

ESTUDIO Y APLICACIÓN DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO



Tesis de Doctorado

Lic. SANDRA RIVERO

Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la
Universidad Nacional de La Plata,
como requisito para la obtención del grado académico de

DOCTOR EN INGENIERÍA

Dirección de Tesis:

Directora: *Dra. Adriana Pinotti*

Co-Directora: *Dra. María A. García*

Jurado de Tesis:

Dra. Silvia Goyanes

Dra. Analía Vázquez

Fecha de defensa oral y pública: La Plata, 19 de Marzo 2012

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ingeniería fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Adriana Pinotti y la Dra. María Alejandra García.

Los resultados del trabajo de investigación desarrollado derivaron en la escritura de esta Tesis de doctorado titulada ESTUDIO Y APLICACIÓN DE PELÍCULAS ACTIVAS A BASE DE QUITOSANO, se hicieron presentaciones en congresos nacionales e internacionales, se presentó una patente y se publicaron artículos en revistas internacionales con referato.

PATENTE: Película Biodegradable: Procedimiento para su preparación y Usos. Rivero S., García M.A., Pinotti A. Acta: P20110101196. 8-04-2011 (2011).

Composite and Bi-layer Films Based on Gelatin and Chitosan. (2009). S.Rivero, M.A. García and A. Pinotti. *Journal of Food Engineering.* Vol.90, 531-539.

Correlations between Structural, Barrier, Thermal and Mechanical Properties of Plasticized Gelatin Films. (2010). S.Rivero, M.A.García and A.Pinotti. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* Vol.11, 369-375.

Crosslinking Capacity of Tannic Acid in Plasticized Chitosan Films. (2010). S.Rivero, M.A.García and A.Pinotti. *Carbohydrate Polymers.* Vol.82, 270-276.

Heat Treatment to Modify the Structural and Physical Properties of Chitosan-Based Films. (2012). S.Rivero, M.A.García and A.Pinotti. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* Vol. 60, 492–499.

Agradecimientos

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

A la Dra. Adriana Pinotti y a la Dra. Mónica Gabriela García mis mentoras de Tesis, por confiar en mí cuando Lore me presentó, por sus consejos, por todos los momentos compartidos por transmitirme sus conocimientos, sus experiencias por sus apreciados y relevantes aportes durante el desarrollo de esta investigación que no hicieron más que fortalecer la decisión de la vía de desarrollo profesional que había elegido.

De ellas aprendí muchas cosas, pero ante todo debo destacar una, el esfuerzo de trabajar sin desánimo para ir consiguiendo poco a poco las metas que nos fuimos proponiendo.

Quiero agradecer al CONICET y a la Dra. Noemí Zaritzky por permitirme realizar el trabajo de investigación en el CIDCA.

También quiero agradecer a todos mis docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias UNMDP de la materia Propiedades Físicoquímicas y Funcionales de los Alimentos: Dra. Miriam Martino, Dra. Alba Navarro, Dra. Adriana Scilingo, Dra. Cecilia Puppo, Dra. Cristina Ferrero, y Dra. Mabel Tomás, por transmitirme su vocación dedicada a la investigación y despertar en mí el interés de explorar este ámbito.

A Norita por su apreciable ayuda, y por su gran aporte en el debate respecto de los tópicos del box.

A Lore por su amistad y su ayuda permanente, por todos esos años compartidos y por aquellos momentos inolvidables.

A Naty por su gran aporte en la dilucidación de las reacciones químicas.

A Majito por su cariño, por su apoyo incondicional, a Marina por su ayuda y compañía en el laboratorio, a los chicos de efluentes por sus palabras y por aquellos momentos compartidos en quesos que ahora los extraño.

A Javier Lecot y Daniel Russo por su buena predisposición y por sobre todo por haberme proporcionado turnos en los equipos para las experiencias de DSC y DMA.

Al Ing. Jorge Crottogini por sus innovadores aportes e ideas para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Leda Gianuzzi, por ayudarnos en el diseño y realización de los experimentos basados en pruebas microbiológicas.

Al Lic. Aldo Campana y al Lic Claudio Reyes por su invaluable predisposición para realizar los experimentos de la Tesis en el HPLC.

A Dianita la bibliotecaria del CIDCA por gestionar la búsqueda de los artículos necesarios para este estudio de investigación.

A Jime por su gran compañía y amistad de gran ayuda en esta atapa, parece que hubiese sido ayer cuando empezamos a hacer el curso de estadística. A Vicky por su amistad y su calidez como persona, gran compañera de danzas junto con Naty R. A Dario por su paciencia cuando nos justábamos con Jime y hacíamos catarsis, a Vane, Analia y Anabel por estar siempre presente, a Ruthi una amiga que se la extraña mucho. A mi gran amiga Paulita por sus consejos que fueron de gran apoyo.

A todos mis compañeros del CIDCA por sus palabras de aliento, fueron años de grandes relaciones de trabajo y amistad, compartimos momentos amenos y divertidos.

También quiero agradecer a los chicos del grupo de secado (Martín y Naty), por proporcionarme algunos de los equipos necesarios para la realización del presente trabajo, gracias por darme ánimo cuando me cruzaban por el pasillo.

Al Dr. Pablo Salgado por su invalorable ayuda. A mis compañeros de la Cátedra de Bromatología Analia, Silvina, Pablo, Cristian y a Vicky.

A mi familia, no sólo he recibido de ellos un ejemplo, sino que en todo momento he tenido toda su comprensión, y estímulo permanente. Gracias a mi Vasquito, por compartir todo, los buenos momentos y los menos buenos, gracias por darme tanto, por el apoyo constante, que me ha permitido hacer todo lo que he hecho.

INDICE

ANTECEDENTES GENERALES	1
OBJETIVO GENERAL.....	7
REFERENCIAS	9

CAPITULO 1: Caracterización fisicoquímica de quitosano

1.1 INTRODUCCIÓN	17
1.2 MATERIALES	22
1.3 METODOLOGÍA Y RESULTADOS OBTENIDOS	22
1.3.1 Caracterización del polímero base.....	22
1.3.2 Determinación del peso molecular del quitosano	24
1.3.3 Determinación del grado de desacetilación del quitosano por titulación potenciométrica	29
1.3.4 Propiedades térmicas estudiadas por calorimetría diferencial de barrido	32
1.3.5 Difracción de rayos X.....	35
1.3.6 Análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	39
REFERENCIAS	44

CAPITULO 2: Estudio y caracterización de películas de quitosano

2.1 INTRODUCCIÓN	50
2.2 MATERIALES	53
2.3 METODOLOGÍA.....	54
2.3.1 Preparación de las soluciones filmogénicas.....	54
2.3.2 Caracterización reológica de las soluciones de quitosano.....	54
2.3.3 Preparación de las películas.....	55
2.3.4 Propiedades fisicoquímicas de las películas de quitosano	55
2.3.4.1 Espesor de las películas.....	55
2.3.4.2 Contenido de humedad.....	55
2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua.....	55
2.3.6 Propiedades microestructurales	56
2.3.7 Calorimetría diferencial de barrido modulada.....	57
2.3.8 Propiedades mecánicas.....	58

2.3.8.1 Ensayos realizados mediante Análisis Dinámico Mecánico (DMA)	59
2.3.9 Análisis por FT-IR	62
2.3.10 Isotherma de sorción.....	62
2.3.11 Análisis estadístico	64
2.4 ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	64
2.4.1. Caracterización reológica de la soluciones de quitosano	64
2.4.2 Propiedades de las películas de quitosano	66
2.4.2.1 Características macroscópicas	66
2.4.2.2 Propiedades microestructurales	67
2.4.2.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	68
2.4.2.4 Propiedades mecánicas.....	70
2.4.2.5 Análisis térmico por MDSC.....	71
2.4.2.6 Análisis Dinámico Mecánico.....	77
2.4.2.7 Análisis por FTIR	80
2.4.2.8 Comportamiento de las películas de quitosano expuestas a diferentes humedades relativas.	83
REFERENCIAS.....	95

CAPITULO 3: Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminados

PARTE I. PELÍCULAS DE GELATINA: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN.....	106
3.I INTRODUCCIÓN	106
3.I.1 MATERIALES	108
3.I.2 MÉTODOS.....	109
3.I.2.1 Caracterización de la gelatina de origen bovino	109
3.I.2.1.1 Determinación del contenido de humedad y cenizas.....	109
3.I.2.1.2 Determinación del contenido de proteínas	109
3.I.2.1.3 Determinación de la fuerza del gel	109
3.I.2.2 Preparación de películas	110
3.I.2.3 Caracterización fisicoquímica de las películas	110
3.I.2.4 Difracción de rayos X.....	110
3.I.2.5 Propiedades térmicas de las películas	110
3.I.2.6 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	111

3.1.2.7 Propiedades mecánicas.....	111
3.1.2.7.1 Ensayos de tracción.....	111
3.1.2.7.2 Resistencia a la propagación del rasgado	112
3.1.2.8 Análisis estadístico	113
3.1.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	113
3.1.3.1 Caracterización fisicoquímica de la gelatina	113
3.1.3.2 Caracterización fisicoquímica de las películas	115
3.1.3.3 Espectroscopía de difracción de Rayos X.....	117
3.1.3.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	119
3.1.3.5 Análisis de las propiedades térmicas de las películas de gelatina	120
3.1.3.6 Propiedades mecánicas.....	126
PARTE II: DESARROLLO DE PELÍCULAS COMPUESTAS DE QUITOSANO Y GELATINA, SISTEMAS BICAPA Y LAMINADOS.....	133
3.II.1 INTRODUCCIÓN	133
3.II.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	134
3.II.2.1 Preparación de las soluciones fimo génicas compuestas	134
3.II.2.2 Preparación de las películas a base de hidrocoloides.....	135
3.II.2.3 Caracterización de las películas.....	136
3.II.2.3.1 Determinación del espesor	136
3.II.2.3.2 Determinación del contenido de humedad	136
3.II.2.3.3 Propiedades ópticas de las películas.....	137
3.II.2.3.4 Caracterización de la microestructura	138
3.II.2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	138
3.II.2.3.6 Propiedades mecánicas.....	139
3.II.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	139
3.II.3.1 Caracterización de las películas desarrolladas	139
3.II.3.2 Microscopía electrónica de barrido	141
3.II.3.4 Propiedades de barrera al vapor de agua	144
3.II.3.3.1 Efecto del espesor en la permeabilidad al vapor de agua (PVA)	144
3.II.3.4.2 Permeabilidad al vapor de agua de películas compuestas y sistemas bicapa y laminados.	151
3.II.3.5 Propiedades mecánicas.....	154

REFERENCIAS	159
-------------------	-----

CAPITULO 4: Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

4.1 INTRODUCCIÓN	169
4.2 MATERIALES	172
4.3 MÉTODOS	172
4.3.1 Preparación de la solución formadora de película	172
4.3.2 Caracterización del ácido tánico utilizado.....	173
4.3.3 Preparación de las películas	173
4.3.4 Caracterización fisicoquímica de las películas	173
4.3.4.1 Solubilidad de las películas en agua.....	173
4.3.4.2 Contenido de humedad de las películas	174
4.3.4.3 Color	174
4.3.5 Propiedades de barrera.....	174
4.3.6 Propiedades mecánicas.....	175
4.3.7 Estudio de las propiedades microestructurales y espectroscópicas	176
4.3.7.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	176
4.3.7.2 Espectroscopía de difracción de rayos X.....	177
4.3.7.3 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier	177
4.3.8 Análisis estadístico	177
4.4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	178
4.4.1 Caracterización del ácido tánico utilizado.....	178
4.4.2 Selección de la concentración de ácido tánico	179
4.4.3 Estudio de la interacción ácido tánico-quitosano	181
4.4.4 Propiedades fisicoquímicas y de barrera de las películas.....	187
4.4.5 Permeabilidad al oxígeno.....	190
4.4.6 Difracción de rayos X.....	192
4.4.7 Propiedades mecánicas.....	195

CAPITULO 5: Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

5.1 INTRODUCCIÓN	210
------------------------	-----

5.2 MATERIALES	213
5.3 MÉTODOS	213
5.3.1 Preparación y condiciones de curado de las películas.....	213
5.3.2 Propiedades fisicoquímicas y de barrera	213
5.3.2.1 Contenido de humedad de las películas y propiedades ópticas.....	213
5.3.2.2 Solubilidad y capacidad de hinchamiento de las películas	214
5.3.2.3 Goniometría-Método de ángulo de contacto	214
5.3.2.4 Propiedades de barrera.....	216
5.3.3 Estudio de las propiedades térmicas y espectroscópicas	216
5.3.3.1 Análisis termogravimétrico (TGA)	216
5.3.4 Estudio de las propiedades morfológicas y microestructurales por microscopía	217
5.4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	217
5.4.1 Propiedades de las matrices a base de quitosano luego del proceso de curado	217
5.4.1.1 Propiedades térmicas de los materiales	217
5.4.1.3 Análisis dinámico mecánico	221
5.4.1.4 Propiedades fisicoquímicas y de barrera	224
5.4.1.6 Propiedades microestructurales y espectroscópicas.....	233
REFERENCIAS	241
CAPÍTULO 6: Películas activas antioxidante a base de quitosano	
6.1 INTRODUCCION	247
6.2 MATERIALES	247
6.3 METODOLOGÍA.....	247
6.3.1 Preparación de las películas activas	247
6.3.2 Estudio de las propiedades macroscópicas y fisicoquímicas de las películas activas	
.....	248
6.3.3. Estudio de las propiedades microestructurales de las películas activas	248
6.3.4 Análisis estadístico	249
6.4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	249
6.4.1 Caracterización de las películas activas antioxidantes formuladas con ácido ferúlico	
.....	249
6.4.1.1 Selección de la concentración de compuesto activo	249

6.4.1.2 Propiedades fisicoquímicas y de barrera al O ₂	252
6.4.1.3 Propiedades microestructurales	254
6.4.1.4 Estudio de las propiedades térmicas y espectrosópicas.....	256
REFERENCIAS.....	263
CAPÍTULO 7: Biodegradación de matrices a base de quitosano	
7.1 INTRODUCCIÓN	266
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	270
7.2.1 Evaluación de la biodegradación en suelo de las películas poliméricas de quitosano	270
7.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	272
7.3.1 Estudio de las propiedades macroscópicas.....	272
7.3.2 Estudio de las propiedades morfológicas	275
REFERENCIAS.....	285
CAPITULO 8: Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano	
PARTE I.....	288
PELÍCULAS ACTIVAS ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS	289
8.1.1 ANTECEDENTES GENERALES DE ENVASES ACTIVOS	289
8.1.1.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS DESARROLLADAS	289
8.1.1.3 CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS DESARROLLADAS	292
8.1.1.4 ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS INCORPORADOS EN MATRICES POLIMÉRICAS	293
8.1.1.5 DIFUSIÓN DE AGENTES BIOACTIVOS A TRAVÉS DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA	295
8.1.1.5.1 Sistemas controlados por mecanismos físicos.....	295
8.1.1.5.2 Sistemas controlados por mecanismos químicos	297
8.1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	298
8.1.2.1 ESTUDIO DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS INCORPORADOS	298
8.1.2.1.1 Preparación de las películas activas antioxidantes.....	298
8.1.2.1.2 <i>Polifenoles totales cuantificados por el método de Folin-Ciocalteau (FC)</i>	299
8.1.2.1.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los componentes activos incorporados en la matriz por DPPH.....	300

8.I.2.1.4 Correlación entre técnicas de determinación de antioxidantes.....	302
8.I.2.2 PELICULAS ACTIVAS ANTIMICROBIANAS.....	302
8.I.2.2.1 Películas estudiadas	302
8.I.2.2.2 Agente antimicrobiano cuantificado por HPLC.....	303
8.I.2.2.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas.....	304
8.I.2.3 Análisis estadístico	305
8.I.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	305
8.I.3.1 DIFUSIÓN DE AGENTES BIOACTIVOS A TRAVÉS DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA	305
8.I.3.1.1 Modelado matemático del proceso de liberación.....	305
8.I.3.1.2 Cinética de liberación de componentes activos antioxidantes	310
8.I.3.1.3 Difusión de compuestos activos antimicrobianos	316
8.I.3.1.4 Estimación de los coeficientes de difusión	320
8.I.3.2 Capacidad antimicrobiana de las películas activas	323
PARTE II.....	330
8.II.1 APLICACIÓN DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS ANTIMICROBIANAS.....	330
8.II.1.1 Características del mercado.....	331
8.II.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	331
8.II.2.1 Preparación de la masa	331
8.II.2.2 Caracterización de masas respecto a un control comercial	332
8.II.2.3 Diseño del producto	333
8.II.2.4 Determinación del contenido de ácido propiónico en masas	335
8.II.2.5 Evaluación de la vida útil del producto	335
8.II.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	336
8.II.3.1 Caracterización de la masa.....	336
8.II.3.2 Aplicación de las películas activas antimicrobianas a discos de masas	337
8.II.3.3 Evaluación de la vida útil del producto	338
REFERENCIAS	343
CONCLUSIONES GENERALES	349
ANEXO A.....	354
ANEXO B	360

RESUMEN

El quitosano es un material biocompatible, biodegradable, no-tóxico, de gran aplicación tanto en el campo de la biotecnología, la medicina, como en la industria alimentaria y en el área farmacéutica, cosmética, y de tecnología de envases. Las películas biodegradables a partir de recursos naturales no pretenden sustituir las aplicaciones de los polímeros sintéticos sino plantear un aprovechamiento integral y eficiente de los recursos. Su utilización en el área de envases depende fundamentalmente de sus propiedades de barrera y mecánicas. Asimismo, las investigaciones realizadas en el campo de la medicina y en el área farmacéutica demostraron que las matrices de quitosano son altamente efectivas en la liberación controlada de componentes activos, debido a su naturaleza hidrofílica y a sus particulares propiedades.

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue desarrollar y aplicar películas biodegradables a base de quitosano abordando diferentes estrategias para modificar sus propiedades funcionales.

El quitosano permitió el desarrollo de películas transparentes, homogéneas, con excelente integridad estructural. Las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua resultaron buenas no obstante tratarse de un polímero biodegradable y de marcado carácter hidrofílico. Las modificaciones realizadas sobre la matriz original combinándolo con otro biopolímero como la gelatina, para formar matrices compuestas y sistemas *bicapa* permitieron mejorar las propiedades de las películas, particularmente aquellas relacionadas con su afinidad por el agua. El entrecruzamiento de la matriz con ácido tánico y el posterior tratamiento de curado, permitieron modificaciones estructurales que llevaron a reducir la influencia de los procesos mediados por la presencia de agua, como el grado de hinchamiento, solubilidad, permeabilidad, entre otras propiedades. Las modificaciones logradas por el agregado de ácidos ferúlico y tánico como por los tratamientos de curado no alteraron el carácter biodegradable del material, si bien se observaron diferencias en la cinética de degradación. El quitosano es conocido por su carácter antimicrobiano, condición que se mantuvo aún en matrices modificadas con ácido tánico o por tratamiento térmico. La aplicación de las películas activas de quitosano con agregado de ácido propiónico a un sistema alimentario permitió extender su vida útil con respecto a los resultados obtenidos con el uso de un polímero sintético. Asimismo, la transformación de la matriz en activa

mediante la adición de agentes antioxidantes y antimicrobianos resultó efectiva para los proceso de liberación por formación de hidrogeles en medios líquidos.

Se demostró la versatilidad del quitosano para obtener desde matrices con un comportamiento similar a la quitina, por medio del uso de altas temperaturas de curado hasta materiales que pueden ser utilizados en la liberación controlada de compuestos activos debido a su elevada capacidad de hinchamiento.



*ANTECEDENTES
GENERALES*



ANTECEDENTES GENERALES

En las últimas décadas se ha producido un aumento sostenible en la utilización de los materiales poliméricos para la fabricación de una amplia gama de productos para diversas aplicaciones. Este notable incremento está asociado a las características que presentan los polímeros sintéticos, tales como la termosoldabilidad, la gran versatilidad de formas y tamaños, el amplio rango de propiedades mecánicas que presentan, y sobre todo su bajo costo. En este sentido, son indudables los beneficios que han aportado el desarrollo de materiales poliméricos derivados del petróleo. Sin embargo, cada vez es más notorio cómo estos materiales afectan negativamente al ambiente debido a la dificultad que presenta su degradación en la mayoría de los casos. En este contexto, la política medioambiental que se está imponiendo a nivel mundial es desarrollar nuevos materiales a base de polímeros biodegradables, como alternativa a los plásticos convencionales de mayor consumo, y que contribuyan a la reducción de los desechos sólidos producidos. El reemplazo por envases biodegradables puede reducir el uso de recursos no renovables y disminuir los desechos ambientales a través del reciclado biológico del sistema debido a su completa biodegradación en productos tales como CO₂, agua y biomasa (Bastioli, 2001).

Los envases son los responsables de mantener la integridad física y microbiológica de los alimentos y de preservar sus características organolépticas intrínsecas, es decir, su función principal es proteger y preservar al alimento de la contaminación externa (Brody y col., 2008). Los agentes causantes del deterioro de los alimentos y bebidas son principalmente los factores ambientales como calor, luz, humedad, oxígeno, presión, enzimas, olores, o contaminaciones generadas por la acción de microorganismos, insectos, partículas de suciedad y polvo, entre otros (Marsh y Bugusu, 2007; Tharanathan, 2003).

En la actualidad el estudio de los envases biodegradables se encuentra en etapa de crecimiento, principalmente en el área de los alimentos. Las películas biodegradables a partir de recursos naturales no pretenden sustituir las aplicaciones de los polímeros sintéticos sino plantear un aprovechamiento integral y eficiente de los recursos. Su utilización en el área de envases depende fundamentalmente de sus propiedades de barrera y mecánicas las que están determinadas por la microestructura y composición. La pérdida de la integridad física de las películas debido a propiedades mecánicas deficientes reduce su efectividad como barrera protectora (Sothornvit y Krochta, 2005). Así, el estudio de las propiedades mecánicas

de los sistemas desarrollados es de gran importancia debido a su influencia en el desempeño del producto y la aceptabilidad del consumidor.

Los biopolímeros naturales provienen de diferentes fuentes de origen: animal (colágeno/gelatina; quitina/quitosano), agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) y microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxicanoatos (PHA), entre otros), (Tharanathan, 2003).

Las formulaciones de las películas biodegradables deben incluir al menos un componente capaz de formar una matriz cohesiva y continua (Krochta y col., 1994). Los biopolímeros pueden emplearse solos o en combinación para obtener películas con propiedades específicas. Los materiales básicos se clasifican en tres categorías:

Polisacáridos, en esta clasificación se incluye a la celulosa o sus derivados (Arvanitoyannis y Biliaderis, 1999; Cyras y col., 2009; Shih y col., 2009), almidones (Famá y col., 2007; 2011; 2012; Mali y col., 2005; López y col., 2011), carragenanos (Choi y col., 2005), gelanos (León y col., 2009), pectinas (Krause Bierhalz y col., 2012), kefiran (Piermaria y col., 2009), quitina, quitosano (Cerqueira y col., 2012; García y col., 2009; Pinotti y col., 2007; Rivero y col., 2009) y otros hidrocoloides. Estos polímeros tienen la capacidad para formar películas de excelente integridad dependiendo fundamentalmente de sus características químicas y estructurales. Además, son reconocidas por sus buenas propiedades de barrera al O₂ y al CO₂.

Proteínas, las fuentes más comunes son: zeína (Lacroix y Cooksey, 2005), soja (Mauri y Añon, 2008), caseína (Audic y Chaufer, 2005; Mauer y col., 2000), albúmina de huevo (Gennadios y col., 1996), lactoalbúmina, amaranto (Jiménez-Elizondo y col., 2009), proteínas de girasol (Salgado y col., 2010) colágeno y gelatina (Cao y col., 2007; Gómez-Estaca y col., 2009; Martucci y col., 2006; Rivero y col., 2010); por sus características se adhieren fácilmente a superficies hidrofílicas permitiendo su empleo como vehículos en la liberación de compuestos activos, si bien pueden actuar como barreras efectivas para restringir el transporte de O₂ y CO₂, en la mayoría de los casos poseen alta permeabilidad al vapor de agua

Lípidos, se utilizan ceras y ácidos grasos, debido a la baja polaridad que poseen. Su principal función radica en su capacidad como barrera a la transferencia de vapor de agua (Hagenmaier, 2005), pero por sus deficientes propiedades mecánicas, generalmente se combinan con otros polímeros como proteínas o polisacáridos.

A continuación se detallan las generalidades del quitosano, polímero utilizado en este trabajo de Tesis y de la quitina, como fuente de obtención del mismo.

La quitina fue reportada por primera vez en 1811 por Henri Braconnot en hongos; en 1830 se aisló de insectos y se le dió el nombre de quitina. Por otra parte, el descubrimiento del quitosano en el año 1859 supuso el inicio de las investigaciones intensivas sobre este compuesto. La quitina es un polisacárido que se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza; después de la celulosa es el polímero natural más abundante, presenta una tasa de reposición tan alta en la biósfera que se estima duplica a la de la celulosa, por lo que constituye un importante recurso natural renovable. Forma parte de la estructura de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. Si bien la quitina extraída de los hongos presenta algunas ventajas como la uniformidad en su composición y su disponibilidad, la misma se encuentra asociada a otros polisacáridos como la celulosa, glucano, manano y poligalactosamina lo que dificulta su aislamiento (Peter, 2002). Por lo tanto, la quitina obtenida de las especies marinas es la que se utiliza en mayor proporción, cuyas principales fuentes son los exoesqueletos de cangrejos, camarones, langostinos y langostas que provienen de los desechos de la industria pesquera y que representan millones de toneladas de desperdicios. Debido a la insolubilidad de la quitina sus aplicaciones son limitadas, sin embargo sus derivados tienen diversos usos. La principal reacción de derivatización de la quitina es la hidrólisis de los grupos acetamida presentes en su estructura para generar un polímero deacetilado conocido como *quitosano*, el cual es sometido a un proceso químico de N-desacetilación para su obtención (Ravi Kumar y col., 2004).

El quitosano, a nivel mundial se produce a escala industrial, siendo un material biocompatible y biodegradable de gran aplicación en el campo de la biotecnología, la medicina, en la industria alimentaria y en el área farmacéutica, cosmética, y de tecnología de envases. En la Tabla 1 se presenta una breve descripción a partir de la revisión bibliográfica realizada respecto de los usos más relevantes del quitosano.

Tabla1: Usos relevantes del quitosano

APLICACIONES	Ejemplos de usos específicos	Publicaciones
Tratamiento de aguas y efluentes industriales	Remoción de metales pesados y pesticidas: remoción de fenoles, radioisótopos, colorantes, recuperación de materiales sólidos de la industria alimentaria.	Crini (2005) Guibal (2004) No y Meyers (2000) Pinotti y col. (2000, 2001)
Cosmética	Maquillaje, lociones, cremas.	Ravi Kumar (2000)
Agricultura	Recubrimientos de semillas y frutas (film), fertilizante, funguicida, antivirósico.	Hirano (1999) Ravi Kumar (2000) Rodríguez y col. (1998)
Biomédicas y farmacéuticas	Gasas, vendas e hilos de suturas, soportes para la liberación de drogas, liberación de genes, inhibición de placas dentarias, cicatrización de heridas, piel artificial, tratamientos de enfermedades óseas, lentes de contacto, membranas de diálisis, bolsas de sangre, tiene efecto anticoagulante, antitumoral, analgésico, hipocolesterolémico y antimicrobiano.	Di Martino y col. (2005) Ho y col. (2005) Kim y Rajapakse (2005) Kong y col. (2010) Ma y col. (2003) Madhally y Howard (1999) Minagawa y col. (2007) Okamoto y col. (1993) Okamoto y col. (2002) Osman y col. (2010) Ravi Kumar y col. (2000; 2004) Shelma y col. (2008) Strand y col. (2010)
Industria de papel	Tratamiento de superficies, papel fotográfico.	Ravi Kumar (2000)
Industria alimentaria	Remoción de colorantes, conservantes, estabilizante de color, exaltador del sabor natural, preservador, antioxidante, emulsionante. Usado como ingrediente funcional (fibra dietaria)	Aranaz y col. (2009) Je y Kim (2006) Nisperos Carriedo (1994) Park y col. (2004a) Zivanovic y col. (2004)

En los últimos 40 años se han obtenido más de 5946 patentes originadas por países como Japón, Corea, China, EEUU y países de Europa en el período de 1976-2006, relacionadas con la obtención, aprovechamiento y aplicaciones del polisacárido. Países como Noruega, Corea, Italia y Japón lo aplican en el área de alimentos debido a su efecto anticolesterolémico y a su enfoque dietético. La FDA (Food and Drug Administration) reconoce la estructura y funcionalidad del quitosano, pero aún no considera su aplicación como excipiente en medicamentos, ya que no se encuentra en la lista de ingredientes activos fiscalizada por dicho órgano regulador.

El mercado mundial de oferentes de quitina y quitosano está formado por diferentes actores. Liderando el mercado se encuentran Estados Unidos y Japón. Según un estudio realizado por la Sociedad Asiática de Quitina (1996), el mercado mundial de quitosano en 1994 era de 1000 Tn de las cuales 800 Tn eran utilizadas en Japón, esto demuestra la gran importancia de este país como productor y consumidor. Actualmente la producción y el consumo se encuentran descentralizados y no sólo ha aumentado el volumen de producción con la participación de nuevos actores globales, sino que las nuevas aplicaciones propuestas en diversos campos han ampliado los mercados, razón por la cual se vislumbra un futuro promisorio.

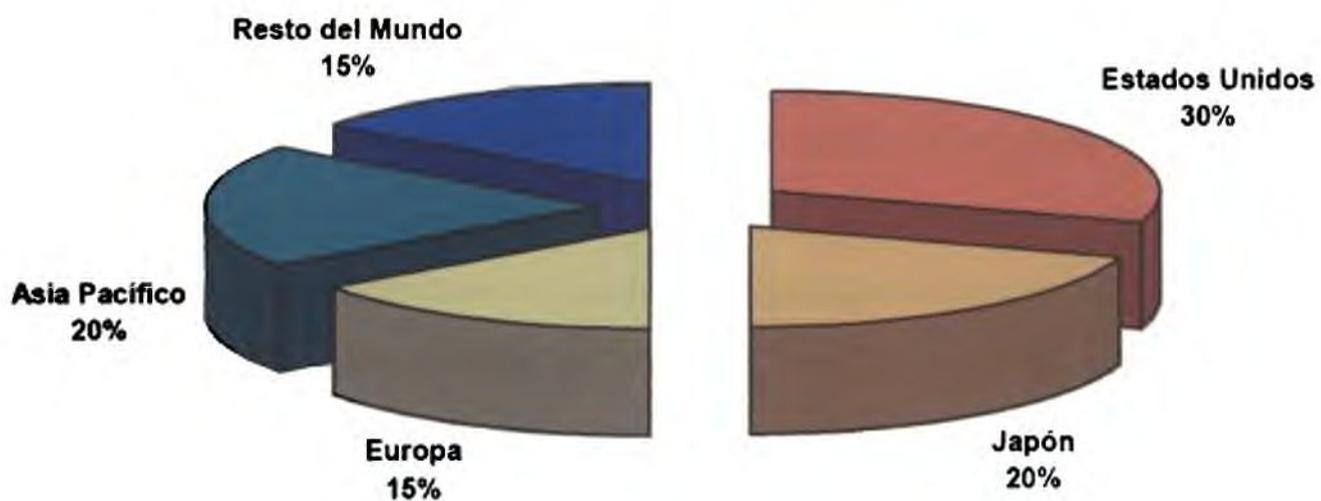


Figura 1. Composición del Mercado Mundial de Quitina y Quitosano

En nuestro país, los exoesqueletos de camarones y langostinos constituyen un desecho de la industria pesquera sin aprovechamiento alguno. En la ciudad de Mar del Plata, este residuo no tiene aplicaciones específicas y se destina principalmente a la producción de harina de pescado. Por otra parte, en otras zonas del país con mayores volúmenes de

captura y procesamiento, como por ejemplo las rías de Bahía Blanca, la disposición inadecuada de estos residuos sin tratamiento, tiende a generar un problema de contaminación ambiental debido a la bioacumulación de materia orgánica. Así, una alternativa que resulta interesante y se encuentra en vías de desarrollo a fin minimizar este impacto y darle valor a los residuos generados, es considerar estos desechos pesqueros como una fuente de materia prima para la obtención de bioproductos. En este sentido, actualmente grupos de investigación de la UNS y del Centro INTI-Mar del Plata trabajan en la producción de quitosano a partir de los exoesqueletos de camarones y langostinos a escala piloto con fines de investigación.

Por ser un producto natural, no posee una composición única, presentando una gran variabilidad debido a su fuente y condiciones de obtención que influye significativamente en las características finales del producto (Goosen, 1997; Pochanavanich y Suntornsuk, 2002). Por esta razón, en el presente trabajo de Tesis se abordará la caracterización del polímero.

Como una alternativa sustentable, este estudio académico contempla el desarrollo de películas biodegradables para aplicaciones específicas en el marco del aprovechamiento de un subproducto industrial. Dado que las películas de un solo componente presentan sus ventajas y desventajas ya sea en sus propiedades mecánicas o de barrera, la tendencia actual es a combinar los polímeros en una misma formulación. En este sentido, la obtención de materiales compuestos a base de quitosano resulta una opción innovadora que se explora en el presente trabajo.

Por otra parte, la presencia de grupos amino distribuidos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los polímeros más versátiles, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones. Asimismo, considerando la diversidad de usos y aplicaciones que posee, se deben conocer las propiedades de las películas a base de quitosano para lograr el diseño de materiales funcionales adecuados para distintos procesos tecnológicos involucrados en cada aplicación en particular. En este contexto, se estudiaron las modificaciones producidas en la matriz, ya sea por la adición de compuestos activos con funcionalidades específicas, o por curado de la matriz mediante un tratamiento térmico.

Resulta de particular interés el agregado de componentes activos en la matriz de quitosano, entre ellos nutrientes, colorantes, saborizantes, minerales, vitaminas y preservadores, como agentes antimicrobianos y antioxidantes, los cuales pueden ser liberados de manera controlada (Park y Zhao, 2004b). No obstante, también es importante

estudiar el efecto producido por los aditivos incorporados sobre las propiedades de las películas desarrolladas. En el presente trabajo se propone la aplicación de los materiales desarrollados a un sistema alimentario. Como es sabido el quitosano posee actividad antimicrobiana inherente contra una amplia variedad de microorganismos. Asimismo su funcionalidad y su actividad dependen fundamentalmente de las características intrínsecas del polímero (Rabea y col., 2003).

Las investigaciones realizadas en el campo de la medicina y en el área farmacéutica demostraron que las matrices de quitosano son altamente efectivas en la liberación controlada de componentes activos, debido a su naturaleza hidrofílica y a sus particulares propiedades.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue desarrollar y aplicar películas biodegradables a base de quitosano abordando diferentes estrategias para mejorar sus propiedades funcionales.

REFERENCIAS

- Aranaz I., Mengíbar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., y Heras A. (2009).** Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology* 3, 203-230.
- Arvanitoyannis I., y Biliaderis C.G. (1999).** Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. *Carbohydrate Polymers*, 38, 47-58.
- Audic J.L., y Chaufer B. (2005).** Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, 41, 1934-1942.
- Bastioli C. (2001).** Global status of the production of biobased packaging materials. *Starch/Stärke*, 53, 351-355
- Brody A.L., Bugusu B., Han J.H., Sand C.K. y Mchugh T.H. (2008).** Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science R: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science*, 73(8), 107-116.
- Cao N., Fu Y., y He J. (2007).** Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1153-1162.
- Cerqueira M.A., Souza B.W.S., Teixeira J.A., y Vicente A.A. (2012).** Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films. A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27, 175-184.
- Choi J.H., Choi W.Y., Cha D.S., Chinnan M.J., Park, H.J., Lee D.S., y Park J.M. (2005).** Diffusivity of potassium sorbate in κ-carrageenan based antimicrobial film. *Food Science and Technology*, 38(4), 417-423.
- Crini G. (2005).** Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science*, 30(1), 38-70.
- Cyras V.P., Commisso M.S., y Vázquez A. (2009).** Biocomposites based on renewable resource: Acetylated and non acetylated cellulose cardboard coated with polyhydroxybutyrate. *Polymer*, 50, 6274-6280.
- Di Martino A., Sittinger M., y Risbud M.V. (2005).** Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26, 5983-5990.
- Famá L., Gañan Rojo P., Bernal C., y Goyanes S. (2012).** Biodegradable starch based nanocomposites with low water vapor permeability and high storage modulus. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1989-1993.

- Famá L., Goyanes S., y Gerschenson L. (2007).** Influence of storage time at room temperature in physicochemical properties of tapioca starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, 70, 265-273.
- Famá L., Pettarin V., Bernal C. y Goyanes S. (2011).** Starch/multi-walled carbon nanotubes composites with improved mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1226-1231.
- García A., Pinotti A., Martino M., y Zaritzky N. (2009).** Electrically Treated Composite Films Based on Chitosan and Methylcellulose Blends. *Food Hydrocolloids*, 23, 722-728.
- Gennadios A., Weller C.L., Hanna M.A., y Froning G.W. (1996).** Mechanical and barrier properties of egg albumen films. *Journal of Food Science*, 61, 585-589.
- Gómez-Estaca J., Montero P., Fernández-Martín F., y Gómez-Guillén M. C. (2009).** Physicochemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study. *Journal of Food Engineering*, 90, 480-486.
- Goosen M.F.A. (1997).** *Applications of Chitin and Chitosan*. Lancaster: Technomic Publishing.
- Guibal E. (2004).** Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Separation and Purification Technology*, 38(1), 43-74.
- Hagenmaier R.D. (2005).** A comparison of ethane, ethylene and CO₂ peel permeance-diffusion for fruit with different coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 56-64.
- Hirano S. (1999).** Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, 48, 732-734.
- Ho M.H., Wang D.M., y Hsieh H.J., Liu H-C., Hsien T-Y., Lai J-Y., y Hou L.T. (2005).** Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials*, 26(16), 3197-3206.
- Je J.Y., y Kim S.K. (2006).** Reactive oxygen species scavenging activity of aminoderivatized chitosan with different degree of deacetylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 5989-5994.
- Jiménez Elizondo N., Sobral P.J.A., y Menegalli F.C. (2009).** Development of films based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and poly(vinyl alcohol. *Carbohydrate Polymers*, 75, 592-598.
- Kim S.K., y Rajapakse N. (2005).** Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 357-368.

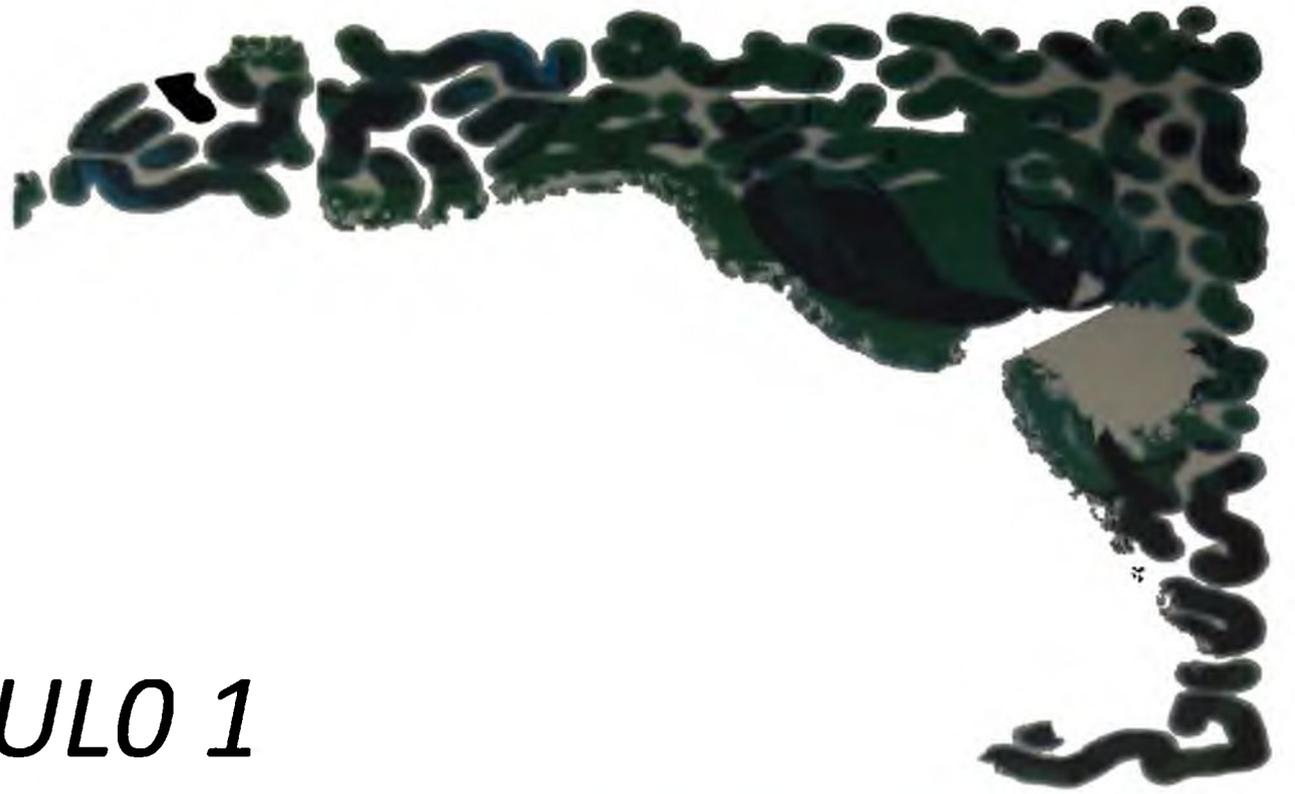
- Kong M., Chen X.G., Xing K., y Park H.J. (2010).** Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- Krause Bierhalz A.C., Altenhofen da Silva M., y Guenter Kieckbusch T. (2012).** Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110, 18-25.
- Krochta J.M., Balwin E.A., y Nisperos-Carriedo M. (1994).** Edible Coating and Films to Improve Food Quality. Basel, Switzerland. Technomic Publishing Co. pp 22-201.
- Lacroix M., y Cooksey K. (2005).** Edible films and coatings from animal-origin proteins. In: Elsevier Ltd (Ed.), *Innovations in Food Packaging*, pp. 301-312, Chapter 18.
- León P.G., Chillo S., Conte A., Gerschenson L.N., Del Nobile M.A., y Rojas A.M. (2009).** Rheological characterization of deacylated/acylated gellan films carrying L-(p)-ascorbic acid. *Food Hydrocolloids*, 23, 1660-1669.
- López O.V., Lecot C.J., Zaritzky N-E. y García M. A. (2011).** Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 254-263.
- Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X., y Han C. (2003).** Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4833-4841.
- Mali S., Sakanaka L.S., Yamashita F., y Grossmann M.V.E. (2005).** Water Sorption and Mechanical Properties of Cassava Starch Films and their Relation to Plasticizing Effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283-289.
- Madihally S.V., y Howard W.T. (1999).** Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20(12,) 1133-42.
- Marsh K., y Bugusu B. (2007).** Food packaging: roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science*, 72(3), 39-55.
- Martucci J.F., Ruseckaite R.A., y Vazquez A. (2006).** Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. *Materials Science and Engineering A*, (435-436), 681-686.
- Mauer L.J., Smith D.E., y Labuza T.P. (2000).** Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible b-casein. *International Dairy Journal*, 10, 353-358.
- Mauri A., y Añón M.C. (2008).** Mechanical and physical properties of soy protein films with pH modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14(2), 119-125.

- Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., y Okamoto Y. (2007).** Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 67, 640-644.
- Nisperos-Carriedo M.O. (1994).** Edible coatings and films based on polysaccharides. Ch. 11 in *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality.*, J.M. Krochta, E.A. Baldwin and M.Nisperos-Carriedo (Ed.). Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA. pp. 305-335
- No H.K., y Meyers SP. (2000).** Application of chitosan for treatment of wastewaters. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 163, 1-28.
- Okamoto Y., Minami Y., Matsushashi A. ,Sashiwa H.,Saimoto H., Shigemasa Y., Tanigawa T, Tanaka Y., y Tokura S. (1993).** Application of polymeric N-acetyl-D-glucosamine (chitin) to veterinary practice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55, 743-747.
- Okamoto Y., Kawakami K., Miyakate K., Morimoto M., Shigesama Y., y Minami S. (2002).** Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 49, 249-252.
- Osman M.; Fayed S.A.; Ghada I.M., y Romeilah R.M. (2010).** Protective effects of chitosan, ascorbic acid and gymnema sylvestre against hypercholesterolemia in male rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, 89-98.
- Park P.J., Je J.Y., y Kim S.K. (2004a).** Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymers*, 55, 17-22.
- Park S., y Zhao Y. (2004b).** Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933–1939.
- Peter M.G. (2002).** Chitin and Chitosan in Fungi, in *Polysaccharides II: Polysaccharides from eukaryotes*, A. Steinbüchel, Editor., Wiley-VCH: Weinheim. pp. 123-157.
- Piermaria J., Pinotti A., García M.A., y Abraham A.G. (2009).** Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23, 684-690.
- Pinotti A., Bevilacqua A., y Zaritzky N. (2001).** Comparison of the Performance of Chitosan and a Cationic Polyacrylamide as Flocculants of Emulsion Systems. *Journal of Surfactants and Detergents (AOCS)*, 4(1), 57-63.
- Pinotti A., García M.A., Martino M., y Zaritzky N. (2007).** Study on Microstructure and Physical Properties of Composite Films Based on Chitosan and Methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21, 66-72.

- Pinotti A., y Zaritzky N. (2000).** Effect of Aluminum Sulfate and Cationic Polyelectrolytes on the Destabilization of Emulsified Food Wastes. *Journal of Waste Management*, 21(6), 535-542.
- Pochanavanich P., y Suntornsuk W. (2002).** Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 17-21.
- Rabea E.I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smaghe G., y Steurbaut, W. (2003).** Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Ravi Kumar M.N.V. (2000).** A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., y Domb A.J. (2004).** Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104, 6017-6084.
- Rivero S., García M.A., y Pinotti A. (2009).** Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90, 531-539.
- Rivero S., García M.A., y Pinotti A. (2010).** Correlations between Structural, Barrier, Thermal and Mechanical Properties of Plasticized Gelatin Films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 369-375.
- Rodríguez M.S., Ramos V., Pistonesi M., Del Blanco L., y Agullo, E. (1998).** Preservación de Membrillos con películas de quitosano. *Información Tecnológica*, 9(3), 129-134.
- Salgado P.R., Molina Ortiz S.E., Petruccelli S., y Mauri A.N. (2010).** Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24(5), 525-533.
- Shelma R.; Paul W., y Sharma C.P. (2008).** Chitin nanofibre reinforced thin chitosan films for wound healing application. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 22, 111-115.
- Shih C-M., Shieh Y-T., y Twu Y-K. (2009).** Preparation and characterization of cellulose/chitosan blend films. *Carbohydrate Polymers*, 78, 169-174.
- Sothornvit R., y Krochta J.M. (2005).** Plasticizers in edible films and coatings innovations. In J.H.Han (Ed.), *Innovations in food packaging* Amsterdam ,The Netherlands: Elsevier.(pp. 403-428).
- Strand S.P., Lelu S., Reitan N.K., de Lange Davies C., Artursson P., y Vårum K.M. (2010).** Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*, 31, 975-987.

Tharanathan R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 71-78.

Zivanovic S., Basurto C.C., Chi S, Davidson P.M., y Weiss J. (2004). Molecular Weight of Chitosan Influences Antimicrobial Activity in Oil-in Water Emulsions. *Food Protection*, 67(5), 952-959.



CAPITULO 1

QUITOSANO

QUITINA

Grupo N-acetilto



1.1 INTRODUCCIÓN

La estructura molecular de la quitina (Figura 1.1) presenta similitudes con la de la celulosa; la diferencia entre sus cadenas radica en el segundo carbono, el cual presenta un grupo acetamida en la quitina y un grupo hidroxilo en la celulosa (Muzzarelli y Muzzarelli, 2005; Ravi Kumar, 2000). La quitina está formada por unidades de 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2. El término quitosano es empleado para describir una serie de polímeros con diferentes grados de desacetilación, el que es definido como el porcentaje de grupos amino primarios libres en el esqueleto del polímero. Así el quitosano es un copolímero de 2-acetamida-2-deoxi- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa (Figura 1.1). De acuerdo con Aranaz y col. (2009) a diferencia de los polímeros sintéticos, la quitina y el quitosano, no presentan limitaciones en cuanto a biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad, además de ser naturalmente abundantes y renovables.

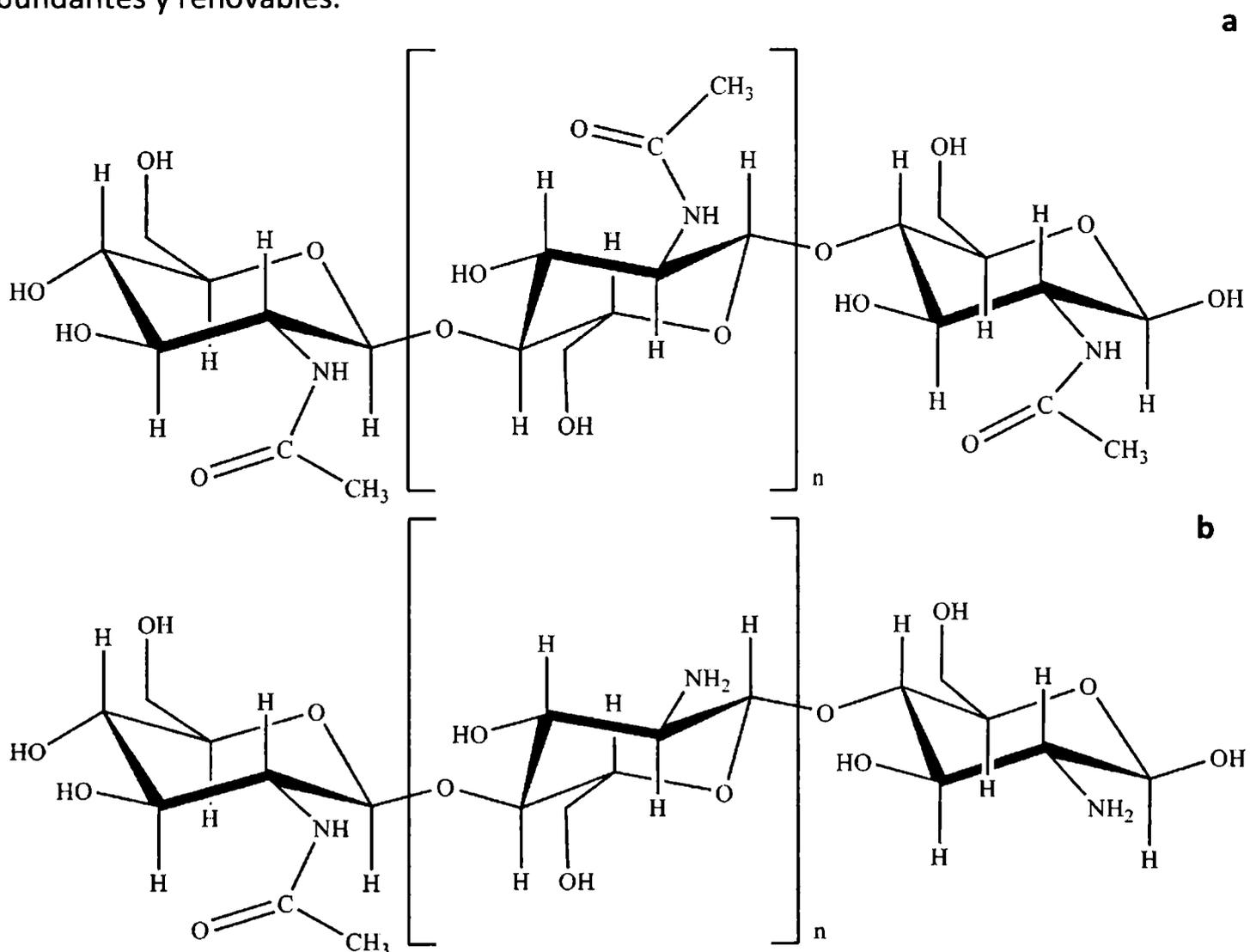


Figura 1.1. Estructura de la quitina (a) y del quitosano (b).

La fuente de la cual es extraído el quitosano, así como las condiciones del método de obtención determinan la composición y el tamaño de las cadenas del polímero. Si bien el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son parámetros importantes que condicionan sus propiedades funcionales, la cristalinidad, el contenido de agua y de cenizas también son características fisicoquímicas a considerar para la aplicación de un quitosano específico.

Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano, que pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, propiónico, butírico, entre otros) ya que el pKa del quitosano varía entre 6,3 y 6,5. Asimismo, la solubilidad está determinada principalmente por tres parámetros: el grado de desacetilación (DD), la distribución de los grupos acetilo y el grado de polimerización.

La protonación de los grupos aminos del polímero en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo convirtiéndolo en un polielectrolito catiónico. Cuando el pH aumenta por encima de 6,5 la carga positiva presente en los grupos aminos se pierde y el quitosano se insolubiliza (Pillai y col., 2009).

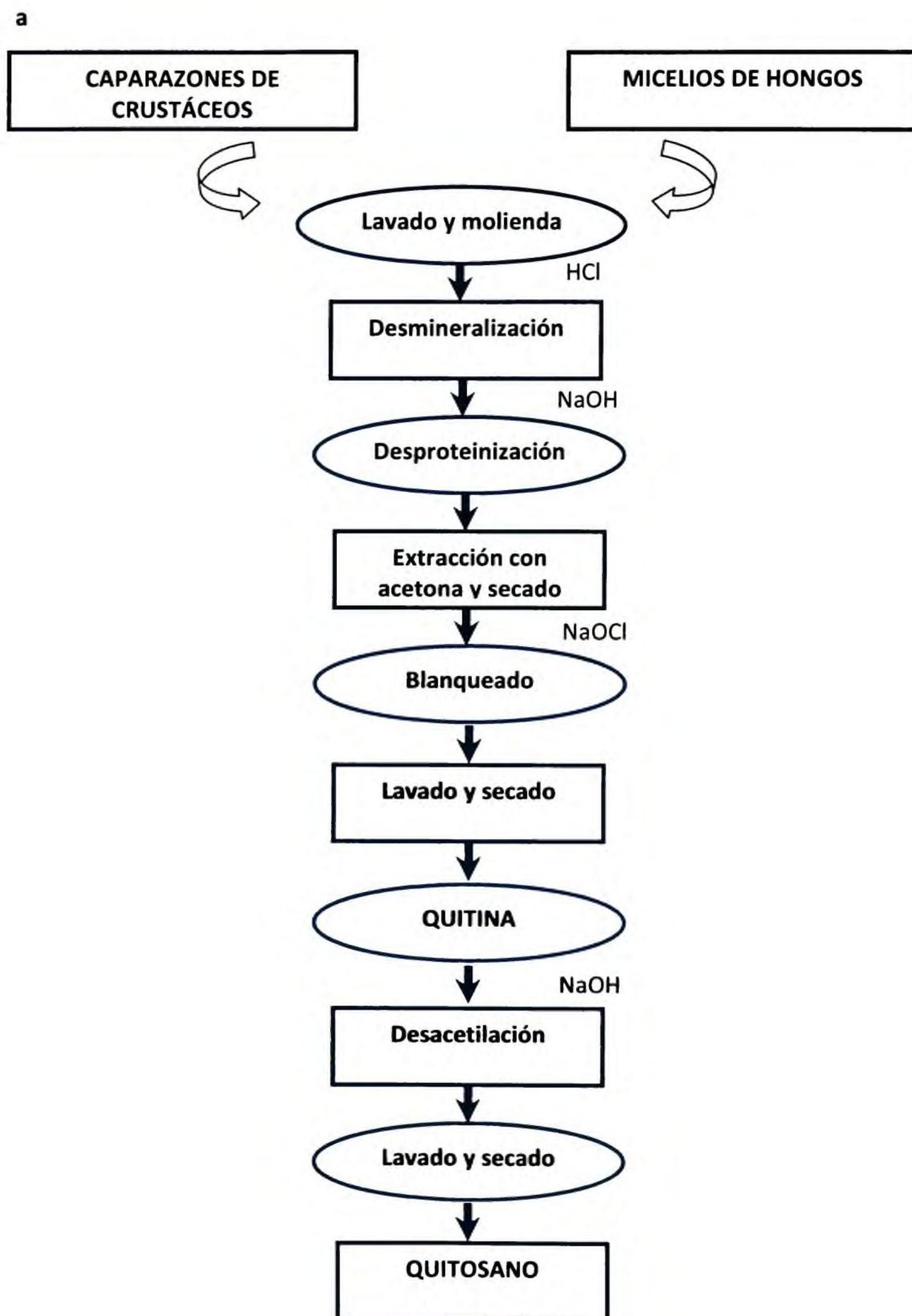
Por las diversas propiedades funcionales que posee el quitosano, su producción a gran escala constituye una alternativa prometedora para numerosas aplicaciones en diferentes campos. Se ha investigado su comportamiento como agente quelante de metales, así como su carácter filmogénico en el área de cosmética (Ravi Kumar, 2000). También ha sido utilizado en la industria papelera y textil, además del tratamiento de aguas residuales (Pinotti y col., 2001). El quitosano ha sido aprobado como aditivo alimentario en Japón y Korea en 1983 y 1995, respectivamente, donde está permitido su uso en la industria alimentaria como ingrediente funcional y aportante de fibra (No y col., 2007).

Por otra parte, su capacidad de asociarse a grasas, permite su empleo como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos (Shahidi y col., 1999). En el campo de la biomedicina se ha utilizado debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas (Ravi Kumar y col., 2004).

Por su carácter catiónico y sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha recibido particular atención en la industria farmacéutica dado su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos (Illum, 1998). Se lo ha empleado como vehículo en la encapsulación de fármacos y se ha comprobado su efectividad en la protección y liberación de componentes activos en forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio.

Características tales como dureza, biodegradabilidad y bioactividad hacen de la quitina y del quitosano materiales que pueden ser empleados para modificar o controlar las propiedades funcionales de los alimentos, ya sea como regulador de formación de cristales de hielo en alimentos congelados, agente espesante, texturizante, quelante, emulsificante y estabilizante (Knorr, 1982, 1984).

La Figura 1.2 muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de quitosano a partir de quitina. Como ya se mencionó, la quitina se extrae principalmente de los exoesqueletos de crustáceos, y en menor escala de los micelios de hongos y de la pluma de calamar. El proceso comienza con el acondicionamiento de la materia prima, el cual consiste en el lavado con agua de los caparzones de crustáceos (generalmente de cangrejos o camarones) a procesar y separación de los restos indeseables que pueden quedar adheridos a los mismos. Posteriormente se procede a su molienda hasta el obtener el tamaño de partículas adecuado para la extracción. Para la desmineralización se emplean soluciones diluidas de HCl a temperatura ambiente, ya que el principal componente inorgánico de los caparzones de los crustáceos es el CaCO_3 . Se realiza luego la desproteización de los exoesqueletos, con una solución acuosa diluida de NaOH a una temperatura entre 60 y 100°C. Estos tratamientos previos no eliminan la coloración de los caparzones que se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como astaxantina, cantaxantina, astaceno, luteína y β -caroteno, motivo por el cual su extracción se realiza a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de éstos solventes. Estos pigmentos son utilizados como aditivos alimentarios naturales en pescados como por ejemplo, el salmón.



b

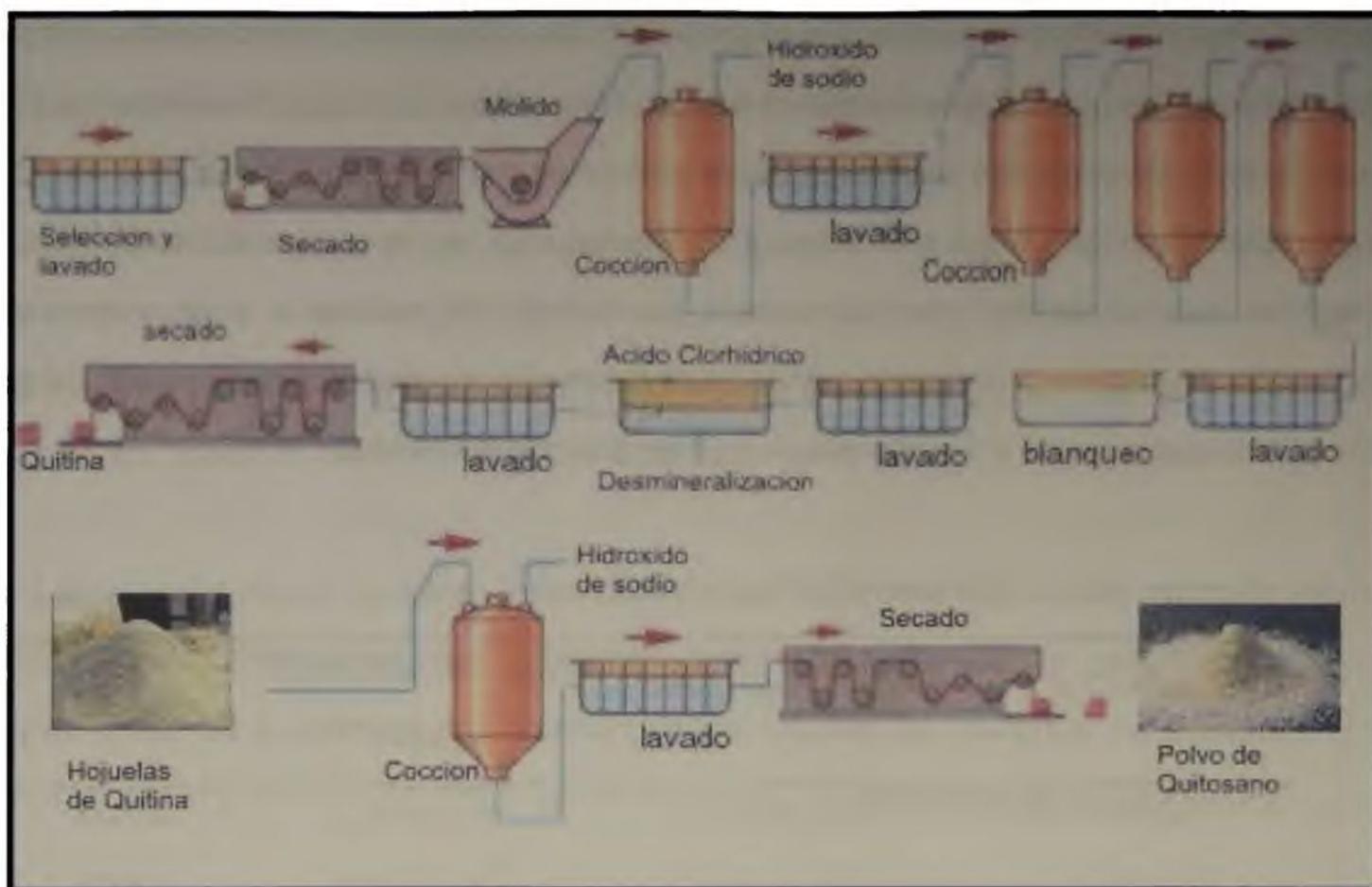


Figura 1.2 (a) Diagrama de flujo de proceso de extracción de la quitina y posterior obtención del quitosano. Adaptado de Aranaz y col. (2009); **(b)** Diagrama de Proceso para la obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de camarón.

La etapa final del diagrama de flujo comprende el proceso de desacetilación de la quitina. El mismo se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Para la obtención del quitosano, el grupo N-acetilo debe ser removido sin la hidrólisis del polisacárido, razón por la cual los métodos alcalinos son los más empleados. Generalmente la reacción se realiza utilizando soluciones concentradas de NaOH o KOH (40-50%) a temperaturas superiores a 100°C, preferentemente en atmósfera inerte o en presencia de sustancias reductoras (NaBH₄ o tiofenol) para evitar la depolimerización del polímero. Las condiciones específicas de la reacción dependerán de diversos factores, tales como el material de origen, el tratamiento previo, y el grado de desacetilación deseado.

Dado que el quitosano es un polímero natural no se puede esperar una composición única, presentando una gran variabilidad en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas. Con el fin de controlar la calidad de los materiales suministrados y conocer las características de mayor relevancia, se realizó una caracterización completa de los materiales base a partir de

los cuales se desarrollaron las películas biodegradables objeto del presente trabajo de Tesis. Resulta imprescindible explicitar las razones de las diferencias mencionadas entre las distintas partidas: i) la utilización de un insumo importado, con especificaciones escasas e insuficientes por parte del proveedor, ii) la existencia natural de la variabilidad debido al origen biológico de la materia prima, las variaciones en la composición química del quitosano que se deben esencialmente a las fuentes de quitina y a los procesos de obtención empleados por el proveedor, iii) el desarrollo del trabajo de Tesis a lo largo de varios años que requirió el uso de quitosanos de partidas diferentes.

Así, los objetivos planteados para este Capítulo fueron:

- ❖ Caracterizar quitosanos comerciales obtenidos de caparazones de cangrejos y camarones a través del estudio de su composición química y de sus principales propiedades fisicoquímicas.

1.2 MATERIALES

El quitosano (Q) empleado fue adquirido a SIGMA (EEUU). El producto se presenta en escamas con grados de desacetilación (DD) de 75 y 85% especificados por el fabricante. Durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis se utilizaron diferentes lotes de quitosano con distintas especificaciones pero bajo la misma codificación del proveedor, siendo entonces imprescindible su caracterización. Estos quitosanos con diferentes DD serán nombrados de aquí en adelante como Q75 y Q85.

1.3 METODOLOGÍA Y RESULTADOS OBTENIDOS

1.3.1 Caracterización del polímero base

La humedad de las muestras de Q en polvo se determinó a través del método indirecto, es decir efectuando la medición de la pérdida de peso luego del secado de la muestra en estufa a una temperatura de 105°C hasta alcanzar peso constante. Los resultados se expresaron en base seca como gramos de agua por cada 100 g de muestra seca.

El contenido de cenizas se determinó de acuerdo al método descrito por Harbers (1998). Para ello se utilizaron cápsulas de porcelana previamente secadas en estufa a 105°C

y calcinadas en mufla. La muestra se carbonizó sobre triángulo de pipa o tela metálica hasta la obtención de un residuo carbonoso. La calcinación del residuo se realizó en una mufla a 500-550°C hasta obtener cenizas blancas. Posteriormente la muestra se enfrió en un desecador y se pesó a temperatura ambiente, expresándose los resultados como porcentaje de cenizas.

Asimismo, se determinó el contenido de nitrógeno de las muestras de quitosano mediante el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning de acuerdo con el protocolo propuesto por la AOAC (1999). Se pesaron aproximadamente 0,5 g de quitosano y se procedió a la digestión de la muestra. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Tabla 1.1 Composición de los quitosanos utilizados con distinto DD %

	Contenido humedad % (b.s)	% Nitrógeno Total	% Cenizas
Q75%	6,83 (0,20) ^a	7,36 (0,04) ^a	0,90 (0,02) ^a
Q85%	9,15 (0,04) ^b	7,59 (0,07) ^b	0,92 (0,03) ^a

DD: grado de desacetilación informado por el proveedor. Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis; letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados de composición para ambos quitosanos se detallan en la Tabla 1.1. Los valores obtenidos para el contenido de cenizas de las muestras fueron bajos, lo que es indicativo de la eficiencia del proceso de desmineralización empleado por el fabricante, debido a que los caparzones contienen alrededor de un 30% de minerales, principalmente atribuidos a la presencia de carbonato de calcio (Aranaz y col., 2009)

Tanto la quitina como el quitosano poseen un grupo amino en su estructura molecular básica, lo que explica la presencia de nitrógeno. Se ha determinado que la quitina posee aproximadamente un 6,89% de nitrógeno (Ravi Kumar, 2000). Sin embargo valores más altos se encontraron para el quitosano con relación al valor informado para la quitina. Esto se explica teniendo en cuenta el efecto de concentración producido con la remoción de los grupos acetilo. En el caso de quitosano con un grado de desacetilación del 85% se obtuvo un mayor porcentaje de nitrógeno debido a una mayor remoción de grupos acetilos respecto del quitosano con un grado de desacetilación (DD) del 75%, siendo este resultado coherente con lo mencionado anteriormente.

También se considera que la eliminación de grupos acetilo como resultado de la desacetilación termoalcalina de la quitina genera grupos amino libres en la cadena polimérica, siendo éstos sitios sensibles para la formación de puentes de hidrógeno con moléculas de agua.

1.3.2 Determinación del peso molecular del quitosano

Una de las técnicas más utilizadas en la determinación experimental del peso molecular de un polímero es la viscosimetría. Se trata de un procedimiento que mediante una instrumentación sencilla permite conocer el peso molecular promedio viscosimétrico (M_v) (Ravi Kumar, 2000).

La viscosidad de las soluciones de polímeros de cadena lineal es elevada debido a su tamaño y al volumen hidrodinámico que ocupan, experimentando así gran resistencia al movimiento. La viscosidad de un polímero en disolución depende de la naturaleza del polímero y del disolvente, de la distribución de pesos moleculares, de la concentración y de la temperatura.

Para determinar el peso molecular de los polímeros provenientes de distintas partidas se utilizó un viscosímetro capilar tipo Cannon-Fenske. Las muestras de quitosano se prepararon por disolución en una mezcla de ácido acético 0,1 M y cloruro de sodio 0,2 M (Ravi Kumar, 2000). Si bien la concentración inicial del polímero fue $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$ en todos los casos, el método requiere la utilización de soluciones diluidas, cuyo comportamiento sea Newtoniano (Tabla 1.2). Las mediciones se realizaron en un cuarto de temperatura controlada a 20°C . Los valores informados son el promedio de tres replicados.

La relación entre la viscosidad y el peso molecular del polímero está dada por la Ec. 1.1:

$$[\eta] = K (M_\eta)^a \quad \text{Ec. 1.1}$$

los parámetros K y a son denominados constantes de Mark-Houwink y dependen de la naturaleza del polímero, del disolvente y de la temperatura. K y a son coeficientes calculados empíricamente válidos para cada sistema soluto-disolvente en particular utilizando como referencia muestras de peso molecular conocido, a una temperatura específica. K es función de la polaridad del solvente y de las fuerzas intermoleculares entre el

soluto y el disolvente mientras que α permite estimar la flexibilidad de la macromolécula y su conformación en solución, es un factor de expansión que tiene en cuenta el cambio que la molécula de soluto experimenta en presencia del disolvente (Curvale y col., 2008). Estos parámetros se pueden obtener para algunos polímeros a partir de la bibliografía disponible (Khan y col., 2000; Ravi Kumar, 2000).

Para calcular la viscosidad intrínseca de los polímeros se obtuvieron los tiempos de recorrido o pasaje a través de un capilar entre dos marcas consecutivas de un conjunto de soluciones diluidas de distintas concentraciones. A su vez se determinó el tiempo de recorrido del disolvente puro utilizado para el ensayo. En la Tabla 1.2 se presentan a modo de ejemplo los tiempos correspondientes a las soluciones diluidas del polímero.

Tabla 1.2 Tiempos de recorrido para quitosano con un grado de desacetilación del 75%

Concentración (g cm ⁻³)	Tiempo de recorrido (s)
Solvente ^a	58,8
0,00625	62,59
0,0125	64,66
0,025	75,65
0,05	92,21
0,1	139,76

^a solvente utilizado (NaCl 0,2M y ácido acético 0,1M)

La viscosidad de un fluido se puede relacionar con el tiempo requerido para que un volumen determinado de disolución atraviese dos marcas sucesivas de un capilar por efecto de la gravedad. Esta relación puede obtenerse a partir de la ecuación de Hagen-Poiseuille (Painter y Coleman, 1994):

$$v = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 \eta l} \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde,

u es el flujo volumétrico del fluido, ΔP es la diferencia de presión que mantiene el flujo, r es el radio del capilar, η es la viscosidad y l es la longitud del capilar.

Teniendo en cuenta que u también puede expresarse como $u = V/t$, donde V representa el volumen de fluido desplazado, es posible hallar una expresión que relacione la viscosidad con el tiempo:

$$\eta = \frac{\pi \Delta P r^4 t}{8 V l} \quad \text{Ec. 1.3}$$

En el caso de soluciones, es frecuente medir la viscosidad por comparación con la del disolvente puro; los parámetros resultantes son la viscosidad relativa (η_r) y la viscosidad específica (η_{sp}), definidas mediante las expresiones:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \approx \frac{t}{t_0} \quad \text{Ec. 1.4}$$

$$\eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} \approx \frac{(t - t_0)}{t_0} \quad \text{Ec. 1.5}$$

donde,

η y η_0 son, respectivamente, las viscosidades de la disolución y la del disolvente puro, t es el tiempo medido entre dos marcas sucesivas en el capilar y t_0 el tiempo correspondiente al disolvente puro medido en el mismo capilar.

Para considerar el efecto de la concentración (c) en la viscosidad, se pueden utilizar otros dos parámetros, conocidos como viscosidad reducida (η_{red}) y viscosidad inherente (η_{inh}):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \approx \frac{(t - t_0)}{t_0} \frac{1}{c} \quad \text{Ec. 1.6}$$

$$\eta_{inh} = \frac{(\ln \eta_r)}{c} \quad \text{Ec. 1.7}$$

La relación entre la viscosidad y la concentración fue demostrada empíricamente por Huggins (1942) y Kramer (1938) y puede ser descrita mediante las expresiones:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} \approx [\eta] + k_H [\eta]^2 c \quad \text{Ec. 1.8}$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} \approx [\eta] + k_k [\eta]^2 c \quad \text{Ec. 1.9}$$

donde,

k_H y k_k son las constantes de Huggins y Kramer, respectivamente.

Para soluciones diluidas, las curvas se aproximan a dos rectas que, extrapoladas a concentración nula, coinciden en el parámetro $[\eta]$. Este parámetro conocido como viscosidad intrínseca, expresada como $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, es una medida del volumen hidrodinámico que ocupan las macromoléculas en solución y por tanto un reflejo de su tamaño y es por ello que está directamente relacionado con el peso molecular del polímero en disolución (Ec. 1.1). En la Figura 1.3 a y b se muestran las viscosidades inherentes y reducidas en función de la concentración de quitosano para un grado de desacetilación del 75 y 85%, respectivamente, obteniéndose un buen ajuste de los datos experimentales con los calculados con las Ec. 1.8 y 1.9.

A partir de los datos extraídos de la Figura 1.3 se calcularon las viscosidades intrínsecas obteniéndose valores de 904,31 y 934,12 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ para Q75 y Q85, respectivamente.

Finalmente, se aplicó la Ecuación 1.1 siendo las constantes utilizadas $K = 1,81 \cdot 10^{-3}$ ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) y $a = 0,93$ seleccionadas a partir de la bibliografía consultada (Abd-Elmohdy y col., 2010; Bravo-Osuna y col., 2007; Gupta y Jabrail, 2006; Khan y col., 2000; Ravi Kumar, 2000).

Así, los pesos moleculares obtenidos fueron de $1,35 \cdot 10^6 \text{g mol}^{-1}$ y $1,38 \cdot 10^6 \text{g mol}^{-1}$ para Q75 y Q85, respectivamente. Estos valores son similares a los informados por Santos y col. (2006) quienes caracterizaron quitosanos comerciales del mismo origen y con similares grados de desacetilación.

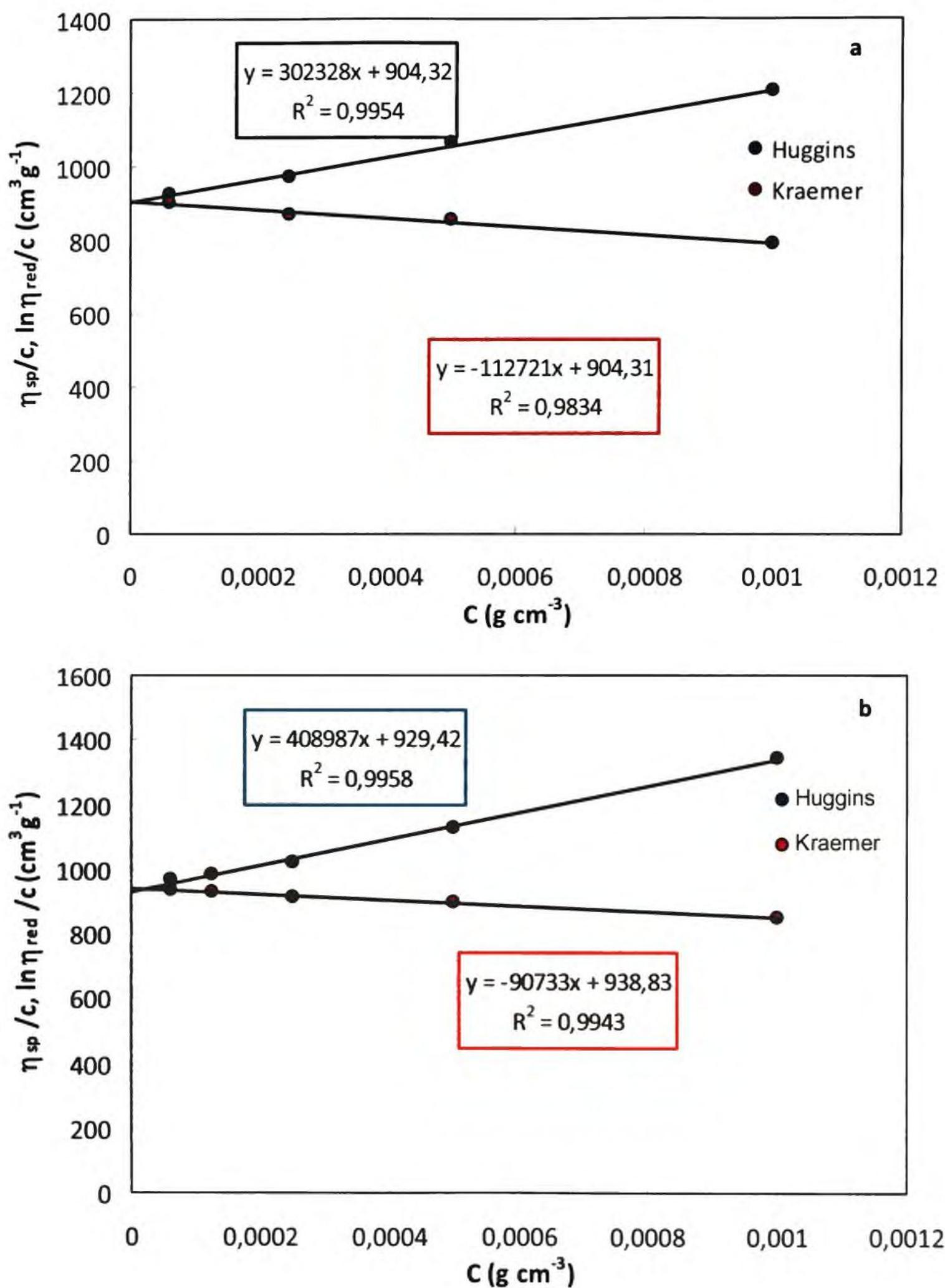


Figura 1.3 Determinación gráfica de la viscosidad intrínseca de quitosanos comerciales con distintos grados de desacetilación: (a) 75% y (b) 85%.

