje de inhibición de radicales.

ABTS^{•+} Catión radical del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico.

AFM (*Atomic Force Microscopy*) Microscopía de fuerza atómica.

BC Nanocelulosa bacteriana.

CAM Cáscara de arroz micronizada.

D[3,2] Diámetro medio de Sauter.

D[4,3] Diámetro medio de De Brouckere.

$D_{aparente}$ Coeficiente de diffusion de timol desde la película de levadura al medio simulante para el proceso a tiempos largos.

$D_{inicial}$ Coeficiente de diffusion de timol desde la película de levadura al medio simulante para el proceso a tiempos inicial.

D_w^{eff} Coeficiente de difusión aparente y efectivo para el proceso de hidratación a tiempos largos.

D_w^{ini} Coeficiente de difusión inicial para el proceso de hidratación a tiempos cortos.

FA Nanofibras de cáscara de arroz.

FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) Espectroscopía en infrarrojo por transformada de Fourier.

H Película de levadura preparada con una dispersión con tratamiento de homogeneización.

h_{∞} Contenido de agua en la película en equilibrio.

HT Película de levadura preparada con una dispersión con tratamiento de homogeneización y térmico, en ese orden.

HTH Película de levadura preparada con una dispersión con tratamiento de homogeneización, térmico y homogeneización.

INS Fracción insoluble de la biomasa de levadura homogeneizada, luego de centrifugación.

MDSC (*Modulated-temperature Differential Scanning Calorimetry*) Calorimetría diferencial de barrido de temperatura modulada.

P_w Coeficiente de permeabilidad de la película al vapor de agua.

SEM (*Scanning Electron Microscopy*) Microscopía Electrónica de Barrido.

SOL Fracción soluble de la biomasa de levadura homogeneizada, luego de centrifugación.

S_w Solubilidad del agua en la película.

T_g (Glass transition temperature) Temperatura de transición vítrea.

TGA (*Thermogravimetric analysis*) Análisis termogravimétrico.