1.3.3 Determinación del grado de desacetilación del quitosano por titulación potenciométrica

El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo que se denomina grado de desacetilación (DD) y está estrechamente vinculado con su solubilidad. Existen numerosos métodos basados en diversas técnicas para determinar esta propiedad que caracteriza al quitosano. Entre estas, podemos destacar la espectroscopía de infrarrojo la cual desarrollaremos más adelante (Brugnerotto y col., 2001; Kumirska y col., 2010), la espectroscopía de UV (Kumirska y col., 2010; Muzzarelli y Rocchetti, 1985), la espectroscopía de RMN (Duarte y col., 2001; Kumirska y col., 2010) y la conductimetría (Raymond y col., 1993). A pesar de la diversidad de métodos informados para la determinación del contenido de grupos amino libres, se seleccionó la titulación potenciométrica para los quitosanos comerciales por tratarse de un método rápido y de bajo costo, que requiere de equipamiento y reactivos fácilmente disponibles en el laboratorio (Abdou y col., 2008). Se utilizó un pHmetro HACH Instrument modelo EC30 (EEUU), equipado con un electrodo de vidrio combinado. La muestra se preparó disolviendo 0,5 g de Q en 20 ml de HCl 0,3 M, y se tituló con una solución valorada de NaOH 0,0773 M, registrando el pH de la solución para diferentes volúmenes de titulante agregado. El punto final de la titulación se determinó a través del método de la derivada primera obtenida a partir de la curva de titulación. La potencimetría es un método útil siempre que el material a estudiar sea completamente soluble, ya que permite determinar el contenido de grupos aminos libres y en consecuencia el DD. Tiene la ventaja de que cuantifica los grupos aminos protonados directamente, por lo que no existe el problema de la no accesibilidad de los grupos aminos durante la etapa de protonación, como resultado de la formación de la sal (Hidalgo y col., 2009).

La Figura 1.4a y b muestra las curvas de titulación obtenidas para las muestras de quitosanos Q75 y Q85, respectivamente. Las curvas presentan dos puntos de inflexión; los volúmenes de NaOH correspondientes se determinaron según el método gráfico de la primera derivada, como se muestra en el detalle de la Figura 1.4.

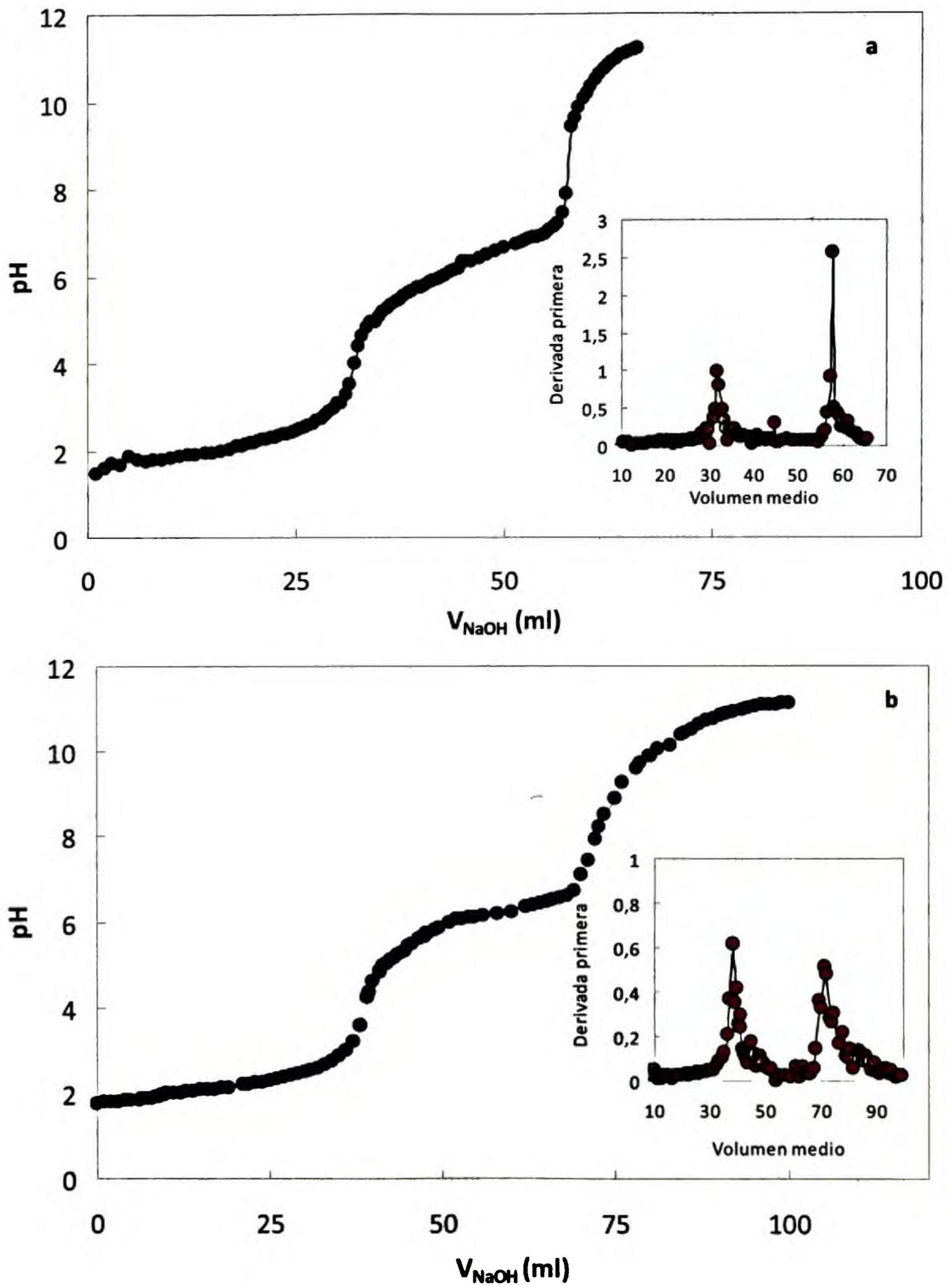


Figura 1.4. Curva de titulación para quitosanos comerciales (a) Q75 y (b) Q85. En el recuadro inserto se muestra la primera derivada; los máximos corresponden a los puntos de inflexión.

Se observó que hacia al final de la titulación, a un pH básico (superior a 9), el quitosano precipitaba, debido a que los grupos amino se encontraban desprotonados y por lo tanto el polímero se volvió insoluble en este medio.

A partir de la diferencia entre los volúmenes correspondientes a los dos puntos de inflexión en la curva de titulación, se puede calcular la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano y conocer el grado de desacetilación. La concentración de este grupo se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$\%NH_2 = \frac{16,1 (y - x)}{w} f \quad \text{Ec. 1.10}$$

donde,

y es el punto de inflexión mayor, x corresponde al punto de inflexión menor, ambos expresados como volúmenes en ml, f es la molaridad de la solución de NaOH, w el peso de la muestra (expresado en g) y 16,1 es el peso equivalente del quitosano (expresado en g/equivalente). Este valor está relacionado al peso del grupo amino (-NH₂) (Abdou y col., 2008). El análisis se realizó por triplicado, habiéndose obtenido los resultados que se presentan en la Tabla 1.3

Tabla 1.3 Porcentaje de grupos amino de quitosanos comerciales

Contenido de grupos amino (% NH ₂)	Q75	Q85
Experimental*	77, 19 (2,21) ^a	86,25 (0,47) ^b
Proveedor	75 ^a	85 ^b

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

El porcentaje de grupos amino indica la cantidad de grupos acetilo removidos de la molécula de quitina debidos especialmente al tratamiento con hidróxido de sodio. Los valores obtenidos mediante esta metodología resultaron levemente mayores que los informados por el proveedor, aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

1.3.4 Propiedades térmicas estudiadas por calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) constituye una técnica adecuada para la caracterización de las propiedades térmicas y la determinación de las transiciones de fase de materiales poliméricos. Se registra el flujo de calor hacia y desde el polímero en función del tiempo y la temperatura. Este flujo se mide empleando un equipo que mantiene un equilibrio térmico entre la referencia y la muestra mientras ambas son sometidas a un programa de calentamiento o enfriamiento controlado. Es decir, el equipo mide la diferencia de energía entregada (o eventualmente extraída) a la muestra para mantenerla a la misma temperatura que la de referencia. El área bajo la curva del termograma obtenido representa una medida directa del calor involucrado en la transición. Los cambios entálpicos son registrados como eventos endotérmicos o exotérmicos, según el proceso que sufra la muestra. A partir de dichos termogramas se determinan las entalpías de las transiciones ΔH (J g^{-1}) y las temperaturas a las que ocurren las mismas. En términos de calor latente, la transición vítrea es a menudo referida como una transición de fase de segundo orden que ocurre sin liberación o absorción de calor latente. Pero debido a la naturaleza de no-equilibrio de dicha transición, es preferiblemente denominada como *cambio de estado* y no *de fase* (Liu y col., 2006). Asimismo, teniendo en cuenta que la transición vítrea involucra un rango de temperaturas y el valor medio de la transición depende de las condiciones experimentales a las que se realiza su determinación sobre el material ensayado, es también preferiblemente denominada *relajación y transición cinética* más que transición de segundo orden.

Las muestras fueron analizadas en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments, EEUU, Figura 1.5). Se utilizaron patrones de indio y zafiro para la calibración del equipo. Para el ensayo, muestras en polvo de quitosano (3-5mg) se colocaron en cápsulas de aluminio, las que se cerraron herméticamente. Como referencia se empleó una cápsula vacía. Los parámetros vinculados al proceso se determinaron con el Universal Analysis V1.7F software (TA Instruments).

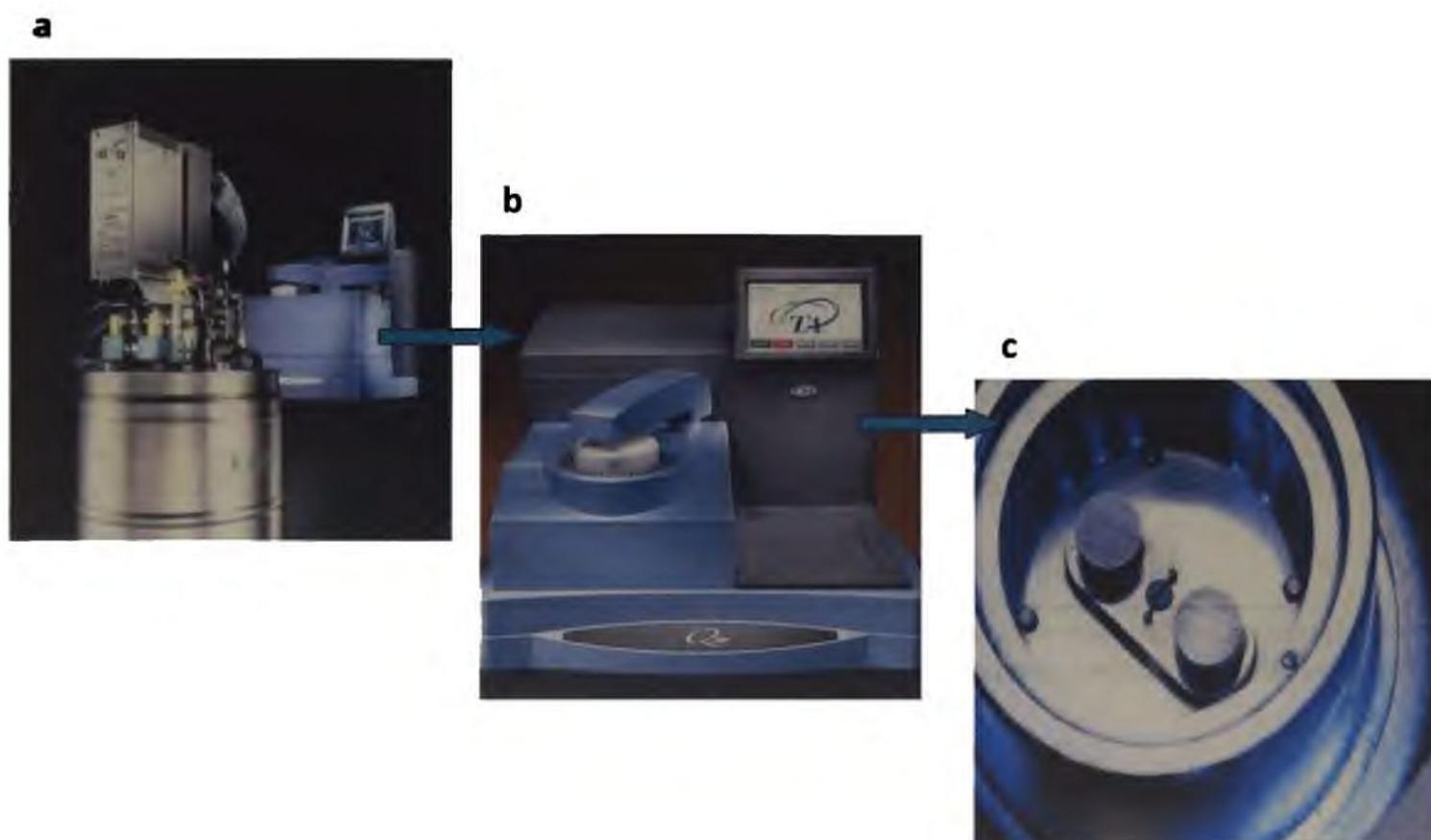


Figura 1.5 Fotografías del calorímetro diferencial de barrido utilizado acoplado a un sistema de enfriamiento (a, b), vista del horno del equipo donde se ubican la cápsula con la muestra y la de referencia (c).

Los análisis de DSC se realizaron a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ en un intervalo de temperaturas de -80 a 200°C . Luego de que el primer barrido fue completado, se procedió al enfriamiento de la muestra hasta alcanzar una temperatura de -100°C donde se programó una isoterma durante 5 minutos para estabilizar el sistema. Posteriormente se registró una segunda corrida en el rango de temperaturas de -100° hasta 350°C con el objeto de alcanzar la temperatura de descomposición del polímero.

La Figura 1.6 muestra la primera y segunda corridas realizadas en el DSC de muestras de Q75 y Q85. En la primera corrida, la temperatura máxima ensayada de 200°C fue seleccionada para limitar la posible degradación del polímero. La energía absorbida durante el primer proceso corresponde a la energía requerida para vaporizar el agua que se encuentra fuertemente asociada al quitosano. Por lo tanto, las variaciones en cuanto a la posición del pico endotérmico reflejan diferencias en la capacidad de absorción de humedad asociado a la interacción polímero-agua.

En la Tabla 1.4 se presenta la información obtenida a partir del análisis de los termogramas de Q con DD del 75 y 85%. Los mismos muestran un evento endotérmico (T_p)

alrededor de 144 y 147°C asociado a la remoción de agua del polímero, y un evento exotérmico correspondiente a la temperatura de descomposición (T_d) del quitosano, respectivamente (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Propiedades térmicas del quitosano

	Evento endotérmico		Evento exotérmico	
	T_p (°C)	ΔH (J g ⁻¹)	T_d (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
Q75	143,93 (2,52) ^a	195,4 (8,98) ^a	308,48 (2,26) ^a	181,3 (5,23) ^a
Q85	147,22 (3,61) ^a	240,4 (7,14) ^b	310,34 (0,65) ^a	196,1 (4,31) ^b

* Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

Resultados similares fueron informados por Kittur y col. (2002) trabajando en la caracterización de muestras de quitina y quitosano con distintos grados de desacetilación. Los autores encontraron una correlación entre el DD y el área del pico endotérmico; a mayor DD mayor entalpía asociada a la transición. Los autores señalaron que los polisacáridos poseen una fuerte afinidad por las moléculas de agua. En el caso de la quitina las moléculas de agua se asocian a los grupos oxhidrilos pero con el proceso de desacetilación o remoción de grupos acetilos se crean nuevos sitios hidrofílicos, lo que explicaría los mayores valores de entalpía asociado a los eventos endotérmicos.

Por otra parte, Guinesi y Cavalheiro (2006) también establecieron una relación entre el área del pico de descomposición de la muestra y el grado de desacetilación del quitosano. Los autores encontraron que mayores valores de entalpía se correspondieron con mayores DD, resultados que concuerdan con los obtenidos en este trabajo de Tesis (Tabla 1.4).

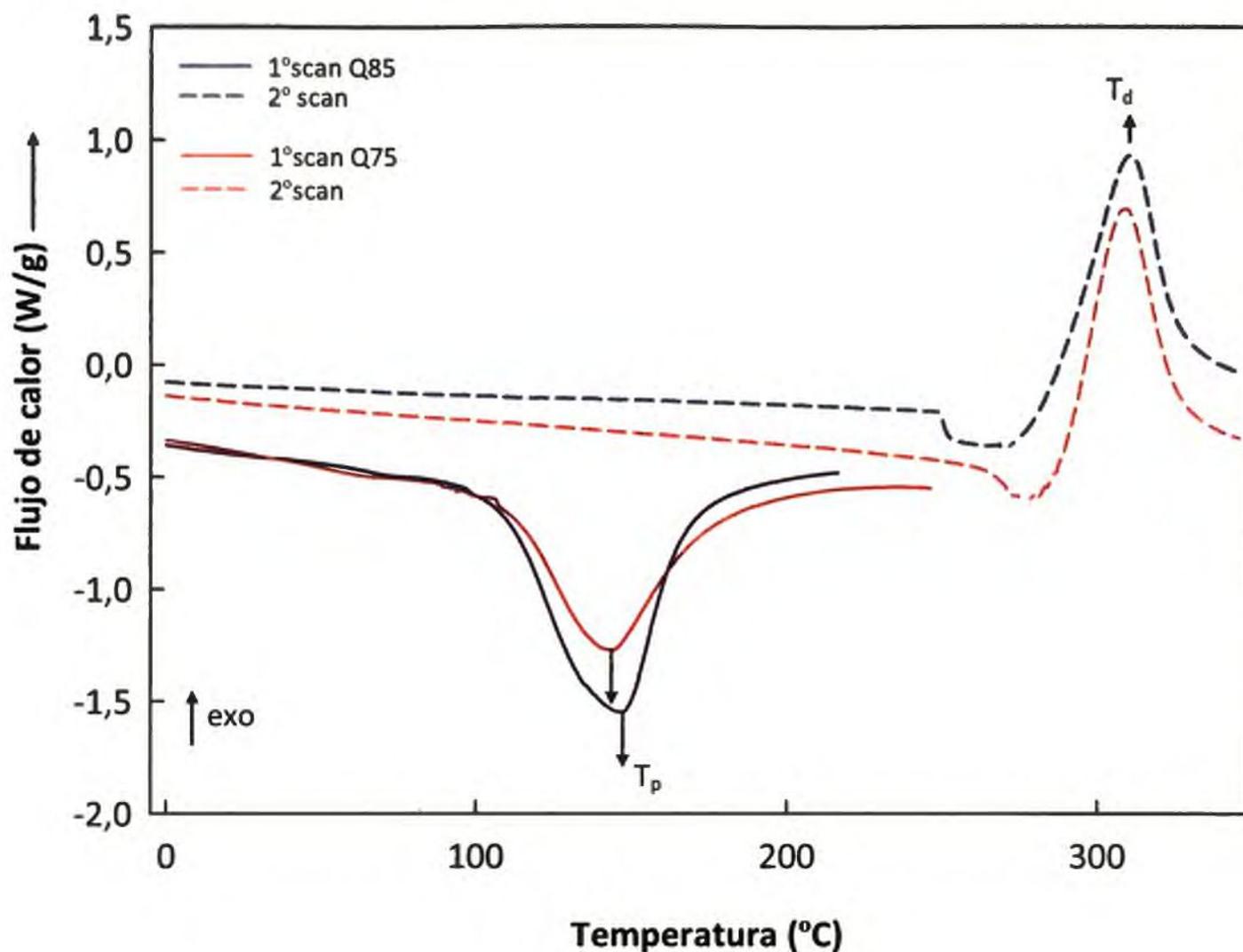


Figura 1.6 Termogramas de quitosanos con diferentes grados de desacetilación, obtenidos mediante la técnica de DSC.

1.2.5 Difracción de rayos X

Los materiales sólidos pueden ser cristalinos, semicristalinos o amorfos. Los cristalinos presentan un ordenamiento periódico de sus átomos, iones o moléculas. Las técnicas de difracción de rayos X sirven para determinar la estructura microscópica detallada de un material.

El fundamento del método radica en que la distancia entre los átomos, iones o moléculas empaquetados de forma regular en un cristal es del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de los rayos X, por lo que de acuerdo con las leyes de la óptica, estos cristales pueden producir fenómenos de difracción. El cristal funciona como una rejilla de tres dimensiones.

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética que tiene una alta energía y consecuentemente longitudes de onda muy cortas, del orden de las distancias atómicas de los sólidos, entre 0,1 y 1 nm. Cuando un haz incide sobre un material sólido, una porción de

éste se dispersará en todas las direcciones por los electrones asociados a cada átomo o ión que está dentro del camino del haz (Figura 1.7). Cuando un haz incide en un cristal, el que es mantenido en un montaje especial que permite la rotación del mismo con respecto al haz incidente, ocurre una difracción. La ley que describe la difracción de rayos X en término de reflexiones provenientes de los planos de un cristal se conoce como ley de Bragg,

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Ec. 1.11}$$

donde,

λ es la longitud de onda del haz irradiado, d el espaciado entre planos atómicos y θ el ángulo entre el haz difractado o incidente y el plano cristalográfico.

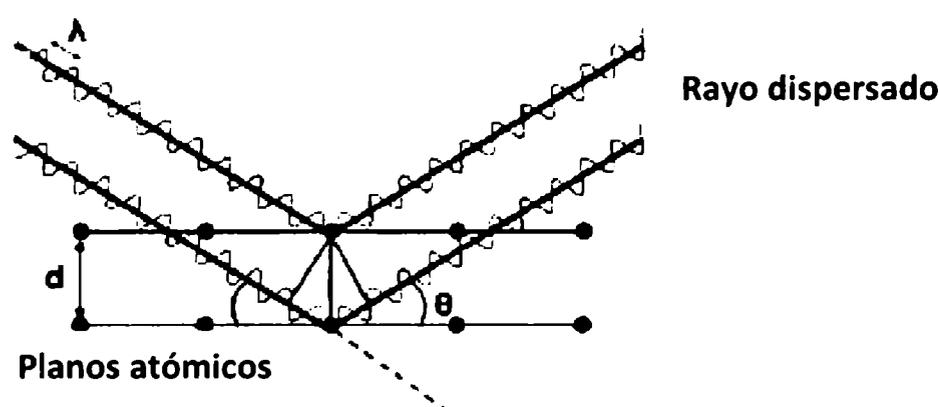


Figura 1.7 Esquema de la Ley de Bragg.

Representando la intensidad de radiación que llega al detector en función del ángulo θ aparecerá un pico cuando se cumpla la condición de Bragg (Ec.1.11). Su presentación se denomina espectro de difracción o difractograma. La distancia entre planos depende de las dimensiones de la celda unidad del cristal, y la intensidad obtenida del haz difractado es función de la posición de los átomos en la celda unidad.

Los patrones de difracción son considerados como “huellas digitales” de los materiales cristalinos; a partir de ellos se puede obtener información cuali y cuantitativa de la estructura cristalina del material.

La quitina, al igual que la celulosa, se encuentra en la naturaleza formando una matriz sólida hidratada compuesta por regiones amorfas donde se encuentran embebidas zonas cristalinas organizadas en forma de fibras fuertes. Estas fibras brindan soporte al exoesqueleto de los crustáceos y los insectos, al igual que a las paredes celulares de los

hongos. En dichas fibras las cadenas de quitina se encuentran empaquetadas y asociadas lateralmente mediante múltiples enlaces de hidrógeno.

Existen tres formas polimórficas en la quitina α , β , y la γ -quitina, las cuales difieren en la disposición de las cadenas poliméricas en las regiones cristalinas (Zhang y col., 2005). Varios estudios han sugerido que la forma γ -quitina podría ser una versión distorsionada de la α o la β en vez de una tercera forma polimórfica (Aranaz y col., 2009). La forma α es la más difundida, estudiada y estable, y se encuentra en los exoesqueletos de los artrópodos, en los hongos, y en los crustáceos específicamente en los caparzones de camarones y cangrejos (Figura 1.8), mientras que la forma β es casi exclusiva de la quitina proveniente de la pluma del calamar, de algunas diatomeas y de ciertas especies de las profundidades marinas. Ambas formas se pueden diferenciar mediante el análisis de sus difractogramas (Campana-Filho y col., 2007). Al igual que la quitina, el quitosano en el estado sólido presenta regiones cristalinas inmersas en una fase amorfa. Los patrones de difracción de rayos X de los polvos de quitosano con distinto grado de desacetilación se obtuvieron usando un equipo X'Pert Pro P Analytical Model PW 3040/60 (Holanda), utilizando la línea Cu K α (1.542 Å), con una diferencia de potencial de 40 kV y una densidad de corriente de 30mA. Las muestras se registraron entre 4-60° (2 θ).

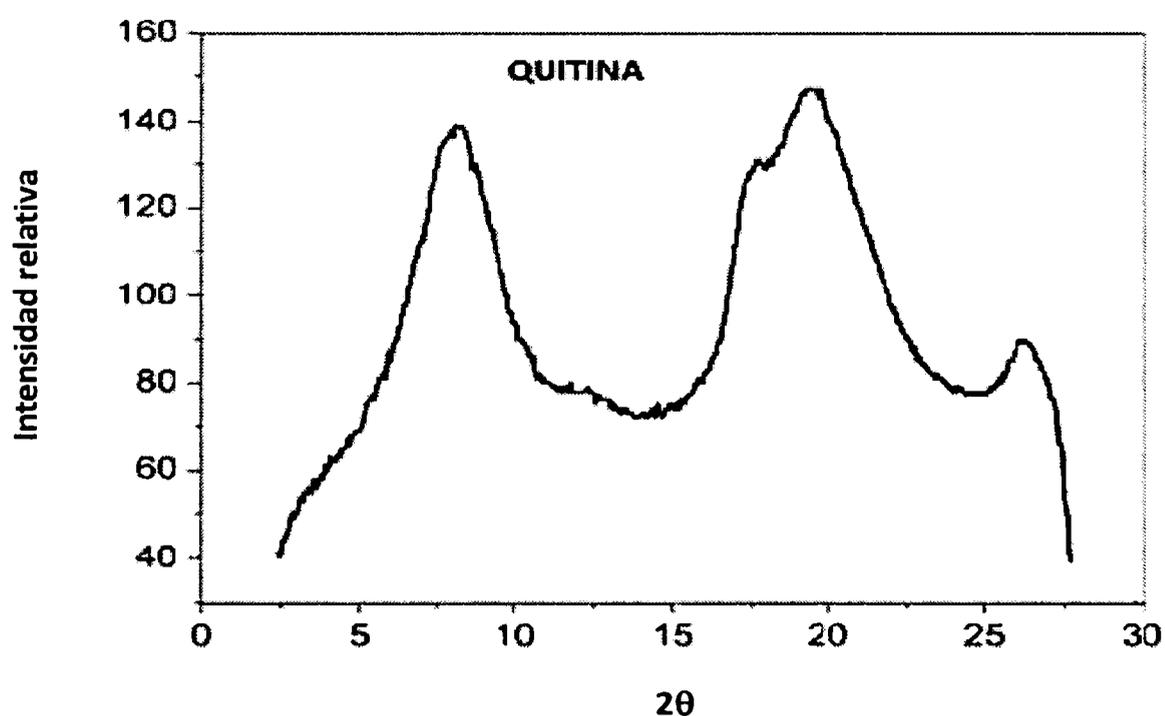


Figura 1.8 Espectro de difracción de rayos X obtenido de fibras de quitina. Adaptado de Muzzarelli y col. (2004).

La Figura 1.9 muestra los espectros de difracción de rayos X del Q75 y Q85. El quitosano con DD 85% presentó un amplio pico localizado en la región de $2\theta = 19,66^\circ$ y otro en la región de $2\theta = 10,26^\circ$. No se observaron diferencias cuando se analizó el difractograma del quitosano con DD 75% ya que los picos se encontraron en la región de $2\theta = 19,92^\circ$ y $2\theta = 10,08^\circ$.

A partir del análisis de los difractogramas es posible calcular el grado de cristalinidad (GC) del material; existen en la bibliografía diferentes formas de estimar este parámetro, siendo el método propuesto por Zhang y col. (2005,2006) el utilizado en el presente trabajo de Tesis. Este método considera la relación entre la intensidad de la máxima difracción localizada a $2\theta=13^\circ$ (I_{020}) y la contribución de la zona amorfa (I_{am}) medida a $2\theta=16^\circ$, y ha sido adaptado de la estimación de GC para la celulosa (Ludueña y col., 2012) debido a su similitud estructural.

$$GC = (I_{020} - I_{am}) * 100 / I_{020} \quad \text{Ec. 1.12}$$

Así, el grado de cristalinidad para las muestras Q75 fue del 21,4% mientras que para las de para Q85 resultó ser de 49,5%. A pesar de que es esperable que al aumentar el DD disminuya el GC, como ya se mencionó deben considerarse las posibles variaciones debido al origen y forma de extracción del material.

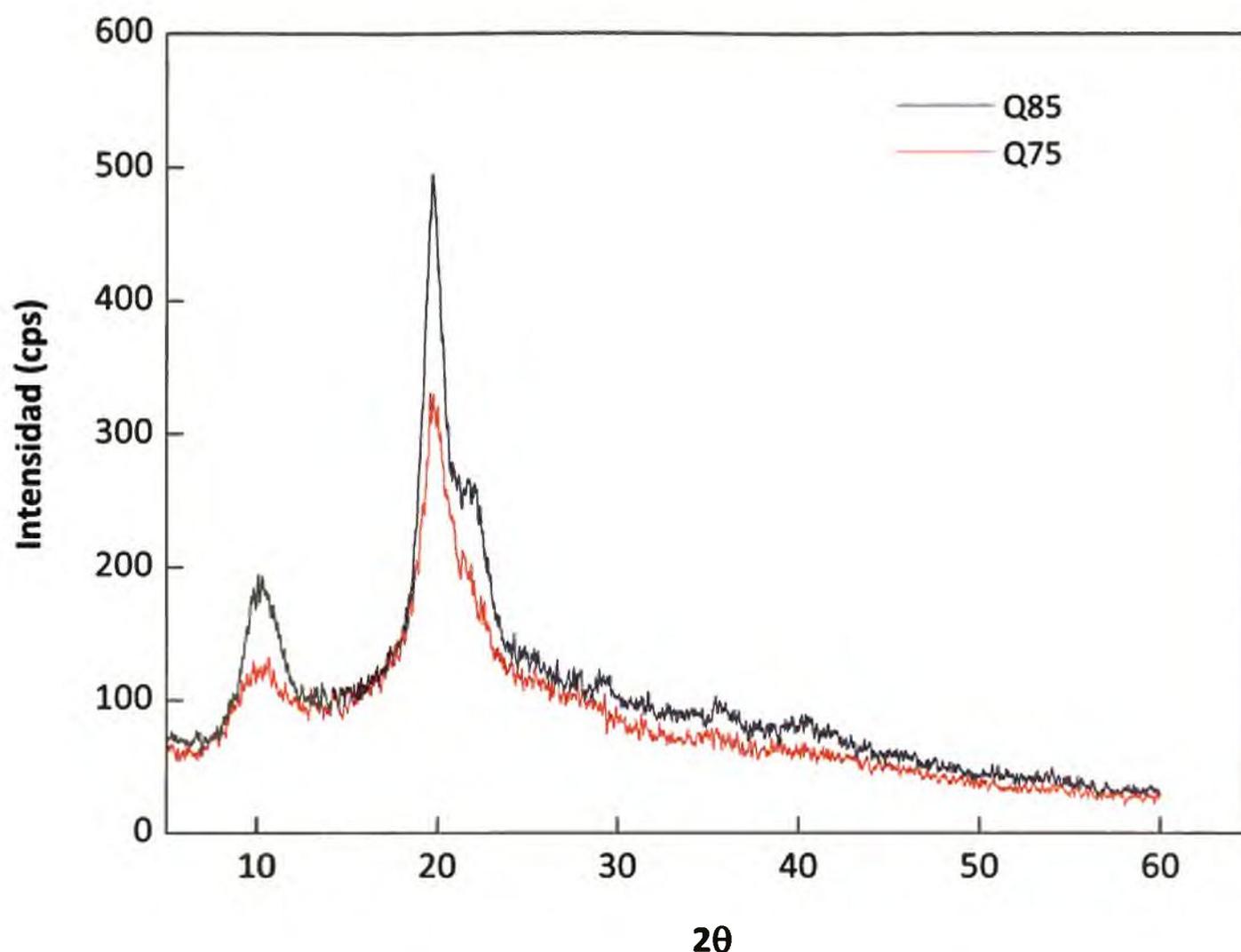


Figura 1.9 Difractogramas obtenidos para muestras de quitosano con diferente grado de desacetilación.

1.3.6 Análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo (IR) es una de las técnicas analíticas más importantes y utilizadas debido a que puede emplearse para establecer la identidad de un compuesto (Kumirska y col., 2010) ya que cada grupo funcional tiene un modo de absorción característico que se presenta en el espectro como un pico o banda y aporta información acerca del tipo de uniones que se establecen cuando se mezclan con otras sustancias. Se basa en la excitación de los modos de vibración de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja. Durante la excitación es necesaria una variación del momento dipolar de la molécula para que se produzca una absorción en el IR que puede asociarse a vibraciones de tensión (simétricas o asimétricas) o de flexión (Figura 1.10). Los espectros se pueden obtener indistintamente en función de la transmitancia o la absorbancia.

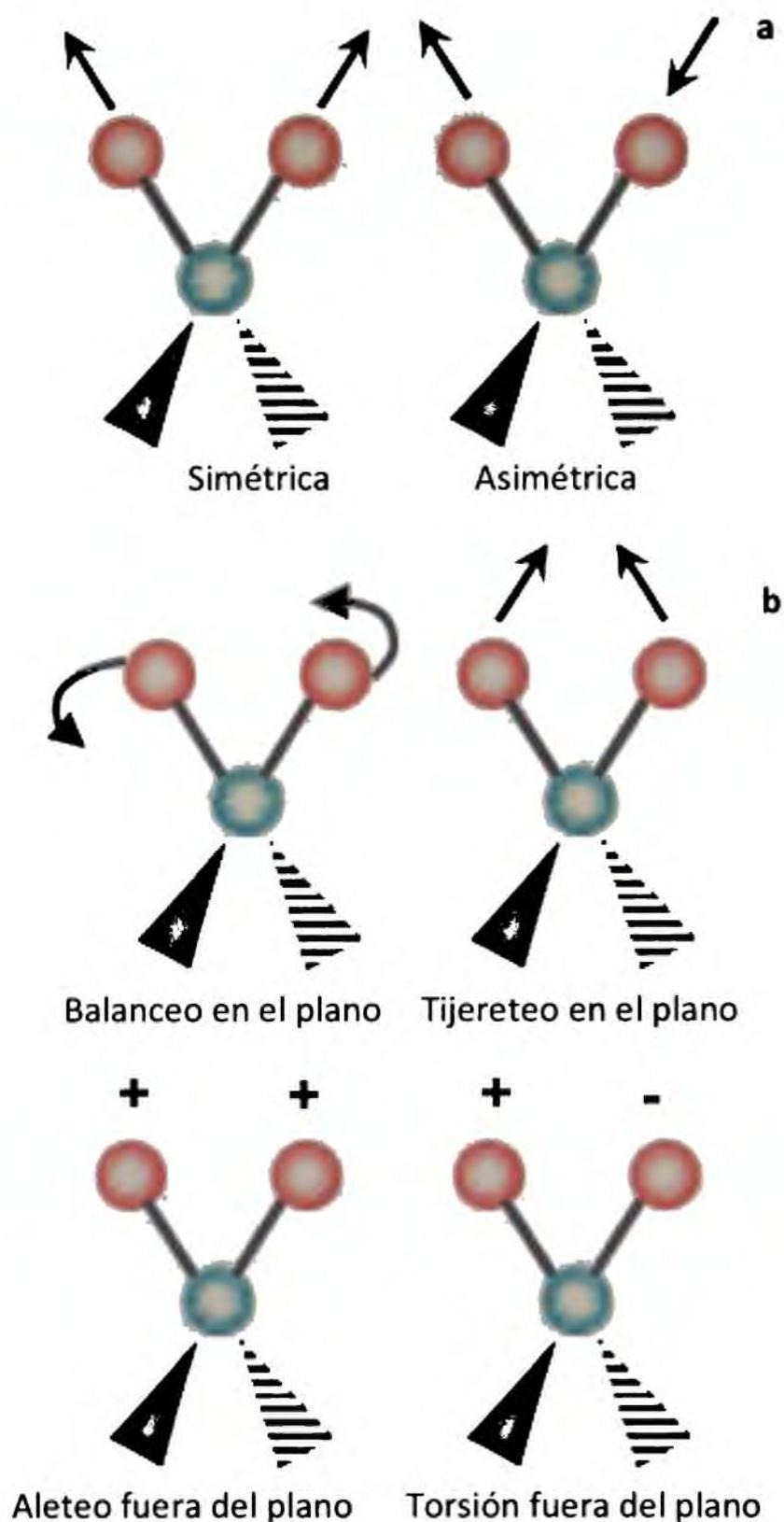


Figura 1.10. Clasificación de los tipos de vibraciones moleculares: (a) de tensión, (b) de flexión, (+) indica un movimiento desde el plano de la página hacia el lector; (-) indica un movimiento del plano alejándose del lector.

Las aplicaciones de las técnicas espectroscópicas, en particular la de FTIR, se centran en casos en los que se requiere un estudio de la estructura y composición del material y para evaluar los efectos del procesamiento. Es importante destacar que en el presente trabajo esta metodología resultó eficaz para estudiar las modificaciones estructurales inducidas en las matrices poliméricas de quitosano.

Para el análisis espectroscópico, las muestras de quitosano con diferente DD se molieron y se mezclaron con KBr, luego las mismas se comprimieron para obtener pastillas. Los espectros de FTIR se registraron en la región 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} en el modo de transmitancia realizando 60 escaneos por ensayo. Las determinaciones se efectuaron a temperatura ambiente.

En la Figura 1.11 se presentan los espectros FTIR obtenidos para las muestras de quitosanos comerciales ensayadas. Se pueden distinguir los picos característicos del compuesto. La región comprendida entre 3600 y 3000 cm^{-1} se debe al solapamiento del estiramiento de los grupos O-H y de los grupos N-H mientras que la zona 2920-2850 cm^{-1} al estiramiento del grupo C-H (simétrico y asimétrico) (Domszy y Roberts 1985; Dong y col., 2002). En 1650 cm^{-1} se observa el pico de la amida I correspondiente al estiramiento del C=O y en 1563-1596 cm^{-1} la banda de la amida II debida al estiramiento del grupo N-H. Además, las bandas entre 1485-1380 cm^{-1} corresponden al estiramiento asimétrico del C-H del grupo CH_2 y entre 1092-1031 cm^{-1} al estiramiento del puente de C-O-C del residuo de glucosamina. Los resultados encontrados concuerdan con los informados por Abdel-Fattah y col. (2007), Kumirska y col. (2010), Lertwattanaseri y col. (2009), Pranshanth y col. (2002), Zhang y col. (2005).

Además la técnica de FTIR permite determinar el grado de desacetilación del quitosano, siendo necesario especificar las condiciones tanto de ensayo como de análisis, si se desean realizar comparaciones. En este sentido, Brugnerotto y col (2001) realizaron una extensa investigación acerca de la diversidad de líneas de base que pueden ser empleadas.

A partir de los espectros obtenidos se determinó DD (%) del quitosano aplicando la ecuación descrita por Brugnerotto y col. (2001). Estos autores estimaron el DD (%) a través de la relación entre bandas de referencia como la de la amida III localizada a 1320 cm^{-1} y la banda correspondiente a la absorción de los grupos metilos localizada a 1420 cm^{-1} .

$$\text{DD (\%)} = 100 - [31,92 \times (A_{1320}/A_{1420}) - 12,20] \quad \text{Ec. 1.13}$$

donde,

A_{1320} representa el valor de absorbancia a 1320 cm^{-1} y A_{1420} corresponde a la absorbancia a 1420 cm^{-1}

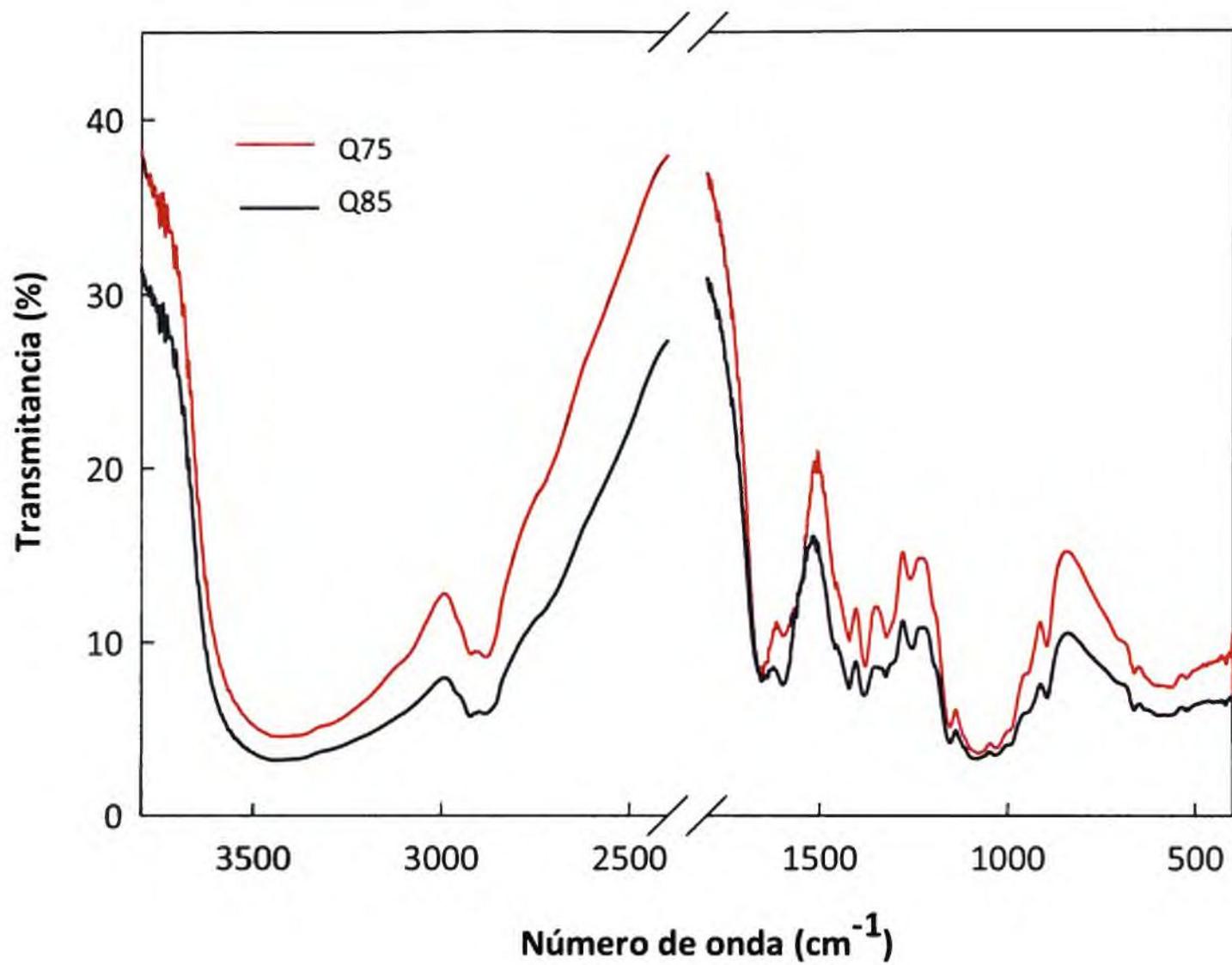


Figura 1.11 Espectro de FTIR de quitosanos comerciales con distinto DD (%).

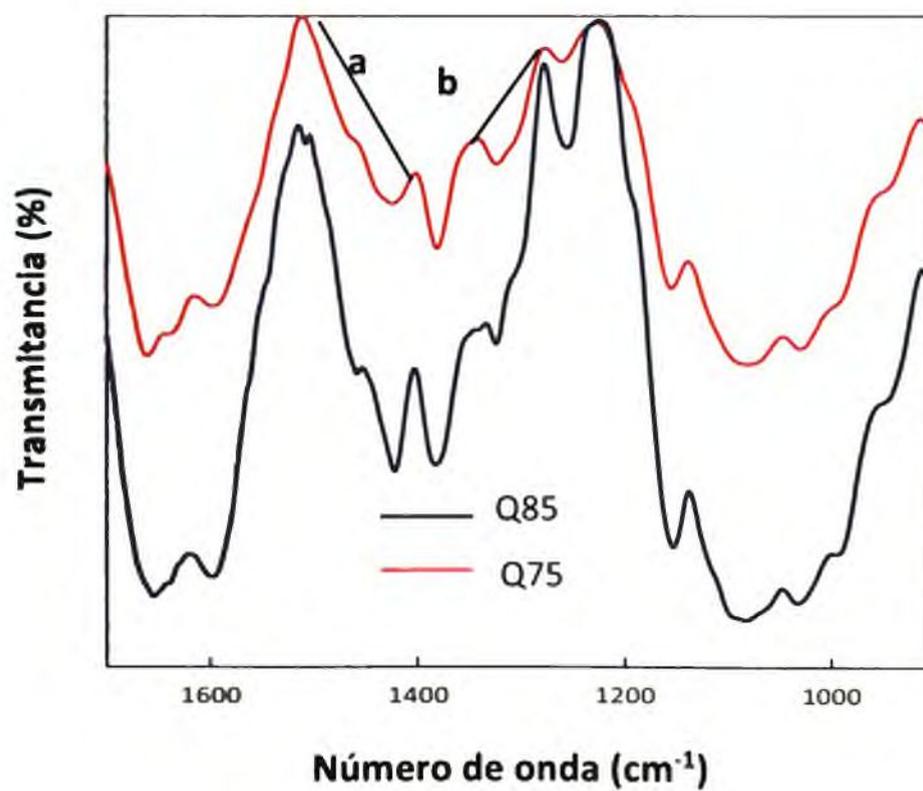


Figura 1.12 Zona espectral utilizada para el cálculo del DD de quitosanos comerciales. a y b corresponden a las líneas de base trazadas según el método de Brugnerotto y col. (2001).

En la Figura 1.12 se muestra la zona del espectro utilizada (entre 1000-1600 cm^{-1}) para el cálculo del grado de desacetilación y los picos correspondientes a la amida III (1320 cm^{-1}) y a los grupos metilo (1420 cm^{-1}). Los valores de DD (%) obtenidos aplicando la Ec. 1.13 indican un grado de desacetilación del 76,9 y 86,7% para las muestras Q75 y Q85, valores que no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) con los informados por el proveedor.

A modo de resumen, la caracterización del material base permitió confirmar que como era de esperar existe variabilidad entre los quitosanos utilizados. Sin embargo, los lotes con diferentes DD sólo presentaron diferencias significativas en los grados de cristalinidad, y contenidos de humedad, exhibiendo valores similares de viscosidades intrínsecas, pesos moleculares, ubicación de los picos de rayos X y de las bandas de los espectros FTIR.

Asimismo, en este estudio se confirmó que es común encontrar problemas de reproducibilidad de las características del quitosano comercial aún cuando se haya trabajado con la misma materia prima provista por el mismo fabricante, ya que deben considerarse los diferentes lotes de producción utilizados. Esto podría estar relacionado con la variabilidad intrínseca de la materia prima quitina, ya que puede provenir de diferentes partes de los exoesqueletos, y fundamentalmente porque proceden del descarte de la industria pesquera, y en estos desechos no hay discriminación de especie, edad y etapa de desarrollo.

REFERENCIAS

- Abd-Elmohdy F.A., El-said Z., Essam S., y Hebeish A. (2010).** Controlling Chitosan Molecular Weight via Bio-chitosanolsis. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 539-542.
- Abdel-Fattah W.I., Jiang T., El-Bassyouni G.E-T., y Laurencin CT. (2007).** Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microsphere matrices for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 3, 503-514.
- Abdou E.S., Nagy K.S.A., y Elsabee M.Z. (2008).** Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99, 1359-1367.
- AOAC. (1999).** Official Methods of Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Aranaz I., Mengíbar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., y Heras A. (2009).** Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology* 3, 203-230.
- Bravo-Osuna I., Ponchel G., y Vauthier C. (2007).** Tuning of shell and core characteristics of chitosan-decorated acrylic nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences* 30, 143-154.
- Brugnerotto J., Lizardi J., Goyoolea F.M., Argülles-Monal W., Desbrières J., Rinaudo M. (2001).** An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.
- Campana-Filho S.P., De Britto D., Curti E., Abreu F.R., Cardoso M.B., Battisti M.V., Sim P.C. y Lavall R.L. (2007).** Extraction, structures and properties of α - and β -chitin. *Química Nova*, 30, 644-650.
- Curvale R., Masuelli M., y Perez Padilla A. (2008).** Intrinsic viscosity of bovine serum albúmina conformers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42, 133-137.
- Domszy J.G., y Roberts G.A.F. (1985).** Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Die Makromolekulare Chemie* , 186, 1671-1677.
- Dong Y., Xu C., Wang J., Wu Y., Wang M., y Ruan Y. (2002).** Influence of degree of deacetylation on critical concentration of chitosan/dichlorocatic acid liquid crystalline solution. *Journal Applied Polymer Science*, 83, 1204-1208.

- Duarte M.L., Ferreira M.C., Marvao M.R., y Rocha J. (2001).** Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(5), 359-363.
- Guinesi L.S., y Cavalheiro E.T.G. (2006).** The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*, 444, 128-133.
- Gupta K.C., y Jabrail F.H. (2006).** Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 66, 43-54.
- Harbers L.H. (1998).** Ash Analysis. In: M.A.Gaithersburg. & S.S.Nielsen. *Food Analysis 2nd ed.:* (pp.141-165). Publishers Inc, Aspen.
- Hidalgo C., Fernández M., Nieto O.M., Paneque A.A., Fernández G., y Llopiz J.C. (2009).** Estudio de quitosanos Cubans derivados de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímero*, 10, 11-27.
- Huggins M.L. (1942).** The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. *Journal of the American Chemical Society*, 64 (11), 2716-2718.
- Illum L. (1998).** Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15, 1326-1331.
- Khan T., Peh K., y Ch'ng H. (2000).** Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 303-311.
- Kittur F.S., Harish Prashanth K.V., Udaya Sankar K., y Tharanathan R.N. (2002).** Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 49, 185-193.
- Knorr D. (1982).** Functional Properties of Chitin and Chitosan. *Journal of Food Science*, 47, 593-595.
- Knorr D. (1984).** Use of chitinous polymers in food, a challenge for food research and development. *Food Technology*, 38, 1-85.
- Kramer E.O. (1938).** Molecular weight of celluloses and cellulose derivates. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 30, 1200-1203.

- Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., y Stepnowski P (2010).** Review: Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs*, 8, 1567-1636.
- Lertwattanaseri T., Ichikawa N., Mizoguchi T., Tanaka Y., y Chirachanchai S. (2009).** Microwave technique for efficient deacetylation of chitin nanowhiskers to a chitosan nanoscaffold. *Carbohydrate Research*, 344, 331-335.
- Liu Y., Bhandari B., y Zhou W. (2006).** Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5701-5717.
- Ludueña L., Vázquez A., y Alvarez V. (2012).** Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 87, 411-421.
- Muzzarelli C., Francescangeli O., Tosi G., y Muzzarelli R.A.A. (2004).** Susceptibility of dibutryl chitin regenerated chitin fibers to deacetylation and depolymerization by lipasas. *Carbohydrate Polymers*, 56, 137-146.
- Muzzarelli R.A.A., y Muzzarelli C. (2005).** Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. *Advances in Polymer Science*, 186, 151-209.
- Muzzarelli R.A.A., y Rocchetti R. (1985).** Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, (6), 61-72.
- No H.K., Meyers S.P., Prinyawiwatkul W., y Xu Z. (2007).** Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A Review. *Concise Reviews/Hypotheses in Food Science*, 72(5), 87-100.
- Painter P.C., y Coleman M.M. (1994).** Fundamentals of Polymer Science, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, USA.
- Pillai C.K.S., Paul W., y Sharma C.P. (2009).** Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641-678.
- Pinotti A., Bevilacqua A., y Zaritzky N. (2001).** Comparison of the Performance of Chitosan and a Cationic Polyacrylamide as Flocculants of Emulsion Systems. *Journal of Surfactants and Detergents (AOCS)*, 4(1), 57-63.

- Pranshanth K.V.H., Kittur F.S., y Tharanathan R.N. (2002).** Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*, 50, 27-33.
- Ravi Kumar M.N.V. (2000).** A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., y Domb A.J. (2004).** Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104, 6017-6084.
- Raymond L., Morin F.G., y Marchessault R.H. (1993).** Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, 246(1), 331-336.
- Santos C., Seabra P., Veleirinho B., Delgadillo I., y Lopes da Silva J.A. (2006).** Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*, 42, 3277-3285.
- Shahidi F., Arachi J.K.V.Y., y Jeon J. (1999).** Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37-51.
- Zhang Y., Xue C., Xue Y., Gao R., y Zhang X. (2005).** Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340, 1914-1917.
- Zhang Y., Xue C., Li Z., Zhang Y., y Fu X. (2006).** Preparation of half-deacetylated chitosan by forced penetration and its properties. *Carbohydrate Polymers*, 65(3) 229-234.



CAPITULO 2



2.1 INTRODUCCIÓN

Los hidrocoloides son polímeros hidrofílicos que provienen de fuentes vegetales, animales y microbianas, contienen en su estructura grupos característicos que determinan sus propiedades funcionales. En los organismos vivos desempeñan diferentes funciones, principalmente de reserva energética y de estructura. Además, han sido ampliamente utilizados en el desarrollo de películas biodegradables incrementándose su aplicación en los últimos años.

La formación de las películas involucra asociaciones inter e intramoleculares de las cadenas de los polímeros para formar una red capaz de atrapar e inmovilizar el solvente, a la que se pueden incorporar aditivos específicos.

Los hidrocoloides más utilizados para la formulación de películas incluyen almidones de diferentes orígenes (García y col., 2009; 2011; Mali y col., 2002; 2005; Flores y col., 2007; Famá y col., 2005; 2007; López y col., 2008; Wilhelm y col., 2003), kefiran (Piermaria y col., 2011), pululano (Diab y col., 2001), alginato (Rhim 2004), gelano (León y col., 2009), pectinas (Krause Bierhalz y col., 2012), carragenanos (Alves y col., 2011), derivados de celulosa (Alvarez y Vázquez, 2004; García y col., 2004), quitosano (Pinotti y col., 2007; Quijada-Garrido y col., 2007; Rivero y col., 2010; Suyatma y col., 2005).

La movilidad de un sistema puede ser afectada por la incorporación de un agente plastificante, que es una sustancia de bajo peso molecular capaz de incorporarse a un material polimérico para modificar las propiedades físicas y mecánicas. Los requerimientos básicos para un plastificante son su compatibilidad con el polímero formador de la red y su permanencia dentro de la estructura resultante. Para que sea compatible debe ser miscible con la matriz y para ello deben existir fuerzas intermoleculares similares en los dos componentes. Los más empleados son los polialcoholes (glicerol, sorbitol, polietilenglicol, etc.) y azúcares, siendo los grupos oxhidrilos de dichos compuestos los responsables del efecto plastificante (Sothornvit y Krotcha, 2005).

Esto conlleva al aumento en la flexibilidad, extensibilidad y resistencia a la rotura del material, en lo que respecta a las propiedades mecánicas. Por otro parte, los plastificantes ocasionan un aumento en el contenido de humedad de la matriz asociado a su carácter higroscópico, causando un aumento en los espacios intermoleculares; por consiguiente,

algunos compuestos difunden más rápidamente modificando las propiedades de barrera del material a los gases y al vapor de agua (Gontard y col., 1993).

Para explicar el fenómeno de plastificación se han propuesto diversas hipótesis, una de las cuales plantea que el plastificante actúa como un lubricante interno por reducción de las fuerzas intermoleculares de cohesión en la estructura del sistema debido a la interferencia en la asociación de las cadenas poliméricas, facilitando su deslizamiento y aumentando la movilidad de las cadenas que lo constituyen (Sothornvit y Krochta, 2005). Otra hipótesis postula que el plastificante “solvata” los sitios polares de las cadenas poliméricas con las que interacciona, reduciendo la atracción intermolecular. Una explicación ampliamente aceptada para la plastificación implica la consideración del volumen libre; las moléculas pequeñas pueden entrar en los intersticios dejados por las moléculas más grandes, aumentando de esta manera el volumen libre y en consecuencia disminuyendo la temperatura de transición vítrea (T_g) del sistema.

Es necesario entonces hacer hincapié en el concepto de transición vítrea teniendo en cuenta que la estructura de un material está definida por el estado físico de sus principales constituyentes, así como también por el tipo de procesamiento y almacenamiento al que fue sometido. El conocimiento de las temperaturas de transición y su dependencia con la composición son factores importantes en el control de los procesos de elaboración, almacenamiento, y manipulación de los materiales (Le Meste y col., 2002). La T_g de los polímeros ha sido objeto de numerosos estudios sobre todo en el caso de los sintéticos.

Un material amorfo se encuentra en un estado de no equilibrio termodinámico o de equilibrio metaestable, pero puede evolucionar con el tiempo hacia un estado de equilibrio (Slade y Levine, 1993). Estos materiales exhiben una T_g , a partir de la cual el polímero experimenta un marcado cambio en sus propiedades. Por debajo de la T_g (estado vítreo), los polímeros amorfos presentan propiedades como rigidez y fragilidad; por encima de la T_g se comportan como gomosos o elastómeros. Si bien es sabido, es necesario resaltar que la T_g no ocurre a una temperatura determinada, sino que tiene lugar en un cierto intervalo de temperaturas.

La T_g es un parámetro relacionado con los cambios estructurales de los materiales y resulta muy afectada por la presencia, tipo y concentración del plastificante. En los

materiales hidrofílicos también la absorción de moléculas de agua provoca una disminución de la T_g por tratarse de un plastificante natural de la matriz. El agua, al ser una molécula pequeña, es un plastificante efectivo; su presencia y sus interacciones con otros componentes son factores importantes a tener en cuenta en la estabilidad de las películas a base de hidrocoloides. Otras moléculas pequeñas como el glicerol, un plastificante de grado alimentario, también pueden producir plastificación ya que interactúa con las moléculas que constituyen la fase amorfa del material produciendo un efecto similar al del agua (Fennema, 1996).

En el presente trabajo se utilizó glicerol como agente plastificante debido a su probada efectividad con matrices a base de polisacáridos y proteínas. Otras razones que justificaron su utilización fueron su alto punto de ebullición y los resultados reportados por diversos autores destacando su capacidad para formar fuertes uniones puente de hidrógeno con las cadenas poliméricas, garantizando su compatibilidad y permanencia en la matriz de quitosano (Aider 2010; Domján y col., 2009; Park y col., 2001; Quijada-Garrido y col., 2007; Suyatma y col., 2005; Ziaini y col., 2008).

Los objetivos de este Capítulo fueron:

- ❖ Explorar la capacidad del quitosano para la formación de películas biodegradables.
- ❖ Estudiar el efecto plastificante del glicerol, analizando los cambios producidos en las propiedades mecánicas, térmicas, y de barrera de los materiales obtenidos, evaluando su efecto sobre las propiedades estructurales.
- ❖ Analizar el efecto plastificante del agua en la matriz para las muestras equilibradas a diferentes humedades relativas, evaluando sus propiedades de sorción.

2.2 MATERIALES

Quitosano (SIGMA, EEUU) con un grado de desacetilación del 75% (Q75) se empleó para el desarrollo del trabajo experimental. Además se utilizó ácido acético (Parafarm, Argentina) y glicerol grado analítico (J.T. Baker, México) como agente plastificante.

2.3 MÉTODOLÓGÍA

2.3.1 Preparación de las soluciones filmogénicas

Las soluciones de quitosano (Q75) al 1,5% (p/p) se prepararon de acuerdo el protocolo descrito por García y col. (2004) por solubilización en ácido acético al 1,5% (v/v). Las soluciones se agitaron durante 24 horas y posteriormente se filtraron para eliminar los sólidos insolubles.

Se evaluaron diferentes concentraciones de glicerol como agente plastificante (P) cuya concentración varió en el rango comprendido entre 0,25 y 1 g glicerol/ 100 g solución filmogénica (0,25-1% p/p).

2.3.2 Caracterización reológica de las soluciones de quitosano

Las propiedades reológicas de un fluido se definen a partir de la relación existente entre la aplicación de un sistema de fuerzas externas, representadas matemáticamente mediante el esfuerzo de corte o de cizalladura " τ " y su respuesta dinámica cuantificada mediante la velocidad de deformación " $\dot{\gamma}$ ". Con el fin de establecer las propiedades físicas, y describir el comportamiento de flujo de las soluciones se usó un reómetro Haake RheoStress 600 (Alemania) con un sistema sensor plato-plato de superficies rugosas, con una distancia entre platos de 1mm.

A partir de los ensayos rotacionales se obtuvieron las curvas de flujo de esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación. El comportamiento reológico se ajustó matemáticamente utilizando el modelo de Ostwald de Waele,

$$\tau = k_v \dot{\gamma}^{n_v} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde,

k_v es el índice de consistencia y n_v el índice de comportamiento de flujo. La viscosidad aparente fue determinada a una velocidad de deformación de 500 s^{-1} . Las determinaciones se realizaron por triplicado a 25°C , temperatura controlada mediante un baño termostático externo.

2.3.3 Preparación de las películas

Las películas se obtuvieron mediante la técnica de “casting” o por moldeo de las soluciones filmogénicas en placas de acrílico de 9 cm de diámetro. Con el fin de garantizar variaciones mínimas en el espesor se mantuvo una relación de moldeo de $0,35\text{ml cm}^{-2}$. Las muestras se secaron en estufa a 37°C durante 36hs; posteriormente las películas se removieron cuidadosamente de las placas y se acondicionaron a 20°C y 65% de humedad relativa (HR) durante 30 días.

2.3.4 Propiedades fisicoquímicas de las películas de quitosano**2.3.4.1 Espesor de las películas**

Las medidas de los espesores de las muestras se realizaron utilizando un medidor electrónico CheckLine 900 (EEUU) para materiales no conductores y sustratos no ferrosos. Los valores informados fueron el promedio de al menos 10 medidas.

2.3.4.2 Contenido de humedad

La pérdida de peso de las películas se determinó midiendo el peso a tiempo inicial y luego de ser secadas en estufa a 105°C hasta peso constante. Las muestras se analizaron por triplicado, y los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje (g agua/100 g película).

2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad constituye una propiedad importante a tener en cuenta en la selección de un material de empaque para estimar la vida útil de un producto o controlar la atmósfera con la que el alimento está en contacto. La permeación, absorción y difusión son fenómenos típicos de transferencia de masa. En este contexto, la permeabilidad es definida como la capacidad de transporte de una sustancia permeante por unidad de tiempo, área y fuerza impulsora. Cuando la fuerza impulsora es una diferencia de concentraciones o presiones parciales, el transporte de masa se debe a la difusión.

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó de acuerdo una modificación de la norma ASTM E96 (Mali y col., 2002). El método permite determinar el flujo por unidad

de área o la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA). Previo al ensayo las muestras se almacenaron durante 48 hs a 75% de HR. Para realizar las determinaciones, las películas se colocaron en celdas de acrílico (Figura 2.1), las que se dispusieron en contenedores herméticos. El gradiente de 75% de HR a través de las películas se obtuvo colocando sílica gel anhidra en la celda (0% HR) y una solución saturada de NaCl en el contenedor (75% HR). La diferencia de presión parcial de vapor de agua existente a ambos lados del film proporciona la fuerza impulsora para el flujo de vapor a través de la película. Este gradiente corresponde a 1753,55 Pa, expresado como presión parcial de vapor de agua a 20°C. Se registró el cambio en el peso de la celda en una balanza analítica con una precisión de 0,0001g. Las celdas se retiraron de los contenedores a intervalos de tiempo (Δt) establecidos para registrar la variación del peso (Δp), que es una medida de la cantidad de humedad que fue transferida por unidad de área a través de la película. A partir de los ensayos se graficó la ganancia en peso de la celda en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y se calculó la permeabilidad al vapor de agua (PVA, $\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) considerando el espesor de las películas y la diferencia de presión parcial de vapor de agua antes mencionada.

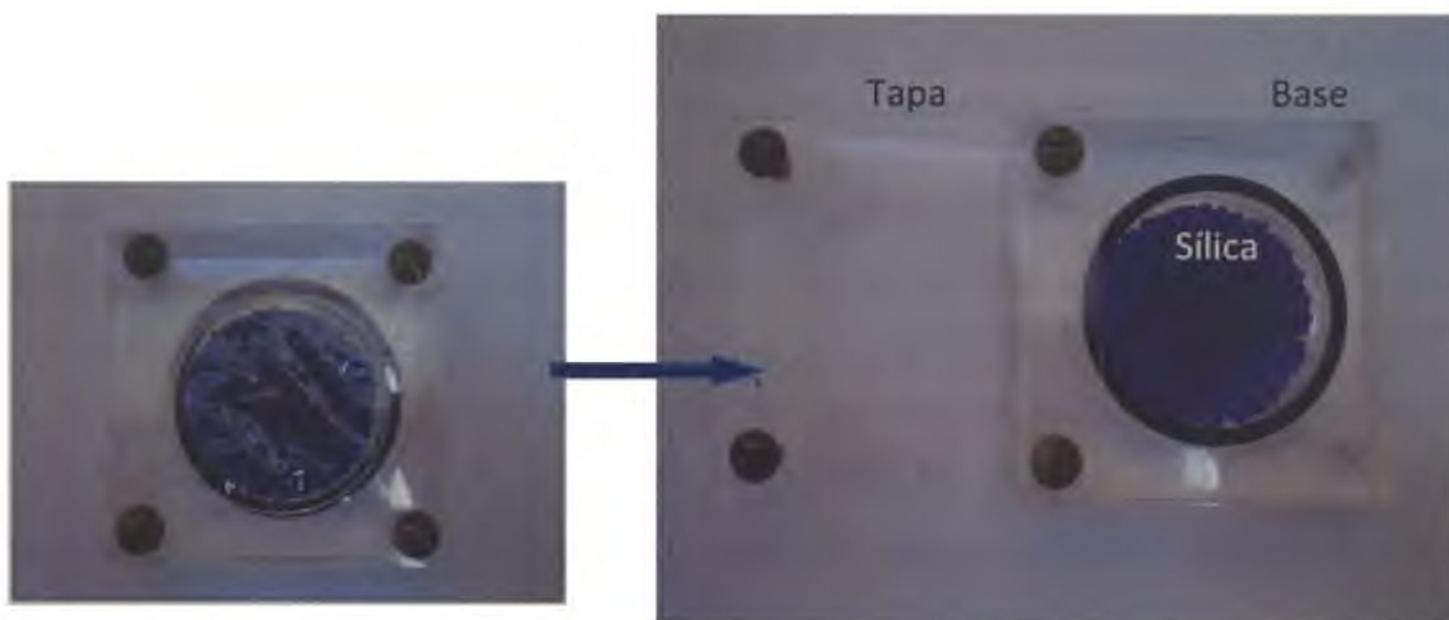


Figura 2.1 Fotografía de la celda de permeabilidad utilizada para evaluar las propiedades de barrera al vapor de agua.

2.3.6 Propiedades microestructurales

En la ciencia de polímeros generalmente el término morfología se refiere a la organización superficial y el término estructura a los detalles de la disposición atómica y molecular. El microscopio electrónico de barrido, permite estudiar la microestructura de las

películas y sistemas desarrollados, formando la imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra mediante un proceso de rastreo (Figura 2.2).

Los estudios de la morfología de las películas se realizaron por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200. La ventaja de este equipo es que no requiere el metalizado previo de las muestras. Las películas se montaron sobre portamuestras de bronce en forma vertical usando cinta bifaz de carbono. Las observaciones se efectuaron usando los siguientes aumentos: 200, 500, 1000 y 2000x.

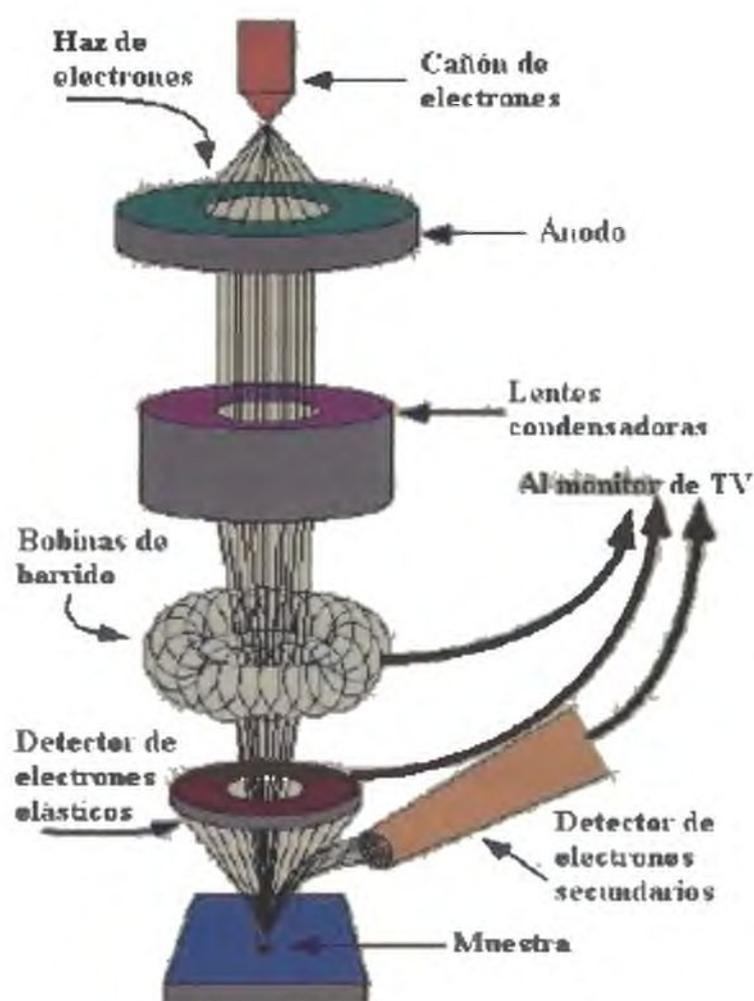


Figura 2.2 Esquema representativo de un microscopio electrónico de barrido.

2.3.7 Calorimetría diferencial de barrido modulada

La calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC), a diferencia de los analizadores térmicos convencionales, proporciona mayor sensibilidad para detectar las transiciones que experimenta un material sometido a un programa de calentamiento o enfriamiento. La técnica utiliza dos velocidades de calentamiento simultáneas, una lineal

que brinda información similar al DSC convencional, y otra modulada o sinusoidal que permite medir simultáneamente la capacidad calorífica de la muestra y diferenciar entre los eventos reversibles (dependientes de la capacidad calorífica) e irreversibles (dependientes del tiempo y la temperatura) que experimenta la muestra. Una de las ventajas de la técnica de MDSC es que permite obtener una mayor resolución de transiciones complejas o eventos muy próximos al poder distinguir entre los eventos reversibles o no reversibles. Esto se debe a que en muchos casos, dependiendo de las características del material las transiciones térmicas se solapan en una misma región, no siendo posible diferenciarlos mediante la técnica de DSC convencional.

Una transición de segundo orden como la transición vítrea constituye un evento reversible y se determina como la temperatura en el punto medio de inflexión de la línea de base de la señal del flujo de calor reversible.

En el estudio de polímeros es conveniente identificar y en ocasiones eliminar la historia térmica del material para poder medir correctamente sus propiedades, o identificar en los termogramas otras transiciones. Esto se puede lograr sometiendo al material a un primer calentamiento y a continuación a un enfriamiento a una velocidad adecuada.

Para evaluar el efecto del glicerol sobre la matriz de quitosano se prepararon películas de Q con distintas concentraciones del plastificante. Para todas las películas ensayadas se realizó un primer calentamiento a una velocidad de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$; para la modulación de la señal el período utilizado fue de 60 s con una amplitud de $0,5^{\circ}\text{C}$. Una vez completado el primer barrido, se procedió al enfriamiento de la muestra a la misma velocidad hasta alcanzar una temperatura de -100°C donde se programó una isoterma durante 5 minutos para permitir la estabilización del material. Posteriormente se registraron dos corridas sucesivas: una segunda corrida realizada en el rango de temperaturas de -100°C hasta 200°C , y posterior enfriamiento hasta -100°C , y finalmente una tercera corrida desde -100°C hasta 350°C para poder determinar la temperatura de descomposición del polímero.

2.3.8 Propiedades mecánicas

Los ensayos de *esfuerzo-deformación* son habituales en la caracterización del comportamiento mecánico de los materiales y permiten evaluar la capacidad del material para soportar cargas y deformarse cuando son sometidos a tensión. Normalmente, los

ensayos de *esfuerzo-deformación* a velocidad constante se utilizan en la comparación de productos similares o en la evaluación del efecto producido por una modificación de la formulación del material. La geometría de la muestra, la temperatura y la velocidad de deformación son factores que deben ser controlados para obtener resultados reproducibles.

Las propiedades de los materiales pueden ser concebidas como una interpolación entre dos extremos ideales o teóricos. Estos límites son el comportamiento elástico y el viscoso. En las curvas de *tensión-deformación* obtenidas para materiales con respuesta elástica ambas variables se correlacionan linealmente y una vez que la tensión deja de aplicarse, la deformación desaparece totalmente siguiendo la ley de Hooke. Mientras que en los materiales con comportamiento newtoniano una vez que cesa la tensión la deformación del material es permanente.

2.3.8.1 Ensayos realizados mediante Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

2.3.8.1.1 Ensayo normal oscilatorio

La técnica de análisis dinámico mecánico, DMA, permite estudiar las propiedades viscoelásticas de los materiales, difiriendo de los ensayos mecánicos convencionales dado que estos trabajan fuera del rango de viscoelasticidad lineal, donde la muestra sufre modificaciones estructurales permanentes. El DMA es una de las técnicas de análisis térmico utilizada para estudiar la influencia de la estructura molecular sobre las propiedades físicas de los polímeros; permite obtener información sobre la T_g y el entrecruzamiento de los polímeros. Además, se caracteriza por su sensibilidad para detectar cambios en la movilidad interna molecular, no detectables por otras técnicas de análisis térmico.

Si bien la T_g se puede estimar a través de MDSC, la técnica de DMA también es apropiada para el estudio de la transición vítrea de los polímeros, dado que permite analizar las contribuciones de las distintas fases, o componentes del material.

En los ensayos de DMA, la muestra es sometida a un esfuerzo, en forma de torque, flexión o tensión, de amplitud pequeña, que varía sinusoidalmente con el tiempo. Si el material es perfectamente elástico, toda la energía mecánica que se le aplique se transforma en energía potencial que se recupera, mientras que si el material se comporta como un líquido, la energía se disipa en forma de calor y no se almacena. En un material viscoelástico

ambos comportamientos están presentes, y al aplicar un esfuerzo sinusoidal, la deformación resultante será también sinusoidal (si el esfuerzo es suficientemente pequeño como para que el comportamiento sea lineal) pero estará desfasada respecto del esfuerzo. Este desfase es consecuencia del tiempo necesario para que ocurra la reorganización molecular y se relaciona con los fenómenos de relajación. A la temperatura y frecuencia a la que el material sufre una relajación, la componente real del módulo de almacenamiento disminuye abruptamente y el módulo de pérdida presenta un máximo. La $\tan \delta$, que representa el desfase entre el esfuerzo y la deformación, también atraviesa un máximo a temperaturas superiores al módulo de pérdida.

Los ensayos fueron realizados en un equipo de análisis dinámico-mecánico térmico Q800 (TA Instruments, New Castle, EEUU) usando pinzas de tensión (Figura 2.3) con un sistema de enfriamiento con N_2 líquido. Las películas se cortaron con una geometría rectangular (30 mm de largo, 6 mm de ancho y espesores entre 40 y 50 μm). El barrido de amplitud se realizó a una frecuencia fija de 5 Hz con el objeto de determinar el rango de viscoelasticidad lineal de la muestra y seleccionar la amplitud de trabajo. Se llevaron a cabo ensayos de barrido de frecuencias a 1, 3, 5, 10 y 15 Hz dentro del rango de viscoelasticidad lineal. La temperatura varió entre -90 a 200°C a una velocidad de calentamiento de 5°C min^{-1} . Para el ensayo se utilizó un recubrimiento de silicona (SILICOLUB G-20) con la finalidad de evitar la pérdida de humedad de las muestras. Cug y col. (1997) emplearon silicona en películas a base de proteínas con el mismo fin.

Las curvas del módulo de almacenamiento (E'), el módulo de pérdida (E'') y la $\tan \delta$ (E''/E') en función de la temperatura fueron registradas y analizadas utilizando el software Universal Análisis 2000. Se determinaron las temperaturas de los procesos de relajación asociadas a la transición vítrea del material a través del pico máximo alcanzado en las curvas de la $\tan \delta$ y del módulo E'' , y el punto de inflexión en la curva del módulo E'



Figura 2.3 Accesorio de tensión utilizado para los ensayos de DMA.

2.3.8.1.2 Ensayo cuasi-estático de esfuerzo-deformación en tensión normal uniaxial

Para realizar los ensayos cuasi-estáticos en condición de tensión uniaxial normal las películas se colocaron y se ajustaron entre las mordazas de tensión (Figura 2.3) del equipo de DMA equipado con una cámara termostática acoplada, que permitió traccionar las películas en condiciones isotérmicas. Las dimensiones de las muestras utilizadas para el ensayo fueron 30 mm de largo y 6 mm de ancho; se aplicó una pre-carga de 1 y 4 N para las muestras de películas de Q con y sin plastificante, respectivamente. El ensayo se realizó a temperatura ambiente, programándose una isoterma de 3 min a 25°C y un aumento de fuerza a una velocidad constante de 0,3 N min⁻¹ obteniéndose las curvas de *esfuerzo deformación* hasta la ruptura de las películas o hasta un máximo de 18 N. Con el objetivo de comparar los distintos materiales, se calculó el módulo elástico, expresado en MPa.

La mayoría de las curvas esfuerzo-deformación (σ - ϵ) están referidas a esfuerzos nominales o ingenieriles, es decir, obtenidos como el cociente entre la fuerza aplicada y la sección transversal de la probeta, y no a esfuerzos verdaderos (σ_v) que son los calculados a partir de la sección de la probeta en un instante. La dificultad experimental que supone el conocimiento de la sección en cada instante ha conducido al desarrollo de diversos métodos que proporcionan las curvas esfuerzo-deformación verdaderas (ϵ_v).

La deformación puede ser expresada como la deformación ingenieril o de Cauchy (ϵ_c) o la deformación verdadera de Hencky (ϵ_H).

$$\epsilon_c = \frac{L - L_0}{L_0} \quad \text{Ec. 2.2}$$

$$\varepsilon_H = \varepsilon_V = \ln(1 + \varepsilon_C) \quad \text{Ec. 2.3}$$

El módulo elástico (E_c) se evaluó a través de la pendiente inicial de la curva esfuerzo-deformación resultante de aplicar una ecuación exponencial a las curvas obtenidas experimentalmente (Del Nobile y col. 2007a, b), siendo

$$\sigma_V = E_C \varepsilon_V e^{-\varepsilon_V K} \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde,

ε_V y σ_V son la deformación verdadera y el esfuerzo verdadero, E_c es el módulo elástico; K es una constante considerada como parámetro de ajuste. A partir de la Ec. 2.4, la relación entre el esfuerzo (σ_V) y la deformación verdadera (ε_V), corresponde al módulo de elástico siendo además afectada por un término exponencial, el cual actúa como un factor de amortiguamiento (Del Nobile y col. 2007a, b). Las muestras se analizaron al menos por triplicado.

2.3.9 Análisis por FTIR

Los análisis por espectroscopía de infrarrojo se realizaron de acuerdo al método descrito en el Capítulo 1.

2.3.10 Isotherma de sorción

Es importante introducir el concepto de actividad acuosa (a_w) el cual se desarrolló para reflejar la intensidad con la cual el agua se asocia con los distintos constituyentes no acuosos (Fennema, 1996). La isoterma de sorción representa la relación que existe entre la actividad acuosa y el contenido de humedad de la muestra en el equilibrio a temperatura y presión constantes. La forma de la isoterma de sorción depende de factores como la composición química, estado fisicoquímico de los componentes y la estructura física del material. La importancia de las isotermas de sorción en la tecnología de envases radica en que proporcionan información teórica necesaria para predecir el contenido de humedad en función de la temperatura del material en contacto con sistemas alimentarios envasados bajo diferentes condiciones de humedad relativa. Más allá de predecir la estabilidad físico-química o microbiológica de los alimentos, la isoterma de sorción es de utilidad (Chirife e

Iglesias, 1982) para seleccionar un material de empaque según sus propiedades de barrera al vapor de agua.

Las isotermas de tipo sigmoidea son características de la mayoría de los materiales y se pueden obtener en dos direcciones: *sorción* y *desorción*. La isoterma de *sorción* se obtiene al colocar el material previamente seco en atmósferas de humedad relativa creciente y midiendo la ganancia en peso debido al agua incorporada por la matriz, mientras que para la *desorción* se coloca el material húmedo a las mismas humedades relativas pero en forma decreciente, y se mide la pérdida de peso del material.

El método comúnmente utilizado para determinar las isotermas de sorción de agua es el método estático de microclimas.

Para obtener la isoterma de sorción, se prepararon distintas soluciones salinas saturadas en un rango de actividades acuosas (a_w) de 0,07 a 0,97. En la Tabla 2.1 se detallan los valores de humedad relativa de cada una de las soluciones utilizadas para el ensayo (Labuza, 1984).

Tabla 2.1 Humedades relativas características de soluciones salinas saturadas a 20°C

Solución salina saturada	HR a 20°C
Hidróxido de sodio	7,0
Cloruro de litio	11,2
Cloruro de magnesio	33,2
Carbonato de potasio	43,2
Bromuro de sodio	59,1
Cloruro de sodio	75,4
Cloruro de potasio	85,1
Cloruro de bario	90,7

Estudio y caracterización de películas de quitosano

Las películas de quitosano fueron previamente deshidratadas en presencia de pentóxido de fósforo (P_2O_5) durante 15 días controlando sus pesos hasta que los mismos alcanzaron valores constantes. Luego, las películas se dispusieron sobre soportes colocados en recipientes con atmósferas equilibradas a diferentes humedades relativas con soluciones salinas saturadas, asegurando que la sorción de agua ocurriera en toda la superficie. Las muestras se almacenaron durante 30 días en una cámara a una temperatura controlada de 20°C. En los recipientes con mayores humedades relativas se colocó timol para prevenir el desarrollo de hongos durante todo el período de almacenamiento. Las películas se pesaron a intervalos regulares de tiempo hasta que alcanzaron peso constante. Alcanzado el estado estacionario se determinó el contenido de humedad por el método de la AOAC (1984) y se midieron las actividades acuosas de las películas, en un higrómetro Aqualab (Decagon, EEUU) a 20°C. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el test de comparación de medias de Fisher (LSD) y de análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Systat® (Versión 10). El nivel de significación usado fue 0,05.

2.4 ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS**2.4.1. Caracterización reológica de la soluciones de quitosano**

El estudio del comportamiento de flujo de las soluciones filmogénicas permite determinar las condiciones de procesamiento de los materiales. Asimismo, la caracterización de las películas y recubrimientos biodegradables requiere el conocimiento previo de las propiedades reológicas de las soluciones que hacen posible su obtención. Es necesario traer a colación el problema de la concentración del polímero utilizado para la formulación de las soluciones filmogénicas. Si la concentración y por ende la viscosidad resultan demasiado altas, la disolución, el manejo y transporte pueden resultar muy difíciles, o aún imposibles. Por el contrario, trabajar con soluciones excesivamente diluídas y poco viscosas derivará en problemas asociados a la incapacidad de formar películas o recubrimientos que pudieran adherirse al material a ser recubierto. Asimismo, el espesor de las películas está determinado por la viscosidad de la solución, así como también la relación de moldeo. Las

características reológicas también condicionan el secado y propiedades estructurales del material como la densidad, presencia de poros y grietas asociados a la difícil eliminación de burbujas desde soluciones muy viscosas. Como es bien sabido es necesario el desarrollo de una matriz densa y sin defectos para obtener materiales con adecuadas propiedades mecánicas y de barrera.

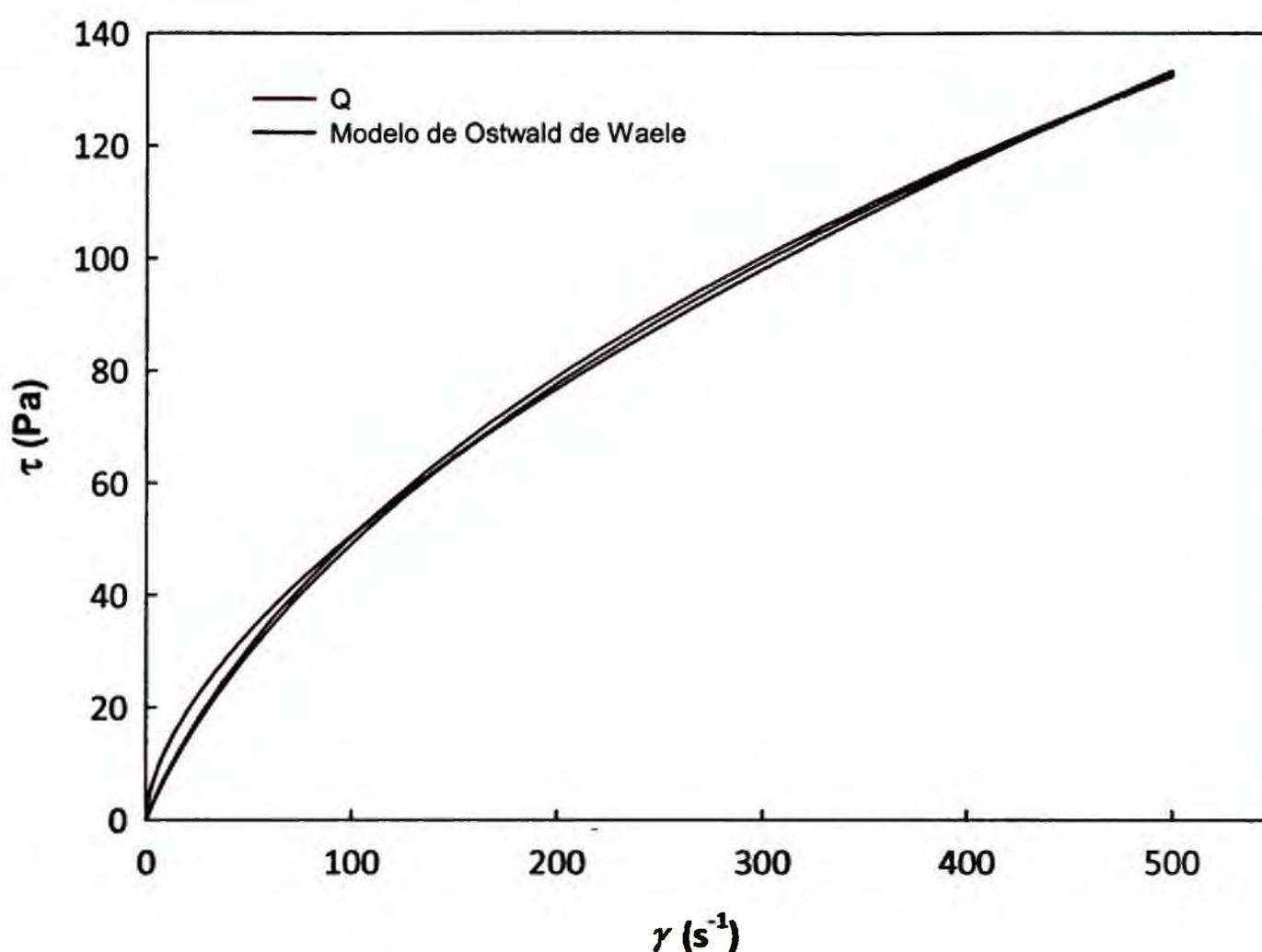


Figura 2.4 Esfuerzo de corte (τ) en función de la velocidad de corte (γ) de solución filmogénica de quitosano (Q75).

Los ensayos rotacionales de las muestras permitieron analizar el comportamiento reológico de las soluciones filmogénicas de quitosano y sus mezclas con glicerol.

Como se observa en la Figura 2.4 el modelo de Ostwald de Waele (Ec 2.1) ajustó satisfactoriamente los datos experimentales ($r^2 > 0,99$). Los parámetros de ajuste del modelo fueron el índice de flujo (n_v) y el coeficiente de consistencia (k_v), presentados en la Tabla 2.2. Las soluciones formadoras de película mostraron un comportamiento no-newtoniano del tipo pseudoplástico ($n_v < 1$) ligeramente tixotrópico. La presencia de glicerol no modificó el perfil reológico de las soluciones filmogénicas. El plastificante hasta una concentración de

0,5% (p/p) no produjo cambios significativos de la viscosidad aparente de la solución de quitosano ($p > 0,05$), mientras que para mayores concentraciones los valores de viscosidad difirieron significativamente ($p < 0,05$) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Caracterización reológica de las soluciones de quitosano con agregado de glicerol como agente plastificante

Concentración de plastificante % (p/p)	Parámetros del modelo de ajuste Ostwald de Waele y coeficiente de correlación*			Viscosidad aparente a 500 s ⁻¹ (mPa.s)
	Índice de consistencia (k _v)	Índice de comportamiento de flujo (n _v)	r ²	
0 ^a	3,00 (0,14) ^a	0,607 (0,0004) ^a	0,999	256,06 (12,79) ^a
0,25	3,19 (0,10) ^a	0,602 (0,001) ^a	0,998	262,96 (9,84) ^a
0,5	3,19 (0,08) ^a	0,605 (0,0005) ^a	0,999	255,57 (11,12) ^a
0,75	3,26 (0,19) ^a	0,605 (0,001) ^a	0,998	274,41 (13,85) ^b
1,0	2,81 (0,14)	0,600 (0,0007) ^a	0,999	279,96 (12,29) ^b

* Los valores informados corresponden a la rampa ascendente de la curva de comportamiento de flujo. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

2.4.2 Propiedades de las películas de quitosano

2.4.2.1 Características macroscópicas

A partir de las soluciones filmogénicas fue posible obtener películas transparentes y de apariencia uniforme, las que se removieron fácilmente de las placas de moldeo (Figura 2.5). El espesor promedio de las películas varió entre 42,5 y 58,9 μm para las películas control de Q y para las muestras con la mayor concentración de glicerol, respectivamente; el efecto del plastificante en el espesor promedio de las películas se observa en la Tabla 2.3. El glicerol usado como agente plastificante no fue liberado de la matriz independientemente de la concentración utilizada, indicando una buena miscibilidad entre los componentes.



Figura 2.5 Fotografía de la película de quitosano

2.4.2.2 Propiedades microestructurales

Resulta interesante también examinar la matriz desde el punto de vista de la microestructura. La técnica de SEM se utilizó para visualizar las secciones transversales y la topografía de la superficie de las películas de Q. El análisis microestructural indicó que la superficie de las muestras fue lisa y uniforme, no presentó ningún tipo de grietas, poros e imperfecciones. En las micrografías QP con una concentración del 0,5% (Figura 2.6) también se observa que el glicerol es compatible con la matriz de Q, encontrándose incluido en la misma. Asimismo, no se encontraron cambios estructurales asociados a la migración del plastificante corroborando las observaciones visuales ya mencionadas.

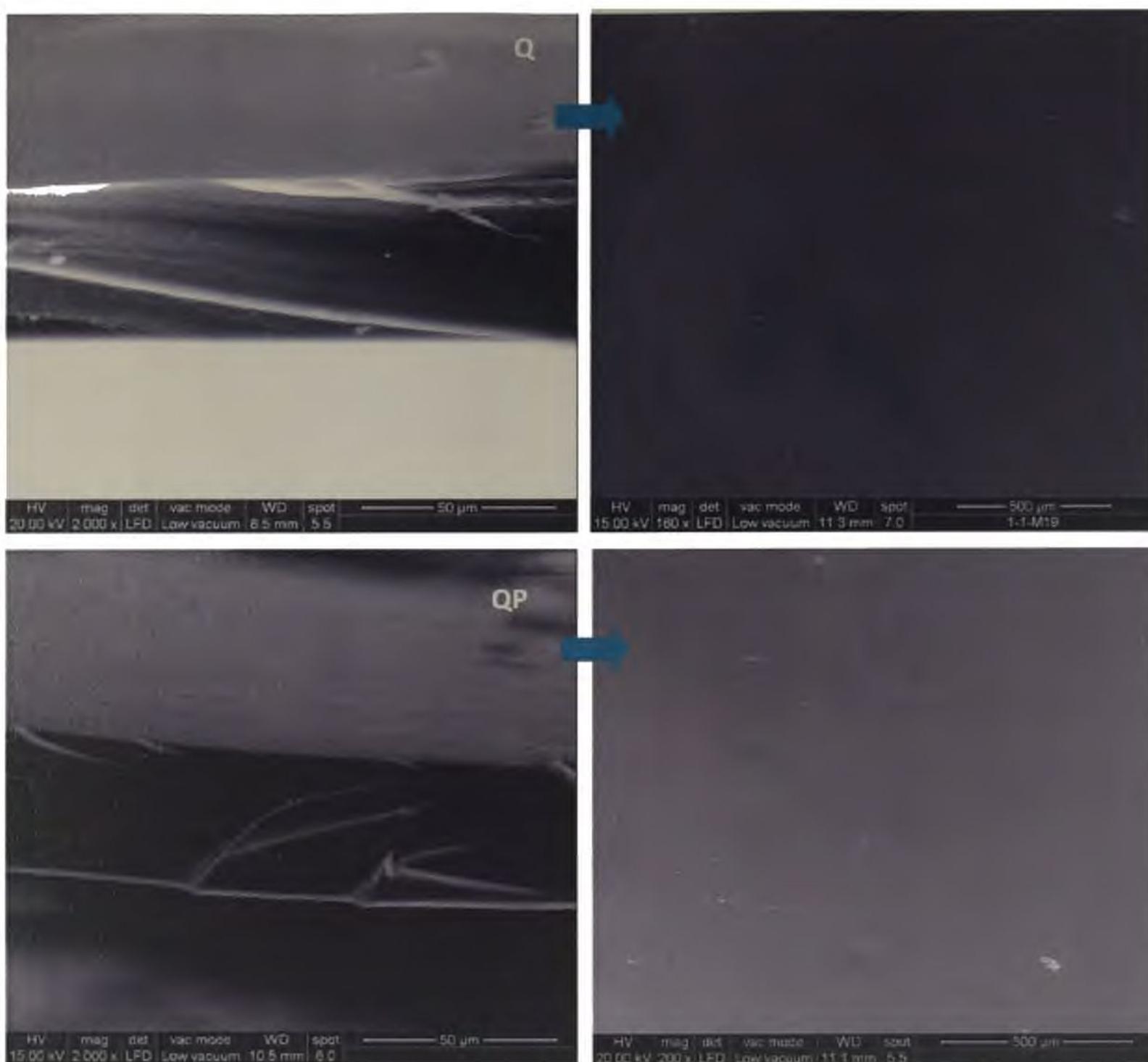


Figura 2.6 Micrografías obtenidas por SEM de secciones transversales y superficies de películas de Q y QP. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

2.4.2.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Las películas de quitosano presentaron una permeabilidad al vapor de agua de $1,08 \cdot 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Este valor resultó menor que los informados para otras películas biodegradables como las de proteína de soja y de zeína (Lacroix y Cooksey, 2005), las de almidón de maíz (López y col., 2008) y las de mandioca reforzadas con nanocristales (García y col., 2011), siendo sin embargo mayor que los valores de las películas de metilcelulosa (Pinotti y col., 2007) y de kefirán (Piermaría y col., 2011). En comparación con los materiales sintéticos, las películas de quitosano fueron menos eficientes como barreras al vapor de

agua. En el caso del LDPE, un polímero ampliamente utilizado en el envasado de alimentos, la PVA es de $7,2 \cdot 10^{-13} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ (Lacroix y Cooksey, 2005).

En la Figura 2.7 se observa el efecto del agregado de plastificante sobre las propiedades de barrera. La PVA de las películas plastificadas de Q aumentó significativamente ($p < 0,05$) para las formulaciones con concentraciones de glicerol mayores al 0,25%. Arvanitoyannis y col. (1998) encontraron una tendencia similar y atribuyeron el aumento en la permeabilidad al efecto plastificante del glicerol, el cual tiende a reducir la densidad de empaque de las cadenas poliméricas, aumentando el volumen libre de la matriz y favoreciendo la permeación. Por otra parte, Cerqueira y col. (2012) y Clasen y col. (2006) estudiaron el efecto plastificante del glicerol en matrices de quitosano y observaron similares resultados.

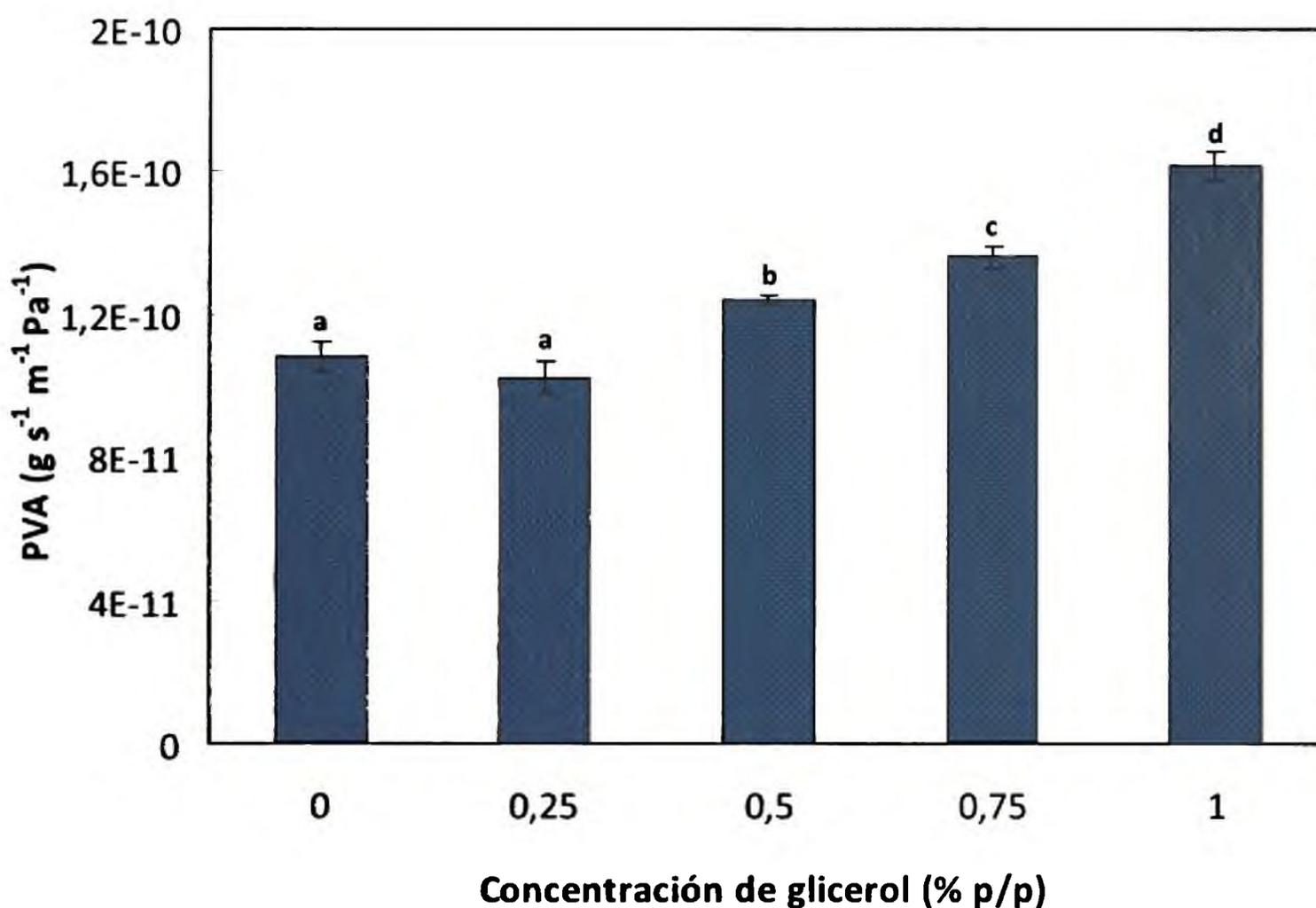


Figura 2.7 Permeabilidad al vapor de agua de películas de quitosano con diferentes concentraciones de plastificante. Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

2.4.2.4 Propiedades mecánicas

La Figura 2.8 muestra las curvas de esfuerzo (σ_v) en función de la deformación relativa (ϵ_v) obtenidas por DMA. Las películas de quitosano presentaron un comportamiento típico de materiales rígidos. Con el agregado de 0,25% y de 0,5% de glicerol se observó que la matriz conservó las características propias de un material dúctil, con mayores valores de deformación relativa, siendo los cambios más evidentes para concentraciones superiores al 0,5%.

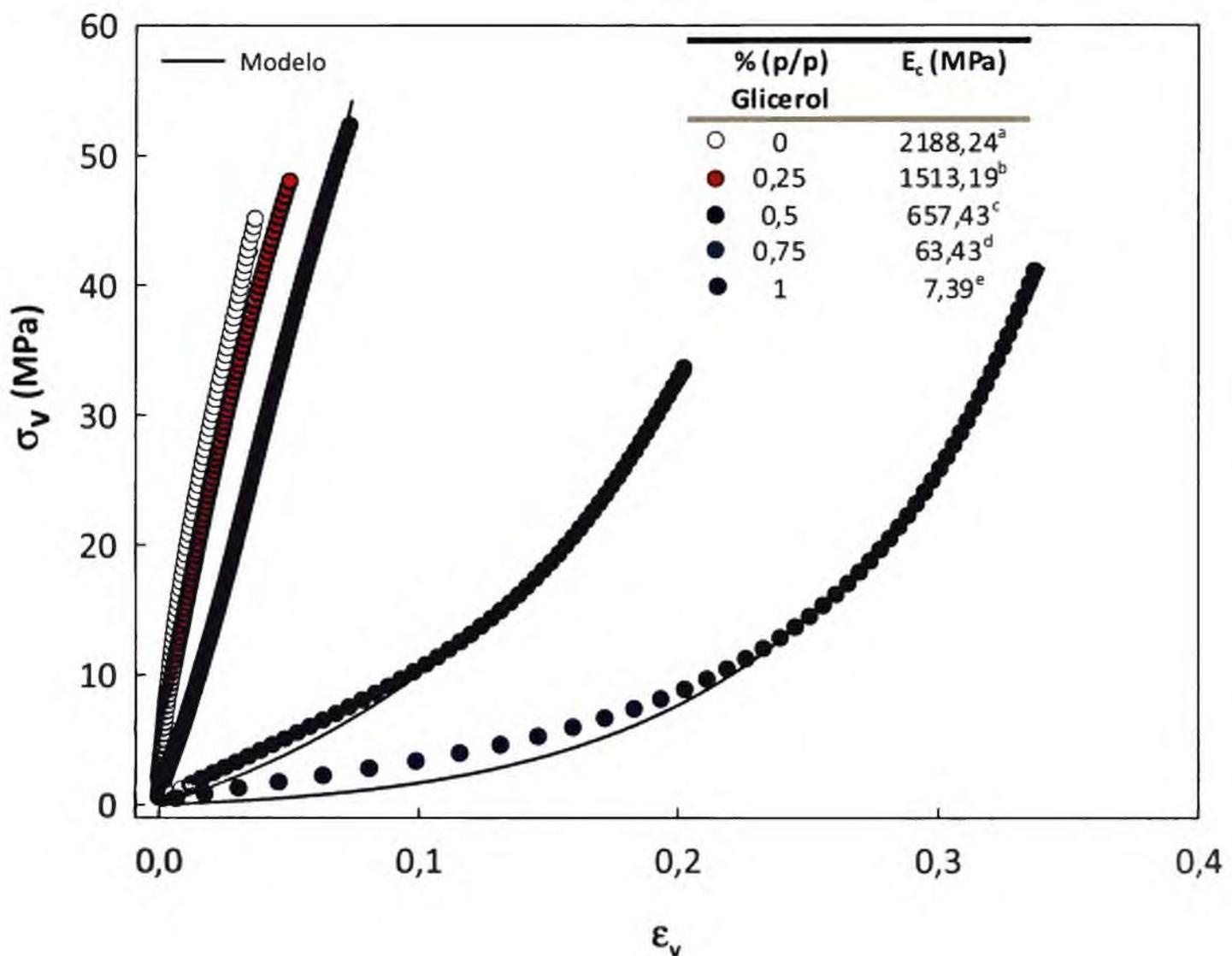


Figura 2.8 Curvas de esfuerzo (σ_v) en función de la deformación relativa (ϵ_v) para películas de Q con y sin glicerol. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas al modelo matemático.

Se observa en la Figura 2.8 un notable cambio en el perfil mecánico a partir de una concentración del 0,75%, ya que se obtuvieron materiales más flexibles con mayores valores de ϵ_v , en correspondencia con las concentraciones más altas de glicerol. A partir de la Ec. 2.4 se pudieron estimar los parámetros que permitieron caracterizar la zona elástica de las curvas; la Tabla inserta en la Figura 2.8 muestra los valores de E_c estimados. Las películas de

Q presentaron los mayores valores de E_c , propios de la mayor resistencia del material, mientras que en el caso de las películas plastificadas los valores disminuyeron con el aumento de la concentración de glicerol (Figura 2.8, Tabla inserta), resultando más evidentes los cambios a mayores concentraciones de plastificante. En comparación con otros materiales biodegradables los valores calculados de E_c para las películas de quitosano resultaron mayores que los obtenidos para matrices a base de gelano (León y col., 2009), medidos en las mismas condiciones y equipamiento que el utilizado en el presente trabajo.

A partir de los resultados obtenidos de propiedades mecánicas así como de la capacidad de barrera al vapor de agua de las películas de Q con adición de plastificante, se seleccionó la concentración del 0,5% de glicerol para los ensayos posteriores que involucren a películas plastificadas.

2.4.2.5 Análisis térmico por MDSC

Las Figuras 2.9 y 2.11 muestran los termogramas correspondientes a la 3ª corrida de las muestras obtenidos por MDSC para películas de quitosano con distintas concentraciones de glicerol. En el primer barrido de la muestra sólo se evidenció un evento endotérmico durante el calentamiento asociado a la eliminación de agua ligada a través de uniones puente de hidrógeno.

En el inserto de la Figura 2.9 se puede visualizar la temperatura de transición vítrea del quitosano en su estado sólido a 136,8°C, mientras que la T_g de la película de Q se localizó a 96°C (Figura 2.9). La T_g ha sido estudiada por varios autores, quienes establecieron un amplio rango de temperaturas en el cual se podía detectar esta transición. A modo de ejemplo, Sakurai y col. (2000) informaron un valor de 203°C determinado por DSC y análisis térmico dinámico mecánico (DMTA) en tanto Dong y col. (2004) hallaron un valor más bajo, alrededor de 140°C utilizando diferentes técnicas para su determinación como DSC, DMTA, espectroscopía estimulada térmicamente y dilatometría. Por otro lado, Fernández Cervera y col. (2004) establecieron la temperatura de transición vítrea del quitosano por DSC en el rango de 130-139°C, mientras que Cheung y col. (2002) la hallaron a alrededor de 103°C. Las discrepancias entre los diversos autores se deben fundamentalmente a que el quitosano es un polímero natural con propiedades que dependen en gran medida de la fuente y/o

método de extracción, el peso molecular, el grado de desacetilación y la cristalinidad, que influyen significativamente en la ubicación de esta transición (Neto y col. 2005).

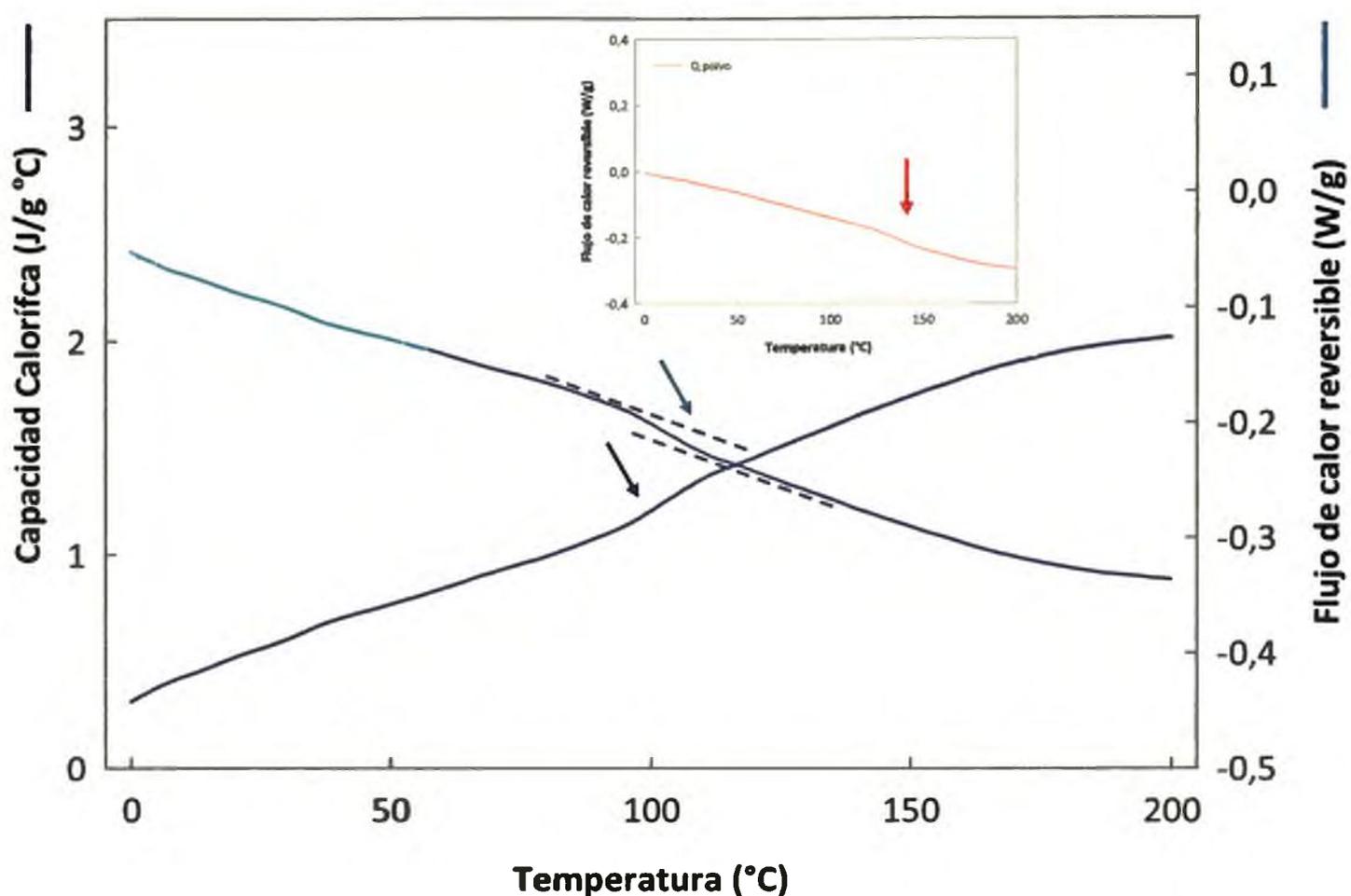


Figura 2.9 Termograma de películas de quitosano. En las curvas se señalan los cambios en la línea de base registrado en las señales de flujo de calor reversible (—) y capacidad calorífica (—) de la muestra. En el inserto se muestra el termograma correspondiente al quitosano en estado sólido (polvo).

Por otro lado, en la Figura 2.10 se muestra el análisis térmico del glicerol puro, evidenciándose claramente una transición de segundo orden a una temperatura de $-85,6^{\circ}\text{C}$ lo que concuerda con la T_g informada por diferentes autores (Masciovecchio y col., 1998; Quijada-Garrido y col., 2007; Reinsberg y col., 2001).

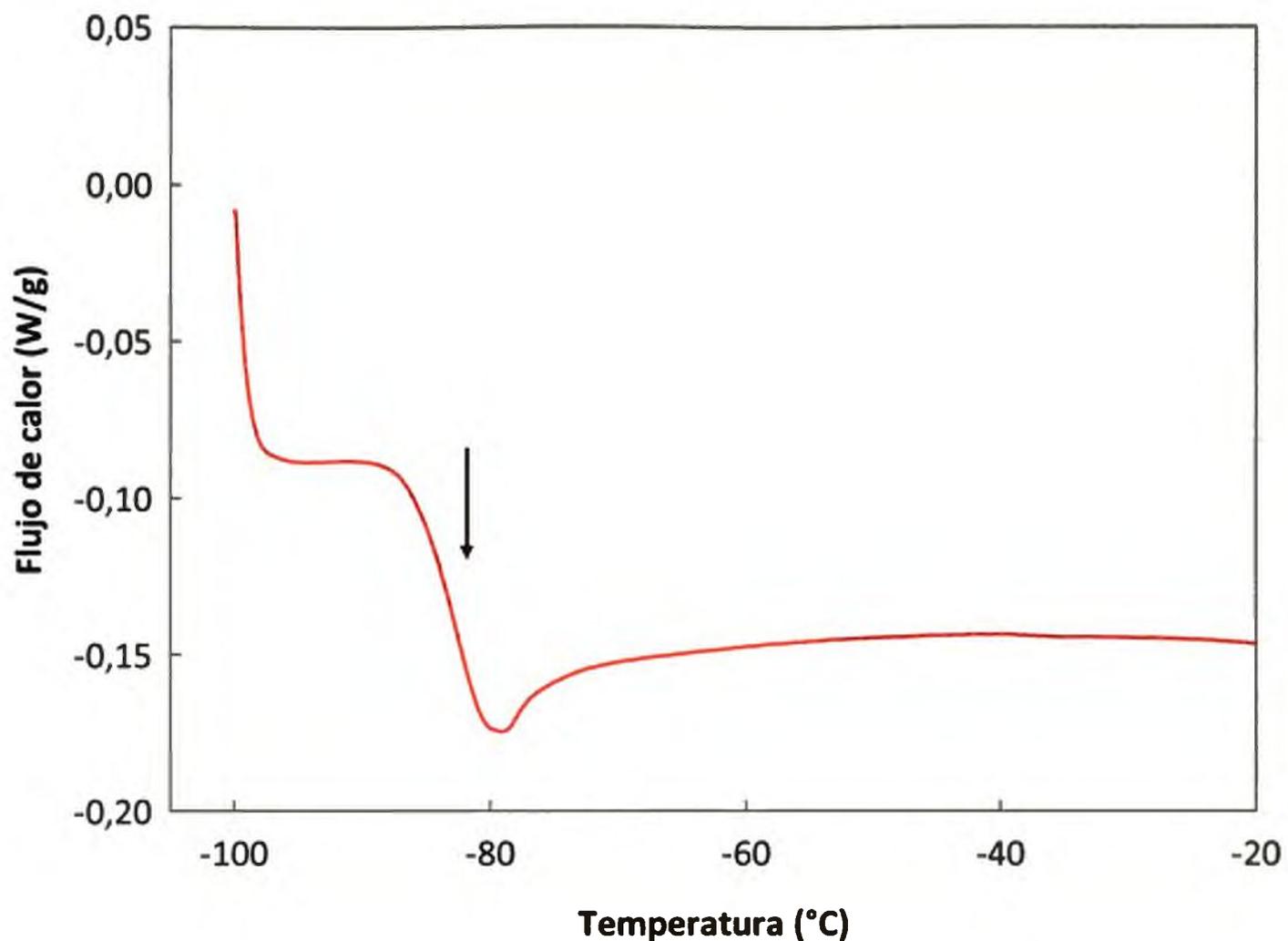


Figura 2.10 Termograma obtenido para una muestra de glicerol, en el mismo se indica la temperatura de transición vítrea.

Asimismo, la incorporación de glicerol modificó las propiedades térmicas de las matrices ya que causó una pronunciada disminución en la T_g para concentraciones superiores al 0,5% como puede observarse en la Figura 2.11. Es importante remarcar que el agregado de plastificante afecta la T_g , y por ende la estructura de la película alterando los espacios de las secciones cristalinas (Donhowe y Fennema, 1993).

Contrariamente a lo esperado el agregado de concentraciones de 0,25% no produjo un corrimiento de la T_g del material. No obstante estos resultados se correlacionaron con los hallados para PVA y las propiedades mecánicas analizadas, dado que las mismas no evidenciaron cambios significativos para esa concentración ensayada. En el mismo sentido, Liu y col. (2006) informaron que la adición de pequeñas cantidades de plastificante no tuvo un efecto significativo sobre la T_g en sistemas de poli(vinilpirrolidona) con sacarosa.

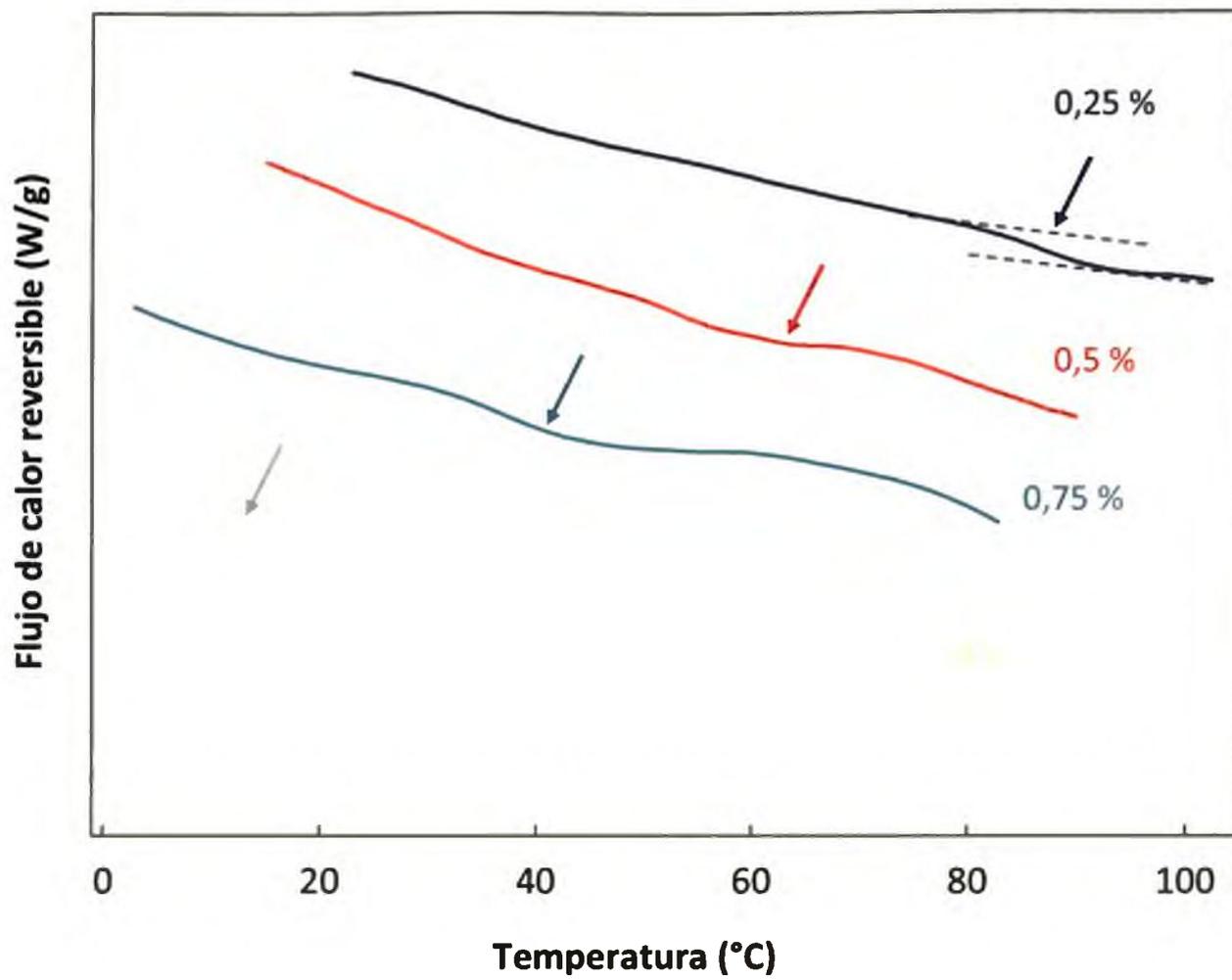


Figura 2.11 Termogramas de películas de quitosano con diferentes concentraciones de glicerol. En el gráfico se indica el cambio en la línea de base registrado en la señal de flujo de calor reversible.

El contenido de humedad de las películas a base de Q aumentó significativamente ($p < 0,05$) con la concentración de glicerol (Tabla 2.3), debido a su naturaleza hidrofílica que le permite interactuar y retener moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno. Domján y col. (2009) estudiaron la influencia del glicerol en películas de quitosano y señalaron la ocurrencia de distintos tipos de plastificación (externa o interna) de acuerdo a las uniones establecidas con el polímero. Asimismo, Suyatma y col. (2005) trabajando con matrices de quitosano plastificadas con glicerol observaron el mismo comportamiento.

Tabla 2.3 Efecto del glicerol sobre el espesor, el contenido de humedad, y las propiedades térmicas de películas de quitosano

Concentración de glicerol % (p/p)	Espesor (μm)	Contenido de humedad (g /100 g película)	T_g experimental*
0	42,5 (1,5) ^a	17,1 (0,80) ^a	96,0 (3,32) ^a
0,25	45,9 (1,6) ^b	22,58 (0,57) ^b	93,6 (2,73) ^a
0,5	50,7 (1,7) ^c	37,67 (1,06) ^c	60,7 (2,9) ^b
0,75	54,2 (1,6) ^d	41,49 (1,43) ^d	42,6 (2,4) ^c
1,0	59,2 (2,7) ^e	46,77 (1,15) ^e	20,8 (0,1) ^d

* Valores de T_g obtenidos por MDSC. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican a diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Varios modelos experimentales se han utilizado para predecir la T_g ; para sistemas binarios la ecuación de Gordon-Taylor ha sido ampliamente empleada (Ec.2.5). Esta Ec. se puede aplicar a mezclas de polímeros con diluyentes.

$$T_g = \frac{X_1 T_{g1} + k_g X_2 T_{g2}}{X_1 + k_g X_2} \quad \text{Ec. 2.5}$$

donde,

T_{g1} y T_{g2} son la temperatura de transición vítrea de los componentes puros; en este caso del quitosano y del agua, X_1 y X_2 representan la fracción en masa de los componentes en la fase amorfa, los subíndices 1 y 2 se refieren al sólido y al agua, respectivamente, y k_g es la constante característica del modelo que se determina mediante ajuste. Este parámetro representa la fuerza de la interacción entre los dos componentes del sistema, y por lo tanto el efecto del plastificante (Buera y col., 1992).

De acuerdo con Couchman y Karasz (1978), la teoría termodinámica de la temperatura de transición vítrea de las mezclas relaciona los cambios de la capacidad calorífica de los componentes con las T_g de los componentes puros. La ecuación derivada de

las consideraciones termodinámicas es similar a la ecuación de Gordon y Taylor pero con un valor de k_g obtenido a partir de la Ec. 2.6.

$$k_g = \frac{\Delta C_{p2}}{\Delta C_{p1}} \quad \text{Ec. 2.6}$$

La predicción de la plastificación del agua mediante la ecuación de Couchman y Karasz requiere que los cambios de las capacidades caloríficas asociados a las T_g de ambos componentes sean conocidos. La ecuación propuesta puede escribirse combinando la Ec. 2.5, y Ec. 2.6, donde los subíndices 1 y 2 se refieren al sólido y al agua, respectivamente.

$$T_g = \frac{X_1 \Delta C_{p1} T_{g1} + X_2 \Delta C_{p2} T_{g2}}{X_1 \Delta C_{p1} + X_2 \Delta C_{p2}} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Por otro lado, Kalichevsky y Blanshard (1993) modificaron la Ec. 2.7 y extendieron su uso para predecir la T_g en mezclas ternarias. La ecuación modificada utiliza las fracciones en peso, las T_g y los ΔC_p de los componentes puros a los que se refieren los subíndices 1, 2 y 3 (Ec. 2.8).

Debido a que las películas de quitosano plastificadas constituyen un sistema ternario, se consideró que el uso de la modificación propuesta por Couchman y Karasz era el modelo más apropiado para estimar la temperatura de transición vítrea de estas películas. La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$T_g(\text{mezcla}) = \frac{X_1 \Delta C_{p1} T_{g1} + X_2 \Delta C_{p2} T_{g2} + X_3 \Delta C_{p3} T_{g3}}{X_1 \Delta C_{p1} + X_2 \Delta C_{p2} + X_3 \Delta C_{p3}} \quad \text{Ec. 2.8}$$

donde,

la expresión $X_1 \Delta C_{p1} T_{g1}$ involucra a las propiedades del agua, $X_2 \Delta C_{p2} T_{g2}$ las del quitosano y la expresión $X_3 \Delta C_{p3} T_{g3}$ las correspondientes al glicerol, X representa la fracción en peso de cada componente del sistema ternario, ΔC_p es el cambio en la capacidad calorífica, siendo ΔC_{p1} la correspondiente al agua ($1,94 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$), ΔC_{p2} la del quitosano ($0,17 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$) y ΔC_{p3} la capacidad calorífica de glicerol ($0,91 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$). Los valores de T_g de los componentes puros

utilizados fueron -135°C para el agua (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2009), $136,7$ y $-85,6^{\circ}\text{C}$, para el quitosano y el glicerol, los cuales fueron determinados experimentalmente.

El modelo propuesto para estimar la T_g a partir de la Ec.2.8 no permitió un buen ajuste de los datos experimentales para este tipo de matrices (Figura 2.11 y Tabla 2.3). Liu y col. (2006) analizaron distintos sistemas y manifestaron que en algunos casos los valores de T_g predichos teóricamente por las Ec. ya mencionadas no se correlacionan con los resultados experimentales. La principal razón es que las Ec. asumen la idealidad de las mezclas, por lo tanto los volúmenes libres son aditivos y que no hay interacciones entre los componentes durante el mezclado. A pesar de que la adición de plastificantes aumenta el volumen libre disponible para la movilidad molecular del polímero, la presencia de grupos hidrofílicos que inducen la formación de puentes de hidrógeno llevan a valores de T_g mayores que los predichos. En otros casos, las ramificaciones de los poliscáridos pueden actuar como plastificantes internos, induciendo una disminución en la T_g comparado con las cadenas lineales.

2.4.2.6 Análisis Dinámico Mecánico

El DMA se empleó para analizar el comportamiento mecánico y los mecanismos de relajación del quitosano y sus mezclas con glicerol, con el fin de corroborar la información obtenida a partir de estos ensayos con las observadas por MDSC.

El rango de viscoelasticidad lineal de las películas de Q se extendió hasta $15\ \mu\text{m}$ para todas las formulaciones estudiadas, por lo que los ensayos de barridos de frecuencia en función de la temperatura se realizaron a una amplitud constante de $7\ \mu\text{m}$.

Como se observa en el espectro dinámico-mecánico del quitosano (Figura 2.12), con el aumento de la frecuencia se incrementa la temperatura de las relajaciones del material, es decir sufren un corrimiento ya que las cadenas del polímero necesitan más energía para responder a las tensiones impuestas. A efectos de comparar los comportamientos de los materiales desarrollados se seleccionará una frecuencia fija de análisis utilizada a lo largo del presente trabajo de Tesis, en este caso de 5Hz.

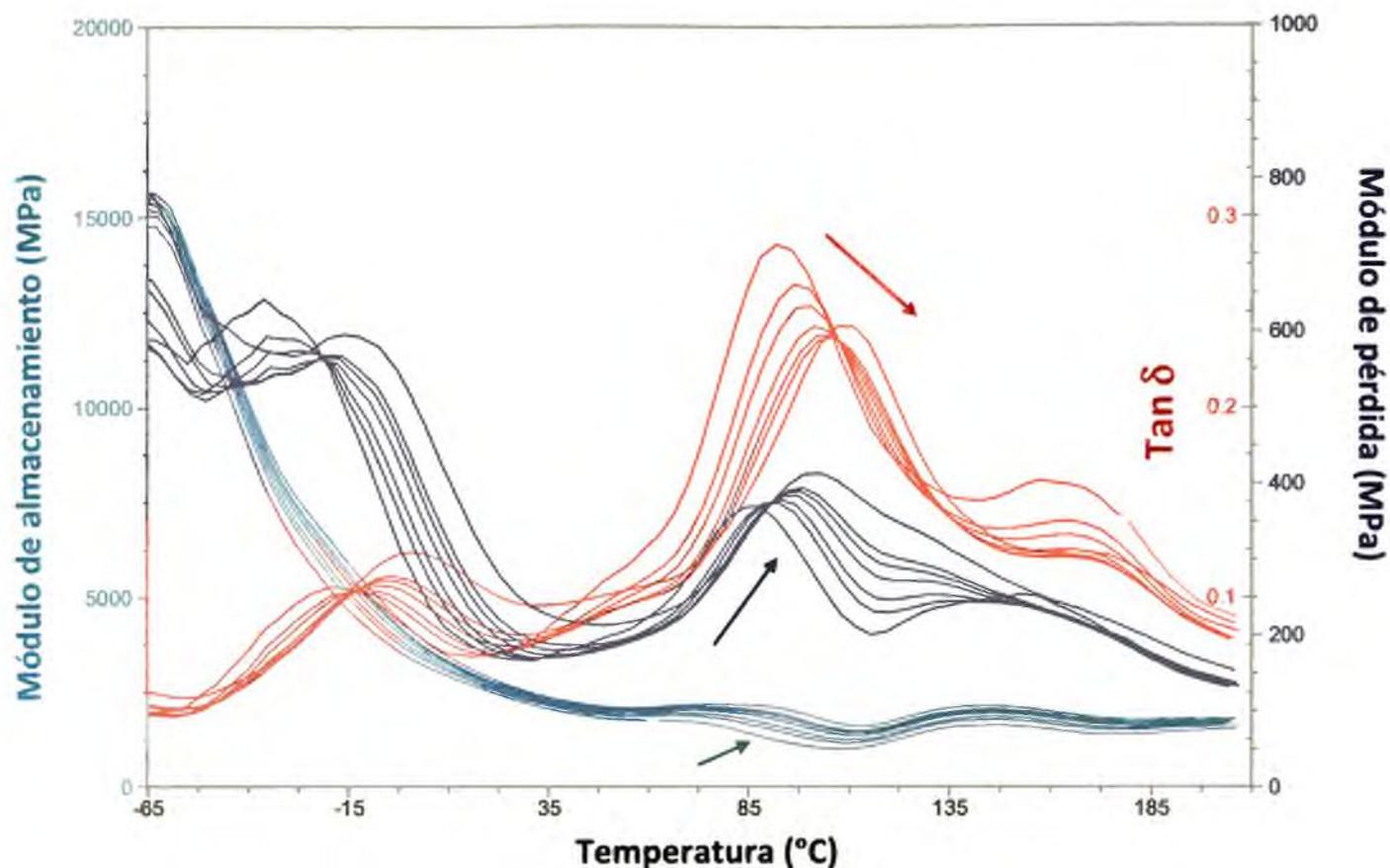


Figura 2.12 Espectro dinámico mecánico de películas de quitosano, efecto de la variación de la frecuencia de deformación aplicada al polímero.

La Figura 2.12 muestra la dependencia de los módulos E' , E'' y la $\text{Tan } \delta$, con la temperatura para las películas de quitosano. La asignación de los diferentes procesos de relajación en estos biopolímeros resulta compleja. En base a la bibliografía consultada el patrón dinámico mecánico de las películas de Q evidenció dos relajaciones con el aumento de la temperatura. A bajas temperaturas la relajación β y a altas la relajación α . La relajación β se localizó alrededor de -10°C . Varios autores han informado que las películas de Q mostraron un evento asociado a esta relajación entre -20°C y -10°C , característico del movimiento local de los segmentos de la cadena polimérica del quitosano (Lazaridou y Biliaderis, 2002; Mucha y Pawlak, 2005; Neto y col., 2005). Los autores señalaron que la magnitud de la misma es mucho menor que la observada para la relajación α . Otros investigadores, como Krumova y col. (2000) y Lazaridou y col. (2003) la consideraron como un evento asociado a los movimientos de las moléculas de agua en los materiales hidrofílicos.

De acuerdo con la Figura 2.12 se observó un corrimiento de la relajación β hacia temperaturas menores con la concentración de plastificante. Para una concentración de 0,5

% (p/p) presentó un máximo en -20°C , lo que muestra un desplazamiento significativo respecto del valor hallado para el control de quitosano (-10°C). Este comportamiento se atribuyó a los movimientos de las cadenas laterales o grupos laterales debidos a la interacción del quitosano con las moléculas de glicerol mediante uniones puente de hidrógeno con los grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ (Quijada-Garrido y col., 2007). Asimismo, Domján y col. (2009) encontraron que las moléculas de glicerol interaccionan fuertemente con los grupos acetamida del quitosano, reduciendo su movilidad e impidiendo las interacciones entre cadenas adyacentes del polímero.

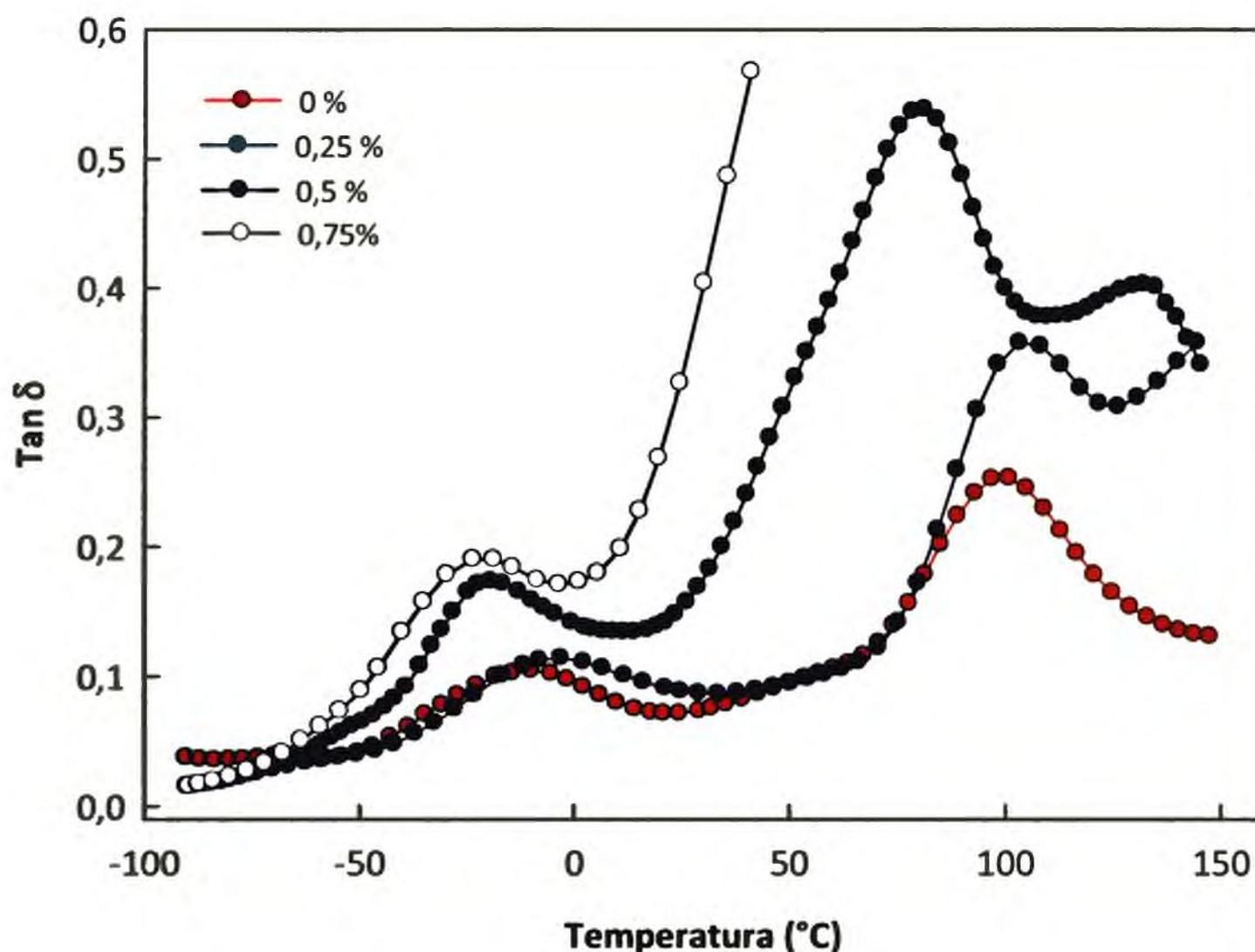


Figura 2.13 Espectros dinámico mecánico (DMA) de muestras de quitosano con y sin glicerol en función de la temperatura, analizados a una frecuencia fija de ensayo de 5 Hz.

Quijada-Garrido y col. (2007) señalaron que con el aumento de la concentración de glicerol aumenta la cooperatividad y la temperatura asociada a la relajación β se desplaza hacia valores cercanos a la T_g del plastificante. Zhang y col. (2004) encontraron resultados similares trabajando con películas de proteínas de trigo y polivinilalcohol.

El segundo pico observado en las curvas de $\text{Tan } \delta$ de los espectros de las películas de Q con y sin glicerol corresponde a la relajación α , asociada a la temperatura de transición vítrea dinámica (T_g). Esta relajación es independiente de la frecuencia ensayada y refleja la movilidad de los segmentos de las cadenas largas en los dominios amorfos del polímero (Lazaridou y Biliaderis, 2002).

La T_g de las películas formuladas sólo con Q se localizó a una temperatura de 100°C, valor similar al hallado mediante MDSC (96°C). En general, se observó una disminución de la T_g con el aumento de la concentración de glicerol. Sin embargo con el agregado de 0,25% no se produjeron cambios significativos en los espectros obtenidos mientras que con la adición de 0,5% de plastificante la T_g se desplazó a valores cercano a 80°C (Figura 2.13), con un notable aumento de la intensidad de la relajación α . Para concentraciones mayores del plastificante no fue posible determinar la T_g por esta técnica, en las condiciones ensayadas, debido a que los valores de E' cayeron por debajo del límite de sensibilidad del equipo (Figura 2.13), sin llegar a detectar el máximo en las curvas de $\text{Tan } \delta$.

2.4.2.7 Análisis por FTIR

En la Figura 2.14 se muestran los espectros correspondientes al quitosano polvo (Q75) y a la película obtenida a partir del mismo, conservándose los picos principales, ya asignados en el Capítulo 1. Las diferencias más notorias entre los espectros se evidencian en la región comprendida entre 3600-3000 cm^{-1} , observándose un ensanchamiento de la banda atribuido al mayor contenido de humedad presente en las películas en comparación al espectro de la muestra sólida (polvo) de quitosano.

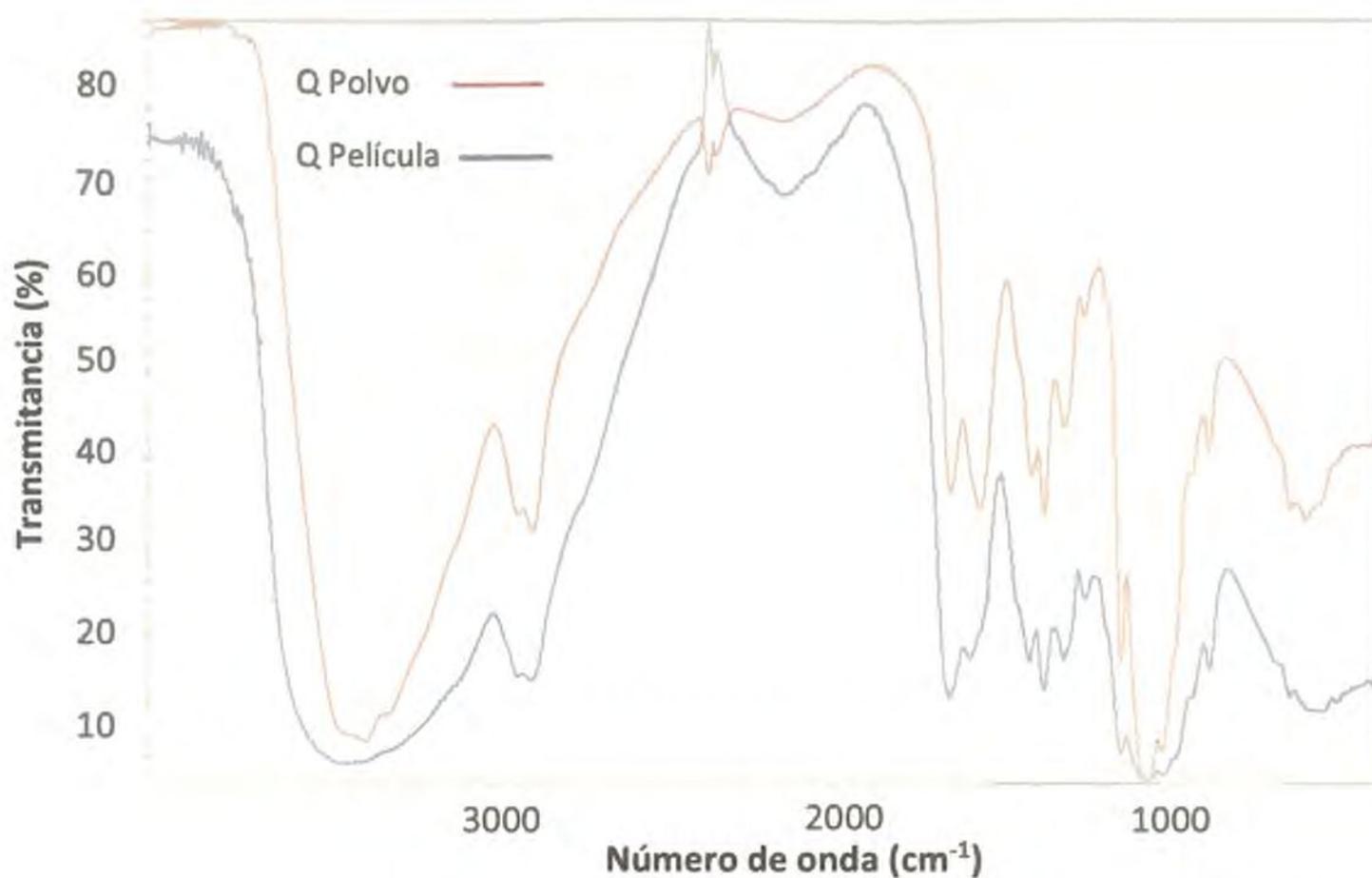


Figura 2.14 Espectros de FTIR de películas de quitosano (Q75) en estado sólido y de la película de Q

La Figura 2.15a y b muestra los espectros de FTIR obtenidos para películas de Q con diferentes concentraciones de plastificante. La banda localizada en la región comprendida entre 3600 y 3000 cm^{-1} en presencia de concentraciones crecientes de glicerol experimentó un ensanchamiento como consecuencia de la mayor intensidad de uniones puente de hidrógeno del polímero con el plastificante y con las moléculas de agua (Tabla 2.3).

Por otra parte, los picos localizados en la región entre 3000 y 2800 cm^{-1} , asociados a las vibraciones de estiramiento del C-H se tornaron equiparables en intensidad. La banda ubicada a 1380 cm^{-1} mostró una marcada disminución con la concentración creciente de glicerol.

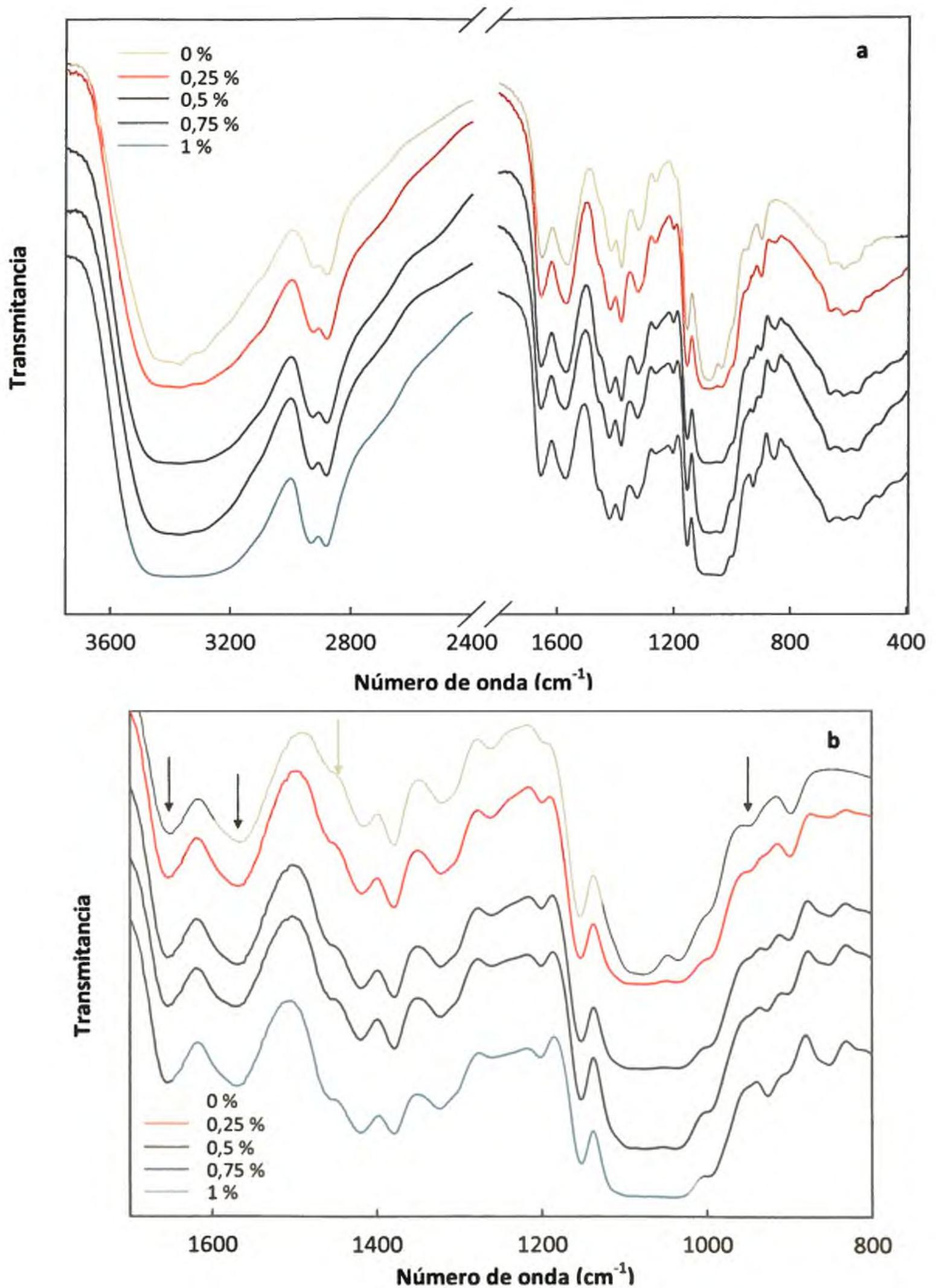


Figura 2.15 Espectros de FTIR de: (a) películas de quitosano con distintas concentraciones de glicerol; (b) se muestra magnificada la región comprendida entre 1680-800 cm^{-1} .

En la región $1460\text{-}1455\text{ cm}^{-1}$ se observó la aparición de un hombro, atribuido al estiramiento del grupo CH_2 que se fue pronunciando con el aumento de la concentración de glicerol (Figura 2.15a y b). Whilhem y col. (2003) señalaron que esta señal indica que el plastificante agregado resultó químicamente enlazado por las cadenas poliméricas. Por otro lado, se observó una disminución del área del pico $1565\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ asociado a la amida II. Además, el plastificante afectó las bandas localizadas entre $1400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, debidas a la deformación en el plano O-H. Se pudo observar una banda de absorción amplia alrededor de 3270 cm^{-1} , asociada a los grupos oxhidrilo del glicerol acoplada con la absorción característica de los alcoholes primarios y secundarios, las cuales ocurren a 1030 y 1100 cm^{-1} , respectivamente. Asimismo la región $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ experimentó cambios y corrimientos en las películas QP, ya que el espectro del glicerol puro exhibe bandas de gran intensidad en la región $1125\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ atribuidas a la vibración CH-OH y $1075\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ a la vibración $\text{CH}_2\text{-OH}$. Asimismo, se observó un corrimiento del pico localizado a 930 cm^{-1} en las películas de Q, asociado con las vibraciones simétricas de estiramiento del grupo (C-O-C) evidenciando la presencia de glicerol en la matriz (Cerqueira y col., 2012) (Figura 2.15).

Para simplificar se puede destacar que todos los cambios observados en los espectros de las películas QP se atribuyeron a la mayor asociación de la matriz con las moléculas de agua debido al fuerte carácter hidrofílico del glicerol. Con concentraciones crecientes del plastificante, las bandas del espectro del glicerol comenzaron a evidenciarse en el de Q.

2.4.2.8 Comportamiento de las películas de quitosano expuestas a diferentes humedades relativas.

2.4.2.8.1 Isotermas de sorción

Los envases o películas biodegradables tienen un rol importante en la conservación de alimentos, debido a que reducen el intercambio de agua entre el alimento y el medio ambiente (Coupland y col., 2000). El estudio del comportamiento de las películas de quitosano en cuanto a la capacidad de absorción de agua o hidrofiliidad se impone frente a la necesidad de formular materiales que sean menos sensibles a los cambios de humedad.

En la Figura 2.16 se presentan las isotermas de sorción obtenidas para películas de Q. Los datos experimentales mostrados corresponden a los que se obtuvieron por medida

directa de a_w en el equipo Aqualab (método higrométrico) así como los determinados por el método gravimétrico. En este último caso, se considera que la a_w de la película puede estimarse a partir de la humedad relativa de la atmósfera (HR) circundante, asumiendo que se alcanzó el equilibrio termodinámico:

$$a_w = \left(\frac{p_w}{p_{w0}} \right)_T = \frac{\% HR}{100} \quad \text{Ec. 2.9}$$

donde,

p_w es la presión parcial de vapor del agua en la muestra; p_{w0} es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.

Si bien generalmente se asume esta relación en la mayoría de los trabajos referidos a isotermas de sorción de materiales biodegradables (Abugoch y col., 2011; Cho y Rhee, 2002; Gennadios y Weller, 1994; Mali y col., 2005; Perdomo y col., 2009; Ludwiczak y Mucha, 2010), de acuerdo con Fennema (1996) esta suposición generalmente no se cumple. Slade y Levine (1991) señalaron críticamente que la actividad acuosa es un concepto de equilibrio derivado del potencial químico de un sistema y que es poco probable alcanzar esa condición, por lo que es conveniente medir el contenido de a_w de la muestra en vez de estimarlo.

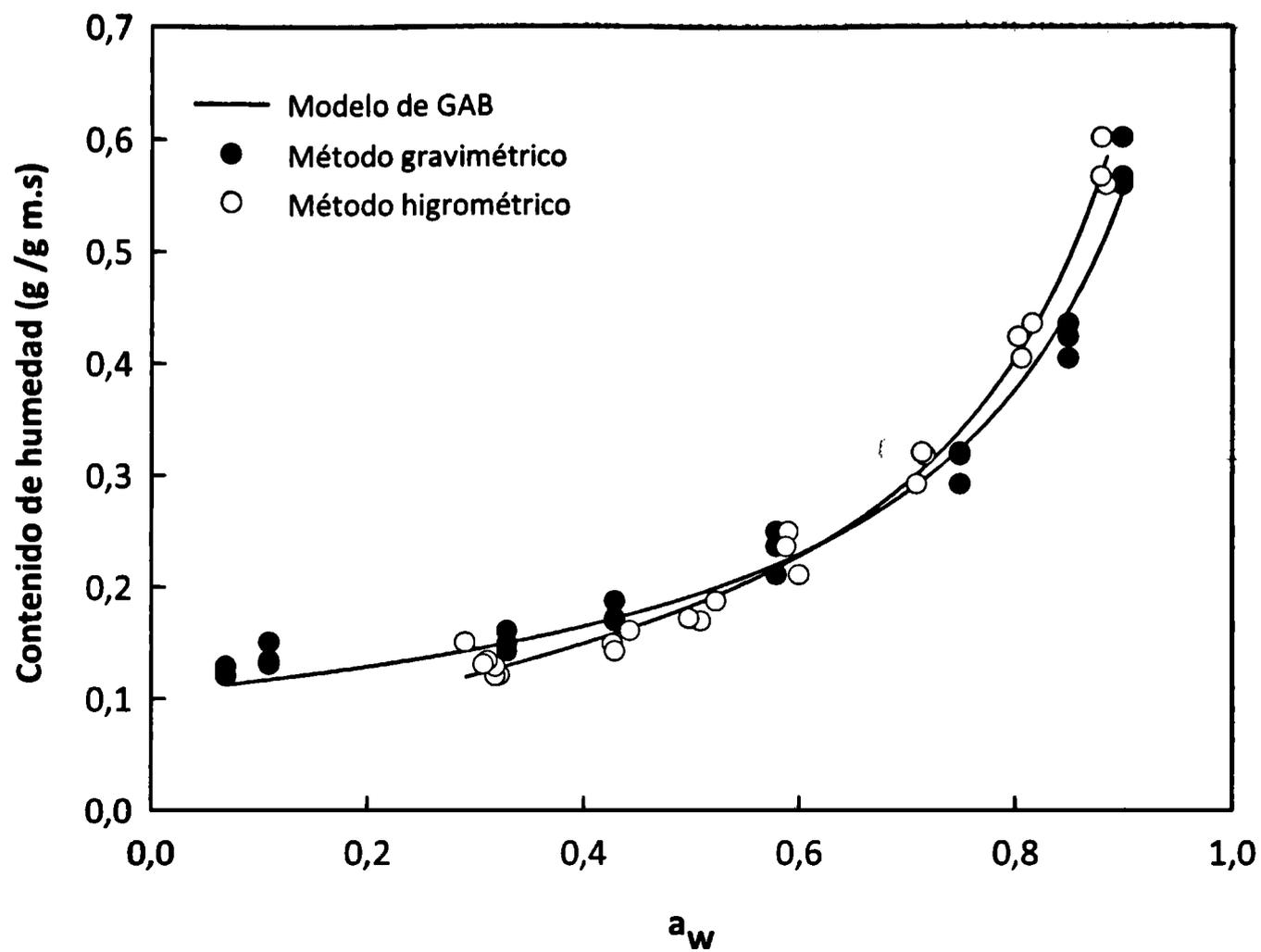


Figura 2.16 Isotherma de sorción para películas de quitosano obtenida a partir de los valores experimentales y predichos por el modelo de GAB. Los datos experimentales corresponden a los valores obtenidos a partir de la medición del a_w por el método higrométrico y los determinados por el método gravimétrico.

A fines de realizar una interpretación teórica de la isoterma de sorción de las películas de Q se aplicaron modelos matemáticos basados en criterios empíricos y teóricos que describen la relación entre el contenido de humedad de equilibrio y la a_w . Los datos experimentales obtenidos por ambos métodos se modelaron matemáticamente con los modelos de isothermas de sorción presentados en la Tabla 2.4, empleando el programa SIGMA Plot 10.0, a fin de estimar los valores de los parámetros correspondientes y el coeficiente de correlación (r^2) en cada caso.

Tabla 2.4 Modelos matemáticos utilizados para ajustar los datos experimentales de la isoterma de sorción de las películas de quitosano

ISOTERMA	Modelo	Ecuación	Referencias
BET	$X = X_m C a_w / (1 - a_w)(1 - a_w + C a_w)$	Ec. 2.10	Brunauer y col. (1938)
GAB	$X = X_m K C a_w / (1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)$	Ec. 2.11	Van der Berg (1981)
Oswin	$X = b_2 [a_w / (1 - a_w)]^{b_1}$	Ec. 2.12	Oswin (1946)
Smith	$X = b_2 - b_1 \ln (1 - a_w)$	Ec. 2.13	Smith (1947)
Chirife e Iglesias	$X = b_1 [a_w / (1 - a_w)] + b_2$	Ec. 2.14	Chirife e Iglesias (1978)

Nomenclatura utilizada:

X = contenido de humedad expresado en base seca

a_w = actividad acuosa de la muestra

X_m = valor de monocapa expresada en base seca (g agua / g muestra seca)

b_1, b_2, C, K = constantes determinadas a través del ajuste del modelo a partir de los resultados experimentales

El primer modelo fue propuesto por Brunauer y col. (1938) y es conocido como el modelo de BET. Se basa en conceptos físicos tales como la energía de adsorción en sitios de enlace, así como el contenido de agua de la monocapa que es definida como la cantidad de agua capaz de interactuar con todos los sitios de adsorción disponibles en un material deshidratado. Los parámetros obtenidos permiten estimar la cantidad de agua de monocapa, también conocida como agua límite de hidratación. El modelo de BET sólo describe adecuadamente los datos experimentales por debajo de $a_w = 0,5$ (Van der Berg, 1985). Este modelo no fue adecuado para ajustar los datos experimentales de isotermas de sorción de películas de quitosano.

El modelo de GAB propuesto por Van der Berg (1981), basándose en los trabajos de Guggenheim (1968), Anderson (1946) y De Boer (1953), es aplicable a la mayoría de los alimentos en el intervalo de a_w de interés práctico, esto es 0,10 y 0,90 (Wolf y col., 1985). Otras ecuaciones que describen adecuadamente las isotermas de sorción de materiales de envase son las de Chirife e Iglesias (1978), Oswin (1946) y Smith (1947). Los parámetros

calculados y el criterio de ajuste para los modelos semiempíricos propuestos se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Parámetros estimados para el ajuste de distintos modelos de la isoterma de sorción de películas de quitosano.

Modelo matemático	Rango de a_w	Constantes de ajuste			
GAB	0,1-0,9	X_0	C	K	r^2
A*		0,105	2,44E+05	0,90	0,980
B*		0,108	11,06	0,924	0,991
Smith	0,1-0,9	b^1	b^2		r^2
A		0,189	0,084		0,955
B		0,250	0,015		0,978
Oswin	0,1-0,9	b^1	b^2		r^2
A		0,416	0,215		0,950
B		0,564	0,185		0,988
Chirife e Iglesias	0,1-0,9	b^1	b^2		r^2
A		0,049	0,137		0,984
B		0,065	0,116		0,972

* Parámetros obtenidos del ajuste de los datos obtenidos por el método gravimétrico (A) y por el método higrométrico (B).

Los resultados obtenidos indicaron que el modelo de GAB describió con mayor exactitud el contenido de humedad obtenido experimentalmente para las películas de Q considerando el valor de r^2 obtenido (Figura 2.16, Tabla 2.5). Además permitió estimar parámetros con sentido físico como **C** y **K**, siendo **C** una constante relacionada con el calor de sorción de la primera capa y **K** una constante relacionada con el calor de sorción de las

multicapas (Sablani y col., 2007). Se observó un mejor ajuste cuando se consideraron los valores de a_w determinados mediante el método higrométrico respecto de los obtenidos por el método gravimétrico, asimismo se hallaron valores más adecuados de C , teniendo en cuenta que este parámetro tiene significado físico. La Figura 2.17 muestra la correlación obtenida entre el contenido de humedad de las películas de Q y los valores predichos por el modelo de GAB.

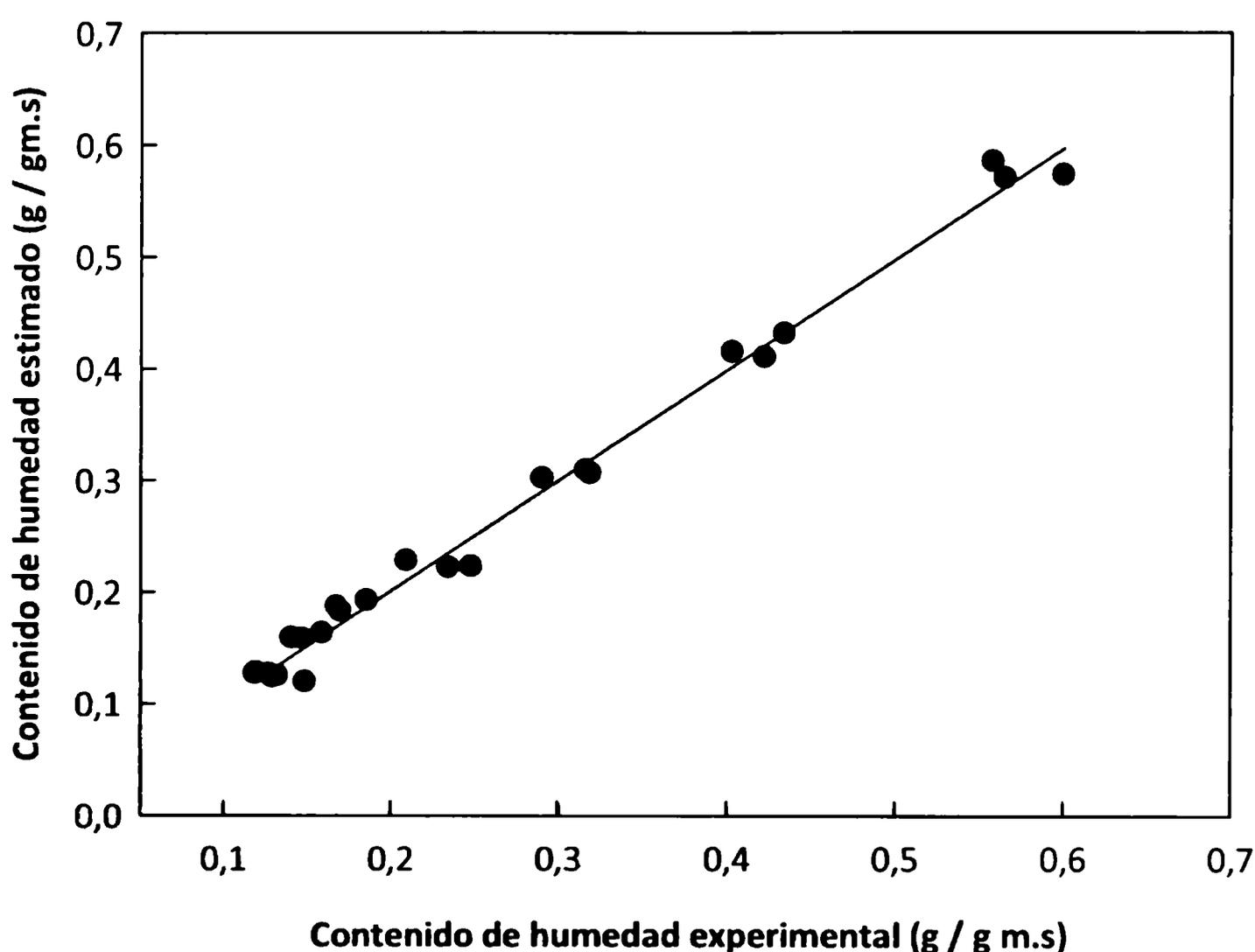


Figura 2.17 Contenido de humedad de las películas de quitosano determinado gravimétricamente en función del contenido de humedad predicho por el modelo de GAB (valores expresados en base seca).

2.4.2.8.2 Análisis térmico y espectroscópico

En la Figura 2.18 se presentan los termogramas obtenidos para muestras de películas equilibradas a diferentes humedades relativas. Se observó un evento endotérmico asociado a la remoción del agua presente en la matriz (T_p).

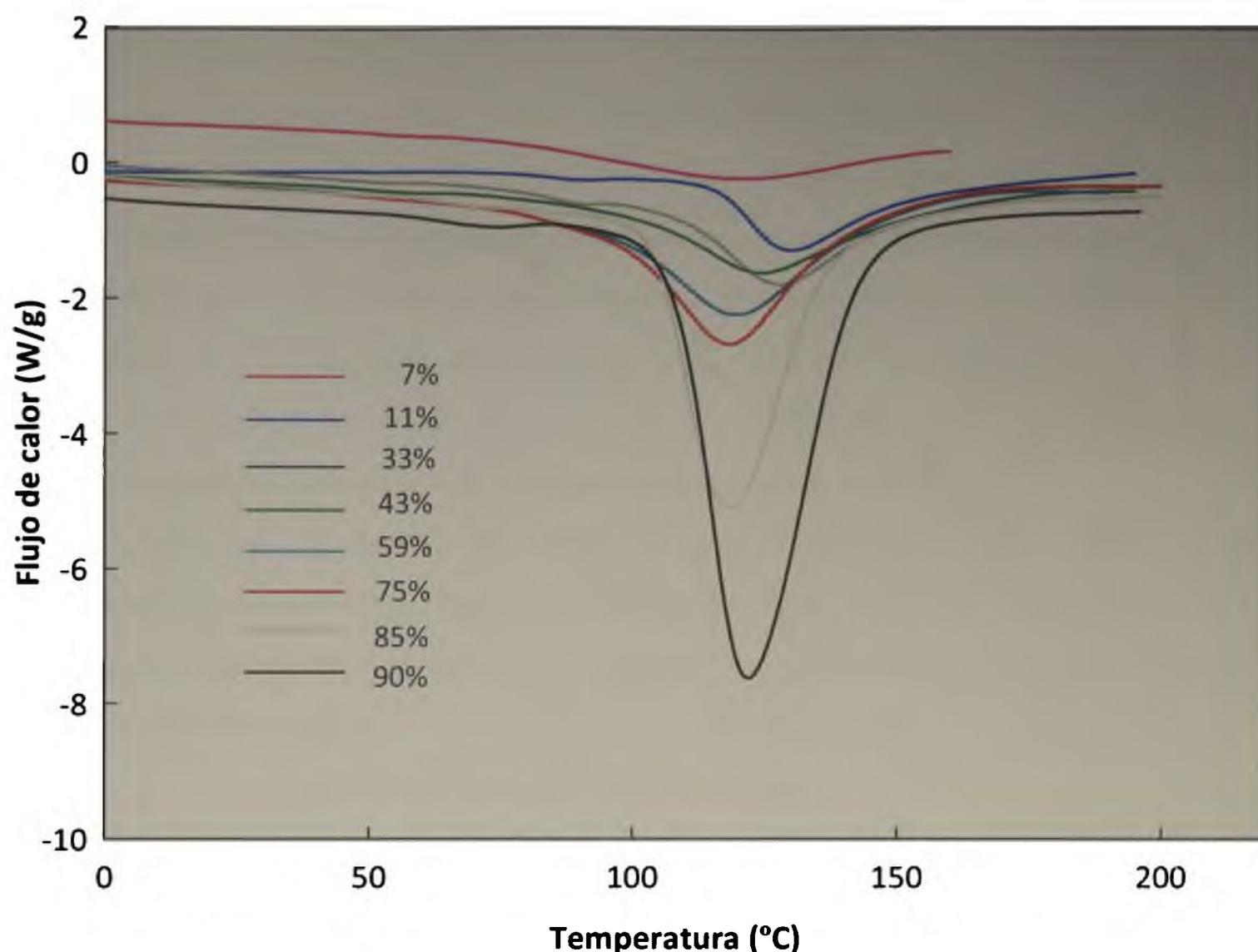


Figura 2.18 Termogramas de películas de quitosano equilibradas a diferentes humedades relativas.

Los termogramas mostraron que el área total del pico endotérmico aumentó con el contenido de humedad de las películas mientras que la temperatura del pico experimentó un corrimiento hacia menores valores. La correlación entre la entalpía y el contenido de humedad de las películas de quitosano se muestra en la Figura 2.19.

El contenido de agua presente en la matriz tiene una significativa influencia en las propiedades físicas de las películas obtenidas a partir de polímeros biodegradables. La matriz se ve afectada por el número de grupos iónicos disponibles para interactuar en el material, así como su naturaleza.

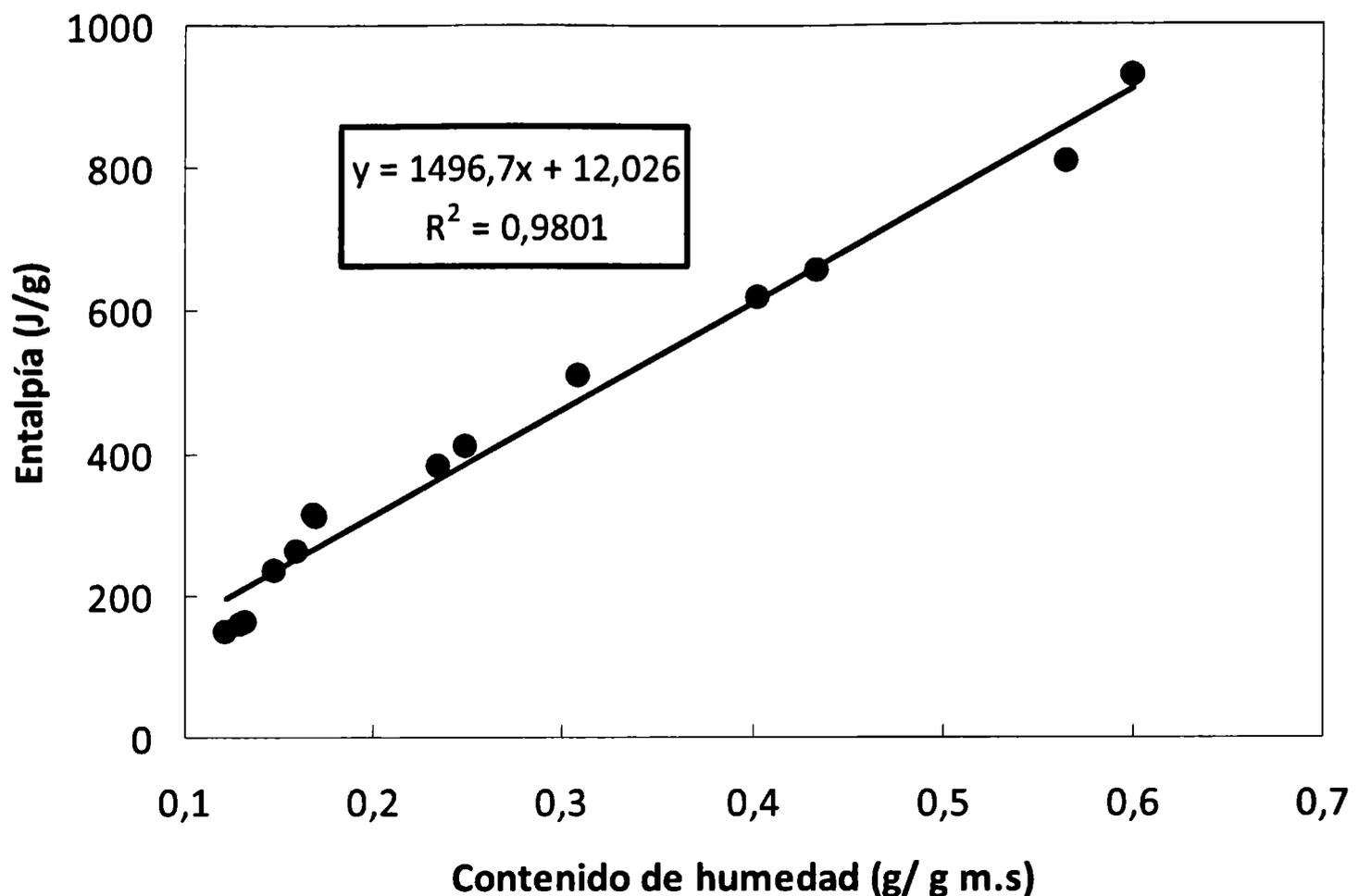


Figura 2.19 Entalpía total del evento endotérmico obtenida por DSC en función del contenido de humedad de las películas de quitosano determinado gravimétricamente (valores expresados en base seca).

En el caso del quitosano, los sitios más importante para la unión de las moléculas de agua son los grupos polares como los oxhidrilos y los grupos amino presentes en el polímero (Neto y col., 2005). Rueda y col. (1999), realizando investigaciones por espectroscopía de infrarrojo encontraron que la interacción del agua con los grupos oxhidrilo es más fuerte que con los grupos amino. También informaron que la cantidad relativa de las moléculas de agua unidas a los dos grupos polares cambia durante el proceso de absorción. La Figura 2.20 muestra los espectros de IR para películas de Q acondicionadas a diferentes HR. Se observó que para bajos contenidos de humedad la intensidad de la banda correspondiente a las vibraciones N-H fue mayor que la de la banda correspondiente a la vibración del O-H (Neto y col., 2005).

Los grupos OH-, cuando forman parte de enlaces hidrógeno absorben aproximadamente a un número de onda de 3400 cm^{-1} . Es necesario remarcar que la absorción en la región $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ de las muestras con mayor contenido de humedad

provocó una saturación de dicha banda como puede observarse en el espectro correspondiente (Figura 2.20).

La zona comprendida entre 1700 y 1500 cm^{-1} corresponde al modo de flexión de las moléculas de agua presentes en la matriz polimérica (Rueda y Bayer, 1999). Esta banda presentó un ligero desplazamiento hacia un número de onda mayor con el aumento de humedad de la película. El rango de absorción varió desde 1640 cm^{-1} para la muestra seca acondicionada en P_2O_5 hasta un valor aproximado de 1650 cm^{-1} para la película con mayor contenido de humedad. Como era de esperar, con el aumento del contenido de agua de las películas los cambios se hicieron visibles debido al incremento del área del pico.

Por otro lado las bandas de referencia propias de la matriz de quitosano se mantuvieron fijas independientemente del contenido de humedad. La asignación de los grupos que absorben en las diferentes regiones ya han sido analizados en detalle previamente en este Capítulo.

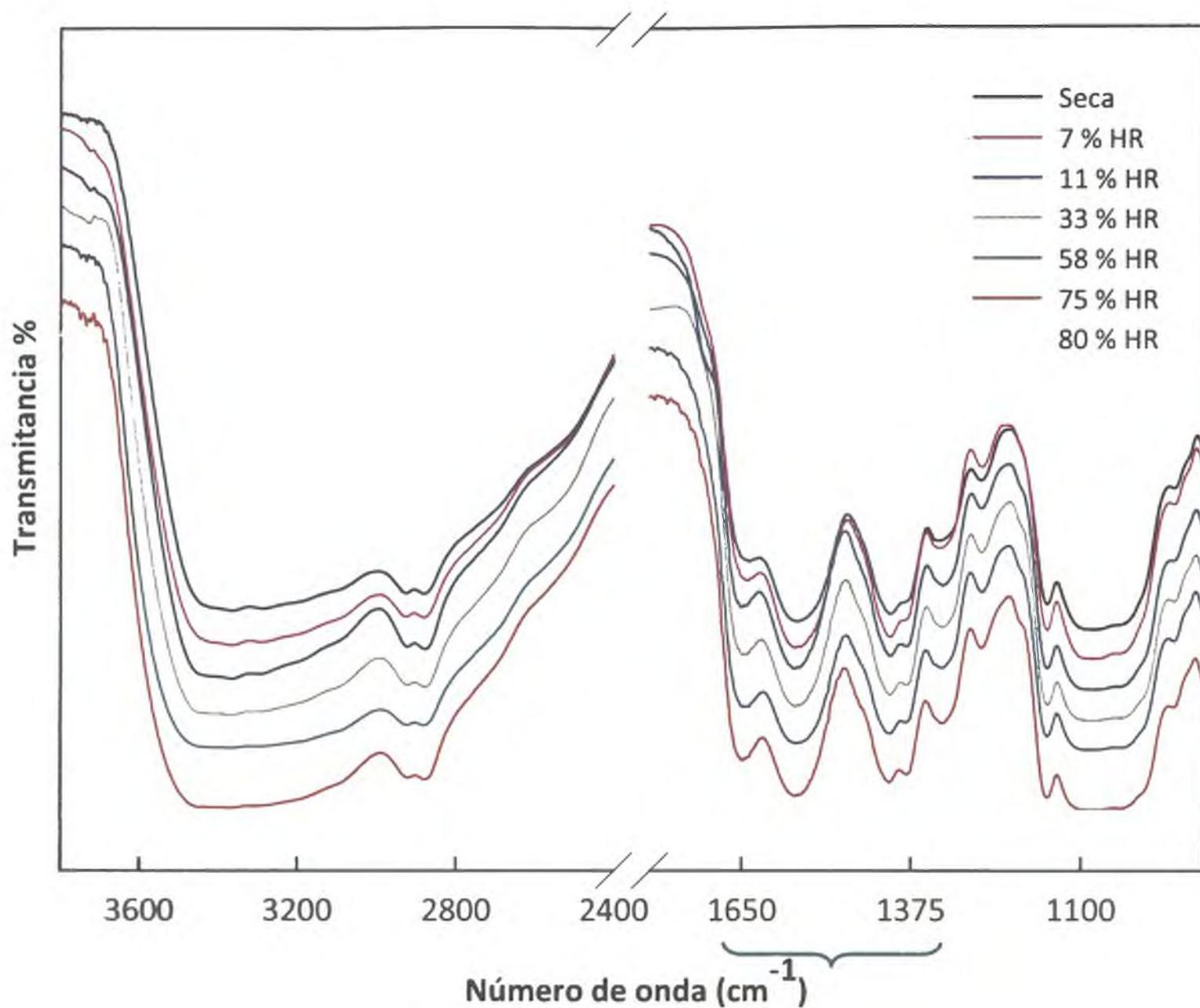
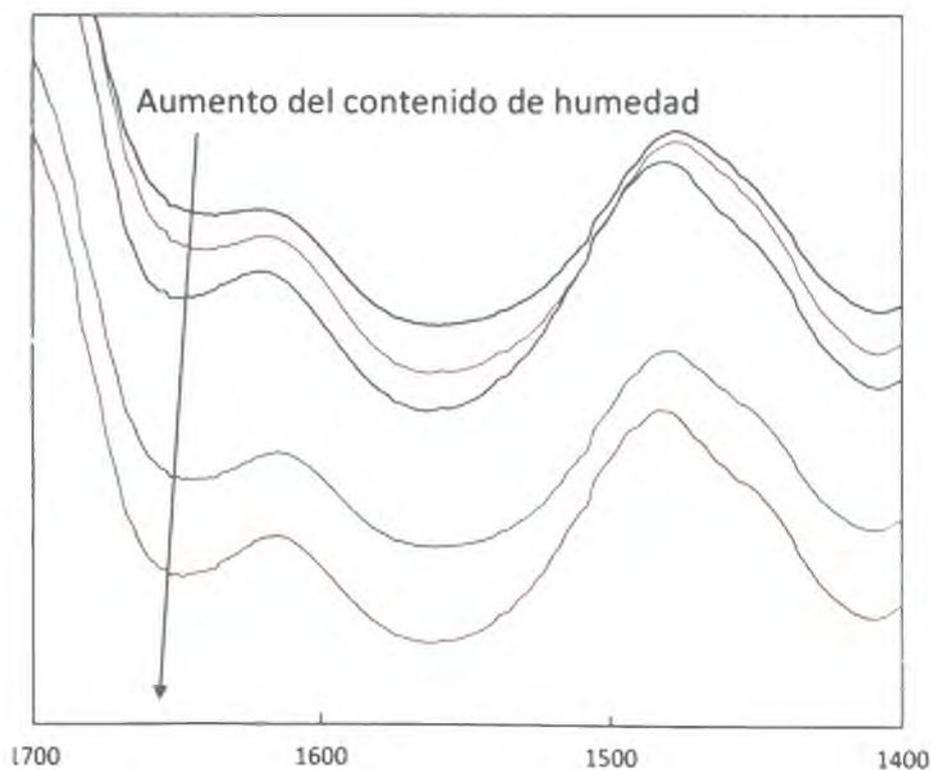


Figura 2.20 Espectro de FTIR de películas de quitosano equilibradas en atmósferas con diferentes HR. La región señalada 1400-1700 cm^{-1} se muestra magnificada en la Figura inferior.



El agua es el plastificante natural de los materiales hidrofílicos. Una de las comprobaciones de las interacciones de las moléculas de agua con los componentes de la matriz es a través de los corrimientos experimentados por la T_g . (Ross, 1995). El modelo de Gordon y Taylor para mezclas binarias (Ec. 2.5) se utilizó para ajustar los valores experimentales de las T_g obtenidos por MDSC de las películas de quitosano almacenadas a diferentes humedades relativas (r^2 0,97) (Figura 2.21), obteniéndose un k_g de 1,051, la cual es una constante que da idea de la fuerza de interacción entre el agua y el polímero, como ya se mencionó.

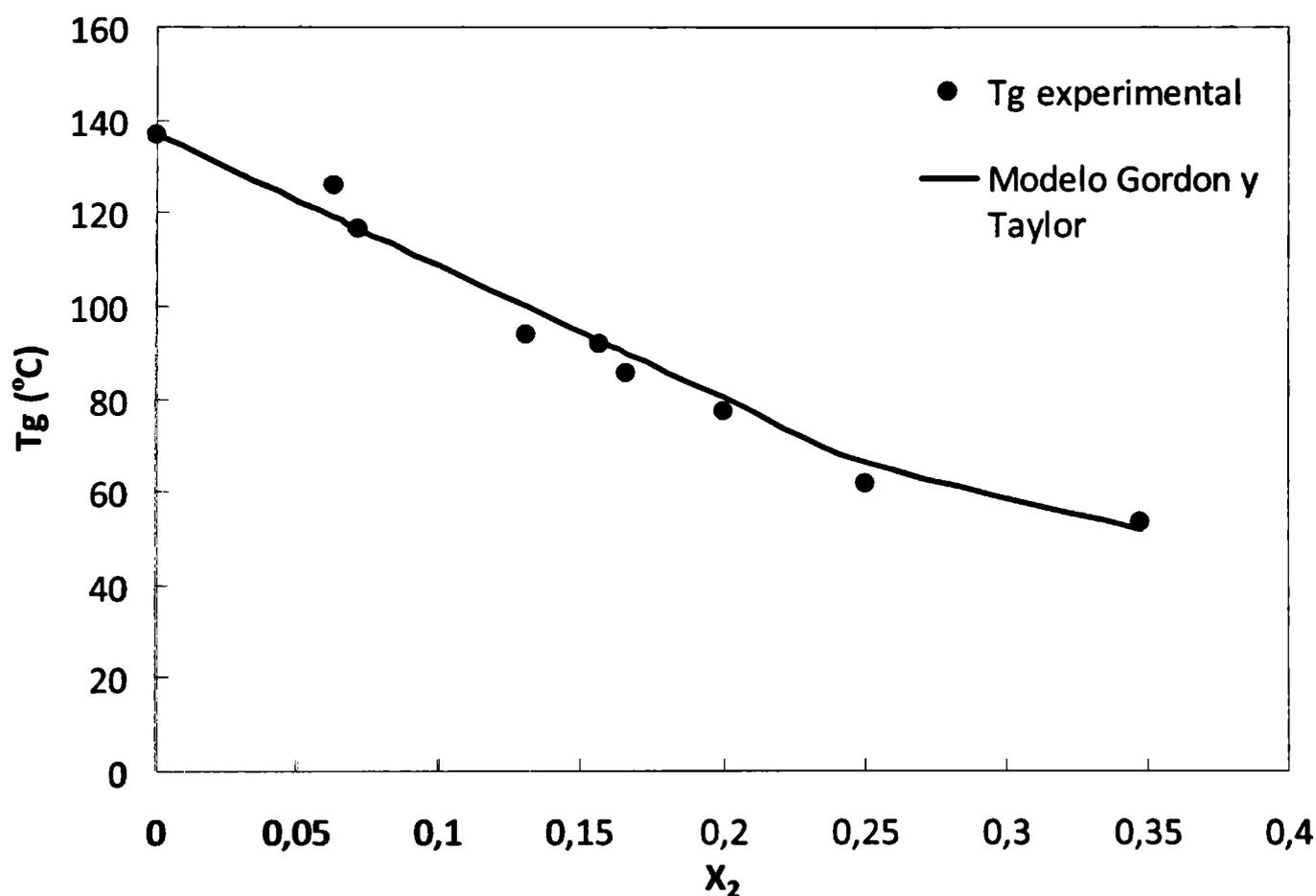


Figura 2.21 Valores de T_g obtenidos experimentalmente (●) y predichos (—) por el modelo de Gordon y Taylor en función de la fracción de agua (X_2) de acuerdo con la Ec. 2.5.

Una tendencia similar fue descrita por diferentes autores para películas a base de polímeros hidrofílicos (Ross, 1995; Lazaridou y Biliaderis, 2002; Lazaridou y col., 2003; Kristo y Biliaderis, 2006; Mendieta-Taboada y col., 2008).

Como conclusión parcial, las películas de quitosano presentaron una buena apariencia e integridad estructural. Asimismo el agregado de glicerol a la matriz disminuyó la resistencia, aumentando la elasticidad y permeabilidad al vapor de agua de las películas, con una marcada disminución en la temperatura de transición vítrea y un aumento del contenido de humedad con la concentración de plastificante. El análisis detallado de los espectros de FTIR sustentaron los cambios ocasionados por la presencia de glicerol en la matriz de quitosano.

Por otra parte, el estudio de la interacción del quitosano como matriz hidrofílica con las moléculas de agua es importante para determinar la estabilidad y posibles aplicaciones del material. Las isotermas de sorción obtenidas por el método higrométrico y los valores hallados de temperaturas de transición vítrea resultaron complementarios y ayudarían a predecir la estabilidad de las películas de quitosano bajo diferentes condiciones ambientales.

REFERENCIAS

- Abugoch L.E., Tapia C., Villamán M.C., Yazdani-Pedram M., y Díaz-Dosque M. (2011).** Characterization of quinoa proteinechitosan Blond medible films. *Food Hydrocolloids*, 25, 879-886.
- Alvarez V.A., y Vázquez A. (2004).** Thermal degradation of cellulose derivatives/starch blends and sisal fibre biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 84, 13-21.
- Alves V.D., Castelló R., Ferreira A.R., Costa N., Fonseca I.M., y Coelho I.M. (2011).** Barrier properties of carrageenan/pectin biodegradable composite films. *Procedia Food Science*, 1, 240-245.
- Aider M. (2010).** Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- Anderson R. B. (1946).** Modifications of BET equation. *Journal of the American Chemical Society*, 68, 686-691.
- AOAC. (1984).** Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. E.U.A. 14^a Ed. Washington, D.C.
- Buera M.P., Levi G., y Karel M. (1992).** Glass transition in poly(vinylpyrrolidone): effect of molecular weight. *Biotechnology Progress*, 8, 144-148.
- Cerqueira M.A., Souza B.W.S., Teixeira J.A., y Vicente A.A. (2012).** Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films. A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27, 175-184.
- Cheung M.K., Wan K.P.Y., y Yu P.H. (2002).** Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, ¹H T₁ and T_{1ρ} CRAMPS. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(5), 1253-1258.
- Chirife J., e Iglesias H.A. (1978).** Equations for fitting water sorption isotherms of food: Part 1. A review. *Journal of Food Technology*, 13, 159-174.
- Cho S.Y., y Rhee C. (2002).** Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *LWT-Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 151-157.
- Clasen C., Wilhelms T., y Kulicke W-M. (2006).** Formation and Characterization of Chitosan Membranes. *Biomacromolecules*, 7, 3210-3222.

- Couchman P.R., y Karasz F.E. (1978).** A classical thermodynamic discussion of the effect of composition on glass-transition temperatures. *Macromolecules*, 11, 117-119.
- Coupland J. N., Shaw N. B., Monahan F. J., Oriordan E. D., y Osullivan M. (2000).** Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behaviour of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43, 25-30.
- De Boer J. H. (1953).** The Dynamical Character of Adsorption. Clarendon Press, Oxford.
- Del Nobile M.A., Chillo S., Falcone P.M., Laverse J., Pati S., y Baiano A. (2007a).** Textural changes of Canestrello Pugliese cheese measured during storage. *Journal of Food Engineering*, 83, 621-628.
- Del Nobile M.A., Chillo S., Mentana A., y Baiano A. (2007b).** Use of the generalized axwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods. *Journal of Food Engineering*, 78, 978-983.
- Diab T., Biliaderis G.C., Gerasopoulos D., y Sfakiotakis E. (2001).** Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 988-1000.
- Domján A., Bajdik J., y Pintye-Hódi K. (2009).** Understanding of the Plasticizing Effects of Glycerol and PEG 400 on Chitosan Films Using Solid-State NMR Spectroscopy. *Macromolecules*, 42(13), 4667-4673.
- Dong Y.M., Ruan Y.H., Wang H.W., Zhao Y.G., y Bi D.X. (2004).** Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1553-1558.
- Donhowe I.G., y Fennema O. (1993).** The effects of plasticizer on cristallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose Films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17(4), 247-257.
- Fernandez Cervera M., Heinämäki J., Räsänen M., Maunu S.L., Karjalainen M., Nieto Acosta O.M., Araizoz Colarte A. y Yliruusi J. (2004).** Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 401-408.
- Fennema O.R. (1996).** Food Chemistry; 3º. Edition, Marcel and Dekker Inc., New York.

- Famá L., Rojas A.M., Goyanes S., y Gerschenson L.N. (2005).** Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT-Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 38, 631-639.
- Famá L., Goyanes S., y Gerschenson L. (2007).** Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 70, 265-273.
- Flores S.K., Famá L., Rojas A.M., Goyanes S., y Gerschenson L. (2007).** Physical properties of tapioca-starch edible films: influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40, 257-265.
- García M.A., Ferrero C., Campana A., Bértola N., Martino M., y Zaritzky N. (2004).** Methylcellulose coatings reduce oil uptake in fried products. *Food Science and Technology International*, 10(5), 339-346.
- García N., Famá L., Dufresne A., Aranguren M., y Goyanes S. (2009).** A comparison between the properties of tuber and cereal starches. *Food Research International*, 42, 976-982.
- García N.L., Ribba L., Dufresne A., Aranguren M., y Goyanes S. (2011).** Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 84, 203-210.
- Gennadios A., y Weller C. L. (1994).** Moisture Adsorption by Grain Protein Films. *Biological Systems Engineering*, 37(2), 535-539.
- Ghanbarzadeh B., y Oromiehi A.R. (2009).** Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *Journal of Food Engineering*, 90, 517-524.
- Gontard N., Guilbert S., y Cuq J.L. (1993).** Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water-vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58(1), 206-211.
- Guggenheim E. A. (1968).** Applications of Statistical Mechanics. Clarendon Press, Oxford.
- Krumova M., López D., Benavente R., Mijangos C., y Pereña J., M. (2000).** Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol). *Polymer*, 41, 9265-9272.
- Kalichevsky M.T., y Blanshard J.M.V. (1993).** The effect of fructose and water on the glass transition of amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 20, 107-113.

- Krause Bierhalz A.C., Altenhofen da Silva M., y Guenter Kieckbusch T. (2012).** Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110, 18-25.
- Kristo E., y Biliaderis C.G. (2006).** Water sorption and thermomechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: Caseinate-pullulan bilayers and blends. *Food Hydrocolloids*, 20, 1057-1071.
- Labuzza T.P. (1984).** Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurement and use. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists. pp. 8-21.
- Lacroix M., y Cooksey K. (2005).** Edible films and coatings from animal-origin proteins. In: Elsevier Ltd (Ed.), *Innovations in Food Packaging*, pp. 301-312, Chapter 18.
- Lazaridou A., y Biliaderis C.G. (2002).** Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers*, 48(2), 179-190.
- Lazaridou A., Biliaderis C.G., y Kontogiorgos V. (2003).** Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers*, 52, 151-166.
- Le Meste M., Champion D., Roudaut G., Blond G., y Simatos D. (2002).** Glass Transition and Food Technology: A Critical Appraisal. *Journal of Food Science*, 67(7), 2444-2458.
- León P.G., Chillo S., Conte A., Gerschenson L.N., Del Nobile M.A., y Rojas A.M. (2009).** Rheological characterization of deacylated/acylated gellan films carrying L-(p)-ascorbic acid. *Food Hydrocolloids*, 23, 1660-1669.
- Liu Y., Bhandari B., y Zhou W. (2006).** Glass transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5701-5717.
- López O., García M., y Zaritzky N. (2008).** Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 73, 573-581.
- Ludwiczak S., y Mucha M. (2010).** Modeling of water sorption isotherms of chitosan blends. *Carbohydrate Polymers*, 79, 34-39.
- Mali S., Grossmann M., García M., Martino M., y Zaritzky N. (2002).** Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50, 379-386.

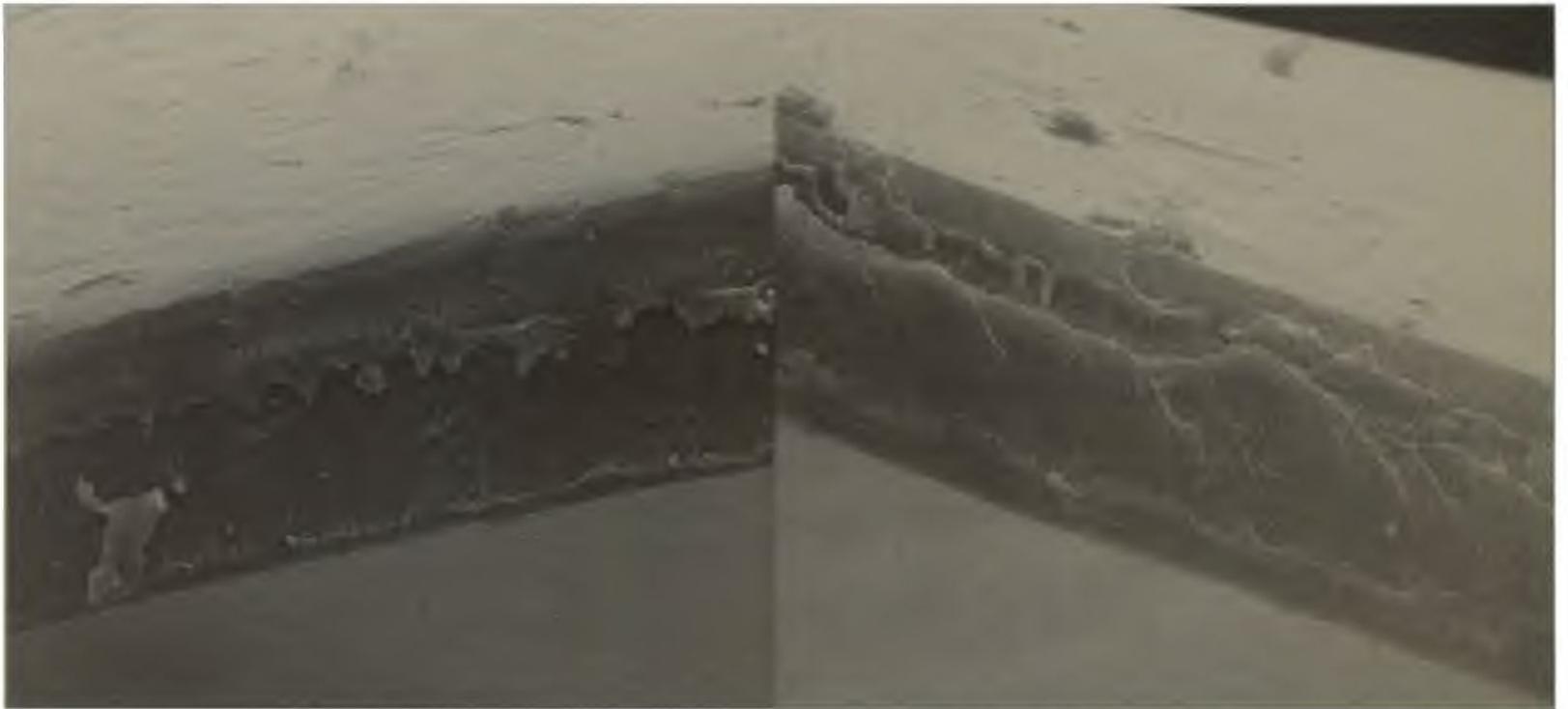
- Mali S., Sakanaka L.S., Yamashita F., y Grossmann M.V.E. (2005).** Water Sorption and Mechanical Properties of Cassava Starch Films and their Relation to Plasticizing Effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283-289.
- Masciovecchio C., Monaco G., Ruocco G., Sette F., Cunsolo A., Krisch M., Mermet A., Soltwisch M., y Verbeni R. (1998).** High frequency dynamics of glass forming liquids at the glass transition. *Physical Review Letters*, 80(3), 544-547.
- Mendieta-Taboada O., Sobral P. J. A., Carvalho R. A., y Habitante A. M. B. Q. (2008).** Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 22, 1485-1492.
- Mucha M., y Pawlak A. (2005).** Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*, 427, 69-76.
- Neto C.G.T., Giacometti J.A., Job A.E., Ferreira F.C., Fonseca J.L.C., y Pereira M.R. (2005).** Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*, 62, 97-103.
- Oswin C.R. (1946).** Kinetics of package life. III. Isotherm. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 65, 419-421.
- Park S.Y., Jun S.T., y Marsh K.S. (2001).** Physical properties of PVOH/chitosanblended films cast from different solvents. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 499-502.
- Perdomo J., Cova A., Sandoval A.J., García L., Laredo E., y Müller A.J. (2009).** Glass transition temperatures and water sorption isotherms of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 76, 305-313.
- Piermaria J., Bosch A., Pinotti A., Yantorno O., Garcia M.A., y Abraham A.G. (2011).** Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1261-126.
- Pinotti A., García M.A., Martino M., y Zaritzky N. (2007).** Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21, 66-72.
- Quijada-Garrido I., Iglesias-González V., Mazón-Arecherra J.M., y Barrales-Rienda J.M. (2007).** The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their

- transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol). *Carbohydrate Polymers*, 68, 173-186.
- Reinsberg S.A., Qiu X.H., Wilhelm M., Spiess H.W., y Ediger M.D. (2001).** Length scale of dynamic heterogeneity in supercooled glycerol near T_g. *Journal of Chemical Physics*, 114(17), 7299-7302.
- Rhim J.W. (2004).** Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT-Food Science and Technology*, 37(3), 323-330.
- Rivero S., García M.A., y Pinotti A. (2010)** Crosslinking Capacity of Tannic Acid in Plasticized Chitosan Films. *Carbohydrate Polymers*, 82, 270-276.
- Ross Y.H. (1995).** Phase Transitions in Foods. San Diego: Academic Press. pp. 73-107.
- Rueda D.R., Secall T., y Bayer R.K. (1999).** Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 40, 49-56.
- Sablani, S.S., Kasapis S., y Rahman M.S. (2007).** Evaluating water activity and glass transition concepts for food stability. *Journal of Food Engineering*, 78, 266-271.
- Slade L., y Levine H. (1991).** Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30, 115-360.
- Slade L., y Levine H. (1993).** Glass transition and water-food structure interactions. In: Taylor L, Kinsella JF, editors. *Advances in nutrition and food research*. pp. 103-269.
- Sakurai K., Maegawa T., y Takahashi T. (2000).** Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(n-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, 41, 7051-7056.
- Smith S.E. (1947).** The absorption of water by high polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 69, 646-651.
- Sothornvit R., y Krochta J.M. (2005).** Plasticizers in edible films and coatings innovations. In J.H.Han (Ed.), *Innovations in food packaging*. Amsterdam: Elsevier. pp. 403-428.
- Suyatma N.E., Tighzert L., y Copinet A. (2005).** Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3950-3957.

- Van der Berg C., y Bruin S. (1981).** Water activity and its estimation in food Systems: theoretical aspects. In water activity: influences in food quality. Academic Press Inc. pp. 1-55.
- Wilhelm H., Sierakowski M., Souza G., y Wypych F. (2003).** Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52, 101-110.
- Zhang X.Q., Burgar I., Lourbakos E., y Beh H. (2004).** The mechanical property and phase structures of wheat proteins/polyvinyl alcohol blends studied by high-resolution solid-state NMR. *Polymer*, 45(10), 3305-3312.
- Ziani K., Osés J., Coma V., y Maté J.I. (2008).** Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT- Food Science and Technology*, 41(10), 2159-2165.



CAPITULO 3



Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

La gelatina y el quitosano son biopolímeros que poseen buena afinidad y compatibilidad, es decir, son capaces de producir mezclas miscibles ya que interactúan a nivel molecular permitiendo el desarrollo de películas compuestas (Arvanitoyannis y col., 1998a; Sionkowska y col., 2004). El desarrollo y caracterización de estos materiales tienen gran potencial de aplicación en el área farmacológica, cosmética, médica y en el sector agroalimentario (Arvanitoyannis y col., 1998a). De acuerdo con Kruif y Tuinier (2001) las proteínas y los polisacáridos pueden formar interacciones del tipo segregativas en las que ambos se repelen y por ende son incompatibles, o pueden establecer interacciones atractivas o asociativas entre los polímeros dando lugar a la formación de un sistema estable. El fenómeno que tiene lugar cuando se mezclan dos biopolímeros con carga opuesta, como la gelatina y el quitosano bajo determinadas condiciones es la formación de un coacervato.

Así, la formulación de películas compuestas de quitosano y gelatina constituye una alternativa para modificar las propiedades de las matrices de quitosano e impartirles funcionalidades específicas. Además, se ha demostrado que ambos biopolímeros interactúan a nivel molecular principalmente a través de enlaces iónicos y de hidrógeno (Taravel y Domard, 1995) afectando las propiedades físicas de las mezclas y dando lugar a nuevas aplicaciones para estos biomateriales.

Diversos autores (Arvanitoyannis y col., 1998a; Chiono y col., 2008; Gómez-Estaca y col., 2010; Kolodziejska y col., 2006; Kolodziejska y Piotrowska, 2007; Liu y col., 2012; Pereda y col., 2011; Sztuka y Kolodziejska, 2008) han llevado a cabo estudios donde evaluaron la combinación de ambos biopolímeros para producir películas biodegradables, caracterizando sus propiedades. En el presente trabajo de Tesis se formularon películas compuestas de gelatina y quitosano obtenidos a partir de subproductos de las industrias de la curtiembre y pesquera, respectivamente. El aprovechamiento de estos recursos naturales renovables representa una alternativa económicamente viable para el desarrollo de envases, confiriendo valor agregado a estos productos y contribuyendo a la preservación del medio ambiente, ya sea por la reutilización de desechos o por la formulación de materiales biodegradables.

En este contexto, el Capítulo se organizó en dos partes, una primera en la que se estudiaron las películas de gelatina utilizada en los ensayos posteriores, y una segunda etapa

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

en la que se desarrollaron diferentes materiales: sistemas compuestos, *bicapa* y *laminados* como estrategias innovadoras para mejorar las propiedades mecánicas y fundamentalmente las propiedades de barrera al vapor de agua.

PARTE I. PELÍCULAS DE GELATINA: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN**3.1 INTRODUCCIÓN**

El colágeno es la fibra más abundante del tejido conectivo. La estructura básica del colágeno, la cual se denomina tropocolágeno, es una proteína fibrosa de peso molecular inferior a 300.000 Da. Cada molécula de tropocolágeno está compuesta de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas. Cada uno de estos polipéptidos se denomina cadena α y posee un peso molecular de 90.000 Da, aproximadamente. Estas cadenas se entrelazan para formar la triple hélice característica del colágeno. Las cadenas α difieren en su secuencia y en el número de aminoácidos. Basándose en estas diferencias, se han encontrado hasta el momento, 20 tipos distintos de moléculas de colágeno.

Cuando los tejidos que contienen colágeno se someten a procesos degradativos que, usualmente, involucran hidrólisis alcalina o ácida seguidos de una extracción acuosa en caliente, la estructura fibrosa del colágeno se rompe irreversiblemente y se obtiene la gelatina. Por consiguiente, el proceso de manufactura involucra la destrucción de la estructura terciaria, secundaria, y en alguna medida también la primaria del colágeno nativo (Ledward, 1986; Ward y Courts, 1977). En efecto, tres tipos predominantes de cadenas se pueden encontrar después de la degradación tropocolagénica, la α , compuesta por una sola cadena peptídica, la β , formada por dos cadenas peptídicas conectadas y la γ , que resulta del vínculo entre tres cadenas.

La gelatina se puede extraer del colágeno proveniente de diversas fuentes animales tales como piel de vaca, cerdo o pescado, polvo de hueso y de otros recursos naturales de menor uso (Ledward, 1986; Ward y Court, 1977). En principio, la composición en aminoácidos de la gelatina obtenida es similar a la del material a partir del cual se obtiene y, por lo tanto, la diferencia de especies y de tipos de tejido da origen a materiales distintos.

Las características del producto obtenido dependerán del tratamiento al cual fue sometido el colágeno durante el proceso de obtención. El proceso alcalino que induce la

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

remoción de grupos amida, provee una gelatina Tipo B con una alta densidad de grupos carboxilos, con un punto isoeléctrico (pI) relativamente bajo, alrededor de 4,8, por lo que a pH neutro las cadenas estarán cargadas negativamente. Por el contrario, la naturaleza eléctrica del colágeno no es sustancialmente modificada mediante el proceso de extracción ácido y como resultado se obtiene una gelatina Tipo A con un pI relativamente alto, entre 7-9 (Ward y Courts, 1977).

La gelatina posee propiedades características, forma una solución de elevada viscosidad en agua y produce un gel cuando esta solución se enfría. Asimismo, estas macromoléculas en solución se comportan como polianfolitos debido a la composición de aminoácidos básicos y ácidos (Dobrynin y col., 2004). El estado conformacional de las cadenas de gelatina es altamente dependiente del medio fisicoquímico en el que se encuentran disueltas, teniendo en cuenta que estas moléculas se estabilizan mediante diferentes tipos de fuerzas inter e intra-moleculares, en las que intervienen principalmente los enlaces del tipo puente de hidrógeno (Bohidar y Jena, 1994; Bohidar, 1998; Herning y col., 1991; Pezron y col., 1991; Tromp y col., 2002). Es un biopolímero con numerosas aplicaciones, reconocido como GRAS y ampliamente utilizado como ingrediente en la industria alimentaria, como en la elaboración de mermeladas debido a su alta capacidad para ligar agua, o en la fabricación de helados como agente estabilizante. También es utilizada por sus propiedades adhesivas, o como agente de compactación.

Además, la industria farmacéutica hace un uso intensivo de la gelatina, empleando aproximadamente el 10% del total de su producción destinada principalmente a la fabricación de cápsulas. Asimismo se han desarrollados hidrogeles a partir de gelatina los que se han empleado como sistemas para la liberación controlada de drogas. Otras propiedades físicas destacables son la adhesividad, gelificación, solvatación y la capacidad filmogénica.

Justamente, debido a esta última propiedad, en los últimos años ha crecido la utilización de la gelatina en el campo de los materiales para el desarrollo de envases biodegradables. Dado que es habitual que las películas de biopolímeros desarrollen matrices rígidas susceptibles a la ruptura durante su manipuleo se incorporan agentes plastificantes para mejorar sus características (Arvanitoyannis y col., 1998b). Como ya se ha discutido en el

Capítulo 2, es de esperar que en matrices de gelatina el glicerol produzca un efecto similar que en las películas de quitosano. Mendieta-Taboada y col. (2008), Sothornvit y Krochta (2001) y Thomazine y col. (2005) señalaron que el agregado de glicerol reduce las fuerzas intermoleculares establecidas entre las cadenas polipeptídicas de la gelatina generando una mayor movilidad de las mismas, acompañado de una mejora en la flexibilidad de las películas. El glicerol posee buena afinidad por las matrices hidrofílicas y ha sido ampliamente estudiado como aditivo en la formulación de películas de gelatina (Audic y Chaufer, 2005).

Asimismo, el conocimiento de la microestructura de las películas es de gran importancia para la caracterización del material, ya que determina sus propiedades fisicoquímicas, de barrera y mecánicas, las que dependen fundamentalmente del estado del polímero. Por otra parte, como ya se ha explicado la temperatura de transición vítrea (T_g) es un parámetro crítico para seleccionar las condiciones de procesamiento y almacenamiento de las películas y definir sus posibles aplicaciones industriales (Langmaier y col., 2008; Mendieta-Taboada y col., 2008).

Los objetivos planteados para esta primera parte del Capítulo fueron:

- ❖ Caracterizar la gelatina utilizada.
- ❖ Desarrollar películas de gelatina con diferentes concentraciones de glicerol y caracterizar las películas desarrolladas.
- ❖ Establecer una correlación entre las propiedades microestructurales y las propiedades de barrera, térmicas y mecánicas de las películas de gelatina como etapa preliminar a la formulación de las películas compuestas de gelatina y quitosano.

3.1.1 MATERIALES

Se empleó gelatina Tipo B de origen bovino suministrado por Gelico (Belo Horizonte, Brazil), disponible en forma de polvo granulado.

Como agente plastificante se utilizó glicerol grado analítico, J.T. Baker (Xalostoc, México).

3.1.2 MÉTODOS

3.1.2.1 Caracterización de la gelatina de origen bovino

3.1.2.1.1 Determinación del contenido de humedad y cenizas

Las determinaciones se realizaron mediante los métodos descritos en el Capítulo 1 y 2.

3.1.2.1.2 Determinación del contenido de proteínas

Para determinar el contenido de proteínas de la muestra de gelatina se utilizó el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning de acuerdo con el protocolo propuesto por la AOAC (1999). Se pesaron aproximadamente 0,5 g de de gelatina y se procedió a la digestión de la muestra. A partir del valor del contenido de nitrógeno obtenido, se puede calcular el contenido de proteínas de la gelatina utilizando el factor de conversión 5,5 g proteína/g nitrógeno, específico para esta proteína (AOAC, 1984). Las muestras se analizaron por duplicado.

3.1.2.1.3 Determinación de la fuerza del gel

Una de las técnicas normalizadas más utilizadas a nivel industrial para estandarizar muestras de gelatina es la determinación de la fuerza de gel o ensayo de "Bloom". Este ensayo de laboratorio, consiste en medir la fuerza necesaria (\vec{g}) para producir una compresión de 4 mm de profundidad en un gel de 4 cm de diámetro y 4,5 cm de alto.

La fuerza del gel de la gelatina utilizada se determinó de acuerdo con el método descrito por Avena-Bustillos y col. (2006) con algunas modificaciones. Para el ensayo se prepararon soluciones de gelatina al 6,67% (p/p) por solubilización en agua destilada a 60°C. A partir de las soluciones se obtuvieron geles manteniendo los contenedores a 10°C durante 18 hs. La fuerza del gel de gelatina se midió a 10°C usando un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra) equipado con un punzón SMS P/0-5R de 12,5 mm de diámetro.

*Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas***3.1.2.2 Preparación de películas**

Las películas se prepararon a partir de soluciones de gelatina de origen bovino tipo B (G) por solubilización en agua destilada a 60°C. En un ensayo preliminar se evaluaron distintas concentraciones del biopolímero (5, 7,5 y 10% p/v), a fin de seleccionar la concentración más adecuada para los ensayos posteriores. Para la selección se tuvieron en cuenta las características reológicas y las propiedades mecánicas de las películas desarrolladas.

Las concentraciones de glicerol ensayadas fueron: 0,75, 1,5, 2,25, 3, 4,5, 6 y 7,5% (p/p) de plastificante. Las películas de gelatina con y sin plastificante se obtuvieron por moldeo de las soluciones en placas de acrílico. El secado se realizó en estufa a 37°C durante 24 hs, y el acondicionamiento de las películas se realizó a una humedad relativa (HR) del 65% y a una temperatura de 20°C.

3.1.2.3 Caracterización fisicoquímica de las películas

El espesor de las películas se determinó utilizando un medidor electrónico como se describió previamente en el Capítulo 2.

3.1.2.4 Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de las películas de gelatina sin plastificar y plastificadas se obtuvieron como se describió en el Capítulo 1.

3.1.2.5 Propiedades térmicas de las películas

Las propiedades térmicas de las películas de gelatina con y sin plastificante fueron determinadas usando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) en el modo convencional como se explicó en el Capítulo 1.

Protocolo utilizado para el ensayo:

Se siguió un protocolo similar al desarrollado en el Capítulo 2, pero bajo el modo DSC convencional, dado que no fue necesario modular la señal para la detección de la temperatura de transición vítrea de la gelatina. Los análisis térmicos de las muestras se

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

efectuaron realizando dos ciclos de calentamiento sucesivos a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ en un intervalo de temperaturas de -80 a 250°C . Luego de que el primer ciclo fue completado, la muestra se enfrió hasta -80°C y se registró una segunda corrida sobre la misma muestra.

Los parámetros vinculados al proceso se determinaron con el software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments) como se describió anteriormente.

3.1.2.6 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua se determinó como se describió en el Capítulo 2.

3.1.2.7 Propiedades mecánicas**3.1.2.7.1 Ensayos de tracción**

Las propiedades mecánicas se determinaron en un texturómetro TA.XT2i- *Stable Micro Systems* (Inglaterra) mediante ensayos de tracción con un sistema de pinzas de tensión A/TG según la norma ASTM D638-01 (2001). Para los ensayos se utilizaron probetas de 60 mm de longitud y 70 mm de ancho obtenidas de las películas; los ensayos se realizaron con un mínimo de seis probetas para cada formulación. Previo al análisis, las muestras fueron acondicionadas como se describió previamente. La separación de las mordazas de tracción se fijó en 50 mm; mientras la mordaza inferior permaneció fija, la otra se desplazó a una velocidad de 1 mm s^{-1} hasta la rotura de la probeta. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación a la ruptura (mm) se registraron mediante el software Texture Expert Exceed instalado en una PC conectada al equipo. De las curvas de fuerza en función de la deformación se calcularon parámetros como la fuerza máxima a la ruptura (N) y la deformación a la ruptura (mm). A partir de estos parámetros se pudo calcular la resistencia a la tracción o el esfuerzo de tensión (N mm^{-2}) que es una medida de la capacidad del material de resistir el esfuerzo de estiramiento. Se calcula dividiendo la fuerza necesaria para provocar la ruptura de la probeta por el área de la sección transversal (espesor por ancho de la probeta). También se calculó el porcentaje de elongación que se define como la variación de la longitud de las probetas respecto de la longitud inicial. Otro parámetro que puede

estimarse a partir de los perfiles mecánicos es el módulo elástico, ME, que se define como la relación entre el esfuerzo aplicado y la deformación del material.

3.1.2.7.2 Resistencia a la propagación del rasgado

Este método de ensayo determina la fuerza necesaria para la propagación del rasgado de las películas, no siendo aplicable a materiales frágiles.

La resistencia a la propagación del rasgado se determinó usando el texturómetro previamente descrito mediante ensayos de tracción, según el método estándar ASTM D1938-02. Para el ensayo se utilizaron probetas de 75 mm de largo y 25 mm de ancho. Con fines comparativos se determinó la resistencia a la propagación del rasgado en películas sintéticas de polietileno de baja densidad y de polipropileno. Para obtener las probetas de ensayo, a las muestras se les realizó un corte longitudinal (en la mitad de su ancho) hasta alcanzar 2/3 de su largo (Figura 3.1). De las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) obtenidas se determinó el esfuerzo inicial para continuar la propagación del rasgado (MPa) considerando la sección transversal de la película (mm^2) y la deformación de extensión (mm).

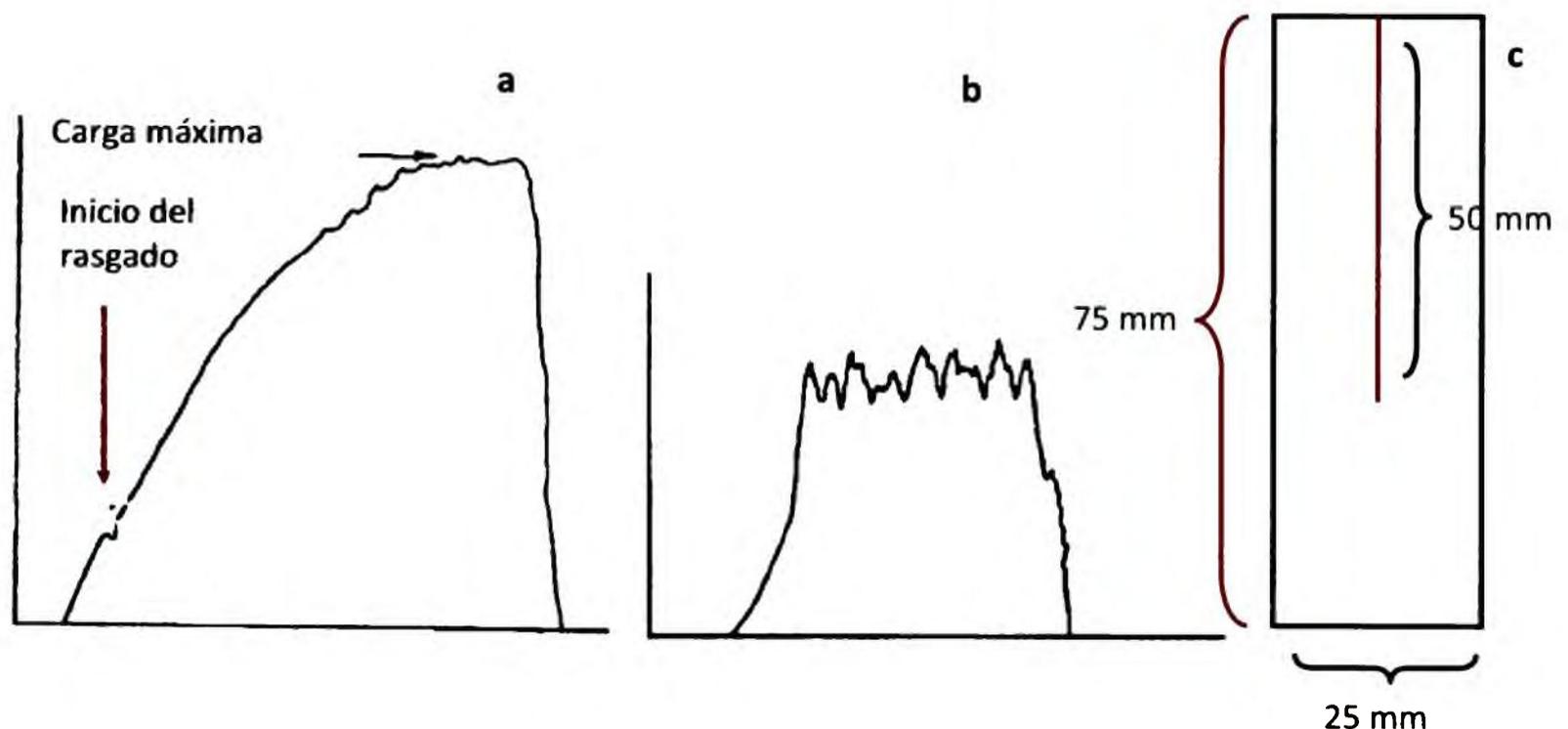


Figura 3.1 Resistencia a la propagación del rasgado. Patrón característico de un material poco extensible (a) y de un material extensible (b); dimensiones y esquema de la probeta utilizada para el ensayo.

3.1.2.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de resultados se utilizó el software Systat® (Versión 10.0). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y de comparación de medias mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de significación $p=0,05$. También se empleó el programa estadístico para el cálculo de regresiones lineales y no lineales.

3.1.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1.3.1 Caracterización fisicoquímica de la gelatina

Debido a la diversidad de gelatinas que se pueden producir y ofrecer en el mercado, resulta relevante desarrollar métodos que permitan caracterizarlas. La caracterización fisicoquímica del colágeno y la gelatina ha sido ampliamente estudiada (Arvanitoyannis y col., 1998ab; Bigi y col., 2004; Eastoe y Leach, 1997; Johnston-Bancos, 1990). Para la gelatina utilizada en el presente trabajo se obtuvo un contenido de proteínas del 82%, 0,52% de cenizas y 12,7% de humedad. Estos valores resultaron comparables con los informados por Carvalho y Grosso (2004), quienes trabajando con gelatina Tipo B, encontraron un contenido de proteína de 88,9%, 0,78% de cenizas y 10,3% de humedad. De acuerdo con Eastoe y Leach (1997) la humedad de muestras de gelatina varía normalmente entre 9 y 14%, el contenido de cenizas es inferior al 2%, y el resto de la composición es proteína. El perfil de aminoácidos de la gelatina utilizada se muestra en la Tabla 3.1.

*Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas***Tabla 3.1** Perfil de aminoácidos de la gelatina utilizada*

Aminoácido	mg/g proteína
Alanina	130
Arginina	82
Ac. Aspártico	60
Cisteína	59
Ac. Glutámico	151
Glicina	157
Histidina	12
Isoleucina	17
Leucina	27
Lisina	45
Metionina	22
Fenilalanina	23
Prolina	121
Serina	37
Treonina	27
Triptofano	23
Tirosina	19
Valina	6

*Determinado siguiendo la metodología descrita en AOAC (1982)

Como se detalló anteriormente, los geles de gelatina pueden ser clasificados mediante la determinación de la fuerza requerida para su ruptura como frágiles, firmes, débiles y elásticos. Los ensayos realizados para caracterizar la gelatina utilizada indicaron que la fuerza del gel fue de 220 g.

El fenómeno denominado gelificación involucra una serie de eventos, los cuales tienen sus propias características distintivas. Cuando la solución de gelatina se enfría se produce la agregación parcial de moléculas, la que tiene lugar aún si la solución es tan diluida como para no formar gel (Bohidar y Jena, 1993). Durante la preparación de la

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

gelatina la estructura característica de la triple hélice del colágeno se pierde, pero puede regenerarse por debajo de la temperatura de fusión del gel (Bigi y col., 2004; Yakimets y col., 2005). La presencia de prolina en el perfil de aminoácidos de la gelatina es la responsable de estabilizar la conformación de la triple hélice (Avena-Bustillos y col., 2006; Gómez-Guillén y col., 2002). La cinética de regeneración de la triple hélice de las cadenas polipeptídicas de gelatina es un mecanismo que involucra tres procesos simultáneos, el de nucleación, crecimiento y estabilización. Dependiendo principalmente de la concentración, tipo de gelatina y de la temperatura, el proceso de maduración de las soluciones de gelatina puede generar diferentes estructuras macromoleculares, las cuales son el resultado de la reversión de una conformación desordenada a la estructura de triple hélice.

3.1.3.2 Caracterización fisicoquímica de las películas

A partir de las características reológicas y del estudio de las propiedades mecánicas se seleccionó la concentración de gelatina a utilizar en los estudios posteriores. Todas las formulaciones ensayadas presentaron características típicas de un material rígido y quebradizo, este efecto se acentuó con la concentración de polímero. Así, la matriz que presentó las mejores propiedades mecánicas fue la formulada con una concentración del 7,5%, ya que las películas con 5% de gelatina exhibieron bajos valores de esfuerzo, siguiendo un patrón de comportamiento mecánico correspondiente a una matriz más débil. Sin embargo, con concentraciones mayores al 7,5% las soluciones filmogénicas resultaron difíciles de moldear debido a la rápida inducción a la formación del gel asociado a la alta concentración polimérica (Figura 3.2).

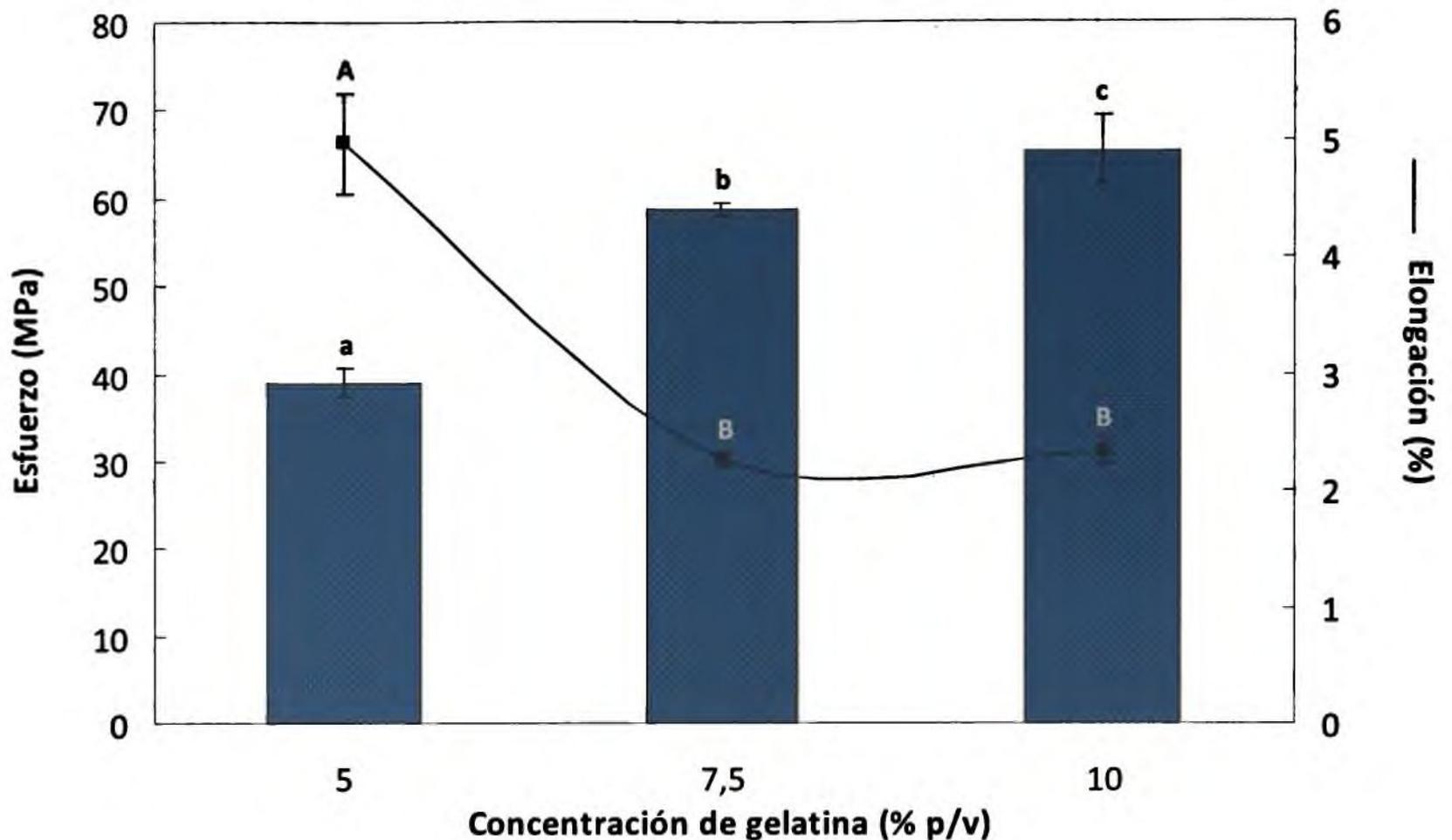


Figura 3.2 Propiedades mecánicas de películas con distinta concentración de gelatina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

La concentración seleccionada en este trabajo fue similar a la utilizada por Avena-Bustillos y col. (2006), quienes estudiaron propiedades de películas de gelatina y trabajaron con 6,67%

Con esta concentración de 7,5% (p/v) de gelatina se prepararon formulaciones con y sin agregado de glicerol, obteniéndose películas transparentes y de apariencia uniforme. Las mismas fueron fácilmente removidas de las placas de moldeo obteniendo un espesor promedio entre 60 y 110 μm . Estos valores fueron similares a los reportados por Gennadios y col. (1993) para películas plastificadas a base de proteína de gluten. No se observó liberación del glicerol usado como agente plastificante durante el tiempo empleado para el análisis de las matrices, independientemente de la concentración utilizada., resultados que indicaron una buena miscibilidad entre los componentes.

La Tabla 3.2 muestra el efecto del agregado de glicerol sobre el contenido de humedad de las películas de gelatina. Se registró una variación del contenido de humedad en el rango de 10,3 a 44,6% para películas sin plastificante y con la mayor concentración de

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

plastificante ensayada (7,5% de glicerol), respectivamente. Este comportamiento puede explicarse considerando que el glicerol posee un fuerte carácter higroscópico. Similares resultados fueron encontrados por Vanin y col. (2005) para películas de gelatina plastificadas.

Tabla 3.2 Efecto del glicerol sobre el contenido de humedad y en el desplazamiento del primer pico del patrón de difracción de rayos X de películas de gelatina

Contenido de glicerol (%)	Contenido de humedad (g agua/ 100 g película)	Desplazamiento del primer pico del patrón de rayos-X (%) [*]
0	10,31 (0,69) ^a	0
0,75	11,44 (0,52) ^a	6,0
1,5	14,29 (0,44) ^b	7,3
3,0	25,16 (0,52) ^c	8,8
4,5	31,63 (0,43) ^d	15,3
6,0	36,84 (1,01) ^e	18,0
7,5	44,61 (1,02) ^f	19,3

^{*} Relativo a la localización del primer pico del espectro de difracción de rayos X de la película de gelatina sin plastificante. Las desviaciones estándar se indican entre paréntesis; letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.1.3.3 Espectroscopía de difracción de Rayos X

La gelatina en polvo tipo B utilizada en este trabajo de Tesis presentó un patrón de difracción característico de un material esencialmente amorfo, con un pico amplio localizado a $2\theta = 20^\circ$ (Figura 3.3). De acuerdo con Crespo y col. (1995) el ancho de las reflexiones de los patrones de difracción de muestras de gelatina indica un bajo grado de orden en la estructura del polímero.

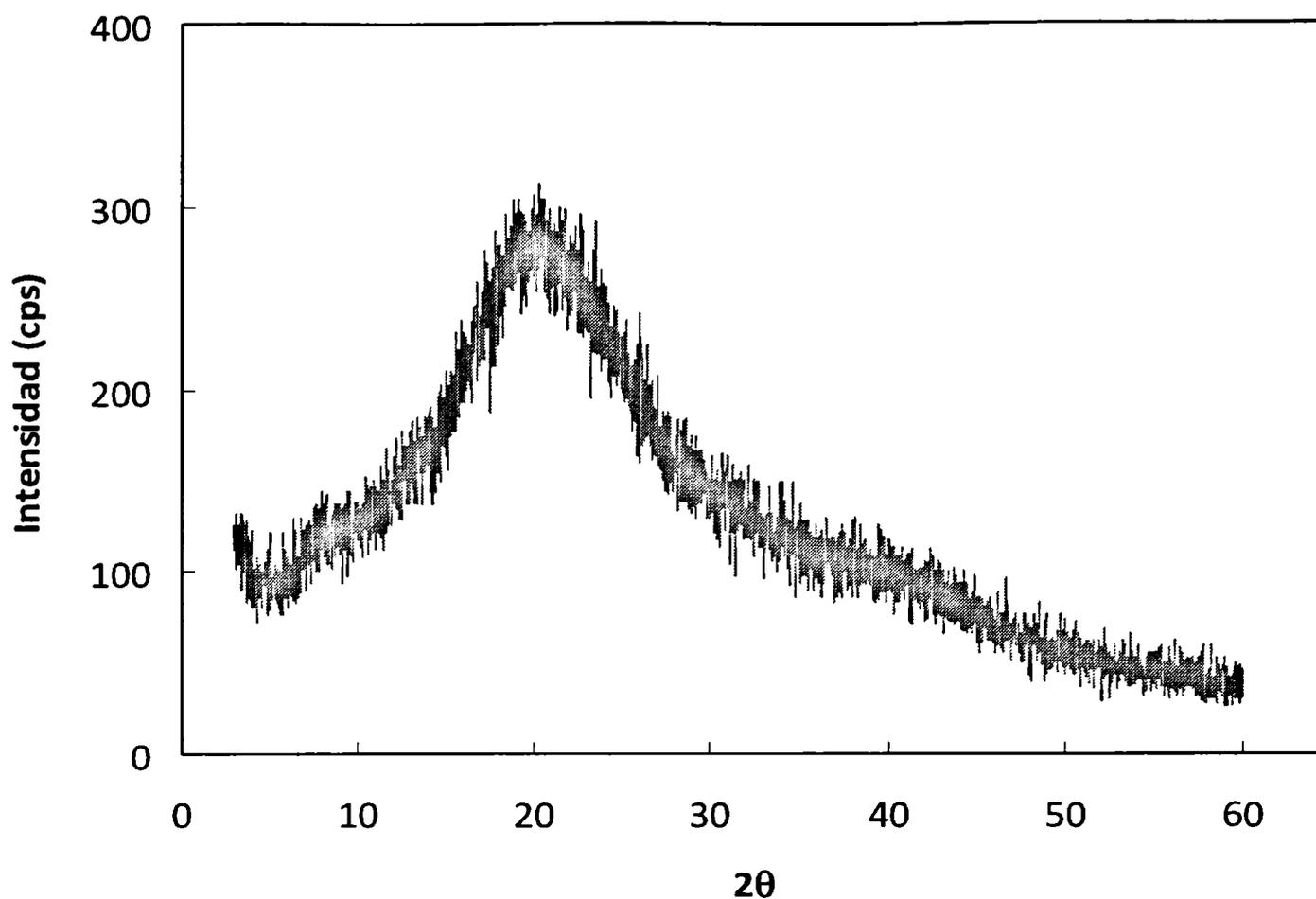


Figura 3.3 Espectros de difracción de rayos X de una muestra de gelatina en polvo.

Los difractogramas de las películas se pueden observar en la Figura 3.4. El espectro de difracción de la película de gelatina sin glicerol exhibió un amplio pico localizado en la región de $2\theta = 20,5-21,5^\circ$ y otro pico en la región de $2\theta = 8^\circ$. Pereda y col. (2011) también observaron que las películas de gelatina presentaron mayor grado de cristalinidad que el polvo debido a la cristalización parcial desarrollada durante el secado.

El agregado de glicerol provocó un desplazamiento en la posición del primer pico ($2\theta = 8^\circ$) como se muestra en la Tabla 3.2. Se observó un mayor corrimiento del pico con concentraciones de plastificante entre 0 y 3% glicerol, siendo esta tendencia menos marcada a concentraciones superiores a 4,5%. Langmaier y col. (2008) propusieron que estos cambios estructurales podrían atribuirse a los efectos del plastificante debido a su elevada afinidad por el agua y la interferencia que éste produce en la interacción entre las cadenas poliméricas. De acuerdo con Pereda y col. (2011) el pico localizado a $2\theta = 8^\circ$ se atribuye a la renaturalización de las cadenas de gelatina a la estructura triple hélice característica del colágeno. Asimismo los autores asignaron la banda ubicada en $2\theta = 21^\circ$ a la fase amorfa de la gelatina.

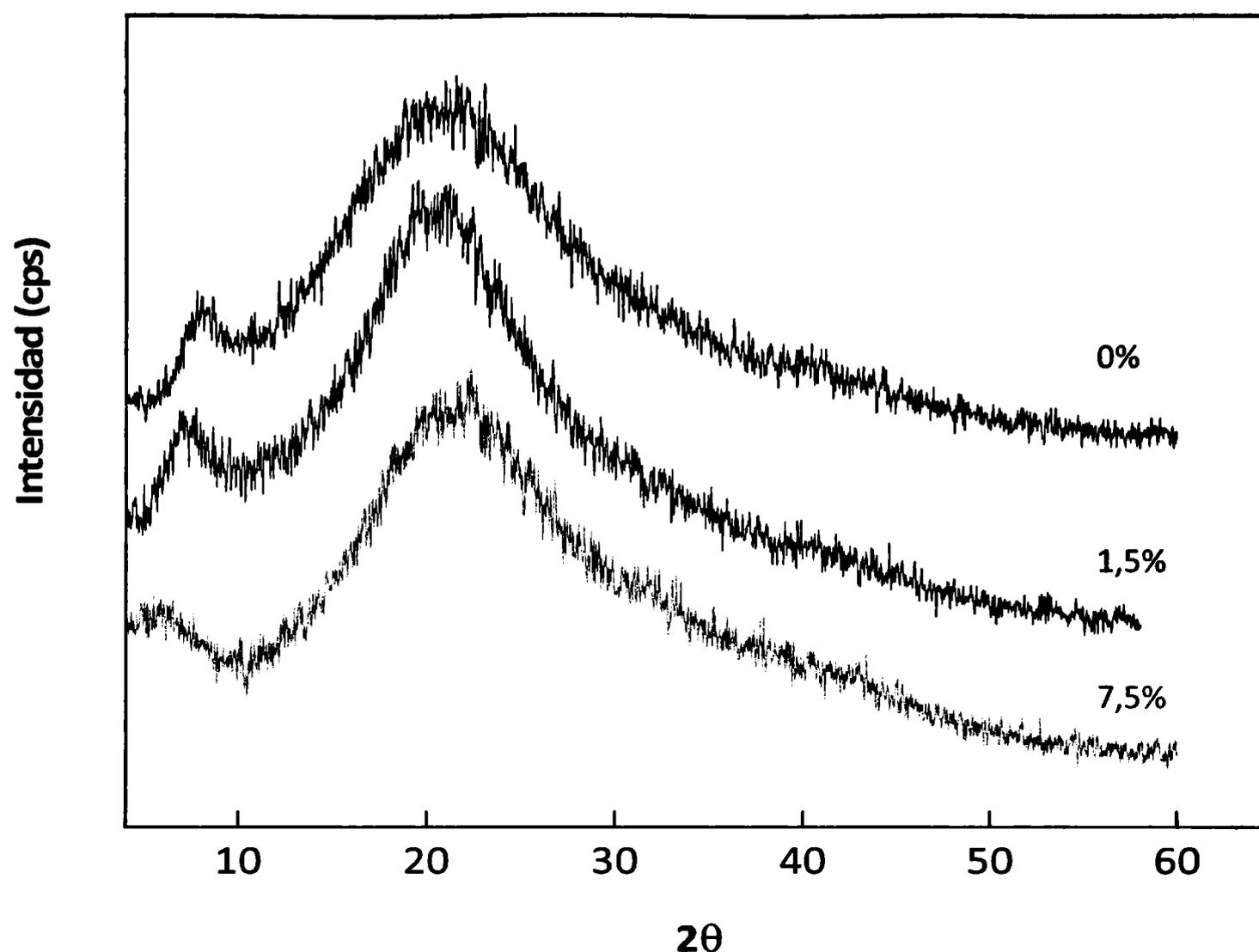


Figura 3.4 Espectros de difracción de rayos X de películas de gelatina sin plastificar y plastificadas con 1,5 y 7,5% (p/p) de glicerol.

3.1.3.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La Figura 3.5 muestra la PVA de películas con y sin plastificante. El efecto del glicerol sobre las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas de gelatina depende de la concentración utilizada. Los valores de PVA para concentraciones inferiores a 3% (p/p) de glicerol fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) que los obtenidos para películas de G, lo que podría atribuirse al desarrollo de una matriz más compacta. Un comportamiento similar fue descrito para películas de kefirán y almidón modificado (Piermaría y col., 2011; López y col., 2011).

Los valores de PVA aumentaron de $3,21 \cdot 10^{-10}$ a $3,87 \cdot 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para concentraciones de plastificante mayores al 3%. La eficiencia del glicerol está asociada con su peso molecular y su alta capacidad para interactuar con las moléculas de agua a través de la formación de puentes de hidrógeno, facilitando su solubilización (Cuq y col., 1997). Anteriormente, en el Capítulo 2 hemos discutido el efecto del glicerol sobre otras matrices

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

hidrofílicas como el quitosano. Asimismo, similares tendencias fueron encontradas para películas a base de proteínas por Cao y col., 2007 y por Cho y Rhee, 2002.

Los mayores valores de permeabilidad al vapor de agua se registraron para concentraciones de P superiores a 4,5%, no observándose diferencias significativas entre los valores obtenidos a concentraciones más altas ($p > 0,05$), (Figura 3.5).

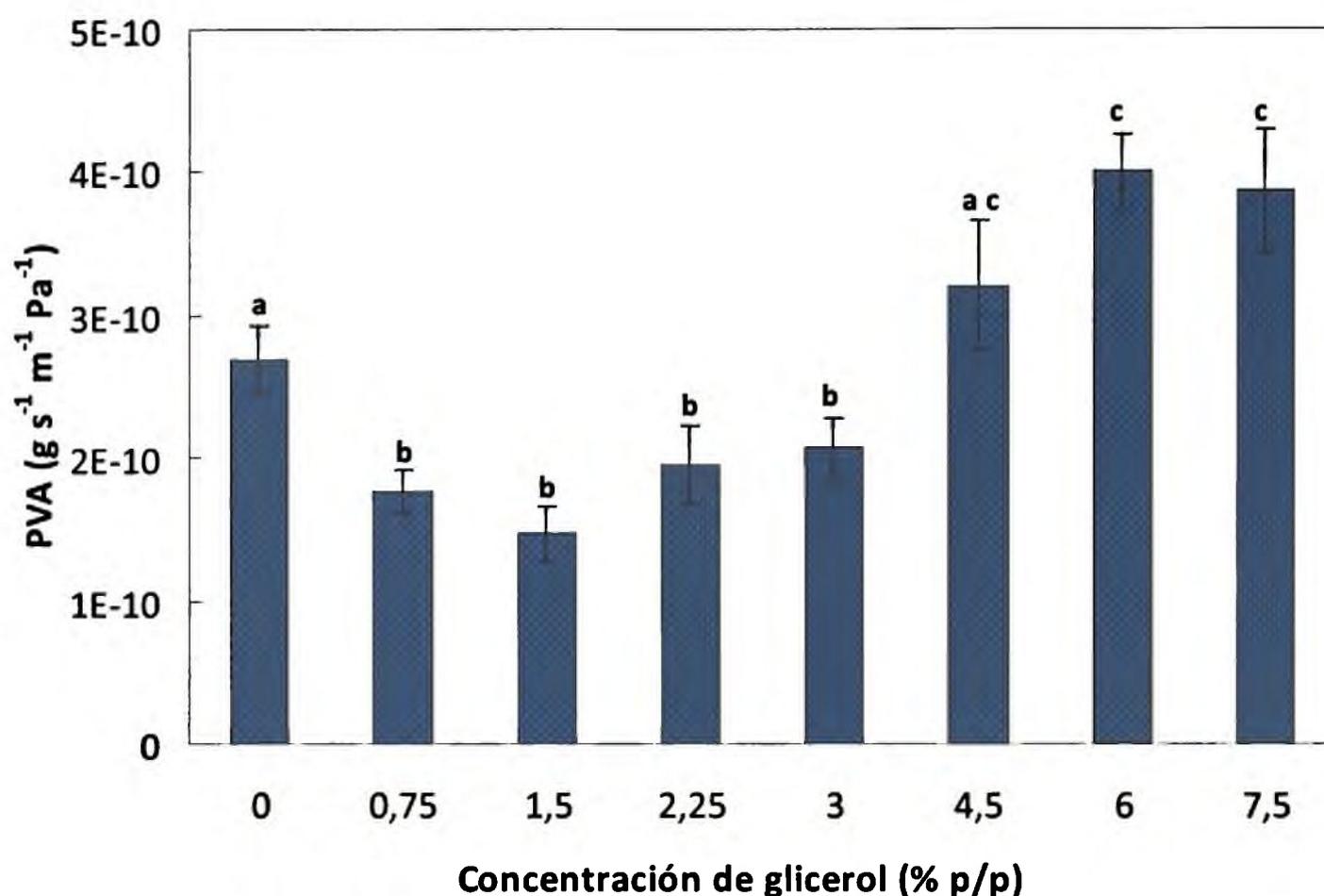


Figura 3.5 Permeabilidad al vapor de agua de películas de gelatina en función del contenido de glicerol. Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

3.1.3.5 Análisis de las propiedades térmicas de las películas de gelatina

La Figura 3.6 muestra el termograma correspondiente a la gelatina en polvo. La primera corrida presentó un pico endotérmico atribuido a la desnaturalización de la gelatina, correspondiente a la fusión de la estructura asociada a la triple hélice característica, mientras que en la segunda corrida se pudo estimar, a partir del cambio en la capacidad calorífica, la T_g del polímero obteniéndose un valor de 183,5°C. Patil y col. (2000) informaron un valor de 217°C para gelatina totalmente deshidratada, mientras que Ward y Courts (1977) la encontraron cercana a 190°C y Martucci y col. (2006) a 195°C para gelatina bovina Tipo B.

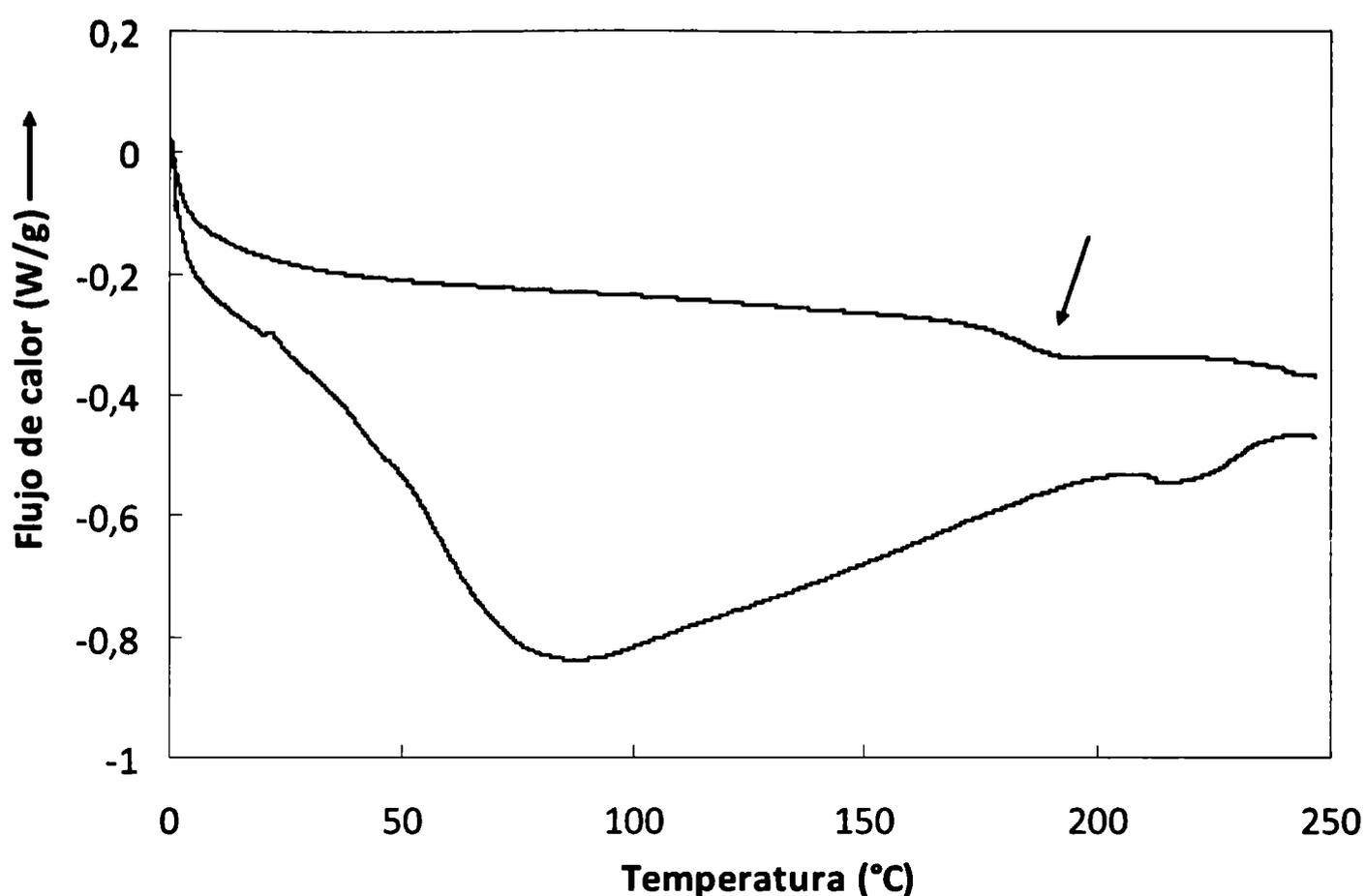


Figura 3.6 Termograma obtenido por DSC para gelatina en polvo mostrando la primera y segunda corrida.

Los termogramas de las películas se muestran en la Figura 3.7. Las películas sin adición de glicerol presentaron un pico endotérmico amplio con un mínimo alrededor de 87°C y una alta entalpía asociada de 540 J g⁻¹. Varios autores atribuyeron este pico endotérmico al solapamiento de diferentes procesos tales como la evaporación del agua, fusión, desnaturalización y recristalización de la fracción cristalina constituida por cristalitas pequeños y/o imperfectos de la gelatina (Dai y col., 2006; Langmaier y col., 2008; Patil y col., 2000). Cabe destacar que la temperatura de pico y la entalpía del proceso endotérmico están fuertemente relacionadas con las condiciones de secado de las películas; este efecto ha sido estudiado por algunos autores, entre ellos Dai y col. (2006) y Chiou y col. (2008).

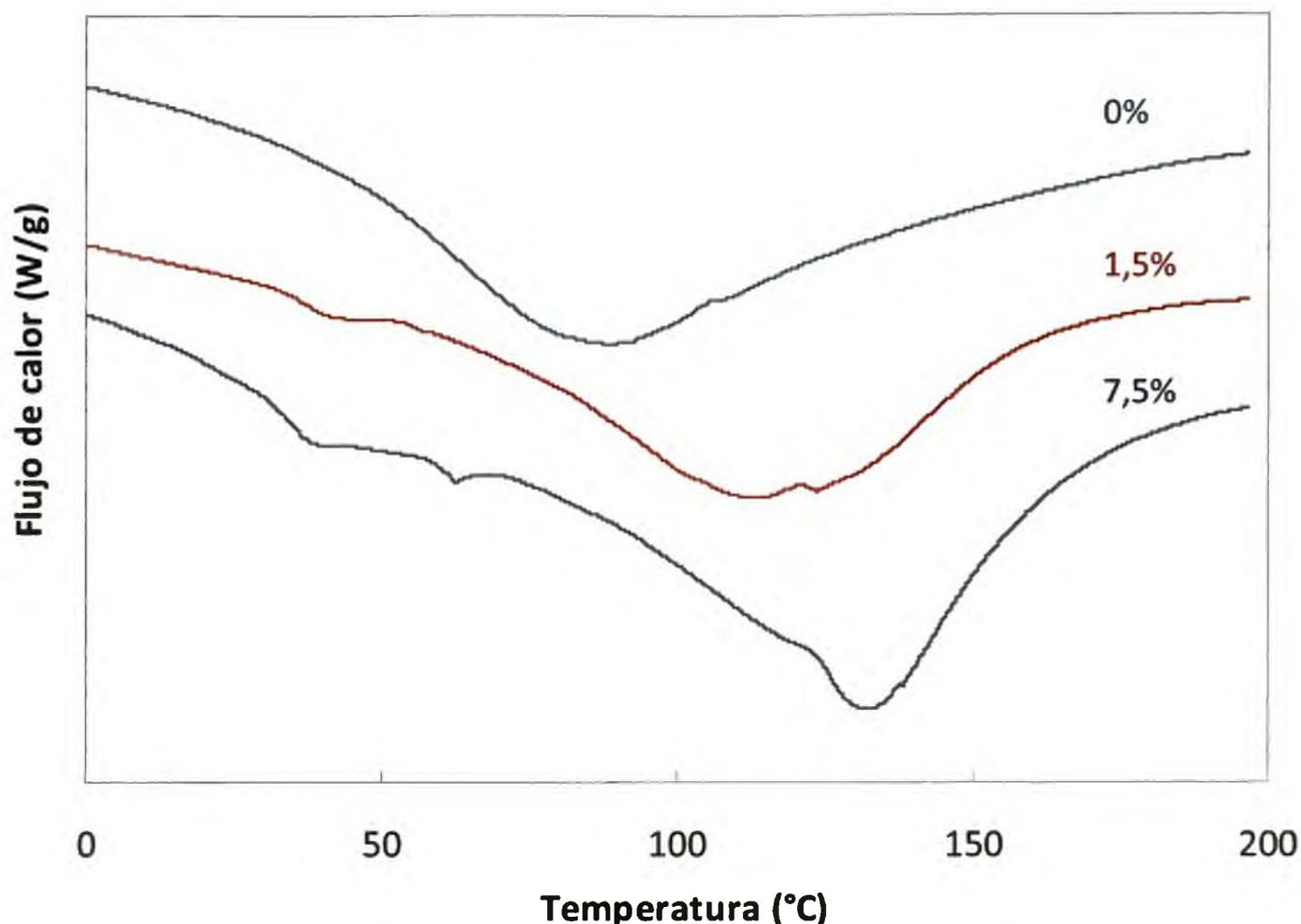


Figura 3.7 Termogramas correspondientes a la primera corrida de DSC para películas de gelatina. En cada curva se indica la concentración de glicerol utilizada.

Como puede observarse, las curvas de flujo de calor en función de la temperatura (Figura 3.7) de las películas plastificadas cambiaron progresivamente con la adición de glicerol; el pico endotérmico mostró un desdoblamiento en varios picos, a pesar de que la entalpía de la transición se mantuvo aproximadamente constante. Este desdoblamiento fue observado también por Rhaman y col. (2008) estudiando el efecto del contenido de agua en películas de gelatina. La temperatura de pico se desplazó hacia valores más altos con el aumento de la concentración del plastificante, hasta el 4,5%, permaneciendo casi invariable a concentraciones mayores (6 y 7,5%), Tabla 3.3.

*Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas***Tabla 3.3** Efecto del glicerol sobre los parámetros térmicos determinados por DSC, de películas de gelatina acondicionadas a 20°C y 65% HR.

Contenido de glicerol % (p/p)	Parámetros térmicos		
	Temperatura de pico T _p (°C)	Temperatura de transición vítrea T _g (°C)	
		Experimental	Predicha
0	87,9 (1,8) ^a	137,5 (2,1) ^a	142,81
0,75	90,1 (1,9) ^a	125,1 (2,3) ^b	128,61
1,5	112,6 (0,9) ^b	111,0 (1,4) ^c	108,59
3,0	125,5 (1,5) ^c	56,5 (1,3) ^d	59,76
4,5	128,4 (1,8) ^{cd}	27,0 (1,0) ^e	32,38
6,0	134,3 (1,6) ^d	21,3 (0,3) ^f	9,12
7,5	132,4 (0,5) ^d	22,0 (1,0) ^f	1,99

* Valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

La T_g (Tabla 3.3) se visualizó con mayor claridad en la segunda corrida de las curvas de flujo de calor, ya que luego de la primera corrida se obtuvo un material completamente amorfo. El efecto de la adición de plastificante en los valores de T_g se puede observar en la Figura 3.8. Los resultados obtenidos para las películas de gelatina plastificadas siguieron la misma tendencia que los obtenidos para matrices de quitosano con glicerol, mostrando una disminución de la T_g desde 137,5 a 22,0°C (Tabla 3.3).

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

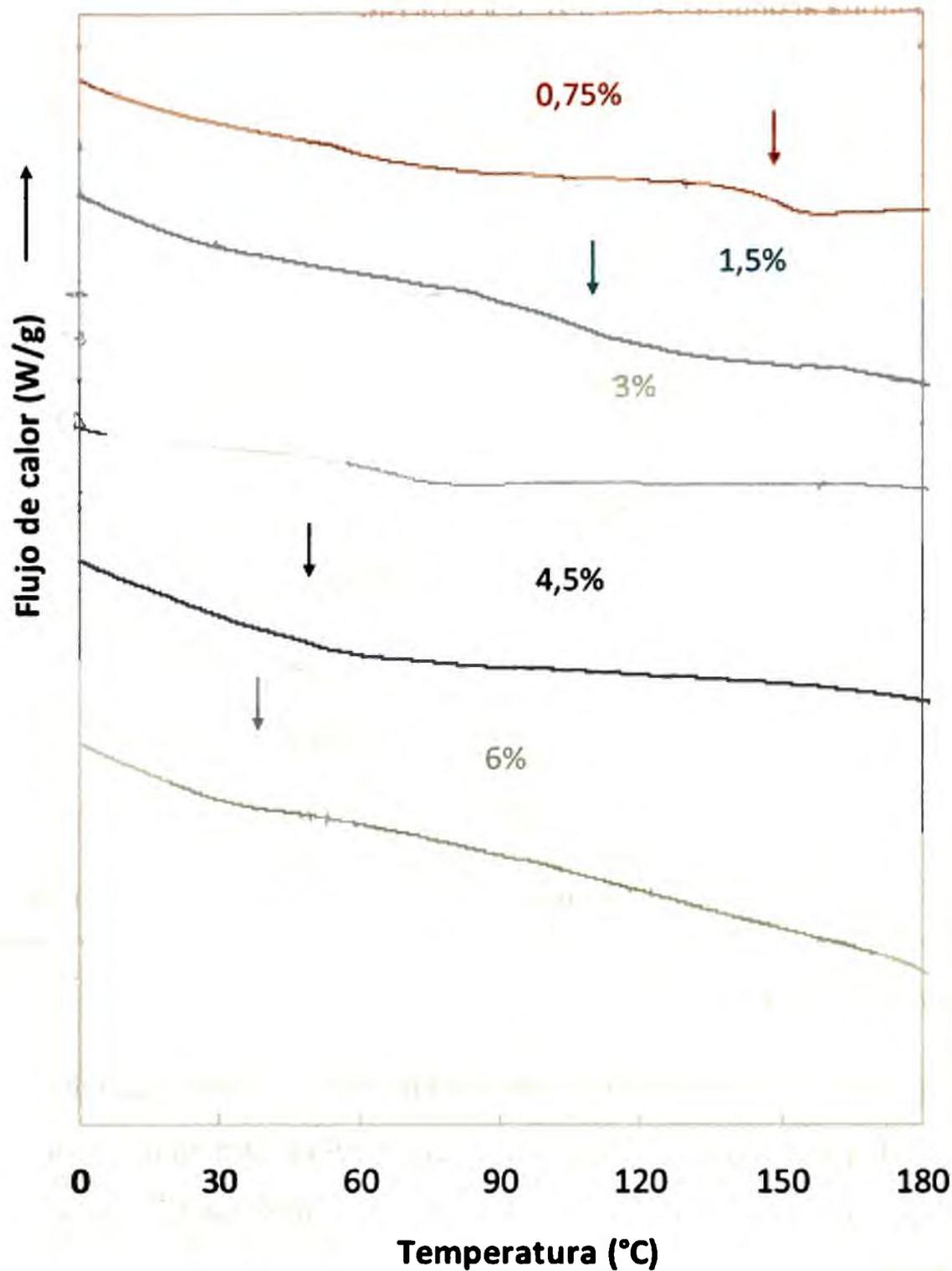


Figura 3.8 Termogramas obtenidos por DSC (segunda corrida) para películas de gelatina con diferentes concentraciones de glicerol. Las flechas indican en el gráfico la temperatura de transición vítrea para cada formulación.

Como ya se describió en el Capítulo 2, varios modelos experimentales se han utilizado para predecir la T_g . Debido a que las películas de gelatina plastificadas constituyen un sistema ternario, el uso de la modificación propuesta por Couchman y Karasz fue el más apropiado para estimar la temperatura de transición vítrea de estos materiales. Resulta oportuno recordar la Ec. 2.8 utilizada en el Capítulo 2:

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

$$T_g(\text{mezcla}) = \frac{X_1 \Delta C_{p1} T_{g1} + X_2 \Delta C_{p2} T_{g2} + X_3 \Delta C_{p3} T_{g3}}{X_1 \Delta C_{p1} + X_2 \Delta C_{p2} + X_3 \Delta C_{p3}}$$

donde,

la expresión $X_1 \Delta C_{p1} T_{g1}$ involucra a las propiedades del agua, $X_2 \Delta C_{p2} T_{g2}$ las de la gelatina y la

expresión $X_3 \Delta C_{p3} T_{g3}$ las correspondientes al glicerol. X representa la fracción en peso de

cada componente del sistema ternario. ΔC_p es el cambio en la capacidad calorífica, siendo ΔC_{p1} la correspondiente al agua ($1,94 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$), ΔC_{p2} la de la gelatina ($1,69 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$) y ΔC_{p3} la capacidad calorífica de glicerol ($0,91 \text{ J g}^{-1} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$). Los valores de T_g de los componentes puros utilizados fueron -135 , $183,5$ y $-85,6^\circ\text{C}$ para el agua, la gelatina y el glicerol, respectivamente.

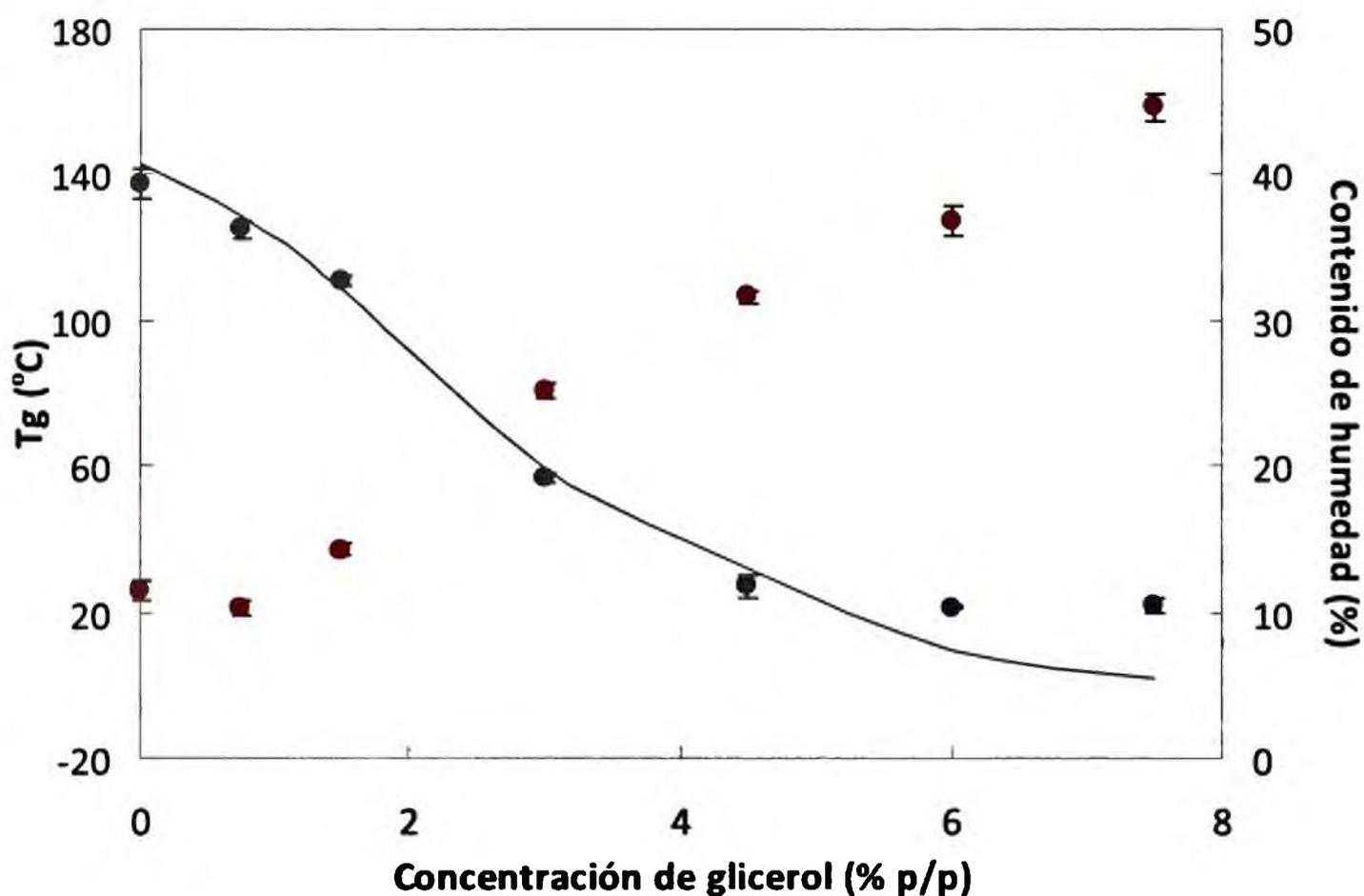


Figura 3.9 Valores experimentales (●) y predichos (—) de T_g y contenido de humedad (●) de películas de gelatina en función de la concentración de glicerol.

La Figura 3.9 y la Tabla 3.3 muestran los datos de T_g experimentales predichos por la Ec. 2.8. A diferencia de lo ocurrido con el sistema ternario de quitosano-glicerol-agua, en este caso el análisis estadístico indicó que se obtuvo un buen ajuste para las películas de gelatina que contenían hasta 4,5% de glicerol ($r^2 > 0,998$). Ghanbarzadeh y Oromiehi (2009)

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

también informaron un ajuste satisfactorio entre los valores obtenidos experimentalmente y aquellos predichos por el modelo para películas de zeína y proteína de suero plastificadas con 23 y 33% de glicerol por cada 100 g de proteína.

Para concentraciones de glicerol superiores al 4,5%, las diferencias entre los valores experimentales y los predichos fueron más marcadas (Tabla 3.3). Este resultado puede atribuirse a la saturación de la matriz proteica, y en consecuencia a una disminución de la miscibilidad entre el plastificante y la gelatina.

Por otro lado, los valores de T_g obtenidos correlacionaron inversamente con el contenido de humedad de las películas de gelatina plastificadas (Tabla 3.2, Figura 3.9). Como era predecible, la humedad aumentó con la concentración de plastificante mientras los valores de T_g disminuyeron. De acuerdo con Dai y col. (2006) el agua libre plastifica la fase amorfa de la matriz, lo que contribuye a la disminución de la T_g del material. Estos resultados fueron similares a los encontrados en las matrices de quitosano plastificadas con diferentes concentraciones de glicerol como se analizó en el Capítulo 2.

3.1.3.6 Propiedades mecánicas

Para estudiar las propiedades mecánicas de las películas de gelatina se determinó el esfuerzo de tensión (MPa), la deformación o elongación (%), el módulo de elasticidad (MPa) y la resistencia a la propagación del rasgado. Las películas de gelatina sin plastificar presentaron un patrón de comportamiento a la tracción correspondiente a una matriz rígida con altos valores de resistencia y bajos valores de deformación (Figura 3.10a). Una tendencia similar fue informada por Cao y col. (2009) trabajando con películas de gelatina Tipo B. Otros investigadores hallaron un comportamiento análogo trabajando con películas de otros biopolímeros hidrofílicos como el caseinato de sodio o mezclas de gelatina-almidón (Arvanitoyannis y col., 1998c).

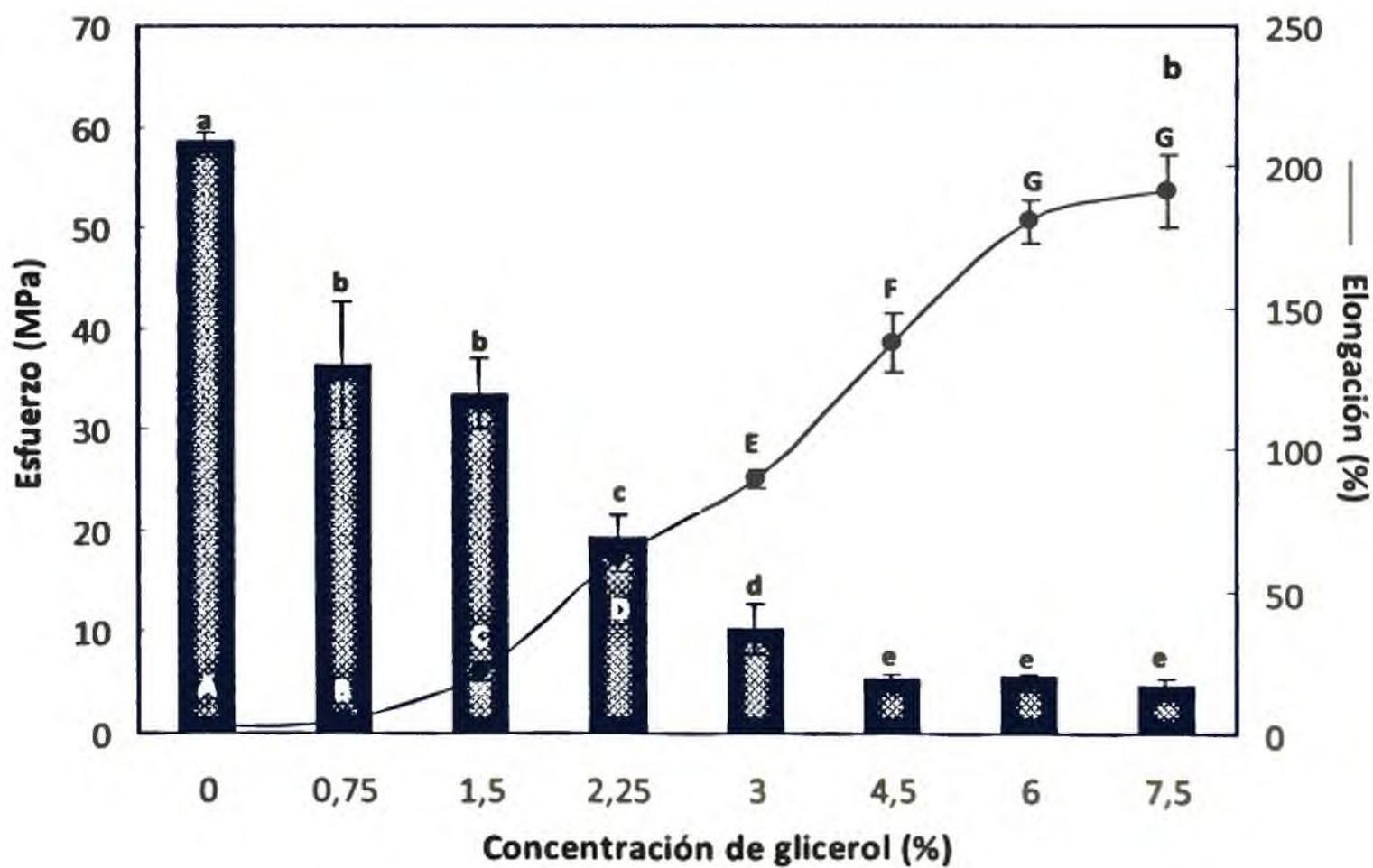
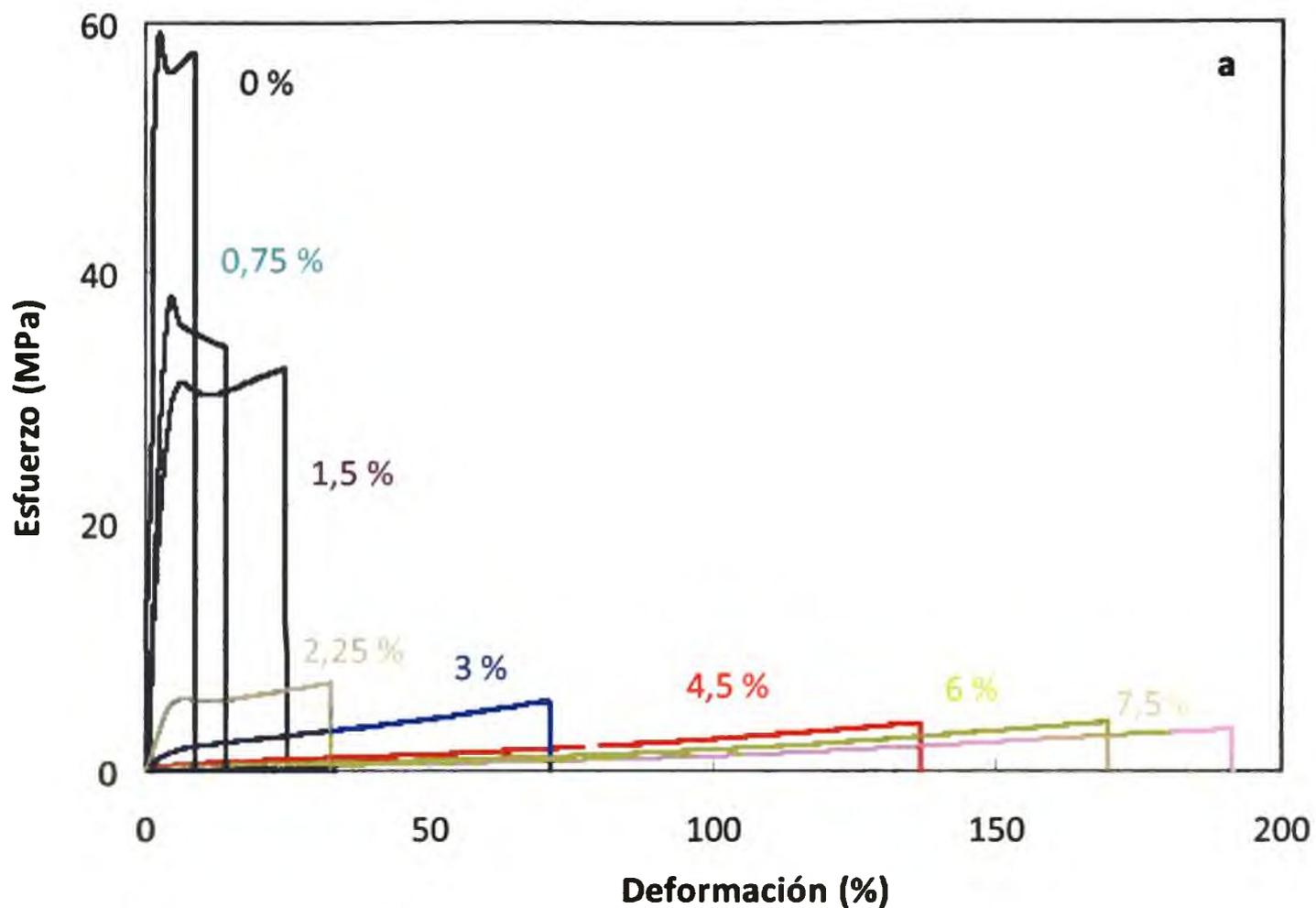
La Figura 3.10a muestra los perfiles de comportamiento mecánico de los materiales ensayados. Las películas con concentraciones de 0,75% y 1,5% de glicerol exhibieron valores de elongación (%) en el rango de 4,7 a 21,4 % respectivamente (Figura 3.10a y b). Mayores concentraciones de plastificante modificaron el patrón mecánico de los materiales obteniéndose un comportamiento correspondiente a un material dúctil y flexible (Figura

3.10b). El esfuerzo disminuyó 11 veces en las películas con 4,5% de glicerol, mientras que la elongación aumentó 61 veces en comparación con las muestras sin plastificar (Figura 3.10b). Una tendencia similar fue observada por Thomazine y col. (2005) estudiando películas de gelatina con mezclas de glicerol y sorbitol. En estos materiales dúctiles, el esfuerzo aumentó continuamente hasta el límite de elasticidad y disminuyó drásticamente en el punto de ruptura (Figura 3.10b).

El módulo de elasticidad (ME) presentó una tendencia similar al esfuerzo (Tabla 3.4). Comparando los materiales sintéticos con las películas de gelatina desarrolladas, los valores de esfuerzo y elongación a la ruptura de las películas con 4,5% de plastificante estuvieron dentro del rango de los correspondientes a las películas de polietileno de baja densidad, LDPE (Smith , 1986).

Las películas de gelatina con 4,5, 6 y 7,5% de glicerol no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) en cuanto al esfuerzo, sin embargo la elongación aumentó, alcanzando un valor de 190% para la mayor concentración de plastificante. Estos resultados podrían explicarse debido a la saturación de la matriz polimérica por parte del plastificante; este comportamiento también fue descrito por Audic y Chaufer (2005) para películas de caseinato de sodio plastificadas.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas



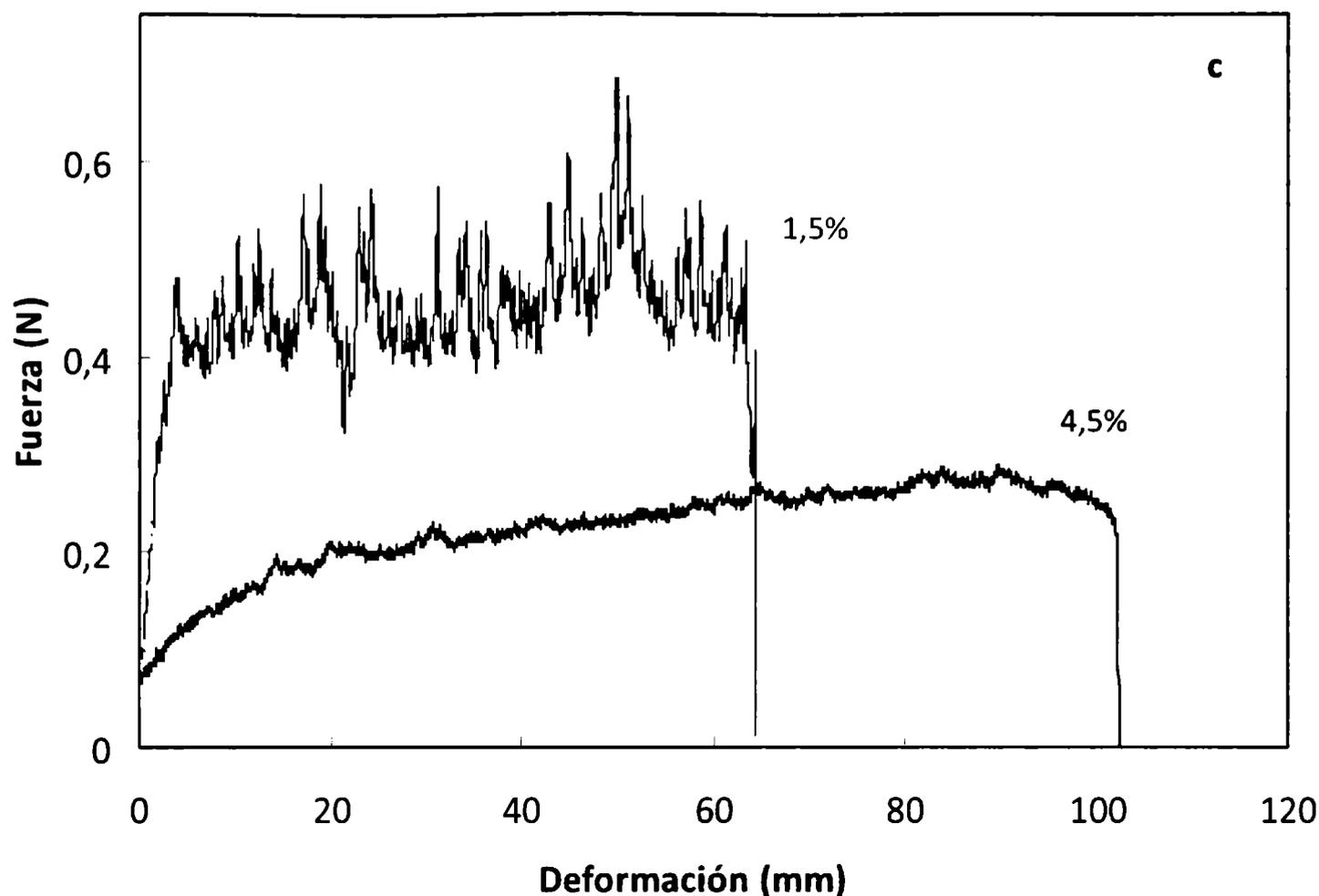


Figura 3.10 Propiedades mecánicas de películas de gelatina con y sin plastificante: (a) perfil mecánico de las muestras, esfuerzo en función de la deformación del material (%), (b) resistencia a la tracción y elongación a la ruptura en función de la concentración de glicerol; (c) resistencia a la propagación del rasgado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

Con el objeto de correlacionar las modificaciones estructurales ocasionadas por el agregado de glicerol con las propiedades mecánicas de las películas de gelatina se analizaron conjuntamente el módulo elástico, ME y la T_g . Las Tablas 3.3 y 3.4 muestran que las propiedades mecánicas y térmicas están fuertemente relacionadas, dado que tanto el ME como la T_g presentaron una tendencia similar. Nuevamente, dos zonas bien definidas pueden observarse: hasta una concentración de 3% de glicerol, los mayores valores de T_g se corresponden con los mayores valores de ME. Con mayores concentraciones de glicerol el ME disminuyó alcanzando un valor constante alrededor de 0,04 MPa para películas con el agregado del 6%, mientras que para la temperatura de transición vítrea se observó un comportamiento análogo al aproximarse a valores cercanos a la temperatura ambiente.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

Tabla 3.4. Efecto del glicerol sobre las propiedades mecánicas estudiadas a través de ensayos de tracción y de resistencia a la propagación del rasgado de películas de gelatina

Concentración de glicerol % (p/p)	Propiedades mecánicas		
	Test de resistencia a la propagación del rasgado		Test de tensión
	Esfuerzo inicial (MPa)	Deformación (mm)	Módulo elástico (MPa)
0	na [*]	na	37,69 (2,37) ^a
0,75	na	na	22,56 (0,60) ^b
1,5	0,94 (0,05) ^a	52,29 (6,08) ^a	12,16 (0,77) ^c
3,0	0,59 (0,03) ^b	85,60 (2,04) ^b	0,76 (0,03) ^d
4,5	0,47 (0,02) ^c	102,20 (2,48) ^c	0,18 (0,03) ^e
6,0	0,45 (0,03) ^c	105,83 (7,15) ^c	0,04 (0,002) ^f
7,5	0,47 (0,02) ^c	114,15 (5,42) ^c	0,04 (0,004) ^f

^{*na} No aplicable. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Por otro lado, la resistencia a la propagación del rasgado se evaluó en películas de gelatina plastificadas. Las películas sin plastificante y aquellas con 0,75% de plastificante no fueron sometidas al ensayo ya que, como se describió previamente, este método no es aplicable para materiales frágiles. El patrón de resistencia a la propagación del rasgado sufrió un cambio aproximadamente a la misma concentración de glicerol que en los ensayos de tracción. La Figura 3.10c muestra las curvas de fuerza-deformación obtenidas para concentraciones de glicerol de 1,5 y 4,5%. Las películas de gelatina con un contenido de plastificante hasta 3% podrían considerarse como materiales poco extensibles, mientras que aquellas con mayores concentraciones se asociaron a materiales extensibles. La Tabla 3.4 muestra los valores de esfuerzo inicial y la deformación que definen la resistencia al rasgado del material ensayado. Con el aumento de la concentración de glicerol disminuyó la fuerza

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

necesaria para propagar el rasgado del material y aumentaron los valores de extensibilidad de las películas de 52,3 a 114,1%.

Respecto de los materiales sintéticos ensayados, el LDPE que es considerado como un material extensible, exhibió una fuerza media (0,54 N) y una elongación (138,6%), es decir un valor mayor que las películas de gelatina con 4,5% de glicerol (Figura 3.9c). Mientras que el polipropileno, un material poco extensible, presentó una fuerza media menor (0,14 N) y una mayor elongación (72,2 %) en comparación con las películas de gelatina plastificadas con 1,5% de glicerol (Figura 3.10c).

Como conclusión, se estableció una correlación entre las propiedades microestructurales de las películas de gelatina desarrolladas y sus propiedades de barrera al vapor de agua, propiedades térmicas y mecánicas, analizando el efecto de la concentración de glicerol en las mismas.

En las películas con una concentración de glicerol superior a 4,5% se observó un punto de inflexión en las propiedades estudiadas. Los estudios de difracción de rayos X y los ensayos de DSC mostraron que las películas presentaron un cambio estructural con el agregado de glicerol, evidenciado en la PVA y las propiedades mecánicas, permaneciendo sus valores prácticamente constantes.

Las películas exhibieron patrones de difracción de rayos X similares independientemente de la concentración de glicerol. Sin embargo, se mostró un desplazamiento en la posición del pico situado a $2\theta = 8^\circ$, observándose el valor máximo para la mayor concentración de glicerol estudiada.

Los valores de T_g experimentales se ajustaron satisfactoriamente mediante la modificación al modelo de Couchman y Karasz propuesta por Kalichevsky y Blanshard para una concentración de glicerol hasta 4,5%. Los valores de T_g obtenidos se correlacionaron inversamente con el contenido de humedad de las películas, mientras que mostraron una dependencia directa con el módulo de elasticidad.

Fue posible establecer relaciones entre las propiedades físicas y la concentración de glicerol de las películas de gelatina, lo que permitiría seleccionar las condiciones óptimas para desarrollar y manejar la formulación de las películas de acuerdo a las condiciones de

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

proceso y de almacenamiento requeridas, así como definir las aplicaciones específicas de las mismas.

PARTE II: DESARROLLO DE PELÍCULAS COMPUESTAS DE QUITOSANO Y GELATINA, SISTEMAS BICAPA Y LAMINADOS

3.II.1 INTRODUCCIÓN

El objetivo de emplear mezclas entre biopolímeros para la elaboración de películas biodegradables es contrarrestar las deficiencias propias de cada componente y así perfeccionar las propiedades y características del material obtenido combinando las propiedades funcionales de cada uno (Tharanathan, 2003). Principalmente se busca mejorar las propiedades mecánicas y de barrera, las que dependen del tipo de material utilizado y especialmente de su cohesión estructural. La cohesión es el resultado de la habilidad de un polímero para formar numerosos enlaces moleculares entre sus cadenas, dificultando así su separación (Guilbert y col., 1996). Teniendo en cuenta que una de las posibles aplicaciones de estos materiales puede ser el desarrollo de envases alimentarios, es necesario que las mismas sean resistentes para proteger al producto envasado y facilitar su manejo, pero a su vez deben ser flexibles para adaptarse a posibles deformaciones por el manipuleo del producto.

Mientras que biopolímeros tales como proteínas y polisacáridos proveen una matriz de soporte, los lípidos otorgan buenas propiedades de barrera al vapor de agua (Baldwin y col., 1997; García y col., 2000; Anker y col., 2001).

Biliaderis y Lazaridou (2002) desarrollaron matrices compuestas por mezclas de polisacáridos, específicamente de pululano-QUITOSANO, y de almidón-QUITOSANO. La propiedad catiónica del QUITOSANO le confiere múltiples funcionalidades y aplicaciones para interactuar con otros componentes. Polímeros con cargas opuestas pueden interaccionar electrostáticamente modificando sustancialmente las propiedades funcionales de las matrices obtenidas. Las películas formuladas con alginato y QUITOSANO son ejemplos de estos sistemas. Es necesario resaltar que en la bibliografía consultada se ha investigado extensamente los sistemas compuestos por polisacáridos; sin embargo matrices compuestas por proteína y polisacárido requieren estudios más profundos ya que han sido escasamente estudiadas.

Por otra parte además de las películas compuestas, existen otras alternativas para mejorar las propiedades de los materiales, como la obtención de sistemas *bicapa* a partir de

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

las películas individuales. Varios investigadores definen las películas *bicapa* como sistemas formados principalmente por deposición de una capa lipídica sobre un soporte de polisacárido o proteico (Kamper y Fennema, 1984; Greener y Fennema, 1989; Weller y col., 1998; Perez-Gago y Krochta, 2005). Sin embargo, no hay referencias que consideren un sistema *bicapa* formado por dos capas de diferentes hidrocoloides.

Además, si bien el laminado es una técnica habitualmente utilizada en la formulación de envases sintéticos no hay estudios previos que incluyan la formulación de sistemas laminados con películas a base de biopolímeros (Vidal y col., 2007). En los trabajos de investigación realizados hasta el presente no se había distinguido entre sistemas *bicapa* y sistemas *laminados* y estos términos se habían empleado en forma indistinta (Park y col., 1994; Cho y col., 2002). En el presente trabajo de Tesis se realizó la distinción entre ambos sistemas; se denominó *bicapa* al sistema preparado por la técnica de moldeo mediante un procedimiento de dos etapas y *laminado* al sistema formado por películas individuales, colocadas una sobre la otra.

Los objetivos planteados para esta parte del Capítulo fueron:

- ❖ Formular soluciones filmogénicas compuestas a partir de quitosano y gelatina.
- ❖ Caracterizar las propiedades de las películas compuestas, con especial énfasis en las propiedades de barrera al vapor de agua.
- ❖ Desarrollar sistemas *bicapa* y *laminados* a base de gelatina y quitosano, y analizar el efecto de las diferentes técnicas de preparación sobre las propiedades microestructurales, mecánicas y de barrera, en comparación con las películas compuestas por mezclas de ambos componentes.

3.II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.II.2.1 Preparación de las soluciones filmogénicas compuestas

Para la formulación de las soluciones filmogénicas se utilizó gelatina de origen bovino Tipo B (G), con una concentración de 7,5% (p/v) solubilizada en agua destilada a 60°C, y quitosano con un DD de 85% (SIGMA, EEUU) al 1% (p/v) que se preparó como se describió en el Capítulo 2.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

Se utilizó glicerol como plastificante (P) en una concentración 1% (p/p). Se prepararon soluciones compuestas por G y Q en una proporción 50:50 (p/p), con o sin el agregado de glicerol como agente plastificante.

3.II.2.2 Preparación de las películas a base de hidrocoloides

En la Figura 3.10 se muestra un esquema de los diferentes tipos de películas obtenidas: películas compuestas, sistemas *bicapa* y *laminados*.

La nomenclatura utilizada fue: películas de gelatina con (GP) y sin plastificante (G); y películas compuestas formuladas con gelatina y quitosano con (GQP) y sin plastificante (GQ). También fueron objeto de análisis películas sólo de quitosano (Q).

Asimismo, se prepararon películas de gelatina (G) y de quitosano (Q) con distintos espesores. Para ello se extendieron soluciones de hidrocoloides con diferentes relaciones de moldeo (g solución filmogénica/ área placa de moldeo), con el fin de evaluar el efecto del espesor en la permeabilidad al vapor de agua de las películas.

Como se describió en el Capítulo 2 las soluciones filmogénicas se extendieron sobre placas de acrílico y se secaron a 37°C hasta alcanzar un peso constante; las películas obtenidas se almacenaron y acondicionaron a 20°C y 65 % de HR.

Para el desarrollo de los sistemas *bicapa* se necesitaron dos etapas; en primer lugar se prepararon películas sólo de gelatina y compuestas, las que se secaron en estufa a 37°C hasta que se obtuvo una matriz con una superficie firme pero que todavía conservaba propiedades adhesivas al tacto. En todas las formulaciones ensayadas para la preparación de los sistemas *bicapa*, se agregó una segunda capa de solución de Q sobre la película previamente formada y finalmente el sistema se secó completamente en estufa a 37°C.

La nomenclatura asignada para los sistemas *bicapa* fue G-Q, GP-Q y GQ-Q, donde el guión (-) indica la composición de cada una de las capas que conforman el sistema, así G-Q corresponde al sistema constituido por la deposición de una capa de G y otra de Q.

Además, se estudiaron los sistemas *laminados* a fin de compararlos con las películas compuestas y con los sistemas *bicapa*. En este caso se colocaron las películas individuales una sobre la otra para efectuar las determinaciones, sin utilizar ninguna sustancia adhesiva.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

La nomenclatura utilizada para los sistemas laminados fue: G+Q, GP+Q, GQ+Q, es decir una película de Q y otra de G, GP o GQ.

En la figura 3.11 se esquematizan los materiales desarrollados.

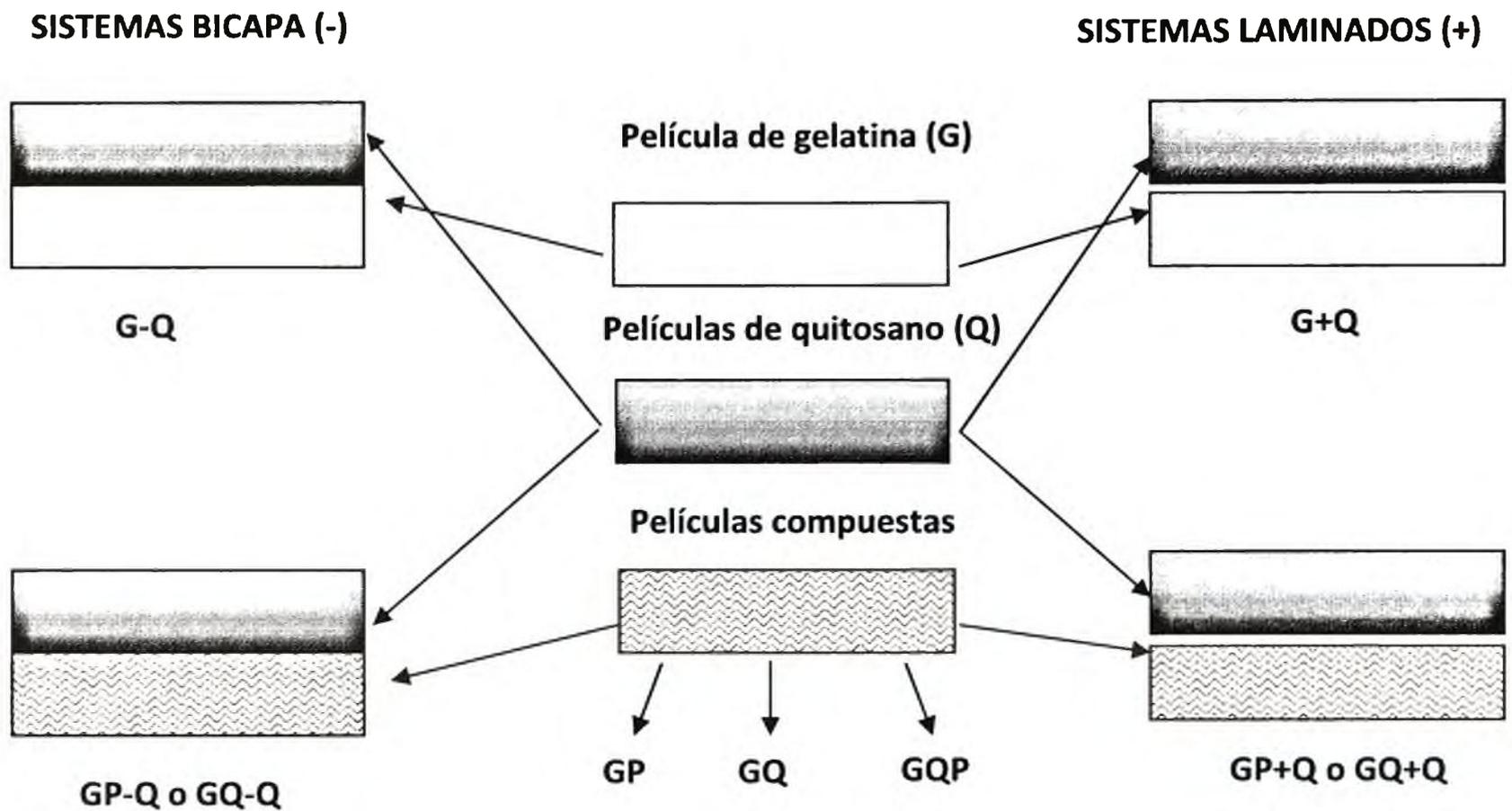


Figura 3.11 Esquema representativo de la preparación de sistemas compuestos, *bicapa* y *laminados*.

3.II.2.3 Caracterización de las películas

3.II.2.3.1 Determinación del espesor

El espesor de las películas se determinó como se describió en el Capítulo 2. En forma complementaria se midió el espesor de las muestras por SEM, a través de las observaciones de las secciones transversales de las películas.

3.II.2.3.2 Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad de las películas se determinó de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo 2.

3.II.2.3.3 Propiedades ópticas de las películas

El color de las películas se midió usando un colorímetro Minolta Serie CR 300 (Osaka, Japón) calibrado con un estándar ($Y = 93.2$, $x = 0.3133$, $y = 0.3192$). Se utilizó la escala CIELab, y se midió, L , que describe la luminosidad (100 para el blanco y 0 para el negro) y los parámetros a^* (rojo – verde) y b^* (amarillo – azul) que describen las coordenadas de cromaticidad (Figura 3.12). Los ensayos se realizaron colocando las películas sobre el estándar. Los análisis se realizaron por triplicado, registrando cinco medidas para cada película.

A partir de la siguiente ecuación se calcularon las diferencias de color (ΔE) de las películas:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde,

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

Siendo,

L_0^* , a_0^* , b_0^* los valores de los parámetros de color del estándar y L^* , a^* , b^* , los correspondientes a las películas.

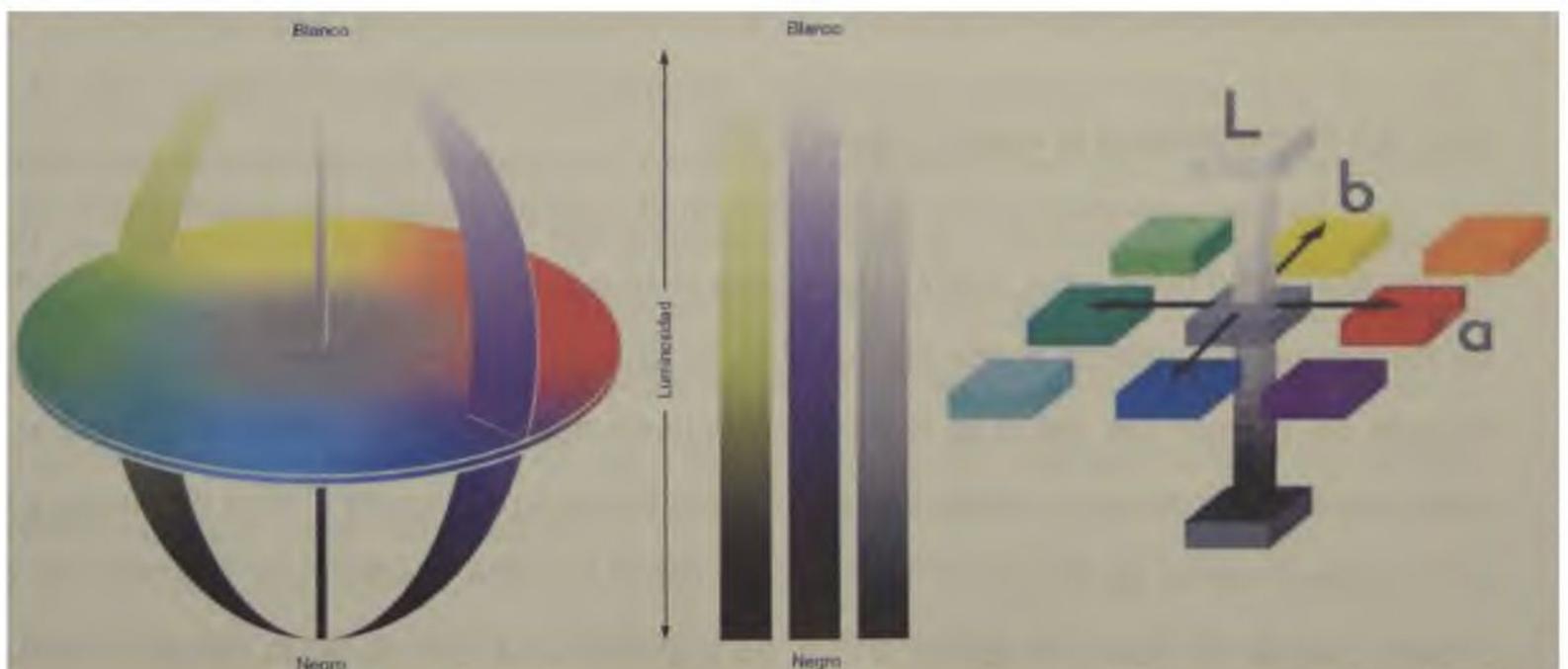


Figura 3.12 Esquema representativo de los atributos de color: luminosidad y parámetros de cromaticidad a^* y b^*

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

La opacidad de las películas se determinó mediante el procedimiento descrito por Cho y Rhee (2004) y la transparencia siguiendo el método propuesto por Zhang y Han (2006). Las muestras se cortaron en rectángulos acorde a las dimensiones de la celda espectrofotométrica, registrándose el espectro de absorción en la región del visible (400-700 nm) usando un espectrofotómetro Beckman DU650 (Palo Alto, CA, EEUU). La opacidad se definió como el área bajo la curva calculada por integración y se expresó en unidades de absorbancia por nanómetro dividido por el espesor de las películas ($\text{AU} \times \text{nm} \text{mm}^{-1}$). La transparencia se calculó a través de la relación entre la absorbancia a 600 nm (A_{600}) y el espesor de las películas, expresada como ($A_{600} \text{mm}^{-1}$). Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.II.2.3.4 Caracterización de la microestructura

La morfología de las películas se analizó mediante SEM con un microscopio electrónico (modelo Philips SEM 505, Fuji, Japón) equipado con el Soft Imaging System ADDA II. Con el empleo de este equipo fue necesario el metalizado de las películas el cual fue realizado con el fin de hacer más conductora a la superficie, y eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica. Para metalizar se utilizó oro en presencia de una atmósfera ionizante de argón y se aplicó una capa de 40-50 nm de espesor para permitir la observación de la superficie y la sección transversal de las películas. Las observaciones se efectuaron usando los siguientes aumentos: 200, 500, 1000 y 2000x.

3.II.2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA se determinó como se describió en el Capítulo 2 según una modificación de la norma ASTM E96 (Mali y col., 2002). Las muestras se colocaron en celdas de acrílico, y éstas en recipientes herméticos a una HR del 75%. Se graficó el cambio de peso de la celda en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y de la pendiente se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) teniendo en cuenta el área expuesta ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2}$). La permeancia ($\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$) se calculó como la VTVA dividido por el gradiente de presión parcial de vapor de agua a través de la película. La PVA se pudo calcular como el

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

producto de los valores de permeancia obtenidos y el espesor de las películas (m), y se expresó como $\text{g Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$.

Los valores de VTVA para los sistemas *bicapa* se calcularon de acuerdo con Cooksey y col. (1999), usando la siguiente ecuación:

$$1/\text{VTVA}_B = 1/\text{VTVA}_1 + 1/\text{VTVA}_2 \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde, la VTVA_B ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2}$) es la velocidad de transmisión de vapor de agua de los sistemas *bicapa*, y los subíndices 1 y 2 indican la capa de Q y de una película formada sólo por G o compuesta (GQ, GP, GQP), respectivamente.

Las propiedades de barrera al vapor de agua de los sistemas *laminados* se analizaron colocando las películas individuales una sobre la otra en la celda de permeabilidad, es decir siempre se usó una matriz de Q, y otra de G, GP o GQ; se evaluaron ambas posiciones relativas de las películas en la celda.

3.II.2.3.6 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas se determinaron de acuerdo a la metodología descrita en la primera parte del presente Capítulo.

3.II.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.II.3.1 Caracterización de las películas desarrolladas

Las películas se removieron fácilmente de las placas de moldeo, independientemente de la formulación, las mismas presentaron superficies suaves al tacto. Las películas individuales de gelatina y quitosano, así como las compuestas con (GQP) y sin plastificante (GQ) se caracterizaron por ser transparentes, flexibles, y homogéneas como puede observarse en la Figura 3.13. Las películas formuladas a partir de G con o sin glicerol como plastificante presentaron un espesor entre 60 y 90 μm , mientras que las películas de Q tuvieron un espesor entre 30 y 45 μm . En el caso de los sistemas *bicapa* los valores obtenidos variaron desde 60 a 100 μm .

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

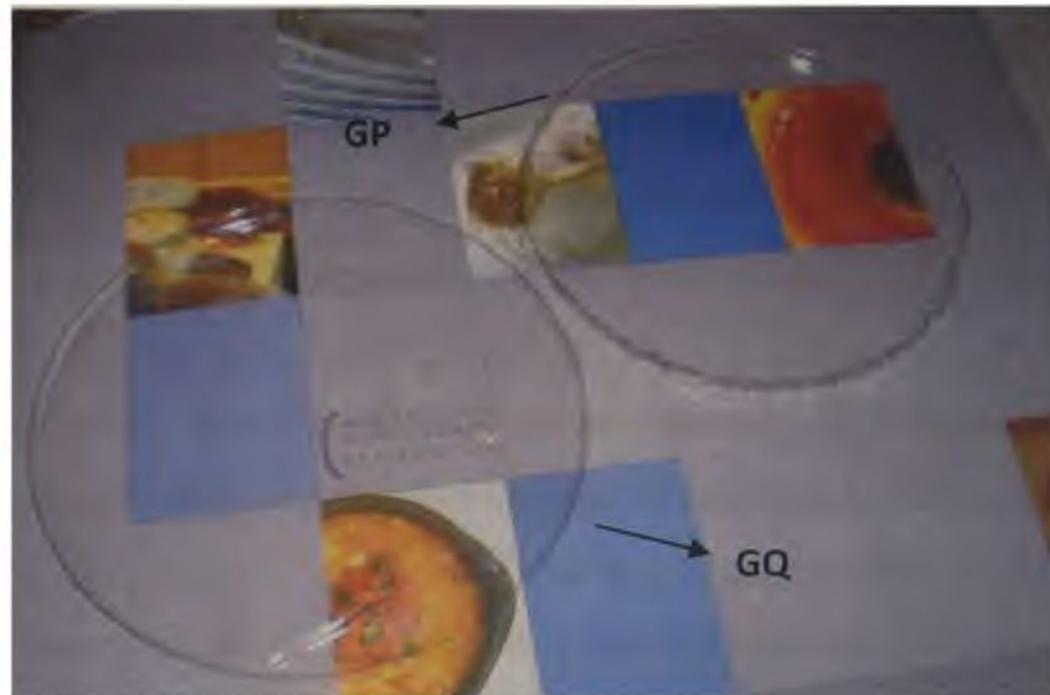


Figura 3.13 Fotografía de una película formulada con gelatina y plastificante (GP) y otra compuesta por gelatina y quitosano (GQ).

La Tabla 3.5 muestra que las películas tanto de un sólo componente (G o Q) como las películas compuestas alcanzaron valores bajos de humedad luego de la etapa de secado.

Tabla 3.5 Caracterización fisicoquímica de películas de G, Q y GQ con y sin plastificante

Formulación	Contenido de humedad (%)	Propiedades ópticas		Color superficial	
		Transparencia ($A_{600} \text{ mm}^{-1}$)	Opacidad ($A_u \times \text{nm } \mu\text{m}^{-1}$)	Diferencia de color (ΔE)	Parámetro de cromaticidad b^*
G	10,31 (0,69) ^a	0,62 (0,04) ^a	0,18 (0,01) ^a	2,11 (0,17) ^{ac}	3,41 (0,18) ^a
GQ	10,31 (0,52) ^a	0,8 (0,04) ^b	0,39 (0,02) ^b	2,32 (0,18) ^a	3,63 (0,11) ^a
GP	11,44 (0,52) ^a	0,65 (0,05) ^a	0,17 (0,001) ^a	1,32 (0,04) ^b	2,71 (0,38) ^b
GQP	10,19 (0,92) ^a	0,82 (0,08) ^b	0,39 (0,02) ^b	1,82 (0,23) ^{cd}	3,08 (0,29) ^{ab}
Q	8,49 (0,42) ^b	1,13 (0,05) ^c	0,54 (0,01) ^c	1,66 (0,15) ^d	3,04 (0,32) ^{ab}

* Valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar, letras distintas en cada columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

Las propiedades ópticas se presentan en la Tabla 3.5. La transparencia de las películas de G fue de $0,6 A_{600} \text{ mm}^{-1}$; el agregado de glicerol no modificó esta propiedad del material, mientras que la presencia de Q aumentó los valores de transparencia de las películas compuestas. Los resultados obtenidos indicaron que las películas a base de gelatina mostraron valores de transparencia más bajos que otras matrices biodegradables plastificadas (Zhang y Han, 2006). Los materiales sintéticos tales como el polietileno de baja densidad (LDPE) y el polipropileno orientado (PP) presentan valores de $3,05$ y $1,67 A_{600} \mu\text{m}^{-1}$ respectivamente.

La opacidad de las muestras no mostró diferencias significativas ($p>0,05$). Los valores obtenidos fueron más bajos que los hallados por Cho y Rhee (2004) para películas de proteínas de soja, y que los informados por Park y col. (2008). Estos resultados son de gran relevancia ya que la opacidad es una propiedad crítica para la aplicación de estos materiales como recubrimientos alimentarios o para mejorar la apariencia de los alimentos a ser envasados, en comparación con los materiales sintéticos.

Respecto a los parámetros de color estudiados, la luminosidad (L) no varió significativamente ($p>0,05$) independientemente de la formulación de la película, exhibiendo un valor promedio de $95,77$. Los parámetros a^* y b^* presentaron una tendencia similar y disminuyeron con el agregado de glicerol y de quitosano cuando se desarrollaron películas compuestas (Tabla 3.5).

3.II.3.2 Microscopía electrónica de barrido

Para todas las formulaciones ensayadas las micrografías de las películas obtenidas por SEM revelaron que las muestras presentaron superficies homogéneas y uniformes en toda su extensión, sin poros y con una buena integridad estructural.

A diferencia de las películas de Q, descritas en el Capítulo 2, el corte transversal de la película de G mostró una estructura de aspecto multilaminar (Figura 3.14a). La micrografía de la película compuesta con gelatina y quitosano (GQ) presentó una estructura más compacta, uniforme, densa y de apariencia homogénea (Figura 3.14b), indicando una buena compatibilidad y miscibilidad entre los componentes. Este resultado se debió a la interacción entre los componentes del sistema; los grupos funcionales presentes en ambos polímeros

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

son capaces de formar fuertes enlaces e interacciones puente de hidrógeno. Asimismo la formación de complejos polianión-policación entre la gelatina y el quitosano, respectivamente, juegan un papel importante en el entrecruzamiento de la red (Liu y col., 2012). En forma similar, Pereda y col. (2011) atribuyeron la microestructura de las películas compuestas a la formación de un complejo polielectrolítico a través de interacciones electrostáticas entre los grupos NH_3^+ del quitosano y los grupos COO^- de la gelatina.

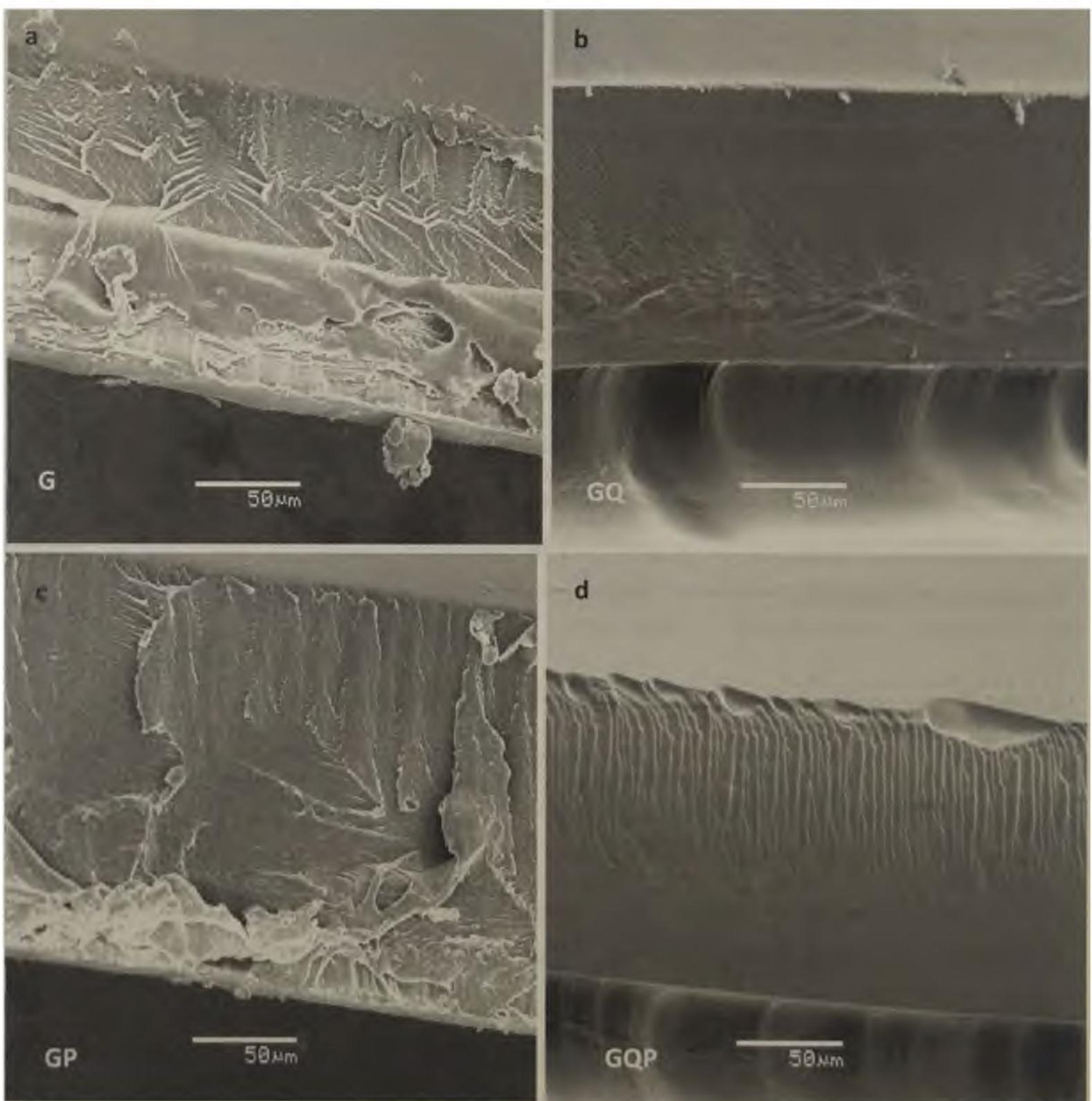


Figura 3.14 Microscopía SEM de cortes transversales de películas de: (a) gelatina (G), (b) compuesta de gelatina y quitosano (GQ), (c) gelatina con plastificante (GP) y (d) compuesta de gelatina y quitosano con plastificante (GQP). Escala: 50 μm entre marcas.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

En la micrografía 3.14d correspondiente a las películas compuestas de GQP podría evidenciarse una migración de plastificante de la matriz, si bien macroscópicamente no se detectó. Aider (2010) atribuyó este fenómeno a la fuerte interacción establecida entre las moléculas de proteínas y las de quitosano lo que induce a la migración del glicerol hacia la superficie. Sin embargo cuando el plastificante es agregado a cada uno de los polímeros individualmente este comportamiento no fue observado.

La Figura 3.15a y b muestra los cortes transversales de las películas *bicapa*, donde se observa que los sistemas G-Q y GQ-Q presentan una estructura menos uniforme que la de las películas compuestas (Figura 3.15c y d). Esto podría atribuirse a una ligera interacción en la interfase entre los componentes del sistema (G y Q o GQ y Q). Resultó importante el aporte de las micrografías para visualizar los componentes individuales del sistema, es decir se pudieron distinguir cada una de las capas que lo conforman (G-Q o GQ-Q), confirmando entonces la formación de un sistema constituido por la deposición de dos capas sucesivas.

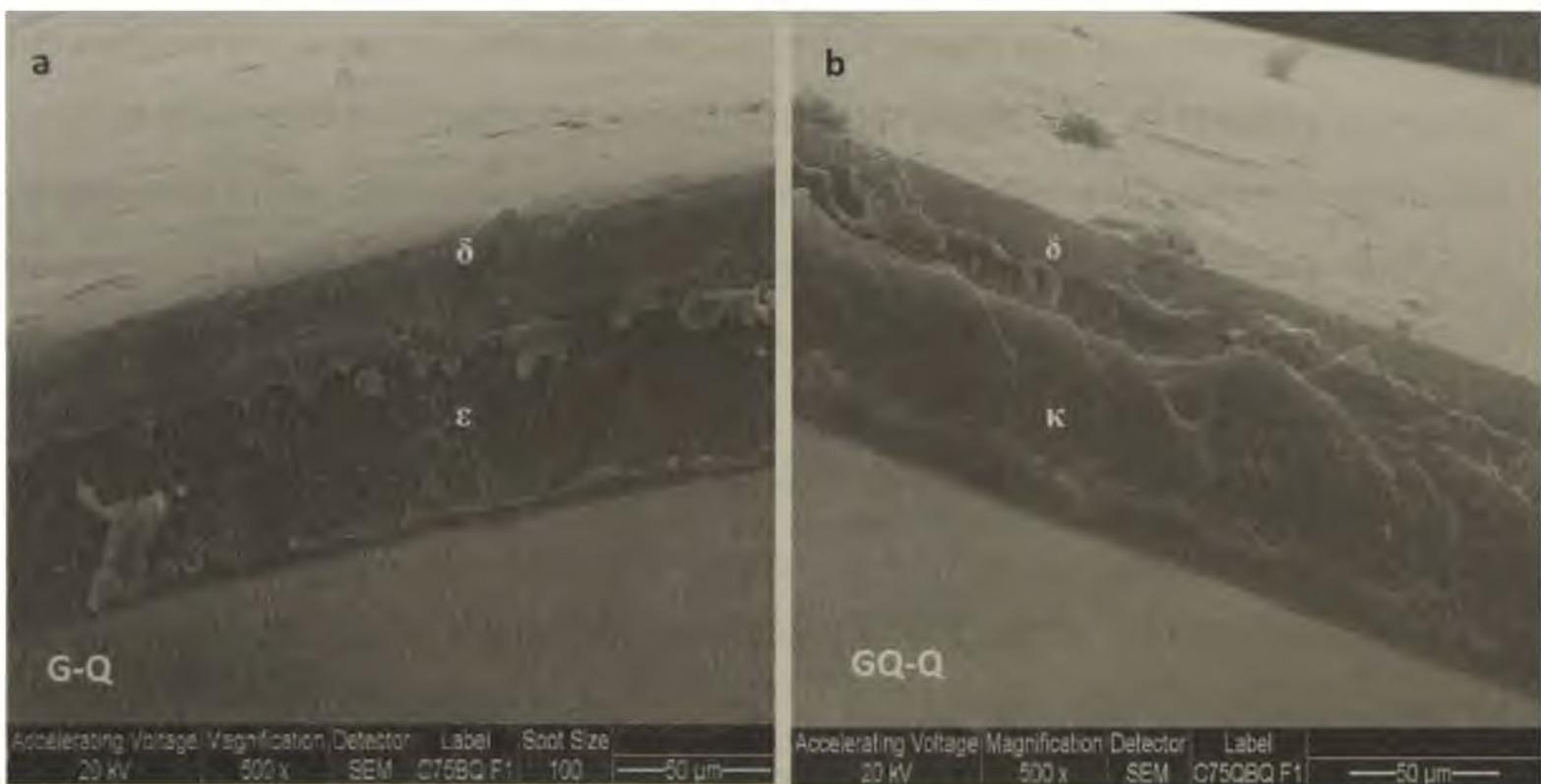


Figura 3.15 Microscopía SEM de cortes transversales de películas *bicapa* de gelatina. (a) sistema G-Q constituido por una capa de Q (δ) y una de G (ϵ) y (b) sistema GQ-Q formado por una capa de quitosano y gelatina (κ) y una de G (ϵ). Escala: 50 μm entre marcas.

3.II.3.4 Propiedades de barrera al vapor de agua

3.II.3.3.1 Efecto del espesor en la permeabilidad al vapor de agua (PVA)

En los materiales poliméricos ideales la permeabilidad al vapor de agua es independiente del espesor de la película. Sin embargo, los valores de PVA de las películas preparadas a partir de biopolímeros dependen de su espesor, debido a su naturaleza hidrofílica, encontrándose una relación lineal entre la PVA y el espesor. McHugh y col. (1993) y Gennadios y col. (1994) consideran que a medida que el espesor de las películas aumenta, se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella. En consecuencia, la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie de la película se incrementa. Otros autores atribuyen este efecto a cambios en la estructura de la película ocasionados por el hinchamiento que provoca el agua en la matriz hidrofílica (Park y col., 1993).

El efecto del espesor en las propiedades de barrera al vapor de agua se analizó en las películas de un sólo componente (Q o G). La ganancia en peso de las películas de gelatina medida a un tiempo constante (6 hs), disminuyó linealmente con el espesor hasta un valor de aproximadamente 130 μm (Figura 3.16a). En películas de G con espesores mayores que 200 μm , la ganancia de peso llegó a ser independiente del espesor del material (a las 6 hs), con una zona de pendiente decreciente entre ambos valores extremos. Por lo tanto cuando se considera el espesor en los cálculos de PVA fuera de la zona de linealidad, se produce un aumento ficticio en dicha propiedad, el cual no se debe a un aumento real de la ganancia de peso de agua. En estos casos la PVA varió entre $3,32 \cdot 10^{-10}$ y $5,16 \cdot 10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para espesores en el rango entre 210 y 410 μm , respectivamente. A partir de los resultados obtenidos, se decidió trabajar con películas cuyos espesores fuesen inferiores a 90 μm , para evitar este efecto ficticio de incremento de permeabilidad debido en realidad al aumento del espesor.

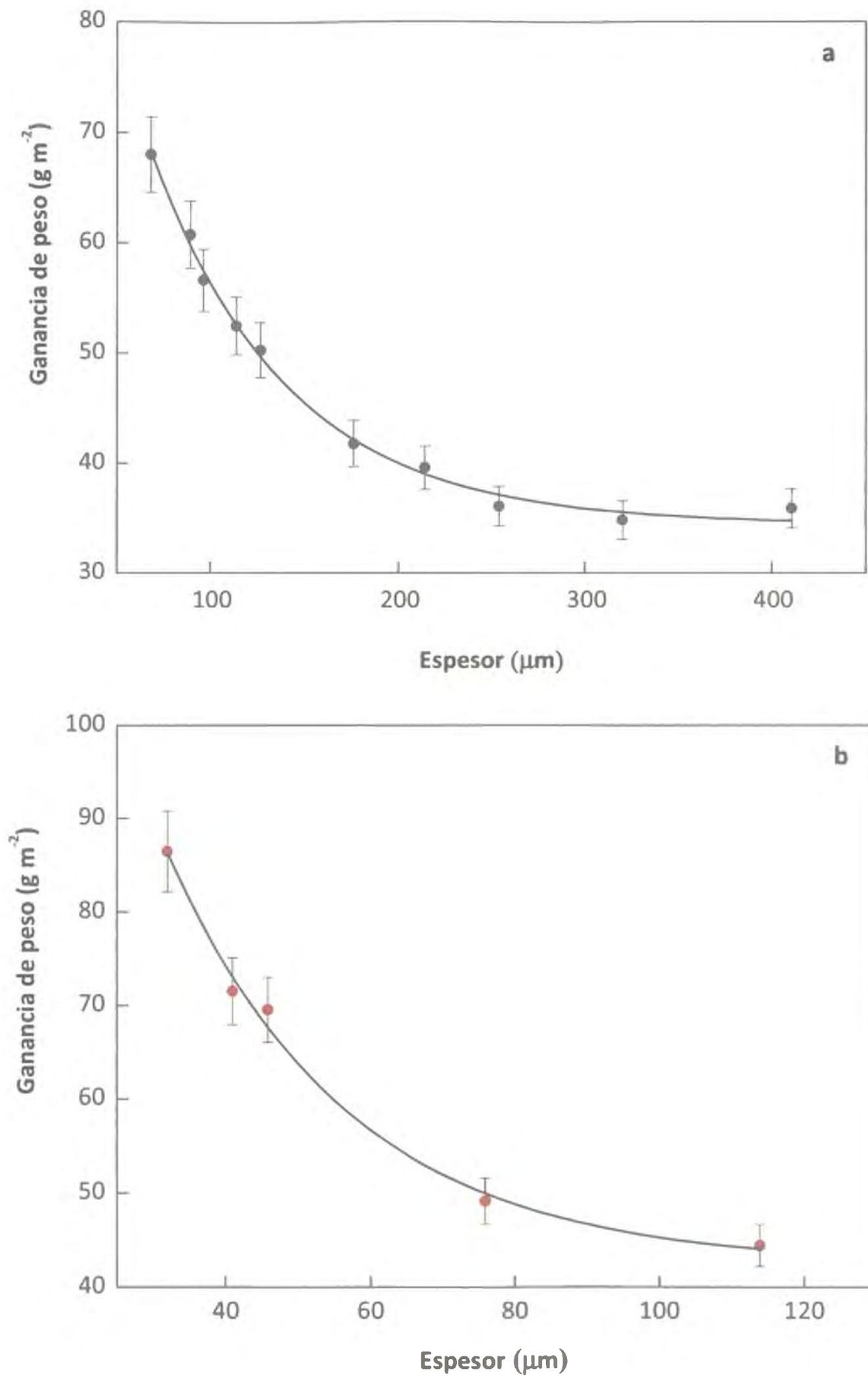
Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

Figura 3.16 Ganancia de peso de: (a) películas de gelatina, (b) y de películas de quitosano en función del espesor determinadas a tiempo constante (6 hs). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

Para analizar desde el punto de vista fenomenológico el problema del hinchamiento de la matriz es necesario insistir en el concepto de que del espesor no afecta la permeabilidad al vapor de agua de los polímeros ideales. Las desviaciones del comportamiento ideal indican que la película no estaría actuando como una barrera simple, presentándose un transporte difusional que podría atribuirse a asociaciones entre las moléculas de agua y los grupos funcionales de la matriz polimérica. Estas asociaciones entre el agua y la película provocan hinchamiento y cambios estructurales que facilitan la difusión del vapor de agua (McHugh y col., 1993). Bertuzzi y col. (2007), trabajando con películas de almidón de alto contenido en amilosa encontraron que cuando las películas se expusieron a humedades relativas mayores al 52%, el hinchamiento de la película fue notable y la matriz polimérica se expandió facilitándose el transporte de agua a través de ella.

En el caso de las películas de quitosano, la ganancia de peso medida a tiempo constante (6 hs) disminuyó linealmente para todos los espesores ensayados en el rango entre 20 y 60 μm (Figura 3.16b); los valores de PVA no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el rango de los espesores estudiados, siendo $6,35 \pm 1,3 \cdot 10^{-11} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$.

Estos resultados mostraron que el efecto del espesor fue crítico en el caso de películas de gelatina debido al carácter hidrofílico de este polímero, pero no resultó tan dramático para el caso de Q, dado que el espesor de estas matrices normalmente no excede los valores en que se manifestaron las desviaciones de la linealidad. Por lo tanto, es esencial con fines comparativos de los valores de permeabilidad al vapor de agua obtener películas con espesores dentro de los rangos establecidos para cada formulación.

En este punto conviene detenerse para remarcar la importancia del espesor en películas con fuerte carácter hidrofílico acondicionadas a distintas HR y su directa influencia sobre la permeabilidad al vapor de agua.

El análisis de la desviación a la ley de Fick en el transporte de agua a través de la película, se explica teniendo en cuenta que la misma va a absorber o liberar parte de su propia humedad (debido a su carácter hidrofílico) según la HR a la que se acondicione en relación a la HR a la cual se va a realizar el ensayo. Cuanto más difieran dichos valores entre sí, mayor será el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio. Si la película se acondiciona a HR por encima del 75% (valor al cual se realizaron las determinaciones) libera

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

parte de su propia humedad, por el contrario si se acondiciona por debajo de éste valor la absorbe. Asimismo, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio será mayor cuanto mayor sea el espesor de las películas, y en consecuencia el proceso podrá ser visualizado más fácilmente. En el caso de películas de G o GP las desviaciones de la idealidad se produjeron para espesores mayores a 130 μm . Para matrices de Q, aún con espesores del orden de 60 μm , las diferencias encontradas no fueron significativas ($p > 0,05$).

Para realizar los ensayos se prepararon películas de Q, G y GP como se ha descrito anteriormente pero con mayor relación peso de solución/ área, de manera que fue posible obtener espesores significativos. Las películas se acondicionaron a 20°C y distintas humedades relativas (43, 75 y 85%).

Para corroborar que las desviaciones halladas se debían a la capacidad de las matrices para retener o liberar parte del agua que aportaba el medio externo y poder cuantificar la diferencia entre el peso de agua de la película y el peso retenido en la sílica, se hizo una modificación de la celda original, que permitió ponderar por separado ambas contribuciones (Figura 3.17). Para evitar errores durante la pesada la película ensamblada en medio de dos coronas de acrílico se cubrió con una tapa (1) y un fondo, mientras la parte inferior conteniendo la sílica también cubrió con la tapa (2) para evitar la transferencia de masa, como se puede visualizar en la Figura 3.17. Es decir, para cada tiempo se registraron dos pesos distintos, el peso de agua absorbida (o liberada) en la matriz y el peso realmente transferido a la sílica. La ganancia de peso de agua total de la celda lleva a una permeabilidad aparente mientras que el peso de la sílica permitiría calcular la permeabilidad verdadera.

En las Figuras 3.18, 3.19 y 3.20 se muestran las curvas de variación de peso en función del tiempo para los distintos casos analizados. Se observó que para espesores mayores que 130 μm y HR del 85% la película de GP perdió peso (\blacktriangle) y la sílica retuvo el agua (\bullet) perdida por la película además de la transferida a través de la misma proveniente del medio (Figura 3.19). Un sistema ideal (que no ganara ni perdiera agua) ubicado en el compartimento de la sílica recibiría una cantidad extra de humedad hasta que la película llegara al equilibrio con el 75% HR. En el caso de la película acondicionada al 43% HR, la misma permitió la transferencia de parte del agua del medio (\bullet) y absorbió otra parte (\blacktriangle)

hasta que su HR llegó al 75% (Figura 3.20). En este último caso el sistema ideal estaría sometido a un ambiente de menor humedad durante el estado transitorio.

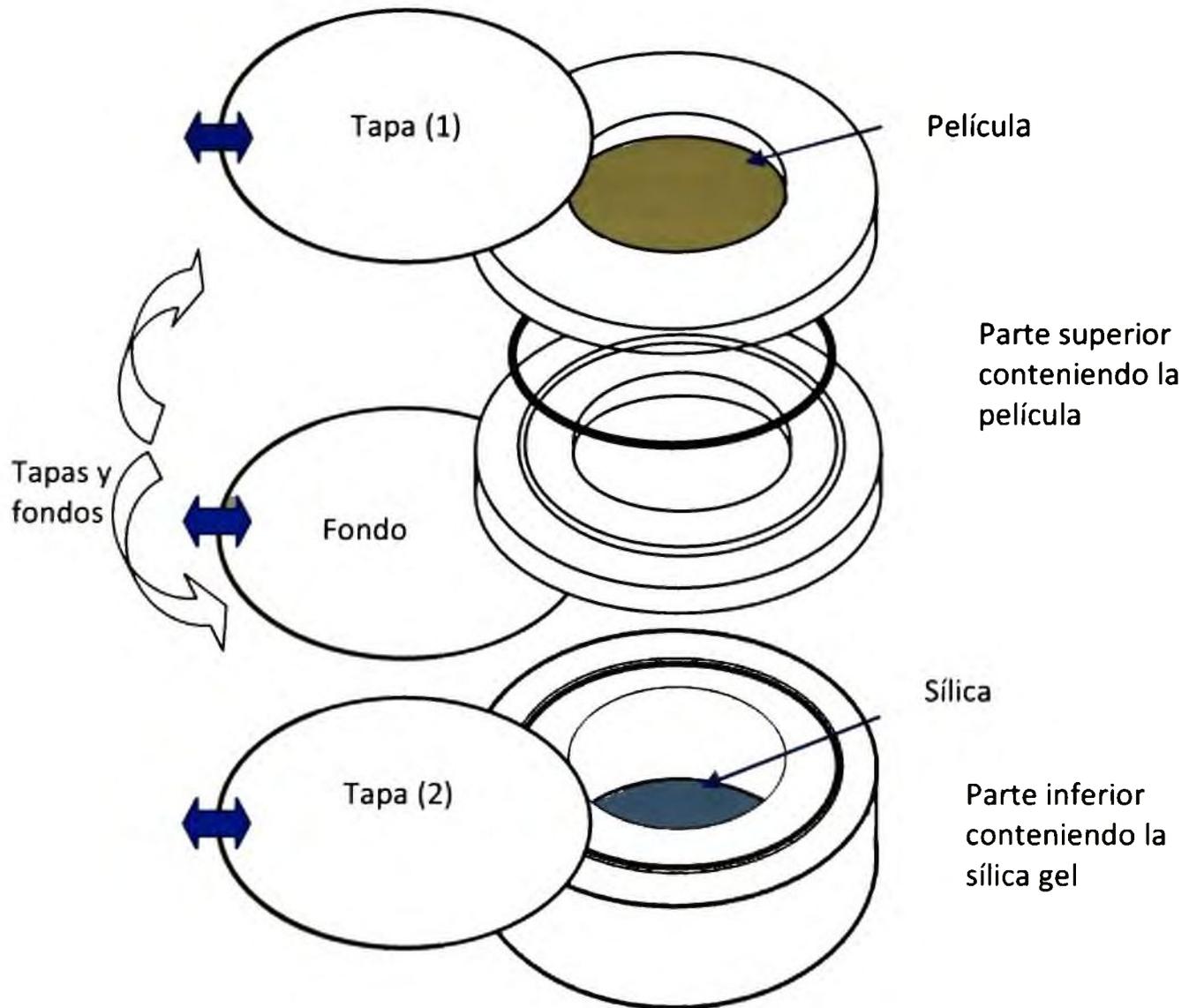


Figura 3.17 Esquema de la celda modificada para pesar la parte superior e inferior en forma independiente

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

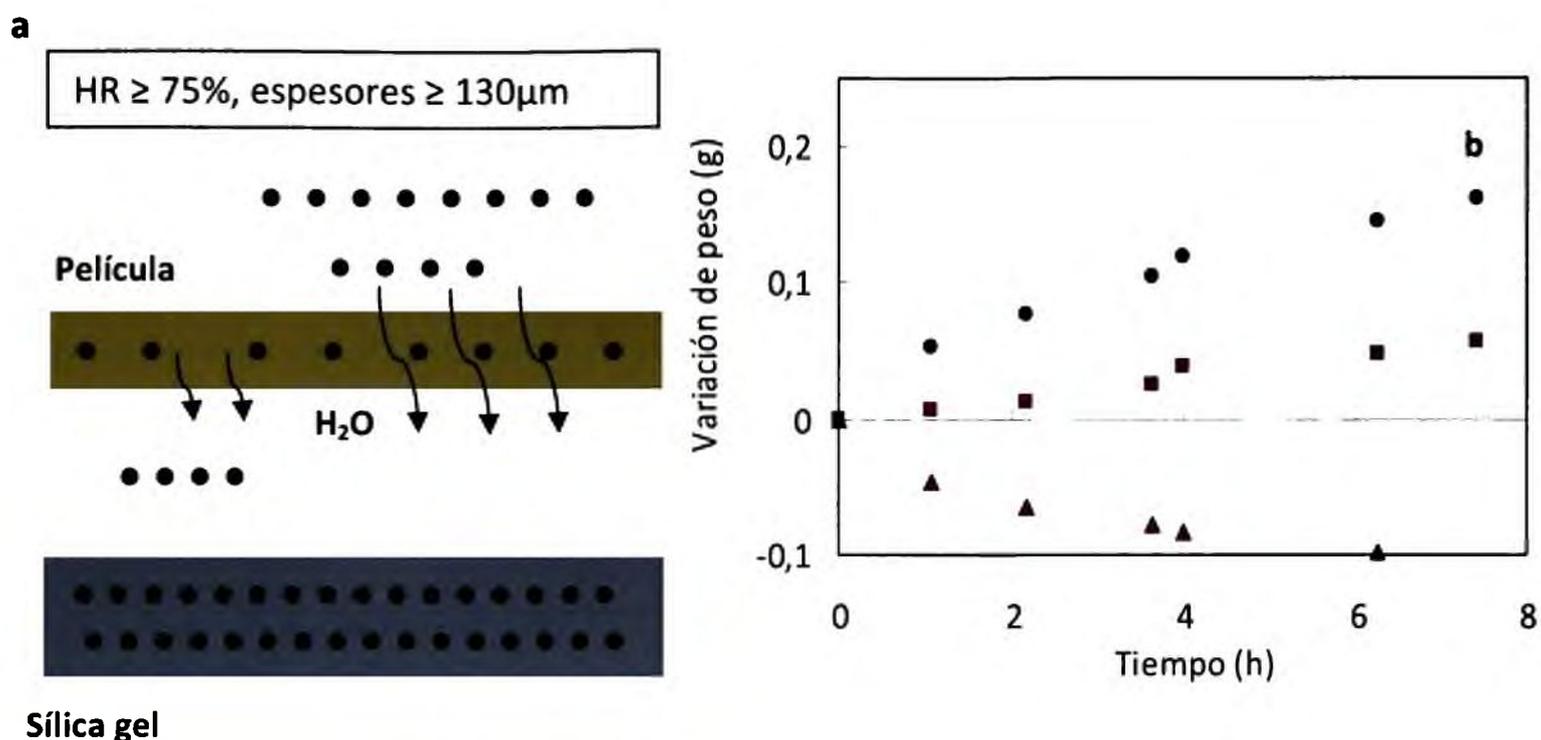


Figura 3.18. (a) Esquema de la transferencia del vapor de agua proveniente del medio externo y de la película hacia la sílica; (b) Variación de peso en función del tiempo para la película (\blacktriangle), la sílica (\bullet) y el sistema total (\blacksquare). Película de GP 1,5%, de 149 μ m acondicionada al 85% HR.

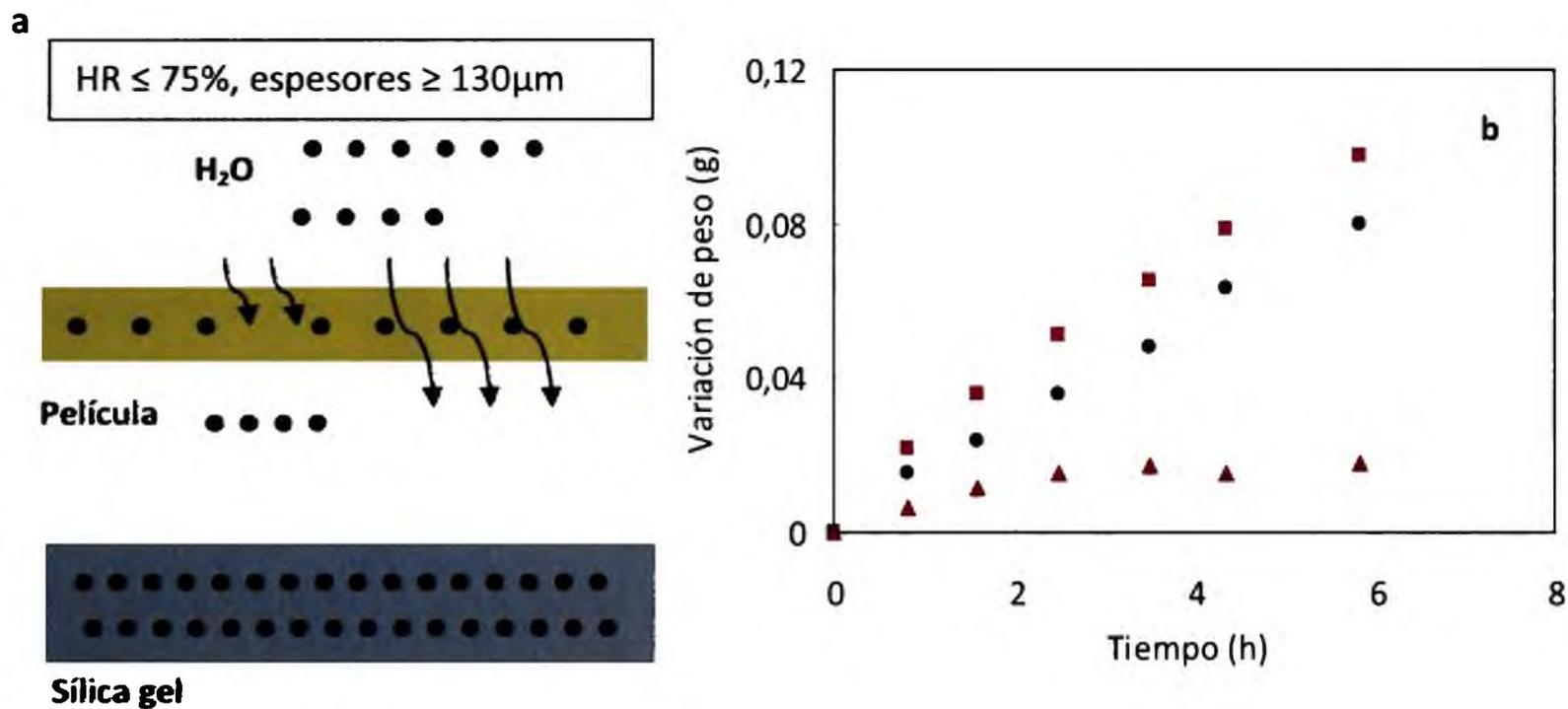


Figura 3.19. (a) Esquema de la transferencia del vapor de agua proveniente del medio externo hacia la película y la sílica; (b) Variación de peso en función del tiempo para la película (\blacktriangle), la sílica (\bullet) y el sistema total (\blacksquare). Película de GP 1,5%, de 141 μ m acondicionada al 43% HR.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

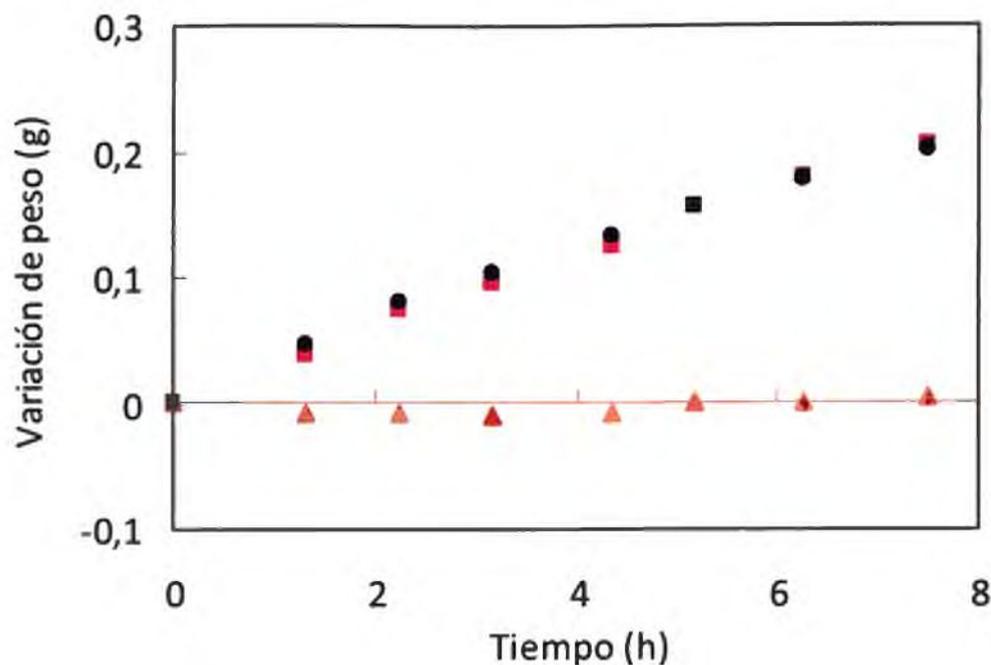


Figura 3.20. Variación de peso en función del tiempo para la película (▲), la sílica (●) y el sistema total (■). Película de G 1,5% de 101 μm , acondicionada al 75% HR.

En los casos analizados con HR distintas al 75%, la permeabilidad tendría que ser determinada una vez superado el estado transitorio en que la matriz absorbe o libera agua. Este transitorio puede ser provocado por el hecho de que la película tenga un espesor tal que el tiempo estudiado no haya sido suficiente para alcanzar el equilibrio, o también por realizar el ensayo con una película acondicionada a una HR distinta a la del medio circundante, o por ambas cosas a la vez. Estudios adicionales podrían realizarse con matrices de otros biopolímeros para determinar la existencia de los fenómenos descritos y en caso afirmativo, determinar la zona de linealidad entre la ganancia de peso y el espesor.

El análisis de la película almacenada en las mismas condiciones que las de la medida (20°C y 75%) y con un espesor menor que 130 μm , no sufrió variación significativa de peso ($p \geq 0,05$) y permitió la transferencia de las moléculas de agua del medio externo desde el inicio del experimento, las que fueron retenidas por la sílica (Figura 3.20). En este caso en todo momento se trabajó en estado estacionario y se obtuvieron los mismos valores de PVA que los determinados empleando la celda original.

Estos resultados ratifican la validez de lo informado mediante el empleo de la celda de permeabilidad usada en todos los ensayos del presente trabajo, descrita en el Capítulo 2, dado que los espesores empleados estuvieron por debajo del límite establecido y las HR de las películas y del medio de ensayo no difirieron.

3.II.3.4.2 Permeabilidad al vapor de agua de películas compuestas y sistemas bicapa y laminados.

Las películas a base de gelatina exhiben pobres propiedades de barrera al vapor de agua debido a su carácter netamente hidrofílico. La mezcla con Q y la adición de glicerol como agente plastificante, disminuyó la PVA de las películas de G, (Figura 3.21). Esto se puede atribuir a que el Q actúa como agente reticulante de la matriz proteica mejorando su funcionalidad y por lo tanto ampliando su posibilidad de aplicación como envase alimentario.

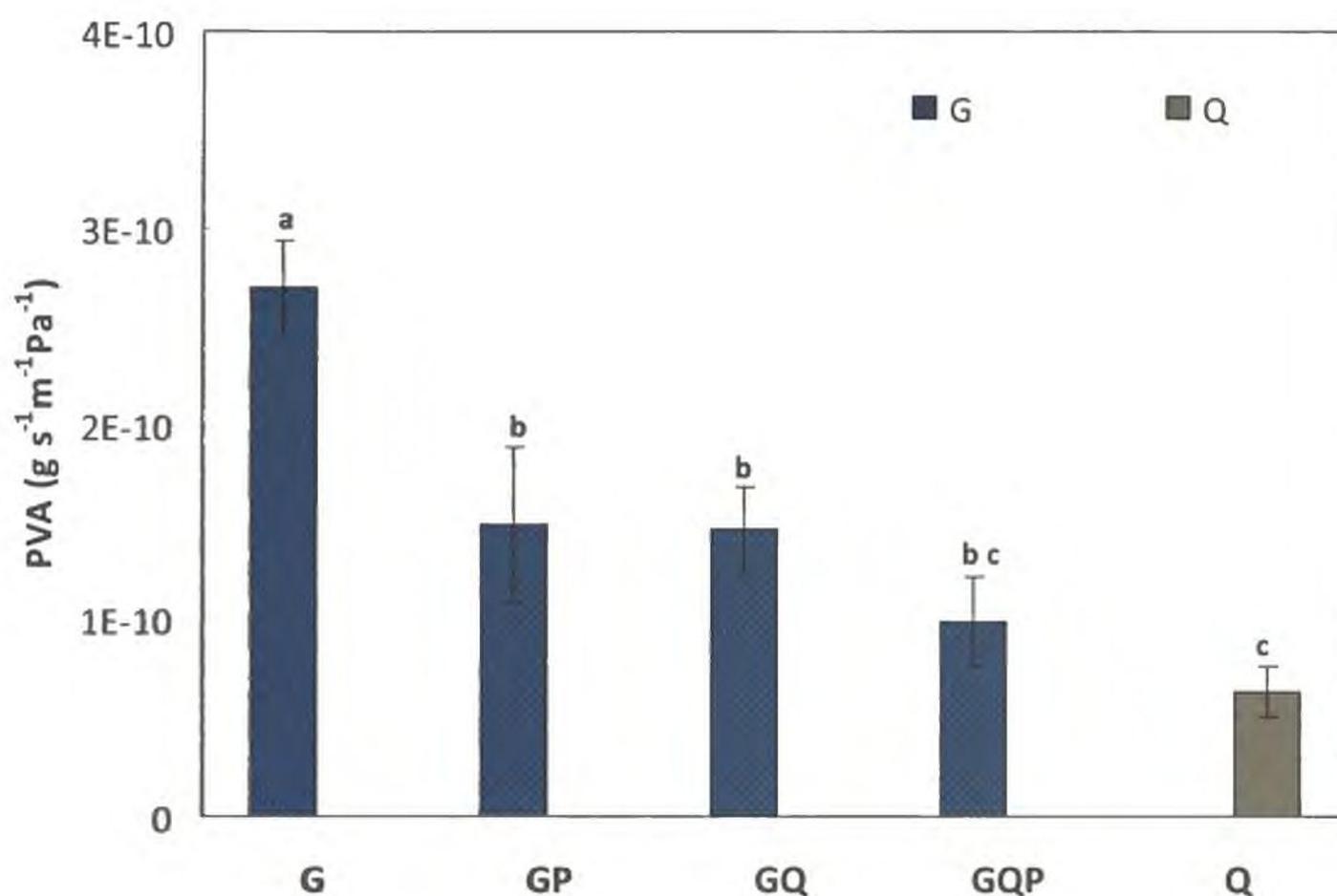


Figura 3.21 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de: película de quitosano (Q), películas de gelatina con (GP) y sin (G) glicerol, películas compuestas de gelatina y quitosano con (GQP) y sin (GQ) glicerol. Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Como ya se mencionó, otra alternativa para mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas fue desarrollar sistemas *bicapas* y sistemas *laminados*. Muchos trabajos han estudiado las propiedades de las películas *bicapa* (Fang y col., 2005; Kamper y Fennema, 1984; Park y col., 1994). Algunos investigadores afirman que estos sistemas *bicapa* son barreras efectivas a la transferencia de vapor de agua en comparación

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

con las películas formuladas a partir de soluciones compuestas (Perez-Gago y Krochta, 2001). Los resultados obtenidos presentan una tendencia similar independientemente del tipo de formulación desarrollada. La Figura 3.22a y b muestra la ganancia en peso de las películas en función del tiempo expresada en g m^{-2} . La pendiente de la recta por regresión lineal ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2}$) corresponde a la VTVA, y se determinó para cada uno de los sistemas desarrollados (películas *bicapa*, *laminados* y películas compuestas) a fin de evaluar la eficiencia de la metodología de preparación en la PVA.

Los ensayos realizados indicaron que la VTVA de los sistemas *laminados* y *bicapa* resultaron independientes de la ubicación relativa de las películas en la celda de permeabilidad.

Los películas *bicapa* disminuyeron la VTVA en un 57,6% para películas G-Q (Figura 3.22a) y un 42,5% para GP-Q (Figura 3.22b), con respecto a las películas compuestas. Los valores de velocidad de transmisión de vapor de agua para los sistemas *laminados* fueron ligeramente más bajos que aquellos obtenidos para las películas *bicapa*. Estos resultados confirmarían que cada una de las capas que conforman el sistema actúa de manera independiente, explicando los valores encontrados de VTVA.

Además, los resultados obtenidos se correlacionaron con las observaciones de la muestras a través de SEM, donde se visualizó que cada una de las capas conservaba su identidad.

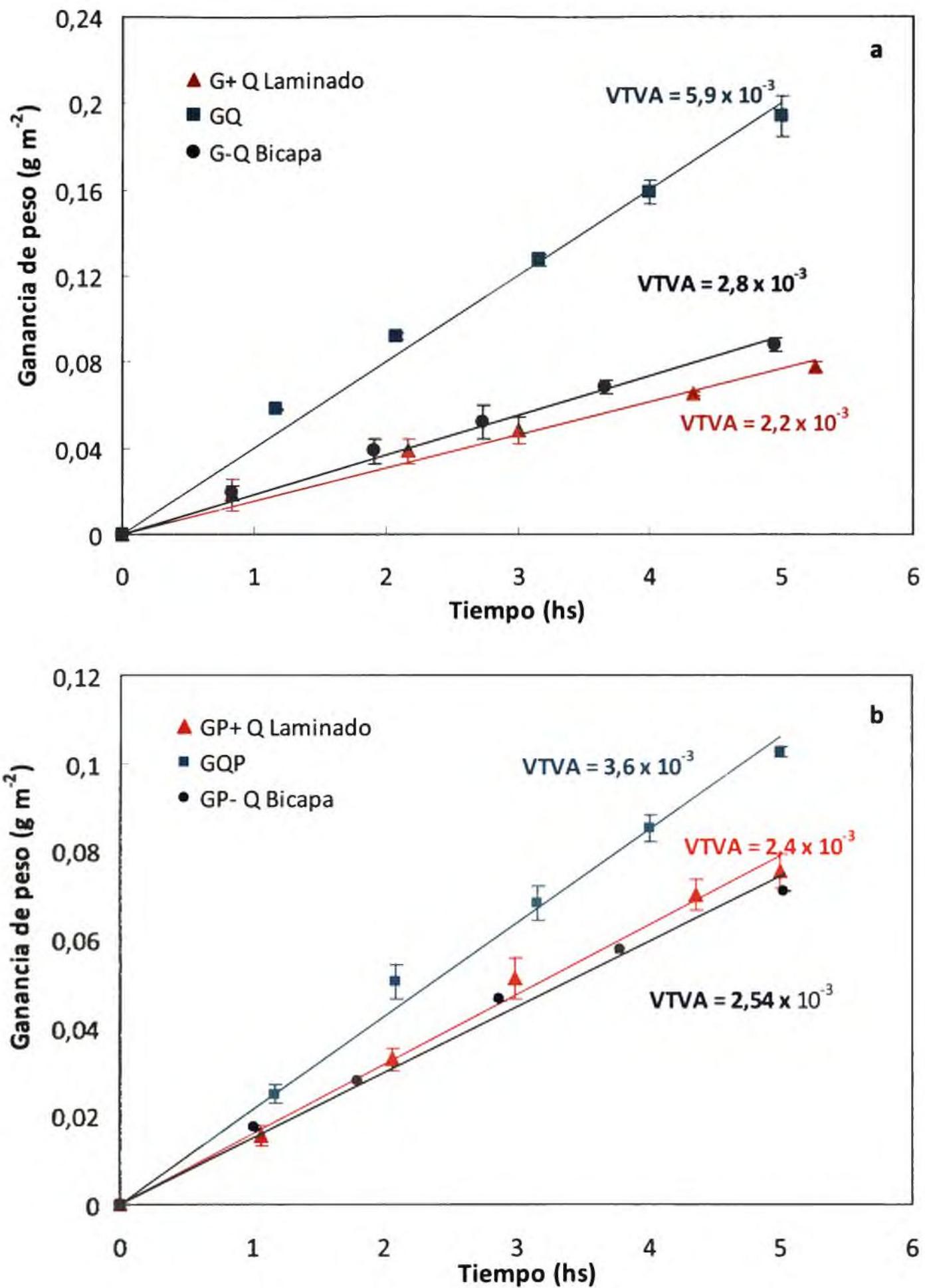


Figura 3.22 Ganancia de peso en función del tiempo para: (a) películas GQ, sistema bicapa (G-Q) y sistemas laminados (G+Q); (b) películas GQP, sistema bicapa (GP-Q) y películas laminadas (GP+Q). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

3.II.3.5 Propiedades mecánicas

Las Figuras 3.23 a y b muestran los valores de esfuerzo y de elongación porcentual de las películas de quitosano y gelatina así como de las películas compuestas.

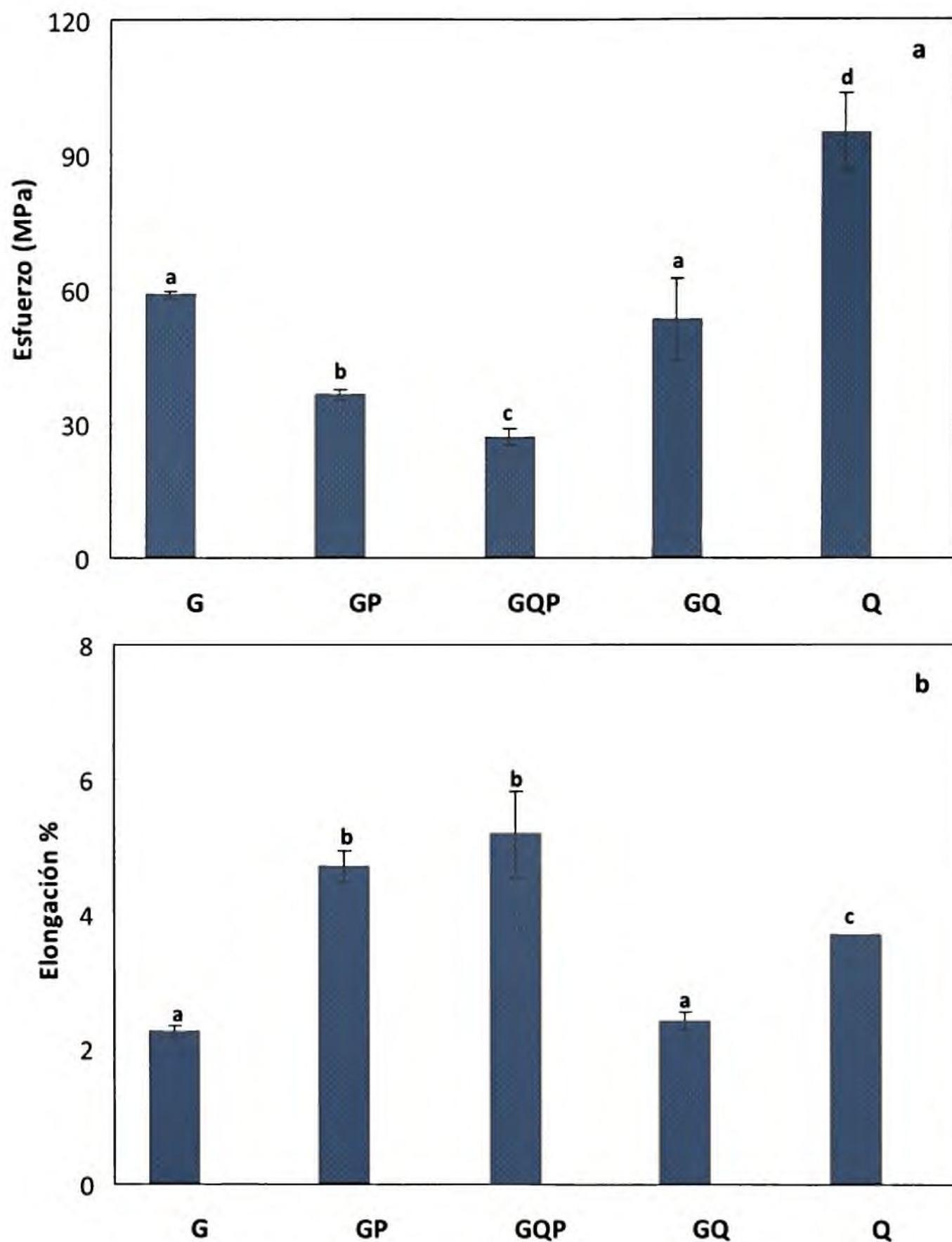


Figura 3.23 Propiedades mecánicas de películas de: quitosano (Q), gelatina con (GP) y sin (G) plastificante, películas compuestas de gelatina G y quitosano con (GQP) y sin (GQ) glicerol: (a) Resistencia a la tracción; (b) porcentaje de elongación a la ruptura. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

Se observa que las películas de un sólo componente presentaron un patrón de comportamiento a la tracción correspondiente a una matriz rígida como en el caso de las películas de Q, y rígidas y quebradizas, en el caso de las de G. Las películas de G mostraron valores más bajos de resistencia a la tracción (60 MPa) que las de Q, con valores alrededor de 94 MPa, las que resultaron más resistentes y tenaces. Los valores de elongación de las muestras de quitosano fueron 1,63 veces más altos que los correspondientes a las de gelatina (Figura 3.23b)

Haciendo mención a los sistemas *bicapa* formulados con G-Q, los mismos mostraron un comportamiento típico de materiales quebradizos en comparación a las películas compuestas. Para los sistemas constituidos por GQ-Q se obtuvieron valores similares de deformación del material pero con una mayor resistencia que las películas compuestas GQ.

El reemplazo de una capa de G por una capa compuesta por GQ (sistema bicapa GQ-Q) aumentó la resistencia del material de 54,3 a 77,2 MPa respecto a los sistemas formulados con una capa de G y una de Q (G-Q).

Además, los sistemas *bicapa* que incluían glicerol (GP-Q) mostraron una disminución en los valores registrados de esfuerzo acompañado de un aumento en los valores de deformación atribuidos a la flexibilidad debido a la presencia de glicerol en la matriz (Figura 3.24).

Sin embargo, algunos autores (Kamper y Fennema, 1984; Park y col., 2008) informaron que las propiedades mecánicas de los sistemas *bicapa* no fueron satisfactorias comparadas con las de películas compuestas, para sistemas que incluían un componente lipídico. En cambio, en el presente trabajo, los valores de esfuerzo obtenidos para los sistemas *bicapa* fueron mayores que los obtenidos para películas compuestas; mientras que los valores de elongación de ambos no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Weller y col. (1998) informaron valores similares, trabajando con películas *bicapa* formadas por una capa de proteínas de zeína de maíz y una capa cera de abejas.

Por otro lado, las películas *bicapa* mostraron mejores propiedades mecánicas que los sistemas *laminados* debido a que las propiedades de estos sistemas estuvieron determinadas por el componente individual más rígido. En los laminados GQ+Q se observó que ambas matrices presentaban un sólo pico de ruptura; mientras que para G+Q y GP+Q los

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

patrones exhibieron dos picos de ruptura que correspondieron a cada una de las películas que conformaban el sistema.

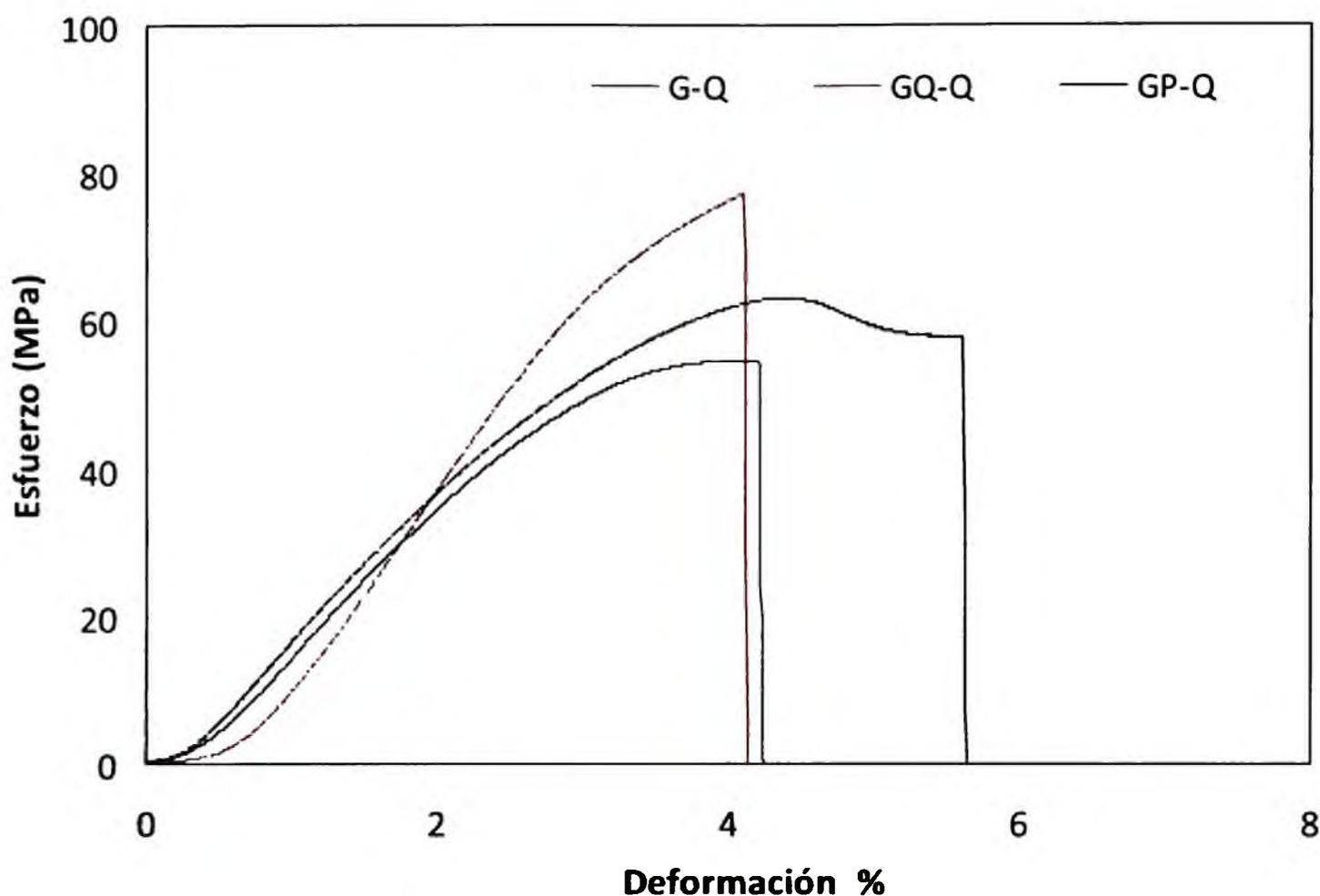


Figura 3.24 Perfil mecánico de sistemas *bicapa* formulados por la deposición de una capa de quitosano sobre: una de gelatina (G-Q), una de gelatina con plastificante (GP-Q) y sobre una película compuesta de gelatina y quitosano (GQ-Q).

Haciendo una recapitulación se podría afirmar que el manejo de la formulación en el desarrollo de películas, así como su interacción, permitiría obtener películas compuestas según las necesidades específicas requeridas.

La presencia de glicerol en la formulación aumentó la flexibilidad de los sistemas compuestos mientras que la PVA de las películas de gelatina mejoró con la adición tanto de quitosano como de glicerol.

Para evaluar las propiedades de barrera de las películas a base de gelatina o quitosano resulta necesario conocer el tipo de dependencia con el espesor de cada formulación de hidrocoloides en particular.

Desarrollo y caracterización de películas compuestas, bicapa y laminadas

Por otra parte, los sistemas *bicapa* y los *laminados* constituyeron alternativas eficaces para mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas, exhibiendo los primeros mejores propiedades mecánicas.

REFERENCIAS

- Aider M. (2010)** Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie, Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- Anker M., Berntsen J., Hermansson A.M., y Stading M. (2001)**. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. *Innovative Food Science & Emerging Technologie*, 3, 81-92.
- AOAC. (1982)**. *Official Methods of Analysis* 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. *Method 982.30 Protein Efficiency Ratio*
- AOAC. (1984)**. *Official Methods of Analysis* 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- AOAC. (1999)**. *Official methods of analysis*. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Arvanitoyannis I., y Biliaderis C.G. (1998c)**. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemistry*, 62, 333-342.
- Arvanitoyannis I., Nakayama A., y Aiba S. (1998b)**. Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate Polymers*, 36, 105-119.
- Arvanitoyannis I., Nakayama A., y Aiba, S. (1998a)**. Chitosan and gelatin based edible films; state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, 37, 371-382.
- ASTM. (1995)**. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95. Annual book of ASTM Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Audic J.L., y Chaufer B. (2005)**. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, 41, 1934-1942.
- Avena-Bustillos R.J., Olsen C.W., Olson D.A., Chiou B., Yee E., Bechtel P.J., y Mc Hugh T.H. (2006)**. Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71, 202-207.

- Baldwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O., Hagenmaier R.D., y Baker R.A. (1997).** Use of lipids in coatings for food products. *Food Technology*, 51(6), 56-64.
- Bertuzzi M.A., Castro Vidaurre E.F., Armada, M., y Gottifredi J.C. (2007).** Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80, 972-978.
- Bigi A., Panzavolta S., y Rubini K. (2004).** Relationship between triple-helix content mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675-5680.
- Bohidar H.B., y Jena S.S. (1993).** Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatin. *Journal of Chemical Physics*, 98(11), 8970-8977.
- Bohidar H.B. (1998).** Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23(1), 1-6.
- Bohidar H.B., y Jena S.S. (1994).** Study of sol-state properties of aqueous gelatin solutions. *Journal of Chemical Physics*, 100(9), 6888-6895.
- Cao N., Fu Y., y He J. (2007).** Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1153-1162.
- Cao N., Yang X., y Fu Y. (2009).** Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23, 729-735.
- Carvalho C.A., y Grosso C.R. (2004).** Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*, 18, 717-726.
- Chiou B.S., Avena-Bustillos R.J., Bechtel P.J., Jafri H., Narayan R., Imama S.H., Glenn G.M. y Orts W.J (2008).** Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. *European Polymer Journal*, 44, 3748-3753.
- Chiono V., Pulieri E., Vozzi G., Ciardell G., Ahluwalia A., y Giusti P. (2008).** Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 19, 889-898.
- Cho S.Y., Park J.W., y Rhee, Ch. (2002).** Properties of laminated films from whey powder and sodium caseinate mixtures and zein layers. *LWT-Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 35, 135-139.
- Cho S.Y., y Rhee C. (2002).** Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *Lebensmittel-Wissenschaft and –Technologie*, 35, 151-157.

- Cho S., y Rhee C. (2004).** Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *LWT-Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie*, 37, 833-839.
- Cooksey K., Marsh K., y Doar L. (1999).** Predicting permeability & transmission rate for multilayer materials. *Food Technology*, 53(9) 60-63.
- Crespo J., Satorre M.A., Quintana J.A., y Ania F. (1995).** Gelatin layers for holographic purposes: an X-ray diffraction study. *Journal of Materials Science*, 30, 6145-6150.
- Cuq B., Gontard N., Cuq J.L., y Guilbert S. (1997).** Select functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 622-626.
- Dai C.A., Chen Y.F., y Liu M.W. (2006).** Thermal properties measurements of renatured gelatin using conventional and temperature modulated differential scanning calorimetry. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 1795-1801.
- Dobrynin A. V., Colby R. H., y Rubinstein M. (2004).** Polyampholytes. *Journal of Polymer Science*, 42, 3513-3538.
- Eastoe J.E., y Leach A.A. (1997).** Chemical and Constitution of Gelatin. In: Ward AG and Courts A., *The Science and Technology of Gelatin* (pp.73-107): Academic Press, New York.
- Fang J.M., Fowler P., Escrig C., Gonzalez R., Costa J.A., y Chamudis L. (2005).** Development of biodegradable laminate films derived from naturally occurring carbohydrate polymers. *Carbohydrate Polymers*, 60, 39-42.
- Gennadios A., Weller C.L., y Testin R.F. (1993).** Property Modification of Edible Wheat, GlutenBased Films. *Transactions of the ASAE*, 36, 465-470.
- Gennadios A., Weller C., y Gooding Ch. (1994).** Measurement errors in water vapour permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.
- Ghanbarzadeh B., y Oromiehi A.R. (2009).** Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *Journal of Food Engineering*, 90, 517-524.
- Gómez-Guillén M.C., Turnay J., Fernández-Díaz M.D., Olmo N., Lizarbe M.A., y Montero P. (2002).** Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.

- Gómez-Estaca J., López de Lacey A., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén M.C., y Montero P. (2010).** Biodegradable gelatine-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27, 889-896.
- Greener I.K., y Fennema O.R. (1989).** Barrier properties and surface characteristics of an edible, bi-layer film. *Journal of Food Science*, 54, 1393-1399.
- Harbers L.H. (1998).** Ash Analysis. In: M.A.Gaithersburg. and S.S.Nielsen. *Food Analysis 2nd ed.*: (pp.141-165). Publishers Inc, Aspen.
- Herning T., Djabourov M., Leblond J., y Takerkart G. (1991).** Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 2. A quasi-elastic light scattering study. *Polymer*, 32(17), 3211-3217.
- Irissin-Mangata J., Bauduin G., Boutevin B., y Gontard N. (2001).** New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, 37, 1533-1541.
- Johnston-Banks F.A. (1990).** Gelatin. In P. Harris (Ed.), *Food Gels* (pp. 233–289). London: Elsevier.
- Kamper S.L., y Fennema O. (1984).** Water vapor permeability of edible film, of edible bi-layer film. *Journal of Food Science*, 49, 1478-1481.
- Kruif G.C., y Tuinier R. (2001).** Polysaccharide protein interaction. *Food Hydrocolloids*, 15, 555-563.
- Kolodziejska I., y Piotrowska B. (2007).** The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatine chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, 103(2), 295-300.
- Kolodziejska I., Piotrowska B., Bulge M., y Tylingo R. (2006).** Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatine chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 404-409.
- Langmaier F., Mokrejs P., Kolomaznik K., y Mladek M. (2008).** Plasticizing collagen hydrolysate with glycerol and low-molecular weight poly (ethylene glycols). *Termochimical Acta*, 469, 52-58.
- Ledward D. (1986).** Gelation of gelatin. In *Functional Properties of Food Macromolecules* Mitchell, J. R. y Ledward, D. A. Eds. Elsevier Applied Science, London.

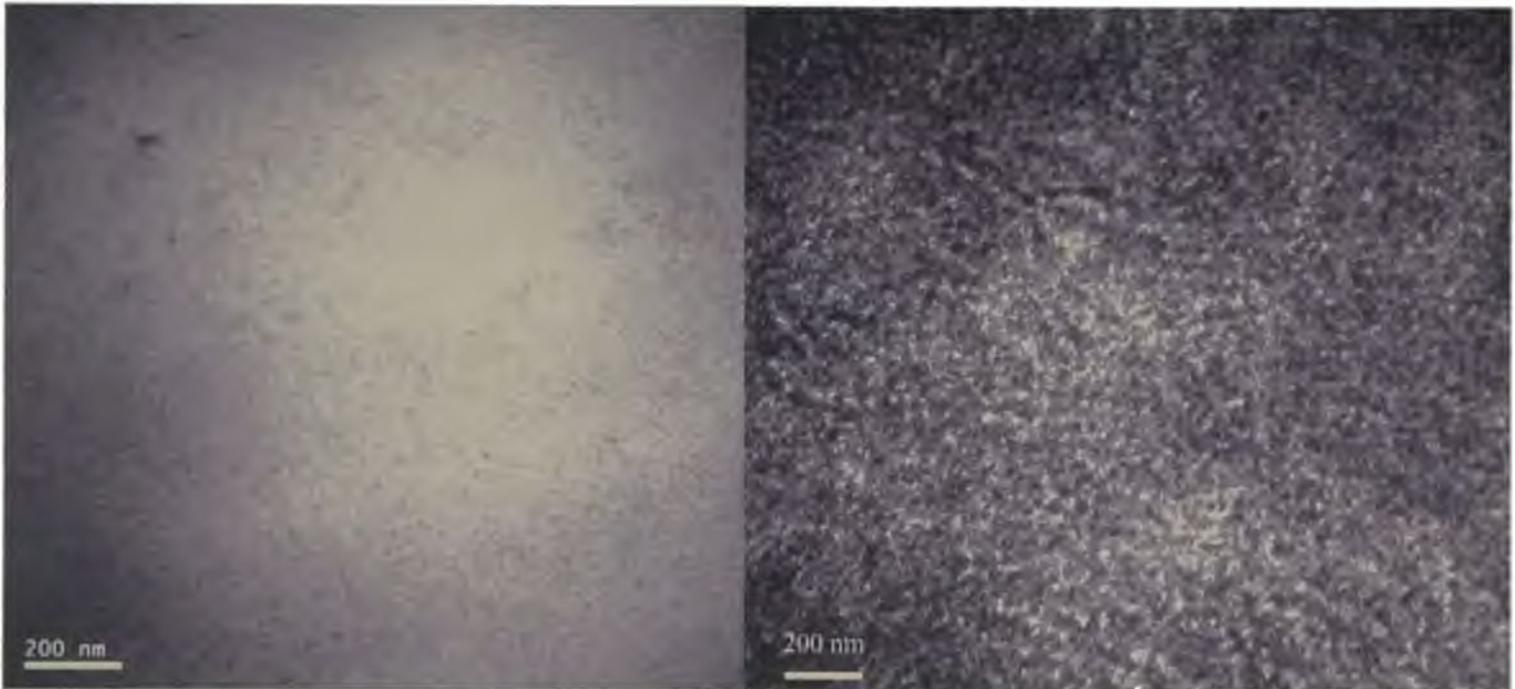
- Liu Z., Ge X., Lu Y., Dong S., Zhao Y., y Zeng M. (2012).** Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. *Food Hydrocolloids*, 26, 311-317.
- López O.V., Lecot C.J., Zaritzky N., y García M. A. (2011).** Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 254-263.
- Mali S., Grossmann M., García M., Martino M., y Zaritzky N. (2002).** Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50, 379-386.
- Martucci J.F., Ruseckaite R.A., y Vazquez A. (2006).** Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. *Materials Science and Engineering A*, (435–436), 681-686.
- McHugh T.H., Avena-Bustillos R.J., y Krochta J.M. (1993).** Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of related thickness effects. *Journal of Food Science*, 58, 899-903.
- Mendieta-Taboada O., Sobral P. J. A., Carvalho R. A., y Habitante A. M. B. Q. (2008).** Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 22, 1485-1492.
- Park J.W., Testin R., Park H., Vergano P., y Weller C. (1994).** Fatty Acid Concentration Effect on Tensile Strength, Elongation, and water vapor permeability of laminated edible films. *Journal of Food Science*, 59, 916-919.
- Park H. J., Weller C. L., Vergano P. J., Testin R. F. (1993).** Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible materials. *Journal of Food Science*, 58(6), 1361- 1364-1370.
- Park J.W., Whiteside S., y Cho S.Y. (2008).** Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. *LWT-Lebensmittel-Wissenschaft and-Technologie* 41, 692-700.
- Patil R.D., Marka J.E., Apostolovb A., Vassilevab E., y Fakirovb S. (2000).** Crystallization of water in some crosslinked gelatins. *European Polymer Journal*, 36, 1055-1061.
- Pereda M., Ponce A.G., Marcovich N.E., Ruseckaite R.A., y Martucci J.F. (2011).** Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potencial antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25, 1372-1381.

- Perez-Gago M.B., y Krochta J.M. (2001).** Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, 66, 705-710.
- Perez-Gago M.B., y Krochta J.M. (2005).** Emulsion and bi-layer edible films. In: Elsevier Ltd (Ed.), *Innovations in Food Packaging*, pp. 384-399 Chapter 22.
- Pezron I., Djabourov M., y Leblond J. (1991).** Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 1. A Light and small-angle neutron scattering study. *Polymer*, 32, 3201-3210.
- Piermaria J., Bosch A., Pinotti A., Yantorno O., Garcia M.A., y Abraham A.G. (2011).** Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1261-1266.
- Rahman M.S., Al-Saidi G.S., y Guizani, N. (2008).** Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chemistry*, 108, 472-481.
- Sionkowska A., Wisniewski M., Skopinska J., Kennedy C.J., y Wess T.J. (2004).** Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, 25, 795-801
- Smith S.A. (1986).** Polyethylene, low density. In M. Bakker (Ed.), *The Wiley encyclopedia of packaging technology* (pp. 514–523). New York: John Wiley & Sons.
- Sothornvit R., y Krochta J.M. (2001).** Plasticizer effect on mechanical properties of lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.
- Sztuka K., y Kolodziejska I. (2008).** Effect of transglutaminase and EDC on biodegradation of fish gelatin and gelatine chitosan films. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1127-1133.
- Taravel M.N., y Domard A. (1995).** Collagen and its interaction with chitosan: II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials*, 16(11), 865-871.
- Thomazine M.A., Carvalho R.A., y Sobral P.J.A. (2005).** Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. *Journal of Food Science*, 70, 72-176.
- Tromp R., Grotenhuis T.E., y Olieman C. (2002).** Self-aggregation of gelatin above the gelling temperature analyzed by SEC-MALLS. *Food Hydrocolloids*, 16, 235-239.

- Vanin F.M., Sobral P.J.A., Menegalli F.C., Carvalho R.A., y Habitante A.M.Q. (2005).** Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids*, 19, 899-907.
- Vidal R., Martínez P., Mulet E., González R., López-Mesa B., Fowler P., y Fang J.M. (2007).** Environmental assessment of biodegradable multilayer film derived from carbohydrate polymers. *Journal of Polymers and the Environment*, 15(3), 159-168.
- Ward A.G., y Courts A. (1977).** *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press, London.
- Weller C. L., Gennadios A., y Saraiva R.A. (1998).** Edible bi-layer film from zein and grain Sorghum Wax or Carnaúba Wax. *LWT-Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 31, 279-285.
- Yakimets I., Wellner N., Smith A.C., Wilson R.H., Farhat I., y Mitchell J. (2005).** Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymers*, 46, 12577-12585.
- Zhang Y., y Han J.H. (2006).** Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71, 253-261.



CAPITULO 4



4.1 INTRODUCCIÓN

Las matrices poliméricas pueden ser modificadas mediante reacciones de entrecruzamiento químicas, físicas o enzimáticas (Bigi y col., 2001; Grosso y Chambi, 2006; Sabato y col., 2000). El entrecruzamiento constituye un paso importante en la preparación de películas de hidrocoloides debido a que proporciona a la matriz una mayor estabilidad y resistencia mecánica (Mathew y Abraham, 2008), permitiendo obtener un retículo estable con capacidad de hinchamiento y buenas propiedades mecánicas. Debido a esto, estas matrices modificadas se utilizan en dos grandes campos, para liberación de agentes activos y como soporte para crecimiento de células (Sánchez y col., 2007).

El entrecruzamiento químico de la matriz puede tener lugar a través de dos tipos de reacciones: base de Schiff o mediante la formación de aductos tipo Michael (Ravi Kumar y col., 2004). Entre los agentes entrecruzantes más empleados se encuentran los dialdehídos como el glioxal y glutaraldehído. La reacción se da entre el grupo aldehído que forma un enlace imina covalente con los grupos amino primarios del quitosano, debido a la resonancia establecida con enlaces dobles adyacentes vía reacción de Schiff (Sánchez y col., 2007). Sin embargo, las características que limitan su utilización son su toxicidad y su naturaleza sintética (Bigi y col., 2001; Beppu y col., 2001; Sung y col., 1999).

Por otro lado, la transglutaminasa ha sido empleada en reacciones enzimáticas en matrices de gelatina, aunque su elevado costo restringe su utilización (Carvalho y Grosso, 2004). Por consiguiente, en los últimos años las investigaciones están siendo dirigidas hacia la búsqueda de alternativas naturales.

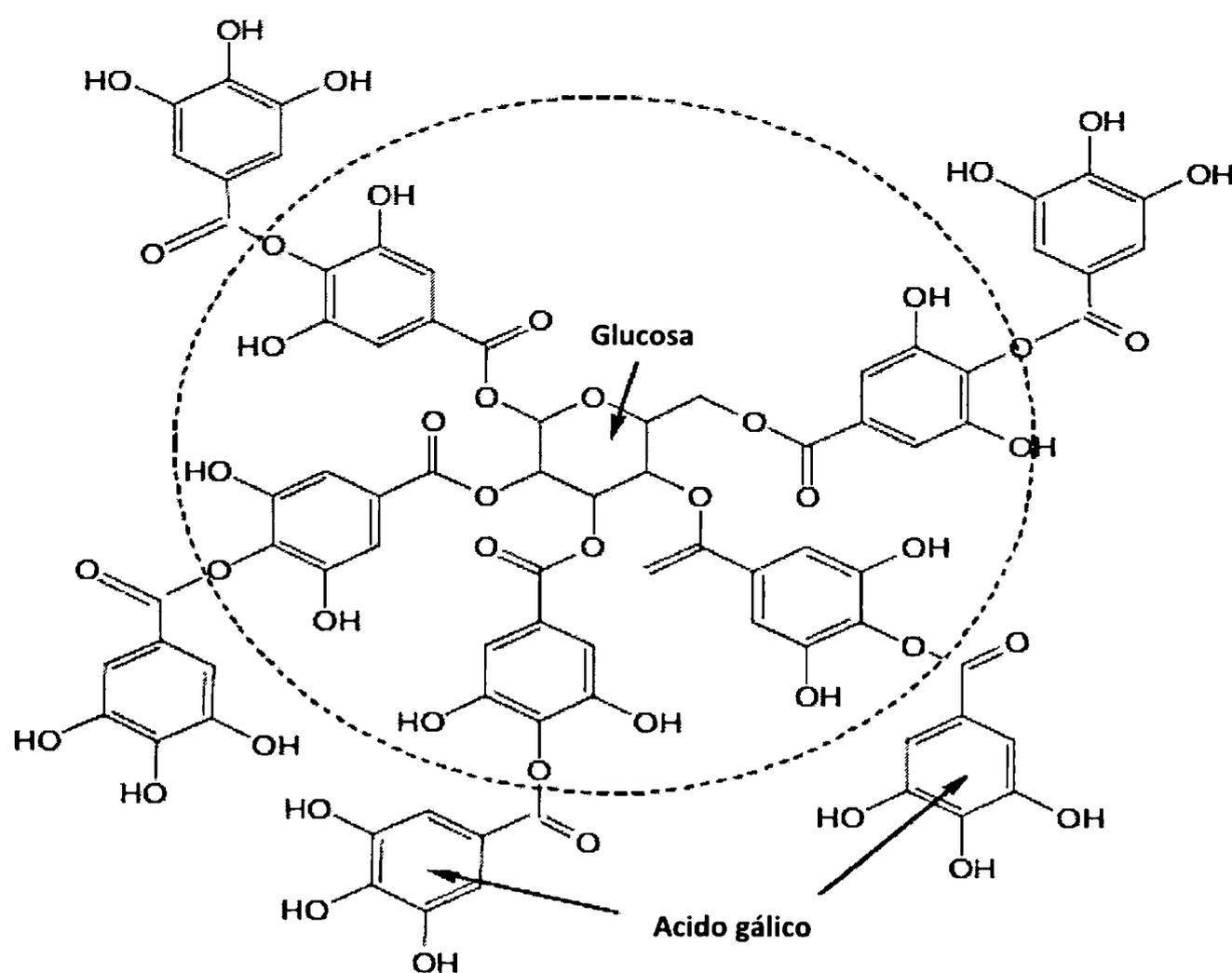
La genipina es un compuesto de origen natural utilizado como agente entrecruzante que se obtiene a partir del genipósido procedente del fruto de *Genipa americana* y *Gardenia jasminoides* (Butler y col., 2003). Una propiedad destacable de la genipina es su capacidad de reaccionar espontáneamente con aminas primarias, dando lugar a pigmentos azules. Se ha descrito su reacción con materiales que contienen grupos amino, como el quitosano y algunos péptidos y proteínas (Bigi y col., 2002). Otros compuestos naturales que pueden ser utilizados con el mismo fin son los ácidos hidroxicinámicos que son componentes bioactivos que se encuentran presentes formando parte de la estructura de la pared celular de las plantas (Rice-Evans y col., 1996). Asimismo, algunos trabajos han informado la capacidad

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

entrecruzante del ácido cítrico en matrices de almidón así como en películas a base de quitosano (Reddy y Yang, 2010; Shu y col., 2001). Por otro lado, Cao y col. (2007) evaluaron la acción del ácido ferúlico y tánico sobre matrices de gelatina, mientras que Kim y col. (2005) estudiaron el efecto producido por el agregado de proantocianidinas en películas compuestas de quitosano y gelatina.

El ácido tánico, una mezcla de ésteres de D-glucosa y ácido gálico, es reconocido por su capacidad antioxidante debido a su múltiples grupos fenólicos los cuales pueden interactuar con diferentes macromoléculas biológicas (Aelenei y col., 2009).

El ácido tánico se compone de una molécula de glucosa central que presenta sus grupos hidroxilo esterificados con uno o más residuos de ácido gálico como puede observarse en la Figura 4.1.



Acido Tánico

Figura 4.1 Estructura química del ácido tánico, una deca-galoilglucosa que consiste en una molécula central de glucosa esterificada en los cinco grupos hidroxilo con dos moléculas de ácido gálico. El círculo destaca la pentagaloilglucosa y la estructura central del ácido tánico.

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

Isenburg y col. (2006) señalaron que dada la naturaleza polifenólica del ácido tánico, éste posee características que lo hacen relativamente hidrofóbico en la región central, la cual está rodeada por grupos con un carácter netamente hidrófilico (Figura 4.1). Esta particularidad es la responsable de su capacidad antioxidante.

Por su estructura el ácido tánico es capaz de formar múltiples enlaces de hidrógeno con diferentes macromoléculas. Ghica y col. (2009) estudiaron su capacidad entrecruzante en matrices de colágeno con el objetivo de utilizarlas como soportes para liberación controlada. Por otra parte, Pyla y col. (2010) lo incorporaron a matrices de almidón con el fin de liberarlo debido a sus propiedades activas como agente antimicrobiano y antioxidante, y atribuyeron la disminución en la velocidad liberación del compuesto activo al grado de interacción establecido con las cadenas poliméricas.

Puede interactuar fuertemente con proteínas y polisacáridos formando complejos insolubles (Chung y col., 1998), siendo por estas características utilizado en la elaboración del vino. Asimismo, se emplea en el proceso de curtido del cuero, y como componente de adhesivos reemplazando al fenol-formaldehído. Otras aplicaciones emergentes son las asociadas a su capacidad antioxidante, sus propiedades astringentes, así como su capacidad para aumentar la intensidad del color. Este compuesto activo también es reconocido por sus propiedades fisiológicas (antialérgico, antiinflamatorio, antimicrobiano, cardioprotector y antitrombótico) (Balasaundram y col., 2006). Todas estas funcionalidades convierten a este compuesto activo en una alternativa interesante para el desarrollo de nuevos materiales poliméricos.

Los trabajos en la bibliografía consultada referentes al empleo de este compuesto activo en matrices de quitosano son escasos. Entre ellos, Aelenei y col. (2009) y Popa y col. (2000) estudiaron las interacciones entre el quitosano y el ácido tánico. En este sentido, la propuesta para este Capítulo es aprovechar la reactividad química que caracteriza al quitosano, relacionada con los grupos aminos primarios distribuidos regularmente en la cadena polimérica, y las reacciones que los involucran a fin de modificar las propiedades y aplicaciones de los materiales desarrollados. En este contexto se propone estudiar la funcionalidad del ácido tánico como agente entrecruzante para mejorar las propiedades de las películas de quitosano.

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

Los objetivos propuestos para este Capítulo fueron:

- ❖ Estudiar la capacidad entrecruzante del ácido tánico en películas de quitosano con y sin plastificante.
- ❖ Evaluar la modificación microestructural producida por la incorporación del ácido tánico en la matriz de quitosano.
- ❖ Estudiar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera de las películas desarrolladas.
- ❖ Analizar los cambios producidos en las propiedades mencionadas luego del almacenamiento.

4.2 MATERIALES

Para la formulación de las películas se utilizó quitosano comercial SIGMA (EEUU) con un grado de desacetilación del 85%.

Glicerol (P) y ácido tánico (AT), ambos de grado analítico proporcionados por Anedra (Buenos Aires, Argentina), se emplearon como agente plastificante y entrecruzante, respectivamente.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparación de la solución formadora de película

Las soluciones filmogénicas de quitosano se prepararon de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo 2.

Se ensayaron diferentes concentraciones del agente entrecruzante (20, 40, 60 y 80 mg AT/g quitosano) las que se incorporaron a las soluciones filmogénicas de quitosano bajo agitación durante una hora aproximadamente; luego se procedió al moldeo como se describió en el Capítulo 2.

Una vez seleccionada la concentración óptima de AT a ser incorporada en la matriz de quitosano, se prepararon películas sin plastificar y plastificadas con glicerol con una concentración de 0,5% (p/p). Asimismo, se estudiaron las propiedades reológicas de las soluciones filmogénicas preparadas.

*Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento***4.3.2 Caracterización del ácido tánico utilizado**

La determinación del pKa del ácido tánico se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Erel-Unal y Sukhishvili (2008), con algunas modificaciones. Las soluciones de AT se prepararon con una concentración de $1,2 \text{ mg ml}^{-1}$, y los valores de pH se ajustaron en el rango de 2 a 12 mediante el agregado de HCl o NaOH. Para efectuar la medida se utilizó un pHmetro HACH sensION™ (EEUU). Se registraron los espectros de absorción de UV-Visible de las soluciones utilizando un espectrofotómetro Hitachi U 1900 (Japón), empleando cubetas de cuarzo y usando agua como referencia. A partir de los espectros obtenidos para cada solución se determinó la relación de absorbancias A_{320}/A_{280} , la que se graficó en función del pH de la solución; de la gráfica se obtuvo el pKa como el punto de inflexión de la curva.

4.3.3 Preparación de las películas

Luego del moldeo de las soluciones filmogénicas, las muestras se secaron en estufa a 37°C como se detalló en el Capítulo 2. Las películas se almacenaron durante 48 hs, previo a las determinaciones de las propiedades mecánicas, físicoquímicas y estructurales. A las medidas realizadas en estas condiciones se las denominó a tiempo *inicial*. Luego las películas se almacenaron durante 30 días (denominado tiempo *final*) bajo condiciones controladas de temperatura, 20°C y humedad relativa (HR) del 65%, para evaluar el efecto del tiempo sobre las propiedades estudiadas.

La nomenclatura utilizada para designar a las películas fue: Q para las películas de quitosano; QP para las de quitosano plastificadas; QAT para las películas de quitosano con ácido tánico y QPAT para las muestras con ácido tánico y glicerol. Además se indicó con la letra I a las muestras analizadas a tiempo *inicial* y F para aquellas estudiadas luego del almacenamiento.

4.3.4 Caracterización físicoquímica de las películas**4.3.4.1 Solubilidad de las películas en agua**

Para los ensayos de solubilidad se cortaron muestras de $2 \times 2 \text{ cm}^2$ de cada película, se pesaron con precisión de 0,0001 y se colocaron en vasos de precipitado con 80 ml de agua destilada; similar protocolo fue utilizado por García y col. (2004). Las muestras se

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

mantuvieron bajo agitación constante durante 1 hora a 20 y 100°C. Las piezas remanentes de las películas se secaron en una estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta peso constante. El porcentaje de solubilidad de las muestras se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{(\text{Peso seco inicial} - \text{Peso seco final})}{\text{Peso seco inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. 4.1}$$

Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.3.4.2 Contenido de humedad de las películas

El contenido de humedad de las películas se determinó de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo 2.

4.3.4.3 Color

Los parámetros de color de las películas se obtuvieron como se describió previamente en el Capítulo 3.

4.3.5 Propiedades de barrera

La PVA se determinó de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo 2. Asimismo también se evaluó la permeabilidad al O_2 de las películas.

Los valores de permeabilidad al oxígeno de las películas de Q con y sin agregado de AT en la concentración seleccionada se determinaron utilizando un medidor de permeabilidad al oxígeno Oxtran-2/20 (MOCON, Modern Controls, EEUU), siguiendo el procedimiento descrito en la norma ASTM F1927-07. Los experimentos se realizaron a 23°C y a 73% de HR. El área efectiva de permeación de la pieza de prueba fue 50 cm^2 . La muestra se colocó en la celda de permeabilidad (Figura 2.2) y se purgó con N_2 para eliminar las trazas de oxígeno de la celda y del material. Luego, se introdujo O_2 en uno de los compartimentos de la celda a presión atmosférica; el O_2 que permea a través de la película es arrastrado y medido en un sensor coulométrico.

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

La permeabilidad al O₂ se calculó dividiendo la velocidad de transmisión de este gas por la diferencia de presión parcial de oxígeno a través la película (1 atm) y multiplicando por el espesor de la misma. Se expresó en $\text{cm}^3 \text{ m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$.



Figura 4.2 Fotografía del equipo utilizado para determinar la permeabilidad al oxígeno de las películas.

4.2.6 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se **determinaron** mediante un texturómetro como se describió en el Capítulo 3. De las curvas de fuerza (N) en función de la deformación a la ruptura (mm), se pudieron calcular el esfuerzo de tensión (N mm^{-2}) y el porcentaje de elongación.

Para evaluar si el entrecruzamiento de la matriz podía desarrollarse en una dirección preferencial se usaron placas rectangulares de $10 \times 20 \text{ cm}^2$, en las que se moldearon las soluciones de quitosano con AT y se procedió a su secado en estufa a 37°C . El análisis de las propiedades mecánicas de las muestras se llevó a cabo con muestras cortadas en dirección longitudinal y transversal (Figura 4.3).

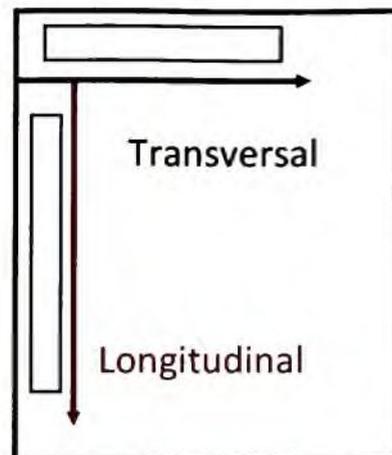
Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

Figura 4.3 Esquema representativo de la dirección de corte de las probetas empleadas para evaluar las propiedades mecánicas.

4.3.7 Estudio de las propiedades microestructurales y espectroscópicas

4.3.7.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio de transmisión electrónica funciona esencialmente como un SEM, pero la señal que utiliza para formar la imagen es la que proviene de los electrones transmitidos a través de la muestra, siendo ésta una técnica capaz de producir imágenes directas de la estructura de secciones muy delgadas del material.

Para la preparación de la muestras se siguió la metodología descrita por Denavi y col. (2009). Pequeñas piezas provenientes del centro de las películas fueron fijadas en gluteraldehído al 2% (v/v) y luego en OsO₄ al 2% (p/v). A continuación las muestras se deshidrataron durante 15 min en una serie de soluciones de etanol de concentración creciente (30, 50, 70 y 90% v/v), tres veces durante 15 min en etanol a 99,5% (v/v), y dos veces durante 20 min en óxido de propileno. Las muestras se impregnaron con distintas concentraciones de óxido de propileno: resina (2:1, 1:1 y 1:2) durante 1 hora y en resina pura. La polimerización de la resina tuvo lugar a 60°C durante 48 hs. Las muestras fueron seccionadas en cortes ultrafinos de 70 nm aproximadamente utilizando una cuchilla de diamante. Las secciones fueron transferidas a un soporte de rejillas de oro y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Posteriormente las muestras se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1200EX II Jeol, Japón) equipado con una cámara digital (ES500W Erlangshen CCD Gatan) (Figura 4.4).

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

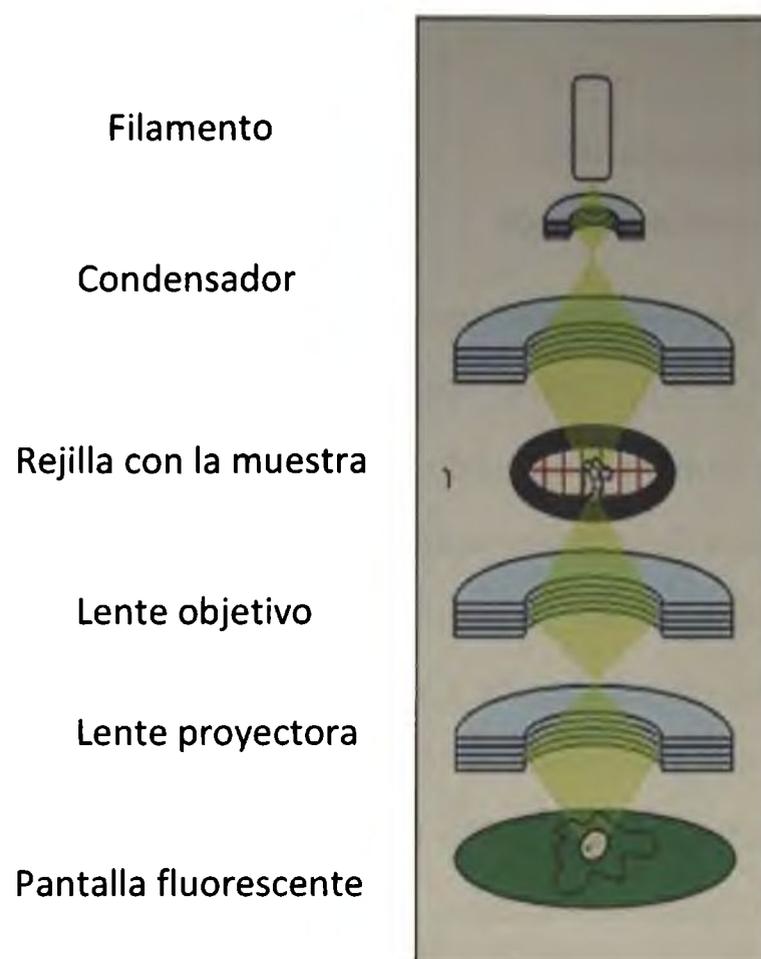


Figura 4.4 Esquema representativo de un microscopio electrónico de transmisión

4.3.7.2 Espectroscopía de difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de las películas de quitosano con y sin agregado de ácido tánico ensayadas tanto a tiempo *inicial* como *final*, se obtuvieron como se describió en el Capítulo 1.

4.3.7.3 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Para el análisis estructural de las muestras desarrolladas, se siguió el protocolo descrito en el Capítulo 2. Para la identificación espectral del ácido tánico puro, muestras en polvo se procesaron como se describió previamente en el Capítulo 1.

4.3.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de resultados se utilizó el software Systat® (Versión 10.0). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y de comparación de medias mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de significación $p=0,05$.

También se empleó el programa estadístico para el cálculo de regresiones lineales y no lineales.

4.4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.4.1 Caracterización del ácido tánico utilizado

Las propiedades de los taninos pueden variar en función de la fuente a partir de la cual son extraídos (Shutava y col., 2005). Por este motivo, su caracterización es imprescindible para explicar los cambios producidos por su incorporación a la matriz de Q. El AT es un ácido orgánico débil cuya disociación depende fuertemente del pH del medio.

La Figura 4.5 muestra el espectro de absorción UV-Visible de la solución de ácido tánico, el cual exhibe a pH ácido, en el rango de 1 y 4, dos picos localizados a 210 y 280 nm. A mayores valores de pH, donde predomina la forma disociada, el espectro presentó los picos de absorbancia característicos a 230 y 320 nm. Tanto Erel-Unal y Sukhishvili (2008) como Shutava y Lvov (2006) atribuyeron los picos de 230 y 320 nm, en los espectros de la solución de AT, a la forma disociada de la molécula, correspondiente a la ionización de los grupos hidroxilo fenólicos que esterifican las unidades galoil del AT.

En el inserto de la Figura 4.5 se muestra la relación entre la absorbancia obtenida a 320 y 280 nm. La relación A_{320}/A_{280} varió con el pH, ya que presentó un notable aumento en el intervalo comprendido entre 7,5 y 11. Se obtuvo un valor de pKa del ácido tánico de 9,1 estimado a partir del punto de inflexión de la curva. Este valor concuerda con los reportados por Erel-Unal y Sukhishvili (2008). Cada molécula de ácido tánico (pentagaloilglucosa) posee 15 grupos oxhidrilos unidos a cinco anillos fenólicos, y por lo tanto, su pKa es menor que el de los monofenoles.

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

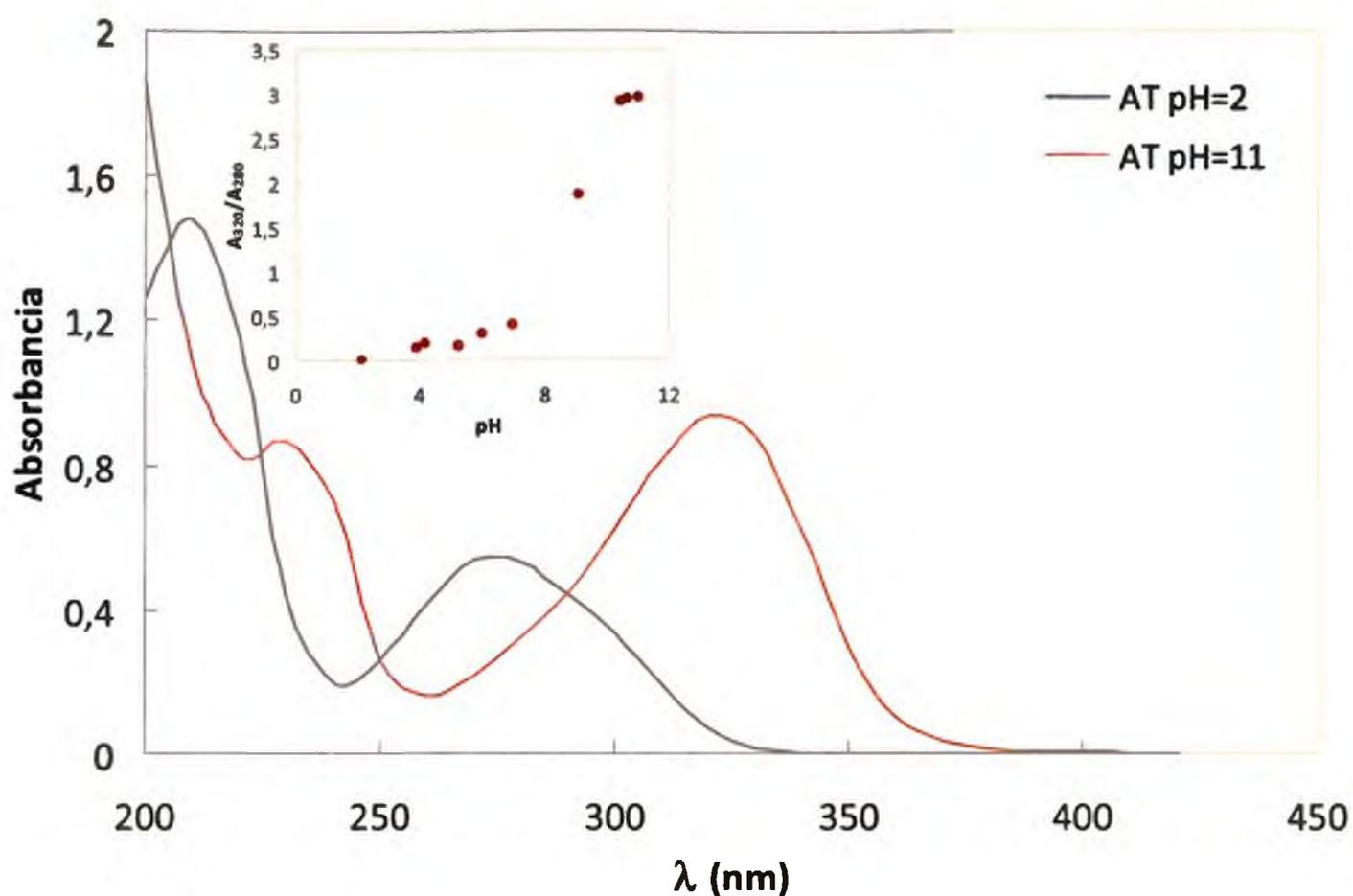


Figura 4.5 Espectro UV-Visible de absorción de soluciones de AT a pH=2 y 11. En el inserto se muestra la relación de absorbancias de la forma disociada (320 nm) y de la forma sin disociar (270 nm) del ácido tánico en función del pH.

4.4.2 Selección de la concentración de ácido tánico

El agregado de 40 mg AT/g Q aumentó ligeramente la viscosidad a las soluciones filmogénicas, presentando un valor de 210,46 mPa s mientras que para las soluciones de Q resultó ser de 196,76 mPa s. No se observó un efecto significativo de la concentración de AT sobre el comportamiento reológico de las soluciones filmogénicas ($p > 0,05$).

La Tabla 4.1 muestra el efecto del AT en las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de las películas de Q. El agregado de 20 y 40 mg AT/g Q permitió lograr películas con propiedades mecánicas que presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del resto de las concentraciones ensayadas (Tabla 4.1). En cambio los valores de la permeabilidad al vapor de agua de las muestras con 40 mg AT/g Q fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) que los obtenidos con 20 mg AT/g Q. Por este motivo, se seleccionó la concentración de 40 mg AT/g Q para los análisis posteriores.

*Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento***Tabla 4.1** Efecto de distintas concentraciones de ácido tánico sobre las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de matrices de quitosano*

Concentración de ácido tánico (mg AT/ g Q)	Permeabilidad al vapor de agua $\times 10^{11}$ ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)	Esfuerzo (MPa)
0	10,14 (0,39) ^a	73,83 (5,37) ^a
20	8,95 (0,02) ^b	92,13 (4,70) ^b
40	8,35 (0,73) ^c	95,03 (4,20) ^b
60	9,44 (0,28) ^a	73,02 (1,27) ^a
80	9,18 (0,42) ^a	75,04 (1,73) ^a

* Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

El efecto del agregado de AT sobre la morfología de las películas de Q se estudió por microscopía electrónica de transmisión, TEM. La Figura 4.6 muestra que las películas de quitosano se caracterizaron por ser homogéneas; las mismas mostraron buena integridad estructural mientras que las películas QAT con una concentración de 40 mg AT/g Q presentaron una superficie más irregular, pero compacta, permitiendo la observación de una estructura particulada sin separación de fases. Las irregularidades que presentaron las películas QAT probarían la existencia de puntos de entrecruzamiento o de refuerzo de la matriz de quitosano. Este tipo de estructura podría explicar las mejores propiedades mecánicas del material, asociadas a altos valores de esfuerzo respecto de las películas de Q (Tabla 4.1), así como también los valores más bajo de permeabilidad al vapor de agua.

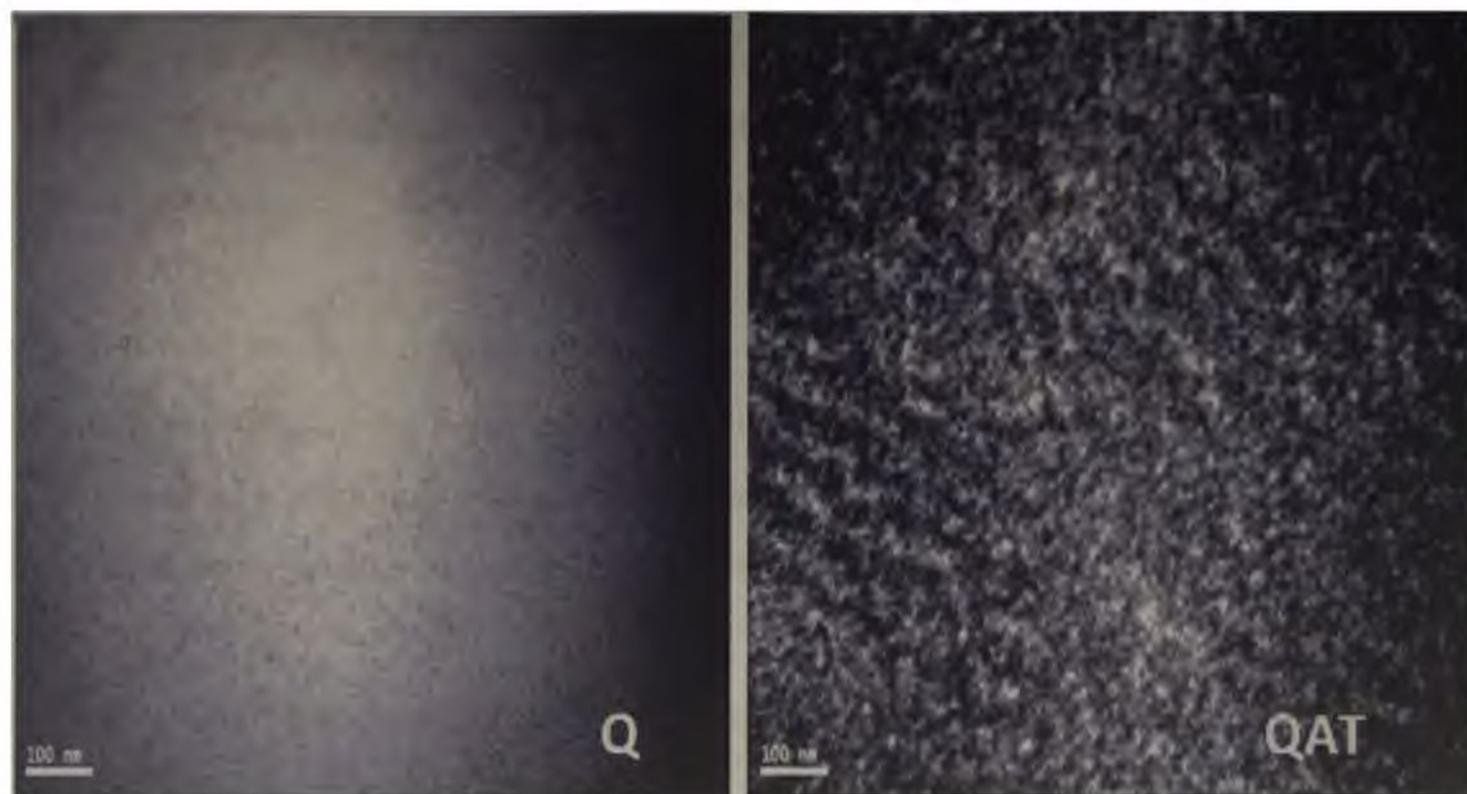
Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

Figura 4.6 Micrografías obtenidas por TEM de películas de quitosano (Q) y de películas entrecruzadas con ácido tánico (QAT).

4.4.3 Estudio de la interacción ácido tánico-quitosano

El AT es un tanino hidrolizable de origen natural, en su mayoría extraído de plantas y microorganismos, y por lo tanto totalmente biodegradable. Como ya se mencionó es reconocido por su actividad biológica, por sus propiedades como anti-mutagénico, anticancerígeno, antimicrobiano, antioxidante, motivo por el cual ha sido objeto de múltiples estudios, especialmente en el campo biomédico (Costa y col., 2011). Varios trabajos científicos han estudiado la asociación del AT con biopolímeros como el colágeno, la gelatina, albúmina y algunos polisacáridos a través de interacciones no covalentes (Baxter y col., 1997; Costa y col., 2011; Haslam, 1996) Los polifenoles como el ácido tánico pueden interactuar con macromoléculas mediante uniones puente de hidrógeno, como donador o aceptor de H^+ (Erel-Unal y Sukhishvili, 2008) y mediante interacciones hidrofóbicas a través de los anillos fenólicos que esterifican a las unidades galoil. También se han reportado interacciones iónicas con aminoácidos cargados positivamente y con otros polielectrolitos (Costa y col., 2011; Shutava y col., 2005).

Como una primera aproximación a la comprensión de las interacciones establecidas entre el Q y el AT, se determinó que el pH de la solución filmogénica fue 4, y bajo estas

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

condiciones el AT permaneció predominantemente en su forma no disociada. Por lo tanto, las interacciones favorecidas entre el quitosano y el ácido tánico fueron tipo puente de hidrógeno. Erel-Unal y Sukhishvili (2008) señalaron que la elevada estabilidad y rigidez de la molécula de AT podría facilitar la interacción con moléculas con grupos cargados positivamente como el quitosano

Las investigaciones realizadas por An y Dultz (2007) relacionadas con la absorción de AT, en matrices de quitosano y montmorillonita indicaron que a pH 4 se obtuvo la máxima capacidad de absorción ya que a mayores valores de pH, si bien aumentaba la ionización del ácido, el quitosano poseía menor capacidad de interacción debido a la desprotonación de los grupos amino de su estructura.

Las interacciones específicas inter o intramoleculares juegan un papel muy importante en el comportamiento y propiedades de los polímeros, influyendo principalmente en las propiedades fisicoquímicas y de barrera, así como en el comportamiento mecánico y térmico, de los materiales. Las técnicas más empleadas en la caracterización y estudio de las interacciones puente de hidrógeno en polímeros son las basadas en procedimientos espectroscópicos. Como ya se desarrolló, una de las técnicas espectrales más ampliamente utilizada, particularmente en mezclas de polímeros, es la espectroscopia infrarroja. Diversos modos espectrales correspondientes a grupos típicamente donadores o aceptores de protones se ven notablemente afectados, tanto en su intensidad como en su posición, cuando forman parte de un enlace de hidrógeno. Frecuentemente, los grupos funcionales implicados en los enlaces de hidrógeno son distintos para cada polímero.

En el presente trabajo se abordará el estudio de la interacción entre los polifenoles y el quitosano, ya que debido a su complejidad aún no se han dilucidado con claridad. En primer lugar se realizará una caracterización espectral del ácido tánico en polvo. En la Figura 4.7 se observa el espectro de FTIR del polvo de AT, mientras que en la Tabla 4.2 se muestran las asignaciones de los picos característicos.

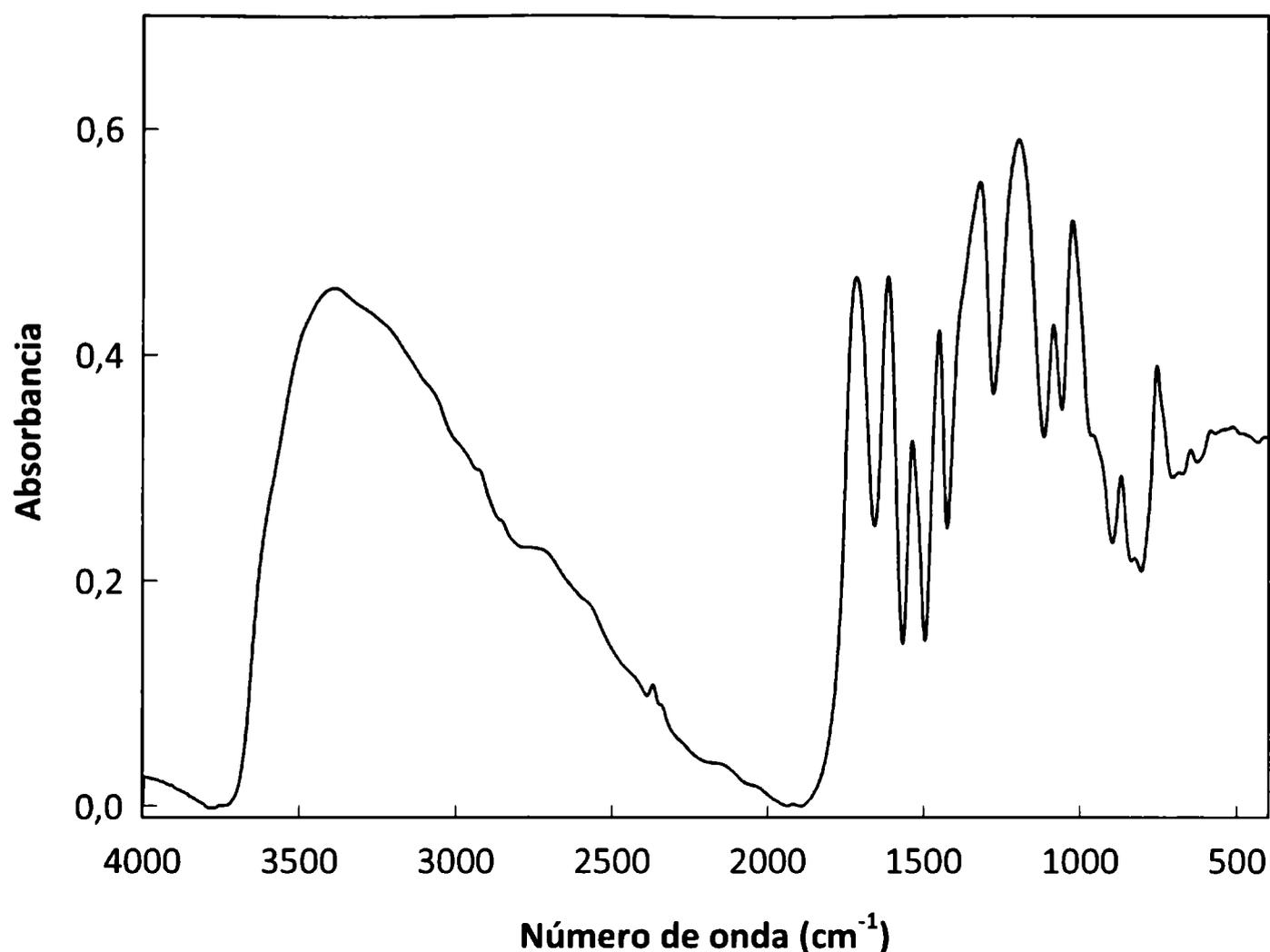


Figura 4.7 Espectro de FTIR de una muestra de ácido tánico en polvo

Una vez establecidas las bandas características del AT, se analizaron los espectros de películas de quitosano formuladas con distintas concentraciones del agente entrecruzante. La Figura 4.8 muestra los cambios observados en las diferentes regiones espectrales. Como la identificación de la posición exacta de los picos en los espectro IR de las muestras biológicas a veces es difícil, se recurre a herramientas matemáticas como la deconvolución o la derivación que permiten mejorar la resolución espectral. Con el fin de intensificar y hacer más evidente la interacción que ocurre en la matriz de quitosano con el agregado de AT se ensayaron agregados de distintas concentraciones del ácido en el rango de 40 a 500 mg AT/g Q.

*Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento***Tabla 4.2** Asignación de las principales bandas del espectro de infrarrojo obtenida del ácido tánico en polvo, de acuerdo con Costa y col. (2011)

Número de ondas (cm ⁻¹)	Asignación de bandas
Presenta una banda amplia en el rango de 2800-3600	Banda atribuida al modo de estiramiento del O-H y de los hidrógenos unidos a los grupos oxhidrilo
3050	Bandas atribuidas al modo de estiramiento de C-H y C-C, respectivamente
2800	
1720	Banda asignada al grupo éster
1609	Bandas asociadas al modo de estiramiento C-C de los anillos aromáticos con una posible contribución del modo de vibración del H-unido al C=O
1535	
1448	
1201	Bandas asociadas a los modos de estiramiento del C-O
1089	
1027	
948	

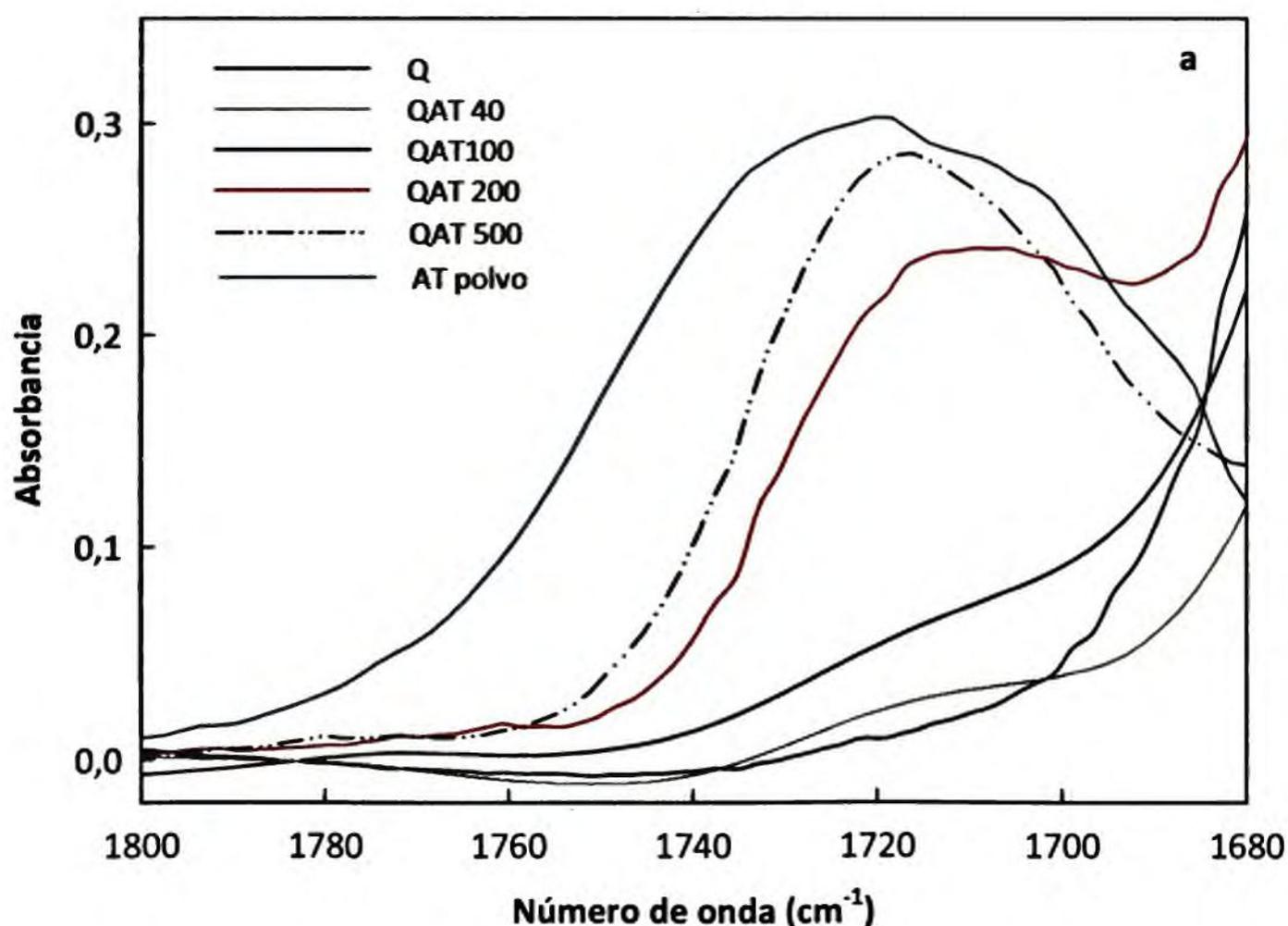
Aquí vale la pena hacer una digresión sobre el uso de la concentración de altas concentraciones de AT (100, 200 y 500 mg/g Q), ya que se hizo con el único fin de intensificar el efecto del agente y resaltar los picos que con bajas concentraciones eran apenas perceptibles.

La Figura 4.8a muestra la ventana espectral comprendida entre 1800-1680 cm⁻¹; en esta región se evidencian los cambios causados por el agregado de ácido tánico en la matriz de Q. En el espectro de FTIR de la pastilla del polvo de AT la banda a 1720 cm⁻¹ corresponde a la vibración del estiramiento del C=O de los grupos éster de acuerdo con las asignaciones realizadas por Costa y col. (2011). En el caso de los espectros de las películas de quitosano formuladas con concentraciones crecientes de AT (QAT), el hombro a 1716 cm⁻¹ se convirtió

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

en un pico bien definido, mostrando un ligero corrimiento hacia el rojo (Figura 4.8a). La aparición de esta banda evidencia la interacción entre el Q y el AT. Resultados similares fueron encontrados por Yen y col. (2008) trabajando con mezclas compuestas por PCL y ácido tánico. Devi y Maji (2009) señalaron que el ácido tánico es capaz de formar complejos con el quitosano a través de uniones puentes de hidrógeno y de asociación hidrofóbica.

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 4.7b el pico localizado a 759 cm^{-1} característico de los anillos de benceno es apenas perceptible, probablemente debido a las bajas concentraciones de AT utilizadas (40 mg/g). Sin embargo, a mayores concentraciones este pico se acentuó, haciendo evidente que el ácido tánico se inmovilizó en la matriz de Q (Li y col., 2010). La Figura 4.7c muestra que con el agregado de 500 mg AT/g Q, la banda localizada a 1650 cm^{-1} , debida a la presencia del quitosano desaparece, (vibración del estiramiento del C=O en el grupo amida, amida I) y aparece un nuevo pico a 1608 cm^{-1} . Este hecho es coherente con la existencia de la banda en 1618 cm^{-1} del espectro de AT puro, asignado al modo de estiramiento C-C de los anillos aromáticos, con la posible contribución de los modos de vibración del H unido a los C=O de los grupos carbonilo.



Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

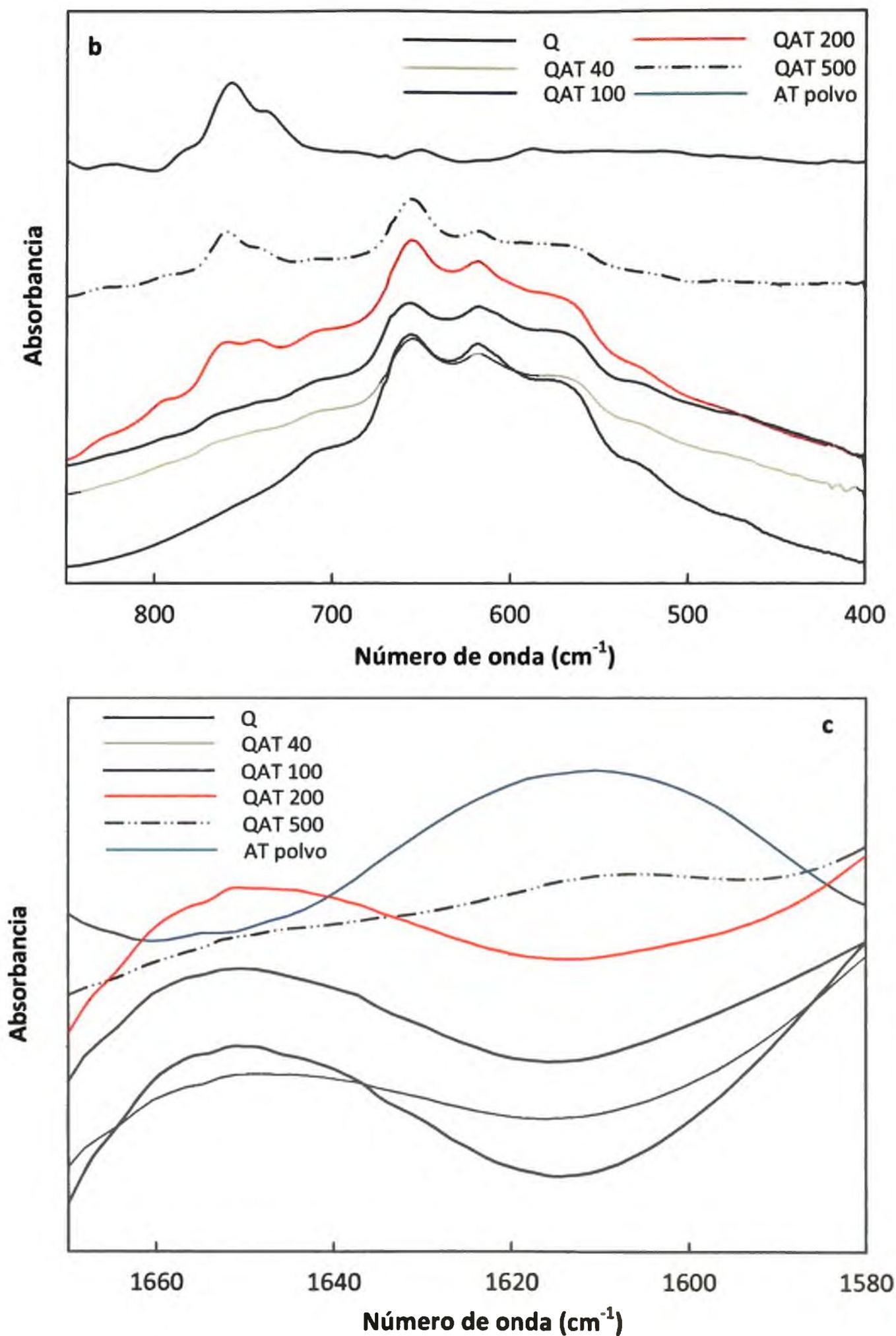


Figura 4.8 Espectros de FTIR de películas de quitosano con diferentes concentraciones de AT en la región de número de onda: (a) 1800 a 1680 cm^{-1} , (b) 850 a 400 cm^{-1} y (c) de 1670 a 1580 cm^{-1} .

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

4.4.4 Propiedades fisicoquímicas y de barrera de las películas

Las propiedades visuales de las películas condicionan la aceptabilidad global del consumidor respecto de los productos envasados. Las películas de polisacáridos son típicamente incoloras, aunque las de Q presentaron una coloración ligeramente amarillenta. En el caso de las películas plastificadas de Q exhibieron un color amarillo más intenso evidenciado por el aumento del parámetro de cromaticidad b^* y los valores de ΔE . Estos valores podrían estar asociados a reacciones de oxidación que se producen durante el almacenamiento de las películas (Tabla 4.3). Esta tendencia fue más marcada para películas de QAT. Trezza y Krochta (2000) encontraron resultados similares trabajando con películas a base de proteínas del suero lácteo, y observaron además que el color de las muestras se intensificó con el tiempo de almacenamiento.

Tabla 4.3 Efecto del agregado de ácido tánico y glicerol en las propiedades fisicoquímicas de las películas de quitosano*

Composición de las películas	Permeabilidad al vapor de agua $\times 10^{11}$ ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)		Color de las películas	
			Diferencias de color (ΔE)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Q	10,14 (0,39) ^a	7,68 (0,48) ^a	3,01 (0,42) ^a	3,12 (0,19) ^a
QP	11,30 (1,42) ^a	9,92 (0,28) ^b	3,35 (0,21) ^a	4,15 (0,28) ^a
QAT	8,34 (0,73) ^b	5,79 (0,36) ^c	5,69 (0,35) ^b	11,62 (0,90) ^b
QPAT	8,72 (0,51) ^b	6,26 (0,42) ^c	5,93 (0,56) ^b	17,24 (0,57) ^c

* Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

La Tabla 4.3 muestra que las diferencias de color de las películas de Q no variaron significativamente ($p > 0,05$) durante el almacenamiento. Con el agregado de AT y de plastificante se obtuvieron mayores cambios ($p < 0,05$), ya que ambos agentes imparten color

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

debido a su tendencia a oxidarse, produciendo películas amarronadas, con una coloración más acentuada en el caso de las películas con agregado de AT.

Tabla 4.4 Efecto del agregado de ácido tánico y glicerol como agente plastificante en el contenido de humedad de las películas *

Composición de las películas	Contenido de humedad (g agua/ 100 g películas)	
	Inicial	Final
Q	18,12 (0,99) ^a	9,73 (0,76) ^a
QP	31,44 (1,03) ^b	21,24 (1,16) ^b
QAT	17,48 (0,79) ^a	11,15 (0,72) ^a
QPAT	34,54 (1,38) ^b	19,04 (0,85) ^b

* Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

En las Tablas 4.3 y 4.4 se puede observar que el agregado de plastificante (0,5%) aumentó el contenido de humedad y la PVA de las películas de Q a tiempo *final* en un 118,3 y un 29,2%, respectivamente, debido a su carácter hidrofílico. Por otro lado, el agregado de AT no afectó la humedad del material. Para todas las formulaciones ensayadas, la humedad disminuyó luego del almacenamiento de las películas.

Sin embargo, la incorporación de ácido tánico causó una disminución significativa en la permeabilidad ($p < 0,05$) a un valor de $8,34 \cdot 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ (Tabla 4.3). Después del almacenamiento esta tendencia fue más pronunciada, haciendo evidente una reorganización de la matriz polimérica. De acuerdo con Ou y col. (2005) las reacciones de reticulación o de entrecruzamiento de la matriz restringen el movimiento de las moléculas permitiendo la formación de una estructura más compacta explicando la disminución en los valores de permeabilidad al vapor de agua. Los resultados de PVA obtenidos para las películas QPAT a tiempos *inicial* y *final* revelaron que el agregado de ácido tánico tuvo una mayor influencia que la adición de plastificante en la matriz, ya que a pesar de los efectos contrapuestos la

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

presencia del entrecruzante logró una disminución de la PVA respecto de las muestras control.

La solubilidad en agua es un factor importante para seleccionar las posibles aplicaciones de las películas a base de biopolímeros. Las películas de Q presentaron los valores más bajos de solubilidad en agua en relación con otras películas formuladas a base de hidrocoloides tales como los derivados de la celulosa (Pinotti y col., 2007) y almidón (Flores y col., 2007; García y col., 2009). La adición de AT disminuyó la solubilidad a 20°C de las películas, mientras que la incorporación de glicerol a las películas formuladas sólo con quitosano o con mezclas de quitosano y ácido tánico (QP y QPAT) aumentó la solubilidad de las muestras en agua (Figura 4.9). Estos resultados opuestos podrían atribuirse al entrecruzamiento de la matriz por acción del ácido tánico y al carácter hidrofílico del agente plastificante, respectivamente.

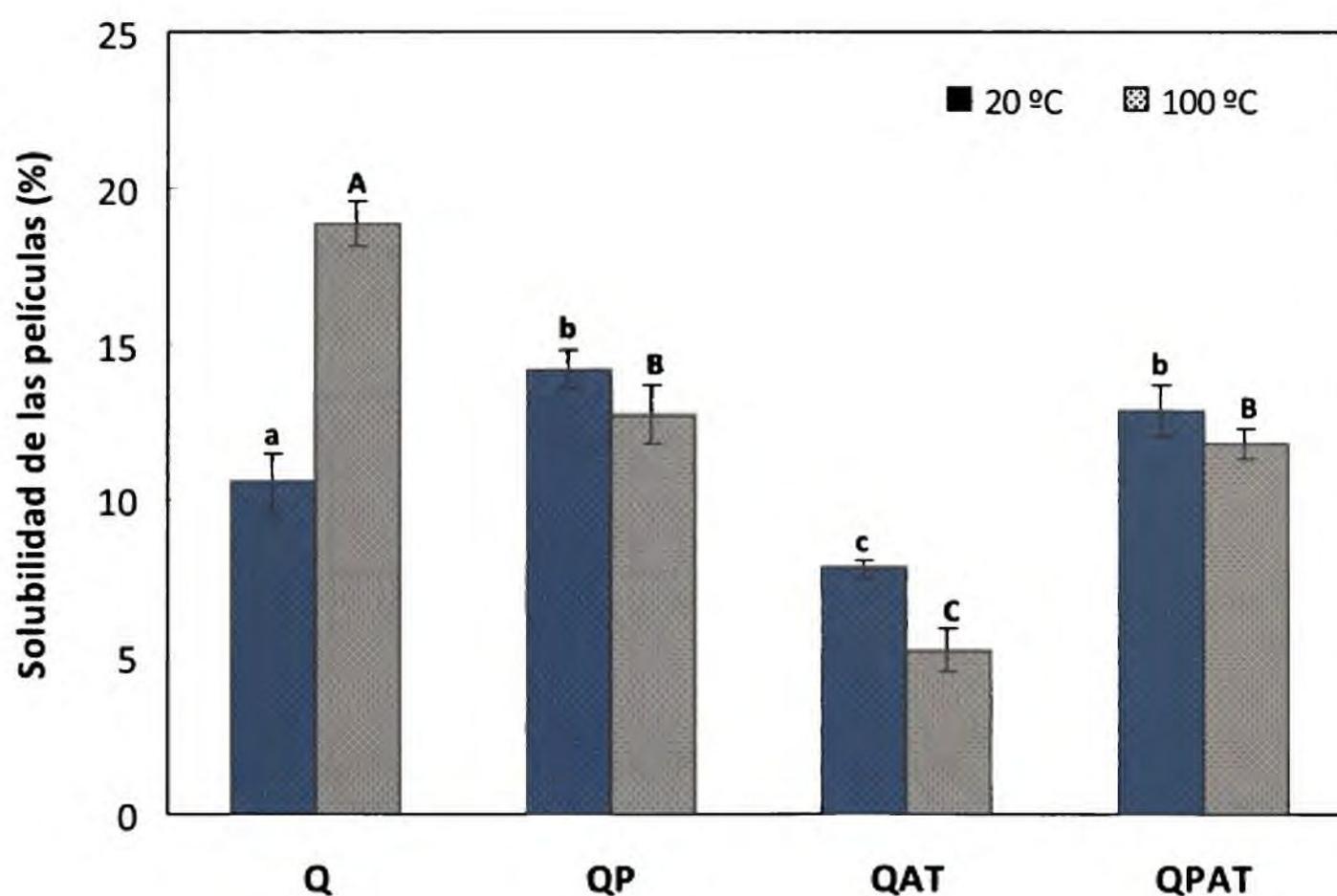


Figura 4.9 Efecto del ácido tánico y la adición de plastificante en la solubilidad porcentual de las películas en agua a 20 y 100°C. AT: la concentración de ácido tánico utilizada fue de 40 mg / g Q. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

La solubilidad en agua a 100°C de las películas de Q fue mayor que a 20°C, mientras que el agregado de plastificante no afectó significativamente los valores de solubilidad del material ($p>0,05$) (Figura 4.9). Por otro lado, la solubilidad de las formulaciones con AT disminuyó a 100°C. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta que la exposición a altas temperaturas facilitaría el proceso de reticulación de la matriz. Kubota y col. (1993), señalaron que la temperatura podría favorecer la N-acetilación del quitosano con algunos entrecruzantes ocasionando una disminución de los grupos hidrofílicos y por consiguiente en el porcentaje de solubilidad en agua.

La evaluación de los resultados obtenidos para la solubilidad de las películas a 100°C fue un indicio de que las propiedades de matrices podrían ser modificadas a través de un tratamiento con altas temperaturas.

4.4.5 Permeabilidad al oxígeno

Los resultados de permeabilidad a los gases para las películas a base de quitosano desarrollados en esta Tesis se presentan en la Tabla 4.5

Tabla 4.5 Permeabilidad al O₂ de películas de Q y QAT*

Composición de las películas	Permeabilidad al O ₂ x 10 ¹³ (cm ³ m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
Q	5,74 (0,94) ^a
QAT	3,57 (0,71) ^b

*Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$). Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

El agregado de AT afectó significativamente ($p<0,05$) la permeabilidades al O₂ de las películas de Q.

Gaudin y colaboradores (1999) informaron una permeabilidad al O₂ de $1,4 \cdot 10^{-14}$ cm³ m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹ para películas de almidón de trigo sin plastificar, determinado utilizando el equipo Oxtran, específico para este análisis. Películas a base de proteína de soja presentaron un valor de permeabilidad al oxígeno de $6,0 \cdot 10^{-13}$ cm³ m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹ según Cho y colaboradores (2010). Con respecto a los materiales sintéticos, en la literatura se informan valores de

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

permeabilidad al O_2 de $5,18 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, para películas de LDPE, mientras que para el caso de películas de HDPE el valor informado fue $8,25 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ (Piringer, 2000).

Dado que las películas a base de quitosano tuvieron buenas propiedades de barrera al oxígeno se estudió su efectividad para inhibir la oxidación de un aceite comercial, en comparación con un material sintético.

A tal fin, se prepararon muestras de aceite vegetal de girasol en vasos de precipitado de 50 ml, dejando un espacio de cabeza de 3 cm, los que se cubrieron en su parte superior con las películas a base de quitosano, con un sello de parafina. En la Figura 4.10 se presenta un esquema del diseño del experimento desarrollado. Las películas ensayadas fueron: Q, QAT, una sintética (BOPA/PE), y se utilizó un control sin recubrimiento. Los vasos se colocaron en estufa a 37°C y a diferentes tiempos se retiraron muestras a las que se les determinó el índice de ácido 2-tiobarbitúrico (Índice TBA) según la metodología propuesta por la AOCS (2006). Los resultados se expresaron como mg malonaldehído/ kg aceite. Similar protocolo fue empleado/descrito por Mathew y Abraham (2008) para películas de almidón y quitosano con ácido ferúlico; los autores trabajaron con aceite y determinaron el índice de peróxidos como otra medida que también da idea de estado de oxidación del aceite.

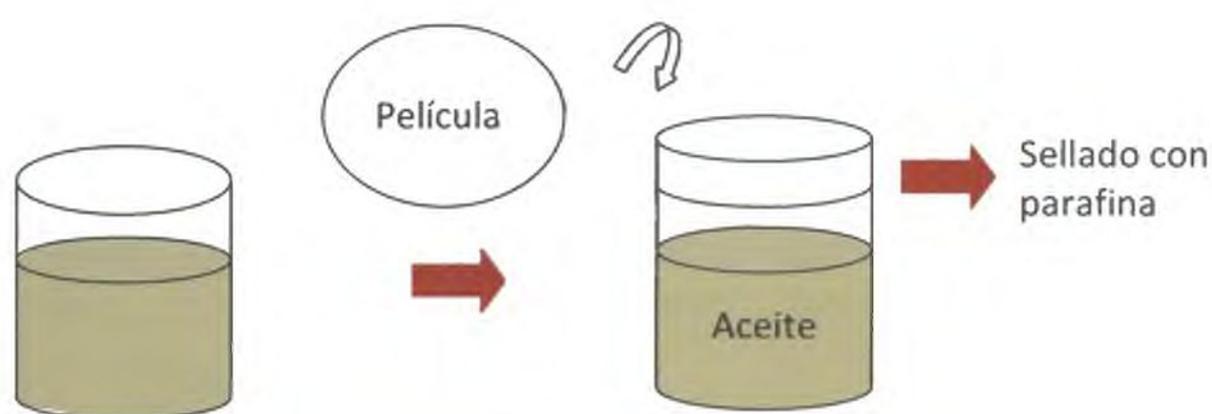


Figura 4.10 Esquema representativo del diseño del experimento

En la Figura 4.10 se muestra la evolución de la oxidación del aceite de girasol medida a través del índice de TBA en función del tiempo. Tanto las muestras recubiertas con QAT como las sintéticas permanecieron sin cambios significativos ($p > 0,05$) hasta los 52 días, mientras que las muestras de aceite control y recubiertas con Q aumentaron linealmente su índice de TBA a partir de los 16 días, con un incremento en la pendiente a los 52 días. Al

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

tiempo final ensayado (85 días) no se observaron diferencias entre las muestras recubiertas, alcanzando un valor de 0,0207 mg malonaldehído/kg aceite.

Estos resultados están vinculados con los de permeabilidad al O₂ previamente descritos, e indicarían que el agregado de AT por su acción reticulante de la matriz y la consiguiente disminución de la permeabilidad al O₂, hizo posible retardar el deterioro de productos susceptibles a la oxidación.

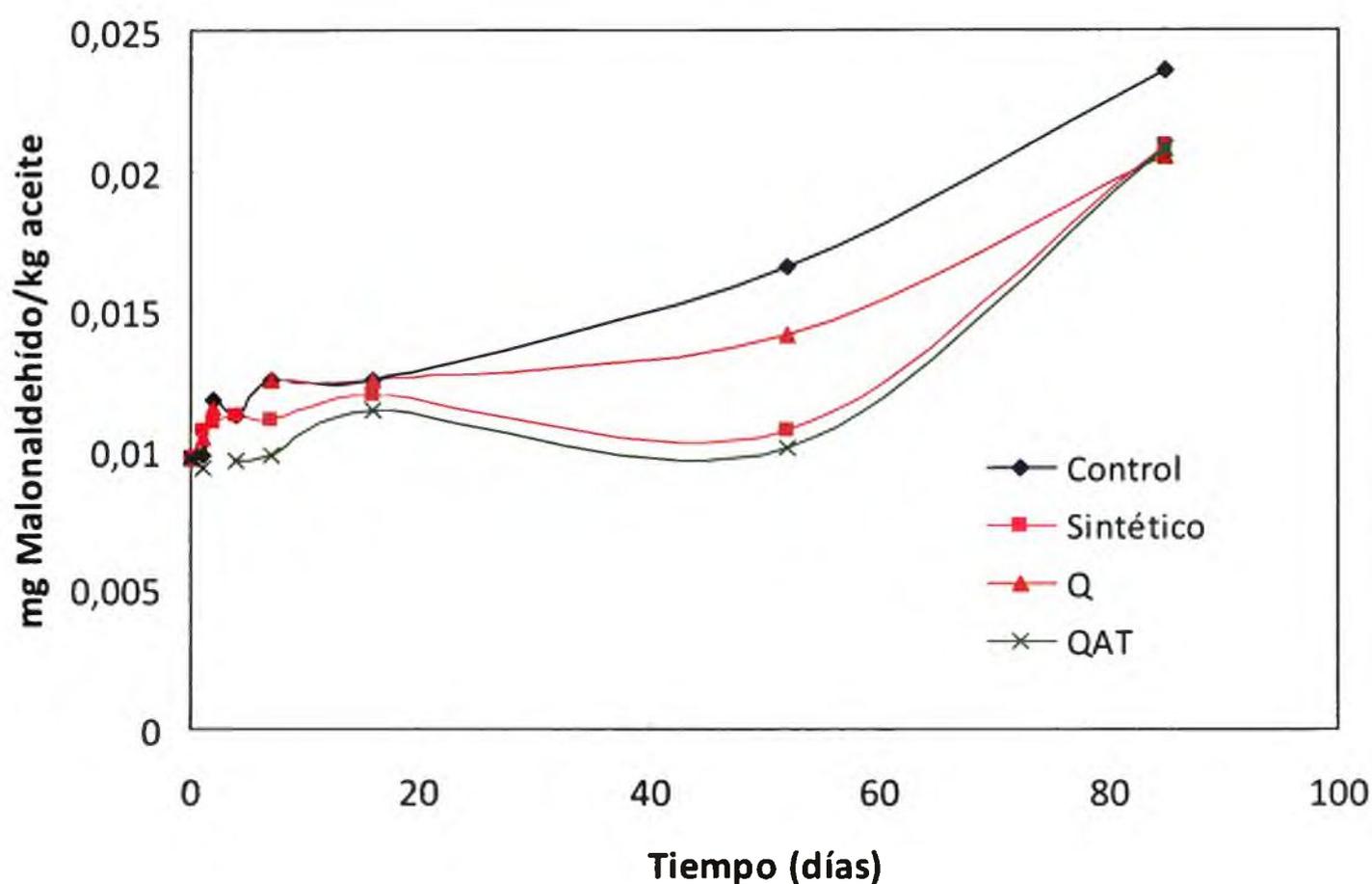


Figura 4.11 Evolución de la oxidación del aceite de girasol recubierto con películas Q y QAT, con un material sintético y sin recubrir en función del tiempo de almacenamiento. Los datos corresponden al promedio de duplicados.

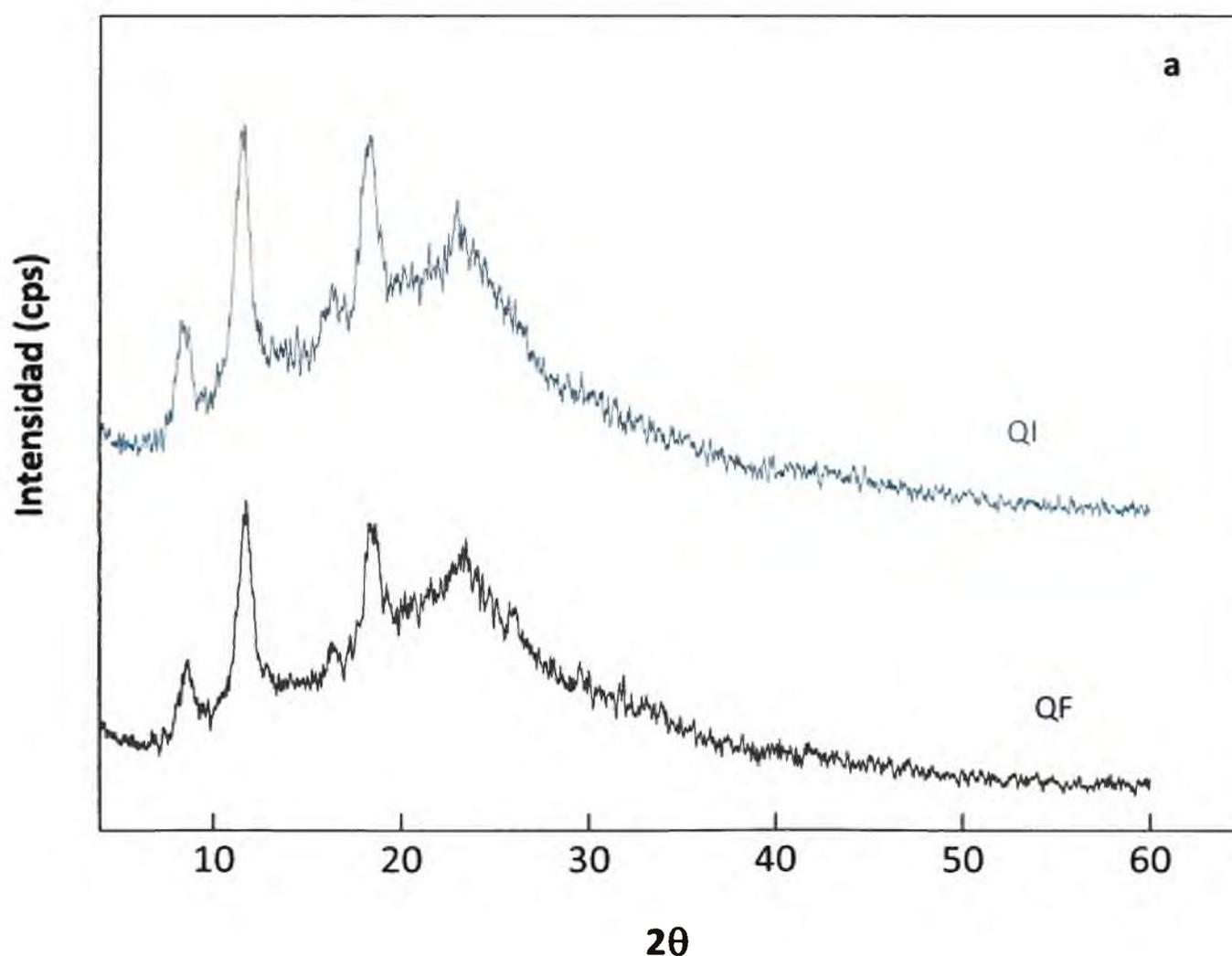
4.4.6 Difracción de rayos X

Se analizaron los espectros obtenidos por difracción de rayos X de las películas con y sin agregado de ácido tánico, dado que el conocimiento de la microestructura del material es crítico y determina sus propiedades mecánicas y de barrera. Ogawa y col. (2004) estudiando la estructura del quitosano solubilizado en distintos ácidos encontraron diferentes conformaciones. Estos autores propusieron tres formas polimórficas o conformaciones para el quitosano: la forma no cristalina, y la cristalina bajo la forma hidratada ("tendón") y anhidra ("templada"). La estructura cristalina hidratada presenta un pico en $2\theta = 10^\circ$ (o

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

entre 8° y 12°), mientras que la anhidra exhibe un pico en $2\theta = 15^\circ$. En el presente trabajo, las películas QI mostraron un comportamiento similar. La Figura 4.8a muestra las reflexiones a $2\theta = 22,9; 18,3; 16,3; 11,6$ y $8,4^\circ$ a tiempo *inicial*. Ritthidej y col. (2002) y Zhong y Xia (2008) encontraron resultados similares. De acuerdo con Wang y col. (2005) los dos últimos picos ($2\theta = 11,6$ y $8,4^\circ$) corresponden a la estructura cristalina hidratada, mientras que el amplio pico alrededor de $2\theta = 23^\circ$ indica la existencia de una estructura amorfa.

Durante el almacenamiento de las películas de quitosano sin plastificar (QF) los difractogramas mostraron un ligero cambio en los picos, con corrimientos de los mismos hacia mayores valores de 2θ con respecto a las películas en su estado *inicial* (QI) (Figura 4.12a y Tabla 4.6). Estos resultados se explicarían debido a la liberación gradual del ácido acético de la matriz de quitosano acompañado por una migración de moléculas de agua. Ogawa y col. (2004) atribuyeron estos resultados a los cambios que experimenta el polímero debido a su evolución gradual hacia la conformación polimórfica anhidra. Una tendencia similar fue informada por Brown y col. (2001).



Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

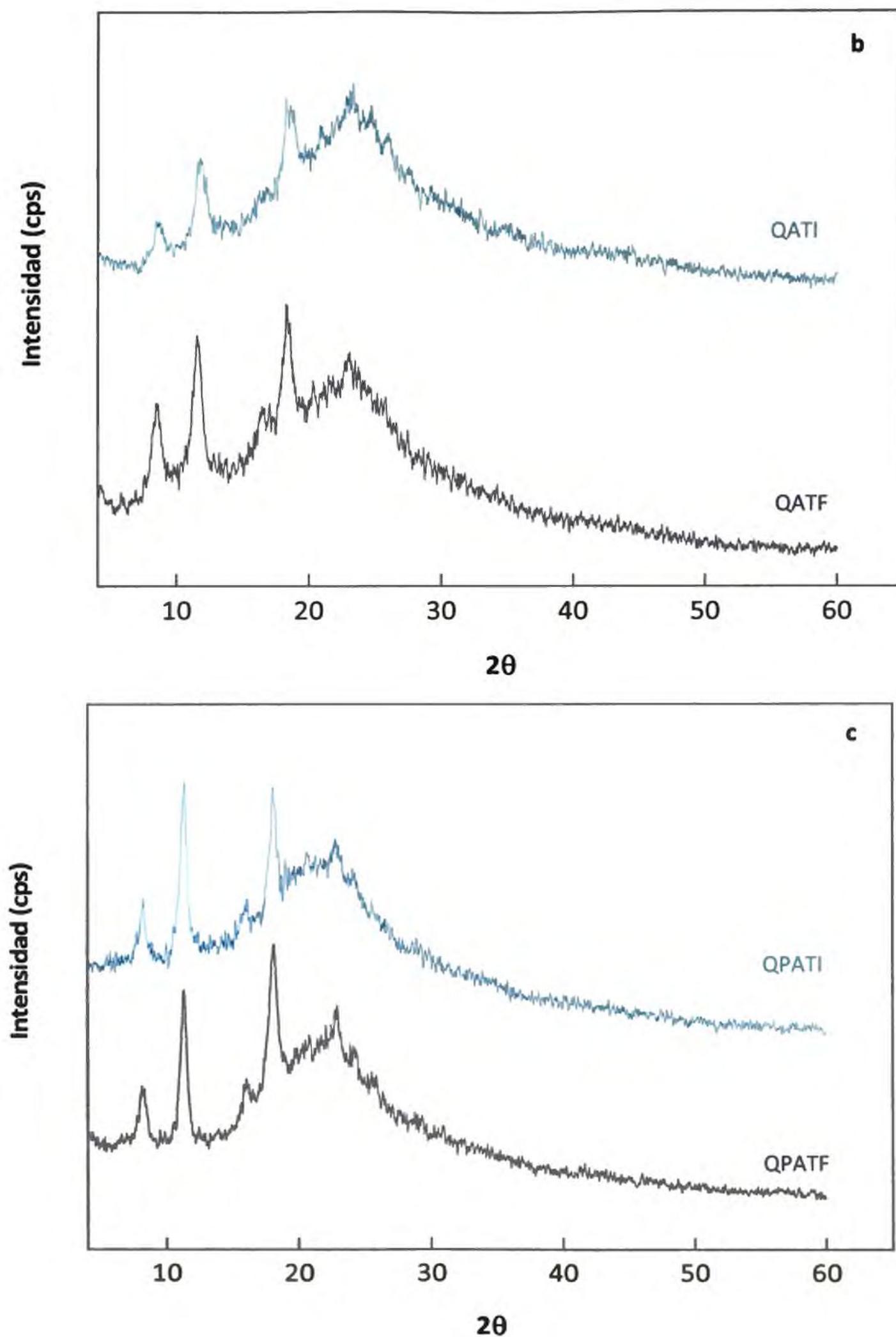


Figura 4.12 Difractogramas de: (a) películas de Q; (b) películas de QAT; (c) películas de QPAT; tiempo *inicial* (I) y luego de un almacenamiento durante 30 días (F) bajo condiciones controladas.

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

Las películas con agregado de plastificante o ácido tánico o una combinación de ambos mostraron patrones de difracción de rayos X similares al obtenido para las muestras control (Q). Los espectros mantuvieron sus picos característicos respecto a aquellos obtenidos para las películas analizadas a tiempo *inicial*. Sin embargo durante el almacenamiento de las películas se observó un cambio en la posición de estos picos (Tabla 4.6), resultando la magnitud de estos desplazamientos diferentes dependiendo del aditivo utilizado. Así, el agregado de AT desplazó los picos hacia valores más bajos de 2θ (Figura 4.12b y la Tabla 4.6), mientras que un efecto más marcado se observó con la incorporación de glicerol a la matriz. Los patrones de difracción de rayos X obtenidos con el agregado de ambos aditivos simultáneamente (QPAT), mostraron un menor desplazamiento de los picos que el observado para las películas de quitosano plastificadas (Tabla 4.6). Estos resultados podrían indicar el efecto estabilizante del AT en la estructura desarrollada.

Tabla 4.6 Desplazamiento porcentual estimado a partir de los picos del patrón de difracción de rayos X de películas de Q con el agregado de ácido tánico (AT) y plastificante (P)

Ubicación de los picos de las películas QF	Desplazamiento de los picos (%) ¹		
	QATF	QPF	QPATF
8,64	0,92	6,48	3,47
11,76	1,19	4,08	3,74
16,30	0,12	7,73	1,47
18,38	0,11	1,63	1,63
23,44	1,54	9,22	2,56

¹ relativo a la localización de los picos de las películas de quitosano luego del almacenamiento (QF)

4.4.7 Propiedades mecánicas

Las películas QI se caracterizaron por su comportamiento como materiales rígidos, ya que mostraron altos valores de esfuerzo (73,8 MPa) y valores de elongación a la ruptura de

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

17,7%. Como se explicó anteriormente en el Capítulo 2 la incorporación del plastificante cambió el patrón mecánico de las películas de quitosano al típico de materiales flexibles o dúctiles obteniéndose valores intermedios de esfuerzo y altos valores de deformación (Figura 4.13).

Los ensayos mecánicos de las películas formulados con AT se realizaron tanto en dirección transversal como longitudinal. Los resultados obtenidos indicaron que no hubo diferencias en los valores obtenidos independientemente de la dirección en la que se efectuó la medida, revelando la homogeneidad del proceso de entrecruzamiento de la matriz con AT. En el caso de las muestras evaluadas a tiempo *inicial*, los resultados obtenidos a partir de los ensayos de tracción mostraron que las películas de QAT tánico fueron más resistentes que las de Q. Es decir, como resultado de la incorporación de AT en la formulación de Q aumentó la rigidez del material, el valor de esfuerzo aumentó significativamente ($p < 0,05$), alrededor del 29%, sin afectar la flexibilidad de la película (Figura 4.13a y b). Una tendencia similar fue encontrada por Cao y col. (2007) trabajando en películas de gelatina entrecruzadas con ácido tánico. Por otro lado, las películas con ambos aditivos (QPATi) mostraron una marcada disminución en los valores de esfuerzo a pesar de que se obtuvieron valores similares de elongación respecto de las películas sin glicerol (QATI).

El agregado de glicerol (QPI) disminuyó (en promedio) un 49% los valores de esfuerzo mientras que aumentó en un 76% la elongación a la ruptura y un 80% el contenido de humedad de las películas.

El agregado de AT estabilizó la matriz durante el almacenamiento ya que los valores de esfuerzo de las películas QATI y QATF no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$). En el caso de las películas de quitosano con y sin plastificante los valores de esfuerzo de los materiales aumentaron luego del almacenamiento (QF y QPF). Asimismo, en todos los casos, la elongación disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con el transcurso del tiempo, siendo este efecto más marcado en las películas sin plastificar entrecruzadas con ácido tánico (QATF) (Figura 4.13b). Estos resultados se correlacionaron con la disminución en el contenido de humedad de las películas y la reorganización estructural de la matriz (Tabla 4.4).

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

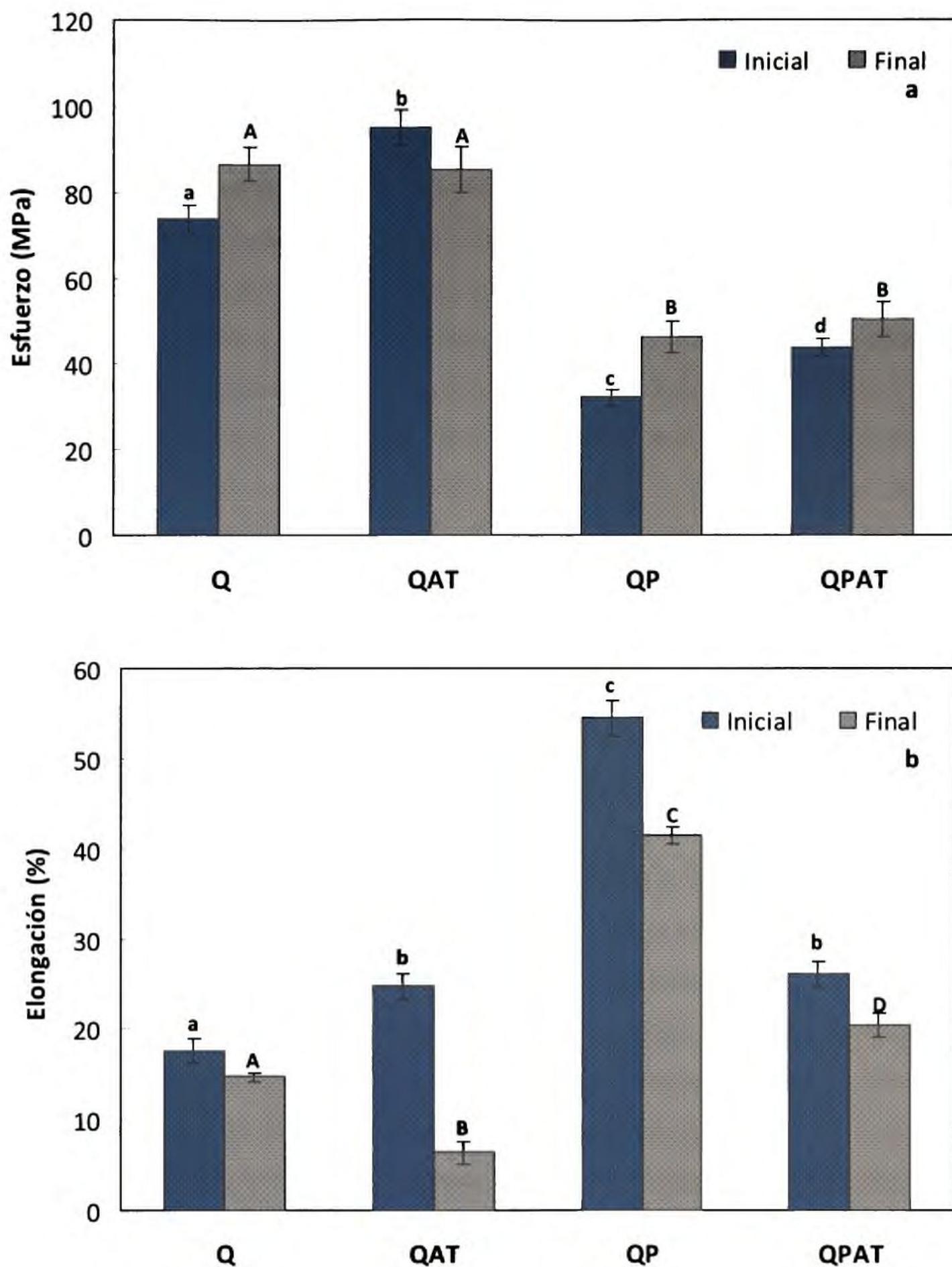


Figura 4.13 Propiedades mecánicas de películas de quitosano (Q) con el agregado de ácido tánico (QAT), glicerol como plastificante (QP) y ácido tánico y plastificante (QPAT), a tiempo *inicial* y luego de un almacenamiento durante 30 días bajo condiciones controladas:(a) Esfuerzo (MPa) y (b) Elongación % a la ruptura. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.4.8 Análisis espectroscópico

El espectro de FTIR correspondiente a la película de QF sin plastificar (Figura 4.14a) mostró una amplia banda de absorción en la región de 3600 a 3000 cm^{-1} con un mínimo a 3460 cm^{-1} . Otras bandas se localizaron a 2867 , 2912 , 1419 y 1263 cm^{-1} y la banda a 1336 cm^{-1} , característica de los grupos $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CO}$, a partir de la cual se puede determinar el grado de N-acetilación o desacetilación, de acuerdo con los resultados informados por Brugnerotto y col. (2001) y Ostrowska-Czubenko y Gierszewska-Druzynska (2009), como se estimó en el Capítulo 1. Asimismo, el espectro de FTIR de QF mostró bandas de absorción a 1650 cm^{-1} y la banda a 1581 cm^{-1} . Se observaron picos a 1158 cm^{-1} (estiramiento asimétrico del puente C-O-C) y a 1031 cm^{-1} , características de la estructura del polisacárido de quitosano (Pawlak y Mucha, 2003; Smitha y col., 2005).

También se encontró el pico localizado a 896 cm^{-1} relacionado al C-O-C del anillo de la piranosa (Pasanphan y Chirachanchai, 2008). Por otra parte, con el tiempo de almacenamiento, el espectro de las películas de quitosano (QF) mostró una separación en varios picos en el rango de número de onda de 1458 - 1562 cm^{-1} y 1637 - 1650 cm^{-1} , en comparación con el espectro de las películas QI.

Residuos de la quitina, correspondientes a la unión N-H del grupo N-acetil (amida II) se evidenciaron como un pico ancho a 1556 cm^{-1} a tiempo *inicial* (QI) y como un pico agudo a mayor número de onda (1581 cm^{-1}) en las muestras almacenadas (QF). Resultados similares fueron encontrados por Yamamoto y col. (1997). Este comportamiento puede ser explicado considerando los cambios experimentados por el material durante el almacenamiento, dado que el espectro de la muestra de QF muestra cambios característicos de una matriz tendiente a una conformación anhidra (Figura 4.10b y c).

En el espectro de QI, como puede observarse en la Figura 4.14a, algunos de los picos anteriormente mencionados mostraron un corrimiento en comparación con las películas QF, entre ellos 1255 , 1340 , 1411 cm^{-1} ; mientras que las bandas localizadas a 2873 y 2929 cm^{-1} también exhibieron un desplazamiento. Estos corrimientos podrían explicarse por la deshidratación de los grupos metilo en la cadena lateral y por los cambios de conformación de la cadena principal (Gu y Wu, 2007).

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

En el caso de las películas QATF, los espectros resultaron similares a los obtenidos para las películas de QF almacenadas. Sin embargo, la absorción de los picos disminuyó en intensidad, como puede observarse en la Figura 4.14c. A su vez la técnica de la derivada segunda puso en evidencia este resultado (Figura 4.14d). De acuerdo con Aelenei y col. (2009) las bandas características del ácido tánico se atenuaron y aparecieron como hombros. Una explicación posible para este hecho es que el AT fue incluido en la matriz de quitosano o bien se encontraba en una cantidad muy pequeña en la mezcla.

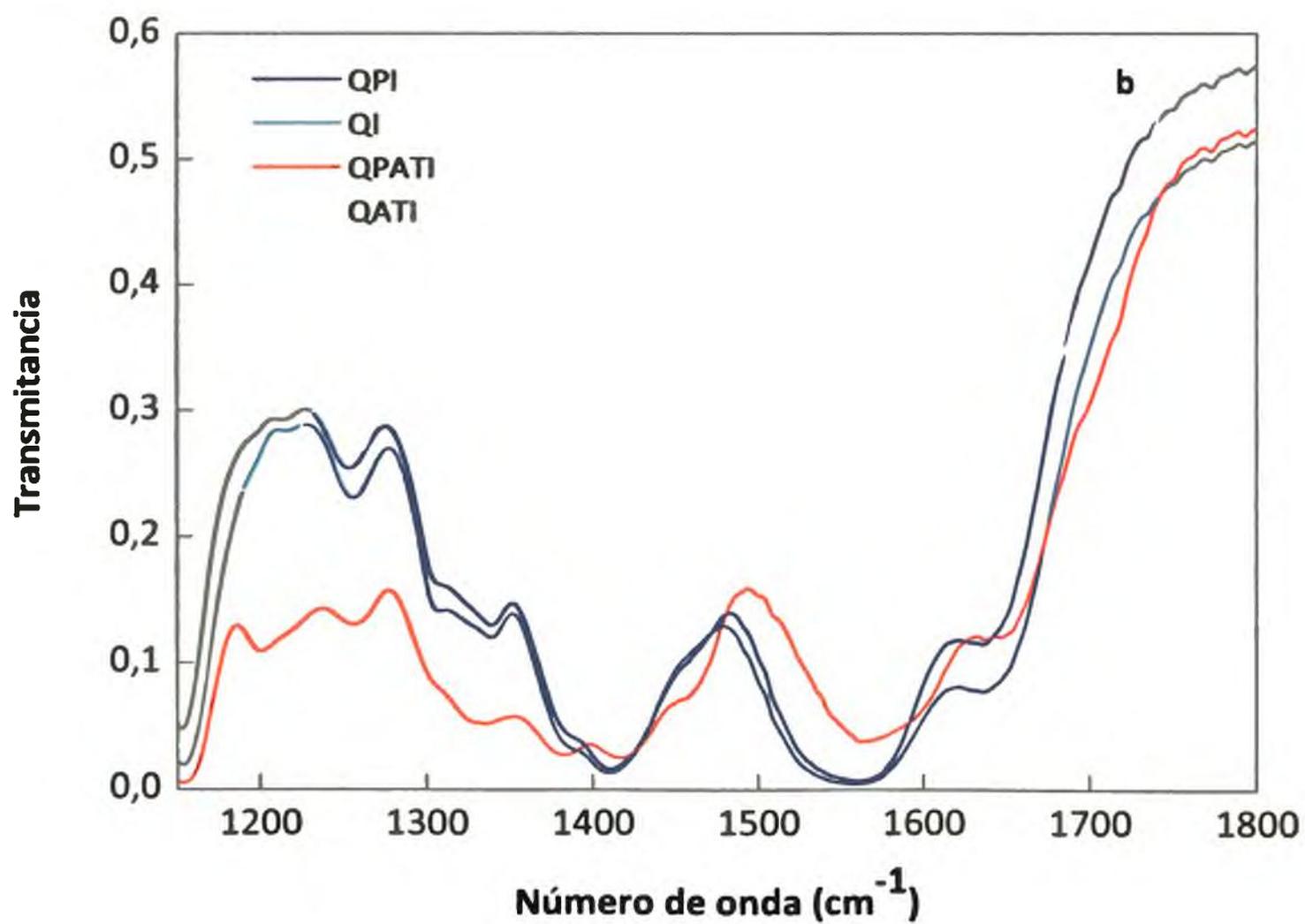
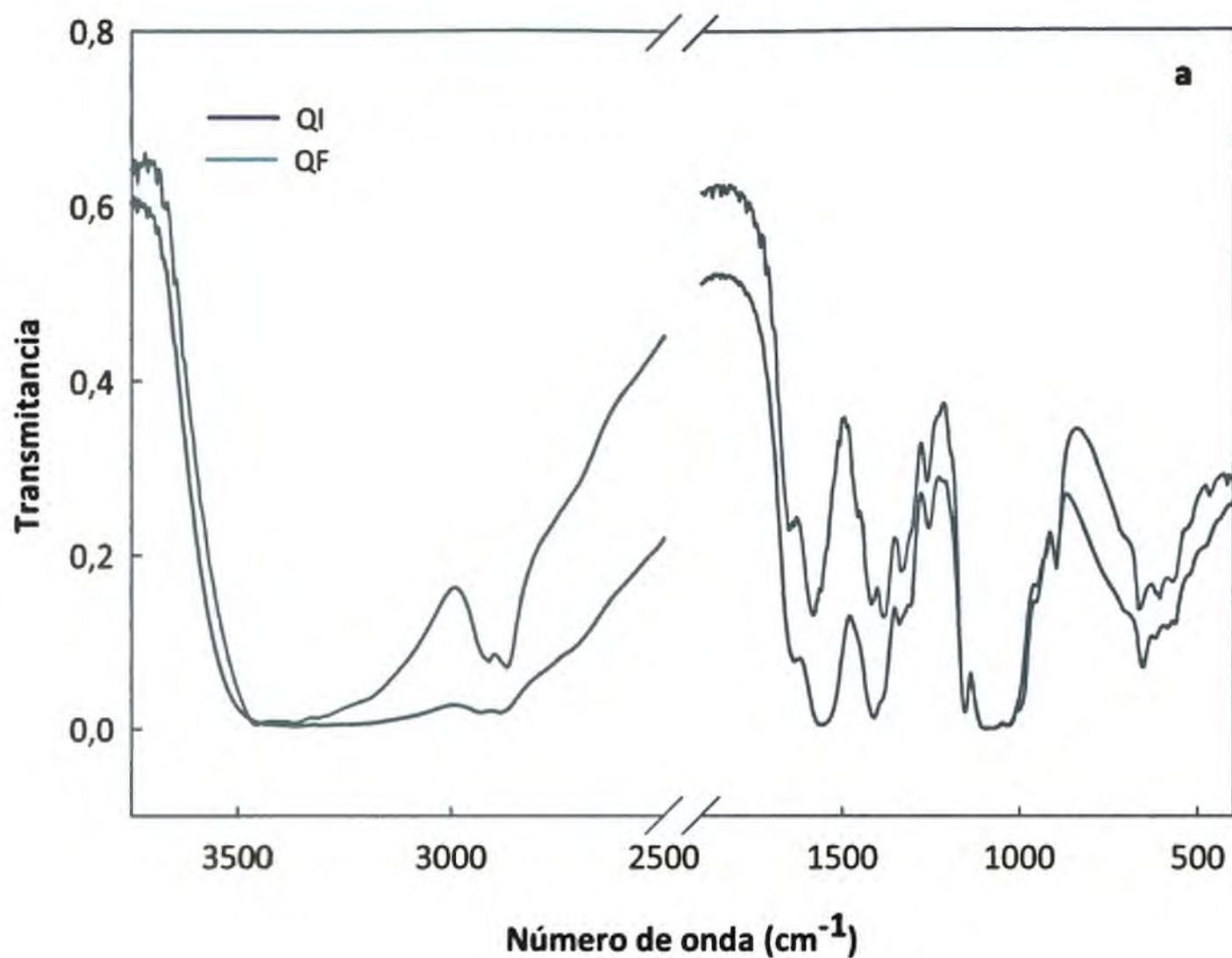
Nuevamente, como se observó en el caso de las películas de Q, los dos picos de los espectros de las películas de la QAT, localizados en la región de 2868 y 2915 cm^{-1} a tiempo *inicial*, experimentaron un desplazamiento en sus posiciones hacia valores de número de onda menores, evidenciándose a 2854 y 2910 cm^{-1} , respectivamente, luego del almacenamiento de las películas.

Los espectros de las muestras de Q con plastificante (QPI y QPF) se muestran en la Figura 4.14 y como puede observarse presentan similitudes con los obtenidos para las películas sin plastificar, siendo las intensidades de absorción fuertemente afectadas por la presencia de glicerol. Los principales cambios en las películas plastificadas durante el almacenamiento (espectros QPI y QPF) se observaron en la región de 2800-3000 cm^{-1} , los picos localizados a 2889 y a 2935 cm^{-1} correspondiente al tiempo *inicial* sufrieron un corrimiento hacia 2877 y 2923 cm^{-1} , respectivamente (Figura 4.14b y c).

Los espectros de QPATF mostraron el efecto sinérgico de ambos componentes, el glicerol y el ácido tánico, ya que se obtuvieron intensidades intermedias de los picos de absorción (entre QPF y QATF), (Figura 4.14c). A partir de los espectros obtenidos se observó un marcado desplazamiento de la banda en el rango entre 2800 y 3000 cm^{-1} ; el efecto debido al agente plastificante fue atenuado por la presencia de ácido tánico.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de FTIR mostraron un comportamiento similar al observado para las otras propiedades estudiadas, ya que se obtuvieron modificaciones intermedias, en la intensidad y el corrimiento de los picos, con el agregado en forma simultánea de AT y glicerol, respecto de los obtenidos con la incorporación de cada uno de los componentes en forma individual.

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento



Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

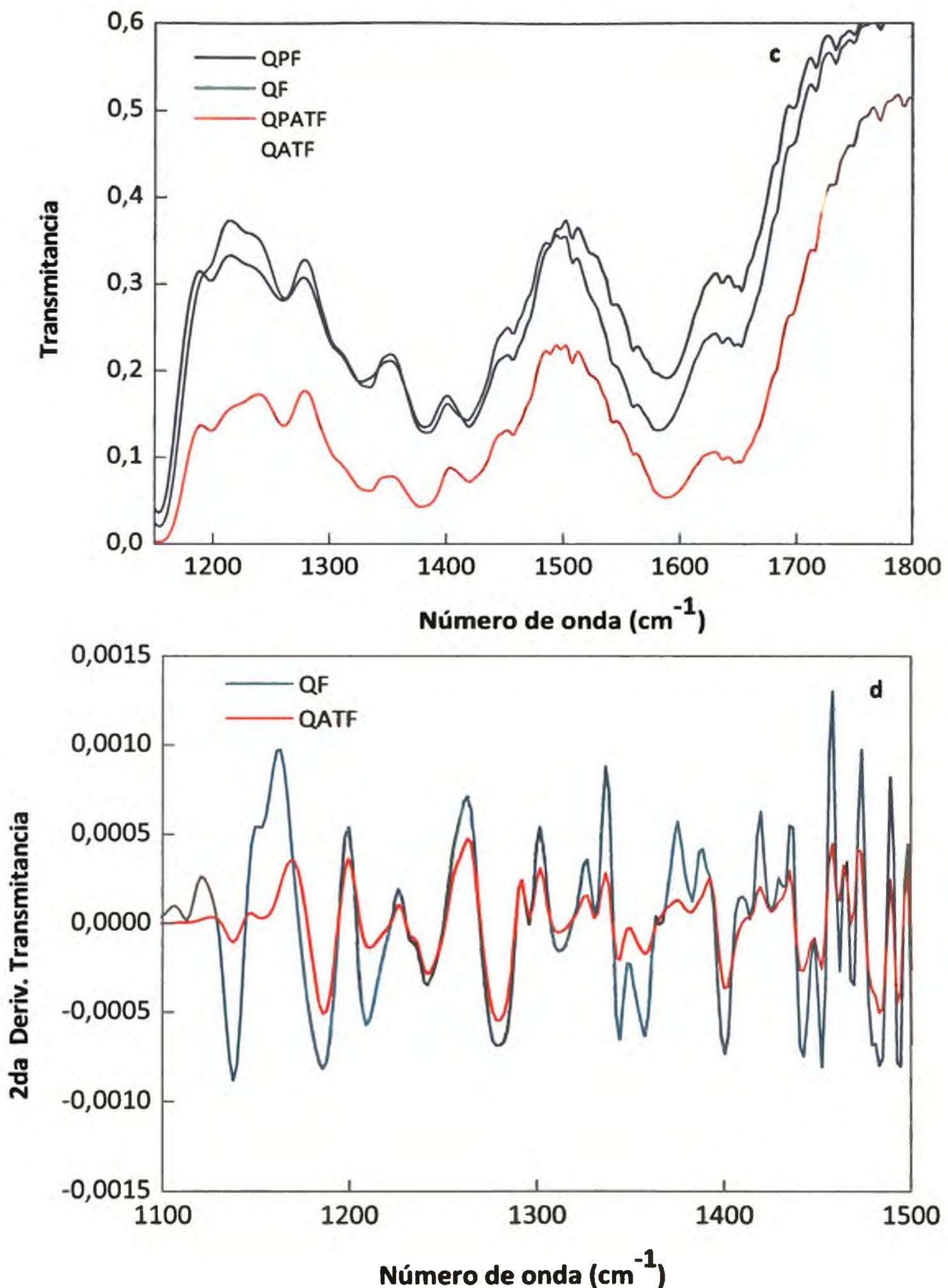


Figura 4.14. Espectros de FTIR de películas de: (a) de quitosano a tiempo *inicial* (QI) y *final* (QF) (b-c) quitosano con (QPI) y sin plastificante (QI), y quitosano entrecruzadas con ácido tánico y agregado de plastificante (QPAT) y sin plastificante (QAT), determinados a tiempo *inicial* (I) y *final* (F), (d) derivada segunda de los espectros de QF y QATF.

Modificaciones de la matriz de quitosano por entrecruzamiento

En conclusión, a través del barrido de distintas concentraciones de ácido tánico se seleccionó la cantidad óptima agregada a la matriz de quitosano, que resultó ser de 40 mg/g quitosano. El agregado de ácido tánico a la matriz permitió formar una estructura más rígida debido a su capacidad para interactuar fuertemente con el quitosano, demostrando así su acción como agente entrecruzante. El aumento en los valores de esfuerzo y la consecuente disminución en la elongación del material, así como el mejoramiento de las propiedades de barrera de las películas de quitosano entrecruzadas, explicarían la compactación de la matriz de quitosano debido a la presencia del AT. En el mismo sentido, la incorporación de ácido tánico en la matriz de quitosano disminuyó la solubilidad de las películas en agua; este efecto resultó más marcado con el aumento de la temperatura, favoreciendo la interacción entre los componentes. Esto permitiría afirmar que la exposición de los materiales a tratamientos térmicos podría ser una alternativa viable para modificar sus propiedades.

El análisis microestructural de las películas de quitosano con adición de AT o glicerol como agente plastificante mostró desplazamientos en los picos de los patrones de difracción de rayos X y en los espectros de FTIR en comparación con las películas de quitosano.

Por otro lado, la presencia en forma simultánea de ácido tánico y glicerol en las películas de quitosano, mostró un efecto sinérgico el cual fue confirmado por los valores intermedios observados para todas las propiedades analizadas respecto a las propiedades determinadas en películas de quitosano con el agregado en forma individual de ácido tánico o de plastificante.

Asimismo, el estudio del efecto del almacenamiento fue relevante, ya que las películas mostraron una tendencia hacia una estructura más estable asociada a la reorganización de la matriz hacia una conformación anhidra. Estos resultados también se pusieron en evidencia mediante difracción por rayos X y por los desplazamientos observados mediante análisis de espectroscopía de infrarrojo, FTIR. Por esta razón, el momento en que se realizan las determinaciones debe ser tomado en consideración ya que las propiedades de las películas no son estáticas y podrían no haber alcanzado aún el estado de equilibrio.

REFERENCIAS

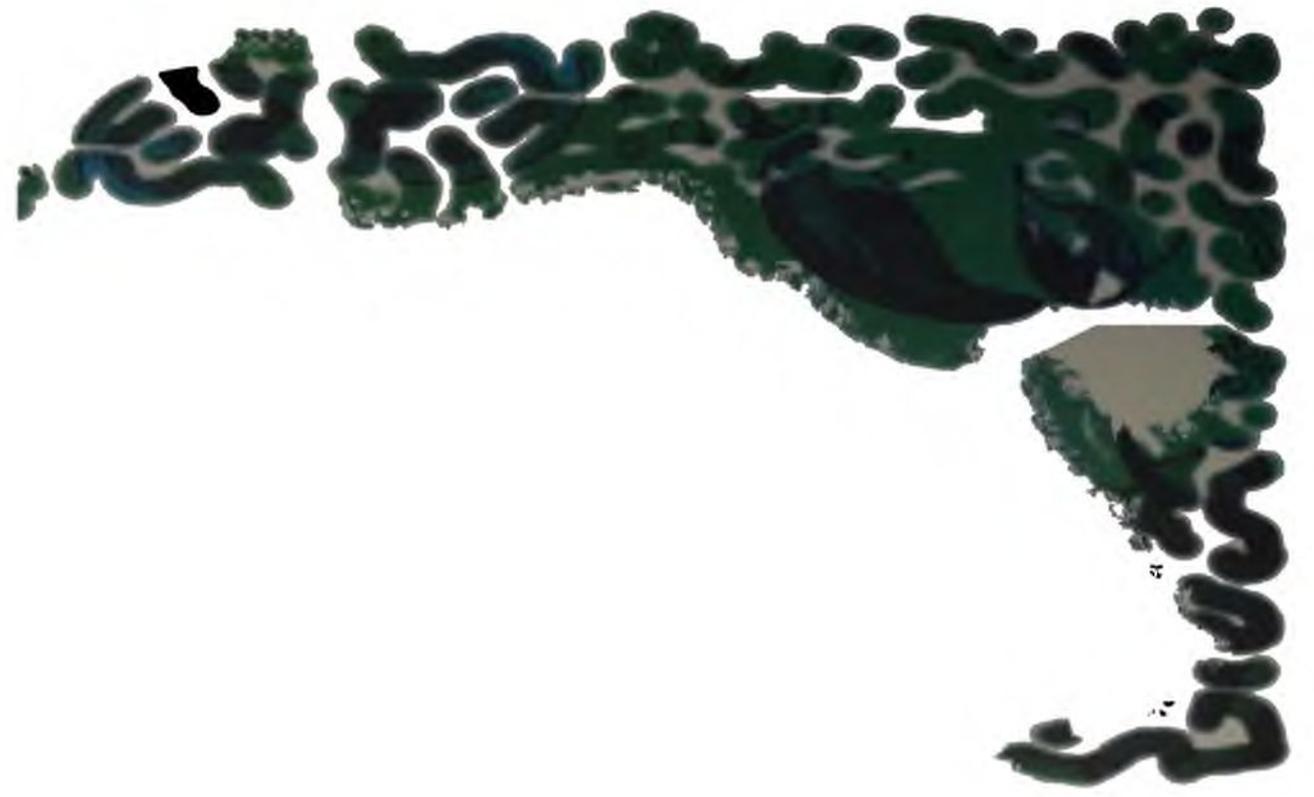
- AOCS (2006).** AOCS (American Oil Chemists' Society). AOCS Official method Cd 19-90. 2-Thiobarbituric acid reactive substances. In Official Method and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 5th eds. Champaign, Illinois, USA.
- An J-H., y Dultz S. (2007).** Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. *Journal of Membrane Science*, 301, 126-130.
- Butler M.F., Ng Y.F., y Pudney P.D.A. (2003).** Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 41, 3941-3953.
- Aelenei N., Popa M.I., Novac O., Lisa G., y Balaita L. (2009).** Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1095-1102.
- Balasaundram A., Sundram K., y Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Baxter N.J., Lilley T.H., Haslam E., y Williamson M.P. (1997).** Multiple Interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36, 5566-5577.
- Beppu M.M., Vieira R.S., Aimoli C.G., y Santana C.C. (2007).** Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science*, 301, 126-130.
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Rubini K., y Roveri N. (2001).** Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22, 763-768.
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., y Rubini K. (2002).** Stabilization of gelatin films by cross-linking with genipin. *Biomaterials*, 23, 4827-4832.
- Brown C.D., Kreilgaard L., Nakakura M., Caram-Lelham N., Pettit D.K., Gombotz W.R., y Hoffman A.S. (2001).** Release of PEGylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from chitosan / glycerol films. *Journal of Controlled Release*, 72, 35-46.

- Brugnerotto J., Lizardi J, Goycoolea F., Arguelles Monal W., Desbrieares J., y Rinaudo M. (2001).** An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.
- Cao N., Fu Y., y He J. (2007).** Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21, 575-584.
- Carvalho R.A., y Grosso C.R.F. (2004).** Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*, 18, 717-726.
- Chambi H., y Grosso C. (2006).** Edible films produced with gelatin and casein cross linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458-466.
- Costa E., Coelho M., Ilharco L.M., Aguiar-Ricardo A., y Hammond P.T. (2011).** Tannic acid mediated suppression of PNIPAAm microgels. *Macromolecules*, 44, 612-621.
- Chung K.T., Wong T.Y., Wei C.I., Huang Y.W., y Lin Y. (1998).** Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 421-464.
- Denavi G., Tapia-Blácido D.R., Añón M.C., Sobral P.J., Mauri A.N., y Menegalli F.C. (2009).** Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, 90, 341-349.
- Erel-Unal I., y Sukhishvili S.A. (2008).** Hydrogen-bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol. *Macromolecules*, 41, 3962-3970.
- Flores S.K., Famá L., Rojas A.M., Goyanes S., y Gerschenson L. (2007).** Physical properties of tapioca-starch edible Films: influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40, 257-265.
- García M.A., Pinotti A., Martino M., y Zaritzky N. (2004).** Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate polymers*, 56(3), 339-345.
- García N., Famá L., Dufresne A., Aranguren M., y Goyanes S. (2009).** A comparison between the properties of tuber and cereal starches. *Food Research International*, 42, 976-982.
- Ghica, M.V., Albu M.G., Popa L., Leca M., Brazdaru L., Cotrut C., y Trandafir V. (2009).** Drug delivery systems based on collagen-tannic acid matrices. *Romanian Journal of Chemistry*, 54(11-12), 1103-1110.
- Gu W., y Wu P. (2007).** FT-IR and 2D-IR spectroscopic studies on the effect of ions on the phase separation behavior of PVME aqueous solution. *Analytical Sciences*, 23, 823-827.

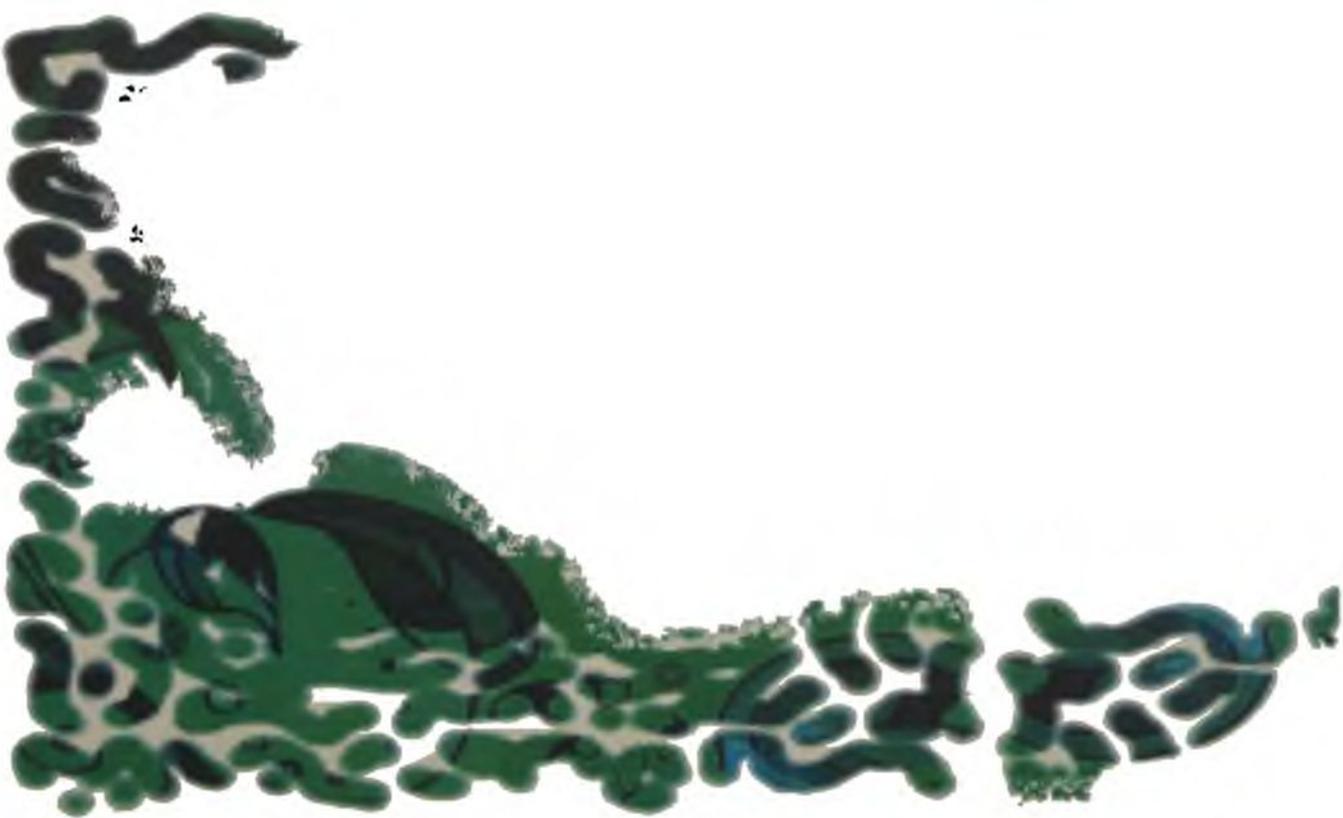
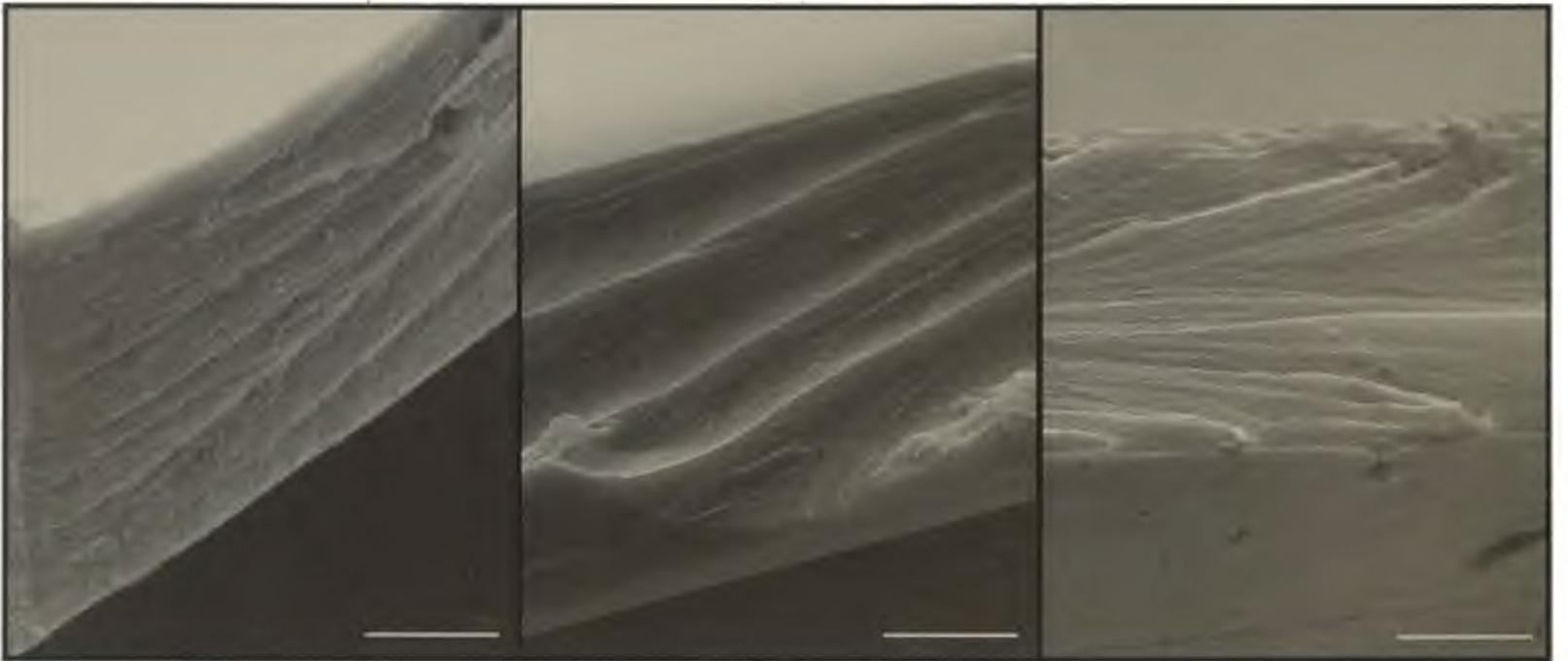
- Kim S., Nimni M.E., Yang Z., y Han B. (2005).** Chitosan gelatin based films cross-linked by proanthocyanidin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 75, 442-450.
- Kubota, N., Kikuchi, Y., Mizuhara, Y., Ishihara, T. y Takita, Y. (1993).** Solid-phase modification of chitosan hydrogel membranes and permeability properties of modified chitosan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 50, 1665-1670.
- Haslam E. (1996).** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.
- Isenburg J.C., Karamchandani N.V., Simionescu D.T., y Vyavahare N.R. (2006).** Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins. *Biomaterials*, 27, 3645-3651.
- Mathew S., y Abraham T.E. (2008).** Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826-835.
- Li H., Wang D., Wang X., Xu Y., Zhang L., y Liu B. (2010).** Study on preparation and properties of tannins immobilized chitosan-Ce⁴⁺ resins. *Journal of Rare Earths*, 28, 144-148.
- Ogawa K., Yui T., y Okuyama K. (2004).** Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 1-8.
- Ostrowska-Czubenko J., y Gierszewska-Druzynska M. (2009).** Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, 77, 590-598.
- Ou S., Wang Y., Tang S., Huang C., y Jackson M.G. (2005).** Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70, 205-210.
- Pasanphan W., y Chirachanchai S. (2008).** Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. *Carbohydrate Polymers*, 72, 169-177
- Pawlak A., y Mucha M. (2003).** Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, 396, 153-166.
- Pinotti A., García M.A., Martino M., y Zaritzky N. (2007).** Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21, 66-72.

- Popa M-I., Aelenei N., Popa V.I., y Andrei D. (2000).** Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 45, 35-43.
- Pyla R., Kim T.-J., Silva J.L., y Jung Y.-S. (2010).** Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 154-160.
- Ravi Kumar, M., N., V., Muzzarelli, R., A., A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., y Domb, A., J. (2004).** Chitosan Chemistry and Pharmaceutical. *Chemical Reviews*, 104, 6017-6084.
- Reddy N., y Yang Y. (2010).** Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 118, 702-711.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., y Paganga G. (1996).** Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 761-769.
- Ritthidej G.C., Phaechamud T., y Koizumi T. (2002).** Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 11-22.
- Sabato S.F., Ouattara B., Yu, H., D'Aprano, G., Le Tien, C., Mateescu, M., A., y Lacroix, M. (2000).** Mechanical and barrier properties of cross linked soy and whey protein based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1397-1403.
- Sánchez A.B., Sibaja B M., Vega-Baudrit J., y Madrigal S. C. (2007).** Síntesis Y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista iberoamericana de Polímeros*, 8(4), 241-267.
- Shu X.Z., Zhu K.J., y Weihong Song. (2001).** Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, 212, 19-28.
- Shutava T.G., Prouty M., Kommireddy D., y Lvov Y.M. (2005).** pH responsive decomposable layer-by-layer nanofilms and capsules on the basis of tannic acid. *Macromolecules*, 38, 2850-2858.
- Shutava T.G., y Lvov Y.M. (2006).** Nanoengineered microcapsules of tannic acid and chitosan for protein encapsulation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 1-7.
- Smitha B., Sridhar S., y Khan A.A. (2005).** Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *European Polymer Journal*, 41, 1859-1866.

- Sung H.W., Huang R.N., Huang L.L.H., y Tasi C.C. (1999).** In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, 10, 63-78.
- Suyatma N.E., Tighzert L., y Copinet A. (2005).** Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3950-3957.
- Trezza T.A., y Krochta J.M. (2000).** Color stability of edible coatings during prolonged storage. *Journal of Food Science*, 65, 1166-1169.
- Wang S.F., Shen L., Zhang W.D., y Tong Y.J. (2005).** Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. *Biomacromolecules*, 6, 3067-3072.
- Yen K-C., Mandal T.K., y Woo E.M. (2008).** Enhancement of bio-compatibility via specific interactions in polyesters modified with a bio-resourceful macromolecular ester containing polyphenol groups. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 86(3), 701-712.
- Zhong Q-P., y Xia, W-S. (2008).** Physicochemical properties of edible and 5 preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 262–269.



CAPITULO 5



5.1 INTRODUCCIÓN

Como ya se ha desarrollado en capítulos anteriores la gran potencialidad del quitosano se relaciona con su versatilidad para ser utilizado en la formulación de películas (Ravi Kumar y col., 2004), recubrimientos, (Lin y Zhao, 2007) y a su capacidad para formar geles termoestables desarrollados específicamente para la liberación controlada de drogas, así como para su aplicación en la ingeniería de tejidos (Raquez y col., 2010).

Los materiales termoestables desempeñan un papel importante en la industria debido a su alta capacidad y flexibilidad para adaptarse y ajustarse a requerimientos específicos, formando matrices con buenas propiedades mecánicas, caracterizadas por su estabilidad, durabilidad, resistencia térmica y química.

En el diseño de materiales termoestables biodegradables las investigaciones se han focalizado en la utilización de hidratos de carbono como el quitosano, y la trehalosa. El aprovechamiento de un recurso renovable como el quitosano constituye una alternativa innovadora para producir materiales termoestables con una amplia gama de aplicaciones en el sector agroalimentario. Para obtener un material termoestable es necesario la transformación del polímero mediante un tratamiento térmico de curado que permite obtener una matriz entrecruzada (Raquez y col., 2010).

Varias investigaciones han abordado estudios acerca de la modificación de matrices poliméricas mediante tratamientos térmicos debido a las reacciones de entrecruzamiento ocasionadas por efecto de la temperatura (Gennadios y col., 1996; Lim y Wan, 1995; Hasimi y col., 2008; Reddy y Yang, 2010; Toffey y col., 1996; Zawadzki y Kaczmarek, 2010). Por lo general, un tratamiento térmico por encima de la temperatura de transición vítrea genera una densidad de entrecruzamiento de la matriz característico de los materiales termoestables; este efecto ha sido descrito por Hasimi y col. (2008) en matrices a base de proteínas del gluten de trigo.

Krumova y col. (2000) encontraron que el entrecruzamiento químico de los polímeros permite mejorar las propiedades mecánicas, la estabilidad térmica y la resistencia a la disolución de las muestras en agua.

Los taninos, utilizados por su capacidad para interactuar fuertemente con proteínas e hidratos de carbono, se obtienen a partir de recursos renovables, y dada su elevada

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

reactividad han sido empleados en el diseño de resinas fenólicas (Rautio y col., 2007). En el Capítulo 4 se estableció la capacidad entrecruzante del ácido tánico en las películas de quitosano evaluando su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas, microestructurales, mecánicas y de barrera de la matriz.

Por lo general, el proceso de curado se aplica para estabilizar la estructura y las propiedades de los polímeros sintéticos. Las condiciones del tratamiento térmico deben optimizarse de acuerdo a la formulación de la matriz ya que, como es bien conocido, las propiedades de los materiales poliméricos muestran un comportamiento dependiente de la temperatura y del tiempo de curado, tal como fue observado por Wurster y col. (2007), trabajando con películas de acrilato.

Además, como se demostró previamente las películas de quitosano no son sistemas estables, ya que sus propiedades cambian durante el almacenamiento en condiciones controladas. Así, el curado de las matrices podría contribuir a estabilizar el material hacia un estado estacionario. Además, la combinación del entrecruzamiento químico y el tratamiento térmico de la matriz es una alternativa que debe ser explorada con el fin de evaluar la sinergia de ambos procesos.

En la bibliografía consultada son escasos los estudios referidos a propiedades de matrices de quitosano sometidas a curado (Balau y col., 2004; Toffey y Glasser, 1998; 2001). Asimismo no se encontraron trabajos en relación al tratamiento térmico de las mismas con agregado de ácido tánico en la formulación.

En este contexto, los objetivos planteados fueron:

- ❖ Determinar las condiciones óptimas (tiempo-temperatura) de curado de películas a base de quitosano con y sin agregado de agente entrecruzante en base al estudio de las propiedades de las matrices tratadas.
- ❖ Estudiar los cambios morfológicos y microestructurales de las películas inducidos por el proceso de curado. Asimismo, analizar la estabilidad térmica, las propiedades de barrera, la solubilidad y el hinchamiento de las películas.

*Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado***5.2 MATERIALES**

Para el desarrollo de las películas se utilizó un quitosano comercial SIGMA con un grado de desacetilación del 75% caracterizado previamente en el Capítulo 1.

Como agente entrecruzante se utilizó ácido tánico (AT) de grado analítico, proporcionado por Anedra (Buenos Aires, Argentina), en una concentración de 40 mg AT/g quitosano, previamente seleccionada en el Capítulo 4.

5.3 MÉTODOS**5.3.1 Preparación y condiciones de curado de las películas**

Las películas de quitosano con y sin agregado de ácido tánico se prepararon de acuerdo con el protocolo descrito en los Capítulos 2 y 4. Una vez obtenidas se removieron de las placas de moldeo y posteriormente se realizó el tratamiento térmico de curado bajo distintas condiciones (tiempo-temperatura).

Las temperaturas y los tiempos de curado ensayados fueron 100, 160 y 180°C y 15, 30 y 60 minutos, respectivamente. Las propiedades de las películas se estudiaron una vez que las mismas alcanzaron el estado estacionario. Para ello, las muestras se acondicionaron a 20°C y 65% de HR. El estado estacionario se definió como aquel en el que las películas no experimentaron cambios detectables en el tiempo a través del estudio de las propiedades microestructurales (ANEXO A).

Se siguió la misma nomenclatura utilizada en el Capítulo 4: Q, para las películas de quitosano y QAT para las películas formuladas con ácido tánico, las cuales fueron usados como controles. Mientras que en la nomenclatura de las matrices curadas, la condición de tiempo y temperatura de tratamiento se indicó en cada caso.

5.3.2 Propiedades fisicoquímicas y de barrera**5.3.2.1 Contenido de humedad de las películas y propiedades ópticas**

El contenido de humedad y los parámetros de color de las películas se determinaron de acuerdo a la metodología descrita en los Capítulos 2 y 3.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

También se evaluaron las propiedades de barrera al UV-Visible de las matrices desarrolladas, registrándose el espectro de absorción en el rango 200-700nm en un espectrofotómetro Hitachi U1900 (Japón), empleando cubetas de cuarzo.

5.3.2.2 Solubilidad y capacidad de hinchamiento de las películas

Para determinar la solubilidad y la capacidad de hinchamiento se cortaron muestras de 2 × 3 cm. En el caso de la solubilidad se siguió el protocolo descrito en el Capítulo 4. Para determinar la capacidad de hinchamiento las películas se sumergieron en agua destilada, se pesaron a tiempo *inicial* y luego de diferentes tiempos de hidratación (5, 15, 30 y 60 min), posteriormente se secaron con papel de filtro para remover el exceso de agua superficial. El hinchamiento (%) de las películas se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hinchamiento} = \left[\frac{(P_t - P_i)}{P_i} \right] \times 100 \quad \text{Ec. 5.1}$$

donde,

P_t es el peso de la muestra hidratada al tiempo t y P_i es el peso de la película a tiempo inicial. En todos los casos, las muestras se analizaron por triplicado.

5.3.2.3 Goniometría-Método de ángulo de contacto

Las propiedades de superficie de un material dependen en gran medida de las especies químicas presentes en la misma. La medida del ángulo que forma la tangente del perfil de una gota de líquido sobre una superficie sólida, considerando que la gota se encuentra en reposo y equilibrio con dicho sólido, brinda información sobre la energía superficial del sustrato. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido, y de las fuerzas cohesivas del propio líquido. Cuando una fase líquida y una fase sólida entran en contacto, forman una interfase común.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

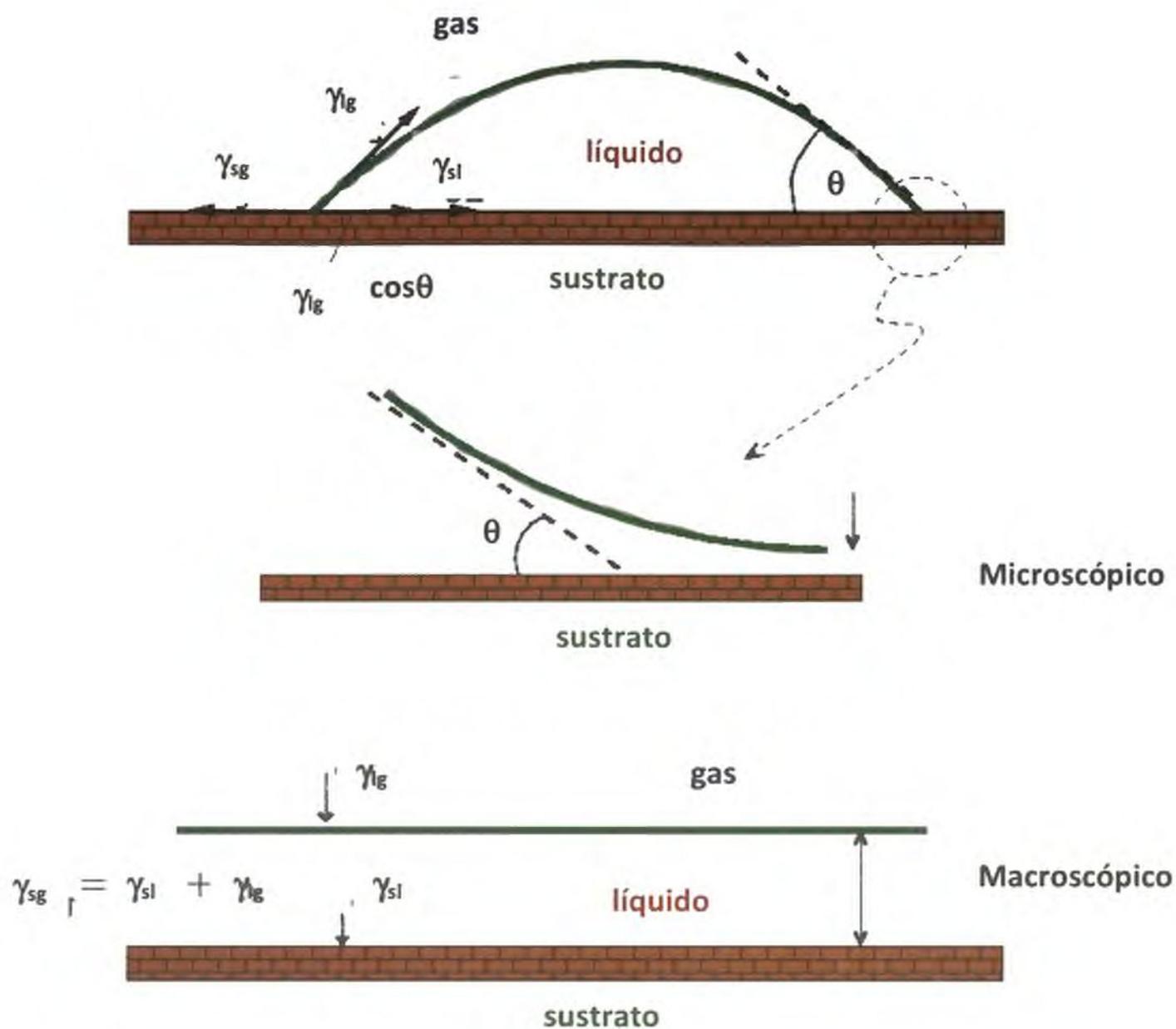


Figura 5.1 Esquema representativo del ángulo de contacto estático de una gota de agua sobre una superficie sólida plana, en contacto con una atmósfera gaseosa.

El ángulo de contacto a menudo se toma como parámetro indicativo de la humectabilidad o mojabilidad de la superficie de un material, es decir da idea de cómo interactúa el agua con la superficie. El perfil que adopta la gota es el resultado del balance entre las fuerzas de la superficie y de la interfase (Figura 5.1). El ángulo de contacto (θ) está relacionado con las tres tensiones γ_{sg} , γ_{sl} , γ_{lg} de las interfases sólido/gas, sólido/líquido y líquido/gas, respectivamente, a través de la ecuación de Young:

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cos \theta \quad \text{Ec. 5.2}$$

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

Por convención, cuando $\theta < 90^\circ$ (equivalente a $\gamma_{sg} > \gamma_{sl}$) se dice que el líquido humecta al sólido mientras que cuando $\theta > 90^\circ$ el líquido no lo humecta. Un caso extremo ocurre cuando θ se aproxima a cero, entonces el líquido se expande sobre el sólido y se dice que la humectación es perfecta.

5.3.2.4 Propiedades de barrera

La PVA se determinó de acuerdo al protocolo descrito en el Capítulo 2 y la permeabilidad al O_2 se midió como fue indicado en el Capítulo 4.

5.3.3 Estudio de las propiedades térmicas y espectroscópicas

Las metodologías usadas para evaluar las propiedades térmicas mediante DSC y DMA de las muestras fueron descritas en el Capítulo 2.

5.3.3.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

Es importante llevar a cabo estudios relacionados con las propiedades térmicas de los polímeros con el fin de conocer su estabilidad térmica y poder establecer su potencial aplicación en la industria de alimentos y farmacéutica dado que los materiales pueden ser sometidos a procesos que requieran tratamientos con calor durante su preparación, elaboración o consumo (Villetti y col., 2002).

El mayor número de aplicaciones de la termogravimetría durante los últimos años ha sido en el campo de la ciencia de los polímeros. Se trata de una técnica especialmente adecuada para estudiar los procesos de degradación de materiales a través de la identificación de los cambios que experimenta la muestra, evaluando la pérdida de masa de la muestra mediante un programa de temperaturas en una atmósfera controlada. El gráfico de pérdida de masa (%) en función de la temperatura se conoce como termograma o curva de descomposición térmica y proporciona información tanto cuantitativa como cualitativa.

Se utilizó un equipo Shimadzu DTG-60 (Japón), empleando alúmina como referencia en cápsulas de aluminio bajo atmósfera de nitrógeno (caudal 30 ml min^{-1}) para prevenir cualquier degradación termo-oxidativa. El calentamiento se realizó a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ desde temperatura ambiente hasta 550°C .

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado**5.3.3.2 Espectroscopía de difracción de rayos X y de infrarrojo**

Los patrones de difracción de rayos X y los espectros de FTIR de las películas de quitosano con o sin ácido tánico curadas en diferentes condiciones (tiempo-temperatura) se obtuvieron como se describió en el Capítulo 1.

A partir de los espectros de FTIR obtenidos se calculó el grado de desacetilación (DD) de las muestras luego del proceso de curado, empleando la Ec. 1.13.

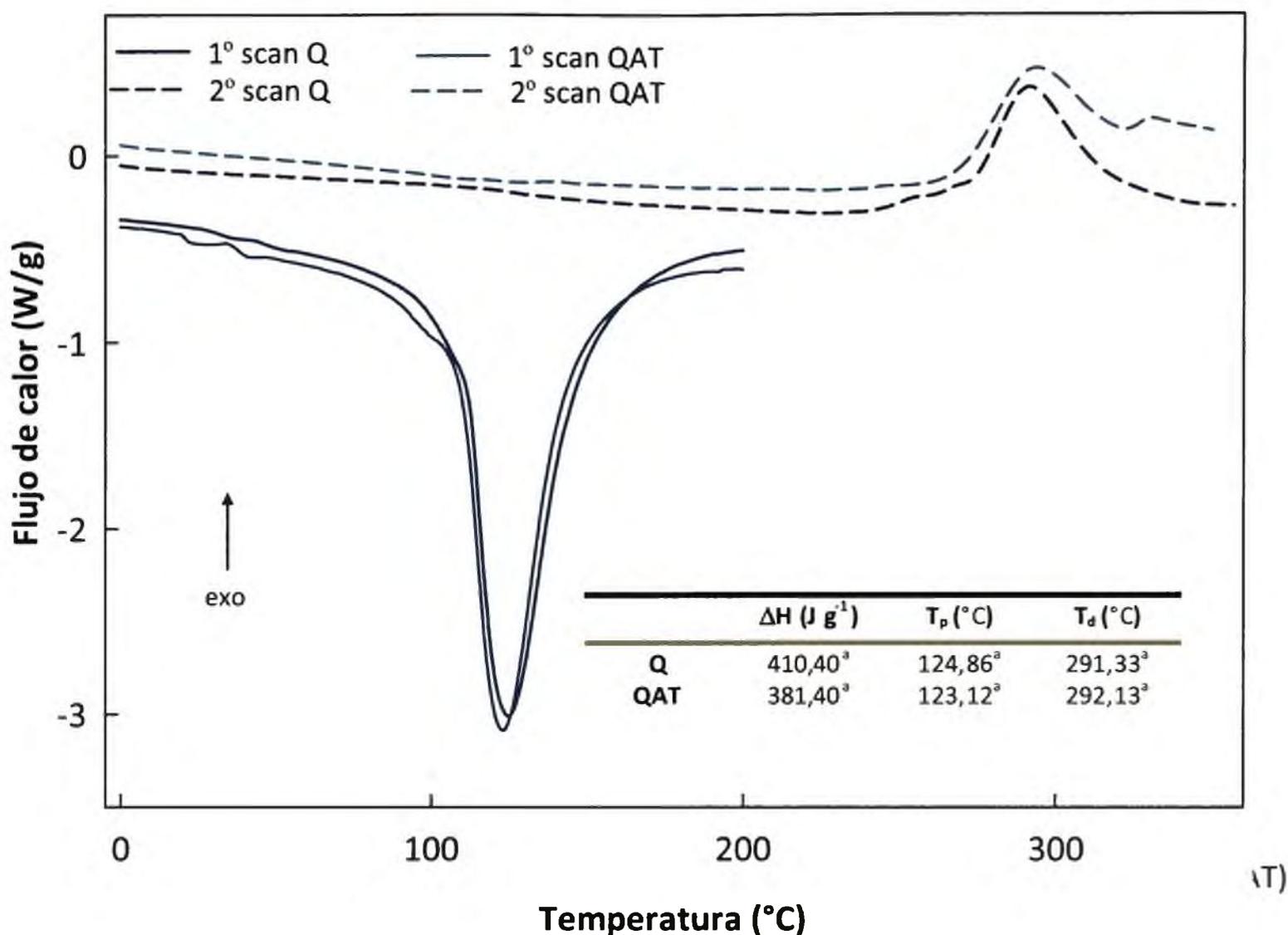
5.3.4 Estudio de las propiedades morfológicas y microestructurales por microscopía

La morfología de las películas curadas se estudió por SEM y TEM, tal como se detalló en los Capítulos 2 y 4.

5.4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**5.4.1 Propiedades de las matrices a base de quitosano luego del proceso de curado****5.4.1.1 Propiedades térmicas de los materiales**

La Figura 5.2 muestra los termogramas obtenidos por DSC correspondientes a la primera y segunda corrida para películas de quitosano. En la primera corrida se observó un pico endotérmico localizado a 125°C atribuido a la pérdida de la humedad residual de las películas de Q. Toffey y col. (1996) y Lim y Wan (1995) encontraron resultados similares. Por otro lado, la temperatura de descomposición de las películas se estimó a partir del evento exotérmico observado a partir de la segunda corrida, con una temperatura máxima alrededor de 291°C. Martínez-Camacho y col. (2010) y Zawadzki y Kaczmarek (2010) informaron resultados comparables para la temperatura de descomposición del quitosano determinada por análisis termogravimétricos.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado



Con el agregado de ácido tánico no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los eventos térmicos mencionados anteriormente, (Figura 5.2).

El rango de temperaturas de curado de las películas se seleccionó teniendo en cuenta las transiciones observadas por DSC y por DMA (descriptas en el Capítulo 2). La temperatura máxima de curado ($180^{\circ}C$) se eligió en base a la temperatura de degradación de las películas de quitosano, mientras que la temperatura mínima fue $100^{\circ}C$ tomando como referencia la T_g determinada en el Capítulo 2. Por consiguiente, las temperaturas seleccionadas para el proceso de curado fueron: 100 , 160 y $180^{\circ}C$. Estas condiciones fueron similares a las propuestas por Toffey y Glasser (1998), quienes trabajaron con temperaturas en el rango 80 - $190^{\circ}C$ para el proceso de curado de películas de Q. Asimismo, Balau y col. (2004) también analizaron el efecto del tratamiento de curado a $180^{\circ}C$ durante 30 min sobre las propiedades de películas a base de quitosano.

*Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado***5.4.1.2 Análisis termogravimétricos**

La Figura 5.3 muestra los termogramas obtenidos por TGA de las películas a base de Q. En general, la disminución inicial de peso registrada correspondiente a la primera etapa comprendida entre 25-160°C estuvo asociada a la pérdida de componentes de bajo peso molecular, principalmente agua unida y adsorbida en la estructura (Martucci y col., 2007), valores que se pueden correlacionar con el contenido de humedad de las películas. Las pérdidas correspondientes a la segunda etapa comprendida entre 160-400°C se debieron a procesos complejos como la deshidratación de los anillos del polisacárido, y a la descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas del quitosano (Peniche Covas y col., 1993; Neto y col., 2005).

En el caso de la muestra de QAT, si bien no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la temperatura máxima de descomposición (detectada a partir de la derivada de las curvas de pérdida de peso) en comparación con la película de Q, se observó un menor porcentaje de pérdida de peso en la segunda etapa (Tabla 5.1). Aelenei y col. (2009) señalaron que el Q forma un complejo estable con el AT; asimismo los autores explicaron que la segunda etapa también puede atribuirse a la descomposición parcial del ácido tánico en ácido gálico o dímeros del ácido gálico. Peña y col (2010) ensayaron distintas concentraciones de taninos en matrices de gelatina y obtuvieron un aumento de la masa residual con la concentración de taninos, lo que podría explicar el mayor valor obtenido para las películas QAT. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta que las altas temperaturas pueden promover reacciones de entrecruzamiento entre grupos hidroxilo y carboxilos del ácido formados por la escisión de la cadena polifenólica, como en el caso de poliamidas (Martucci y col., 2007). En el caso de las películas curadas los resultados revelaron que con el tratamiento térmico se formaron estructuras más estables que explicarían el aumento en la temperatura máxima de descomposición y el mayor % de masa remanente. Zawadzki y Kaczmarek (2010) atribuyen resultados similares a la formación de un retículo entrecruzado más estables que las cadenas poliméricas lineales.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

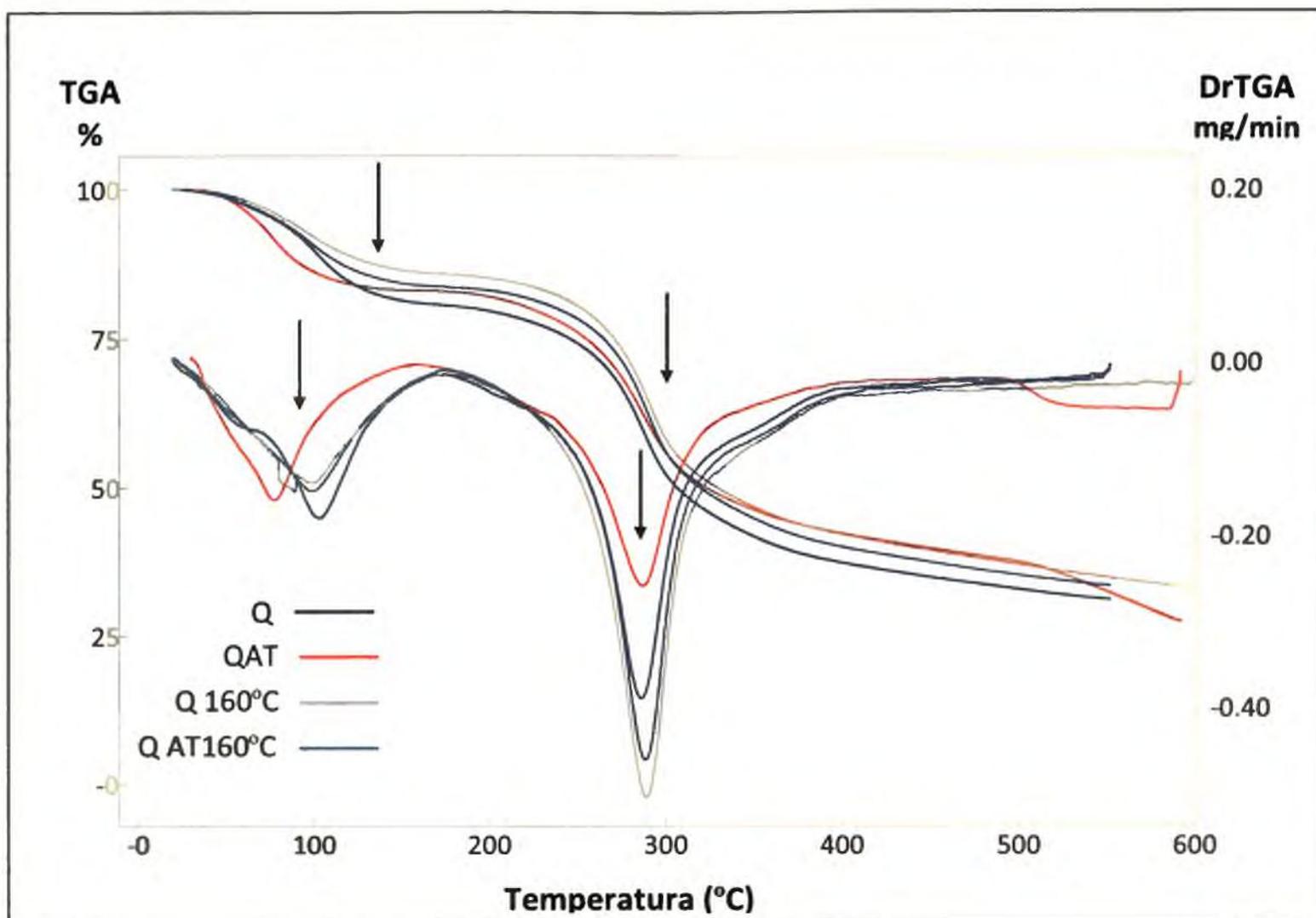


Figura 5.3 Termogramas obtenidos por TGA de películas de Q, QAT, y de matrices curadas a 160°C durante 30 min.

Tabla 5.1. Efecto del agregado de AT y del tratamiento de curado en la pérdida de masa % de películas a base de quitosano empleando TGA

	Etapa I		Etapa II		
	T _{max}	% Pérdida de masa	T _{max}	% Pérdida de masa	% Masa residual a 550°C
Q	96,4 ^a	19,35 ^a	284,8 ^a	43,47 ^a	31,03 ^a
QAT	77,9 ^b	17,22 ^b	284,3 ^a	40,68 ^b	32,34 ^b
Q 160°C	93,3 ^a	14,13 ^c	287,5 ^b	43,82 ^a	34,76 ^c
QAT 160°C	93,0 ^a	15,15 ^c	287,4 ^b	43,83 ^a	34,50 ^c

^o Los valores informados corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05).

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

5.4.1.3 Análisis dinámico mecánico

La técnica de DMA también es apropiada para estimar la T_g debido a la sensibilidad que posee para detectar transiciones que ocurren en el material. Los ensayos permitieron observar la T_g de materiales termoestables entrecruzados, revelando el efecto producido por el proceso de curado en el módulo de almacenamiento y en las relajaciones de las curvas de $\tan \delta$. Para el conocimiento y caracterización de un material termoestable es conveniente conocer la T_g , sobre todo teniendo en cuenta que ésta depende del grado de curado del material. A mayor extensión del proceso de curado, mayor será la temperatura de transición vítrea. Cuando las películas de Q se analizaron por DMA, se observaron dos relajaciones con el aumento de la temperatura, β y α , localizadas a -10 y 100°C , respectivamente. Con el aumento de la temperatura de curado la T_g se desplazó a valores mayores (Figura 5.4). Este fenómeno es consistente con el comportamiento de los polímeros termoestables sometidos a curado (Toffey y col., 1996).

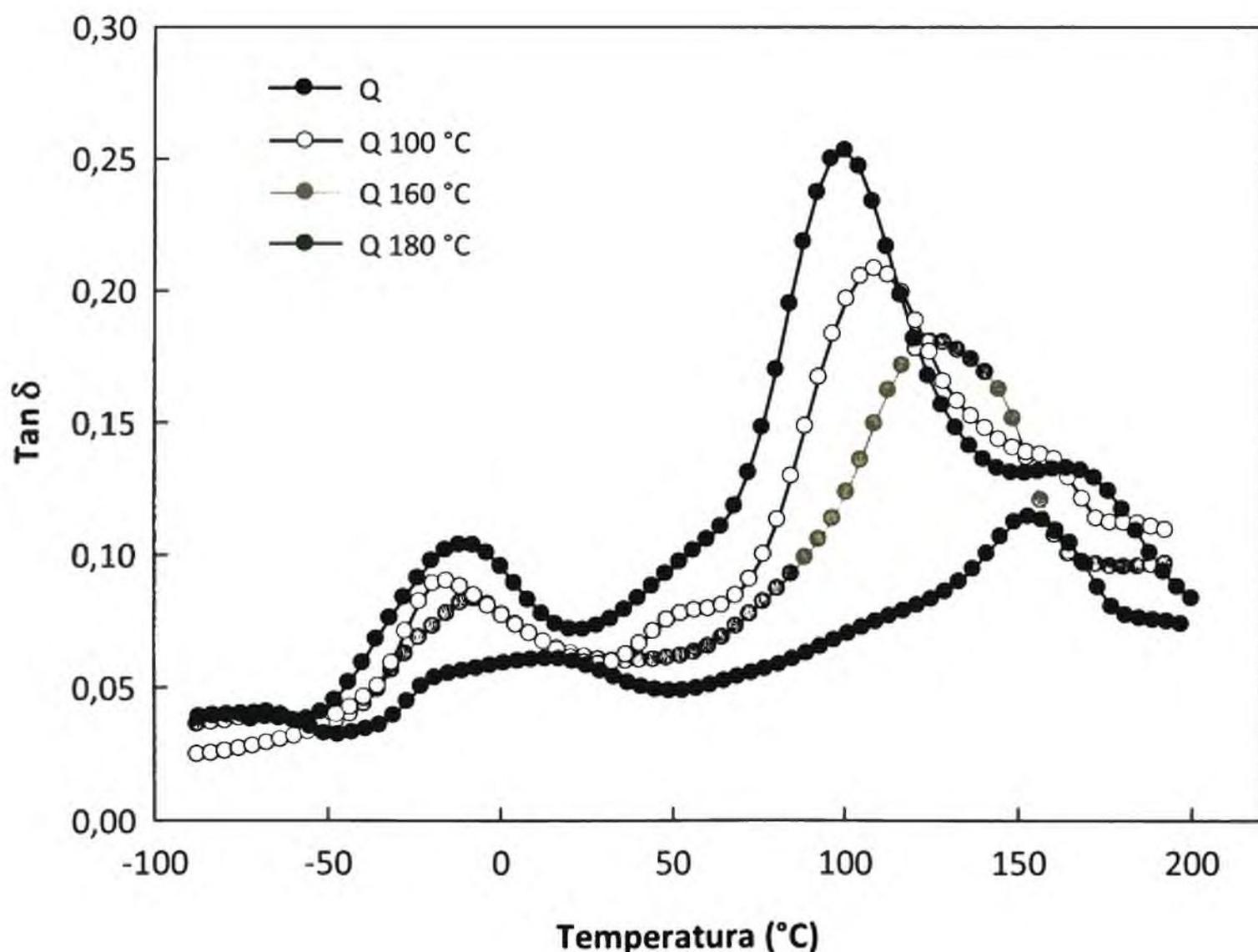


Figura 5.4 Efecto de la temperatura de curado sobre el espectro dinámico mecánico de películas de Q curadas durante 30 min.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

Asimismo, como puede observarse en la Figura 5.4 los picos de la $\text{Tan } \delta$ fueron progresivamente más anchos y menos intensos. Toffey y col. (1996) informaron una tendencia similar para películas de acetato de quitosano curadas a diferentes temperaturas. El desplazamiento de la T_g con la temperatura se observó hasta un tiempo de curado de 30 min. Para tratamientos más extensos el valor de T_g se mantuvo constante lo que podría indicar que el proceso se desarrolló por completo en ese lapso de tiempo (Figura 5.5).

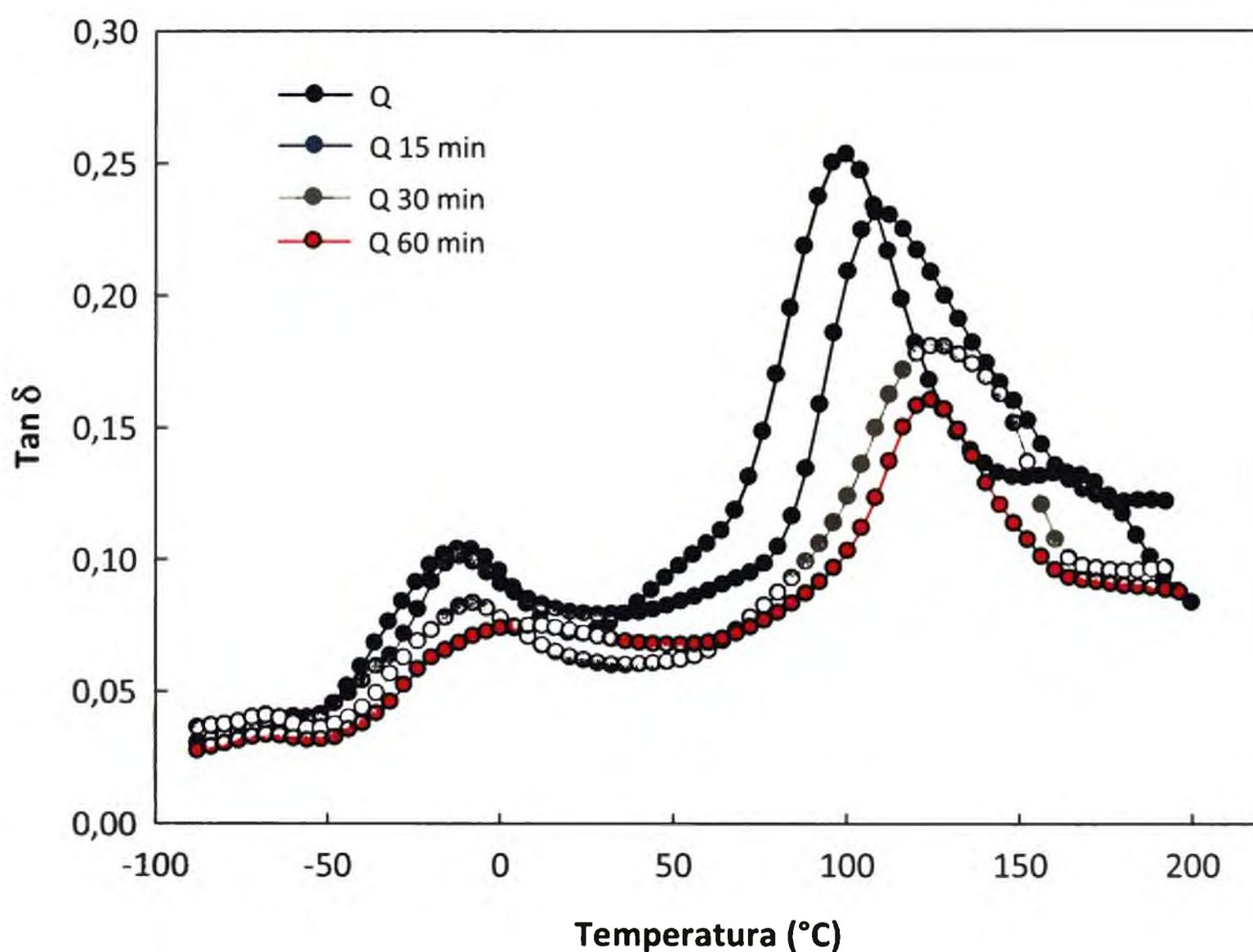


Figura 5.5 Efecto del tiempo de curado sobre el espectro dinámico mecánico de películas de Q curadas a 160°C.

En el caso de las películas QAT, las relajación β y α se localizaron a -5 y 120°C, respectivamente. Comparando la Figura 5.4 y 5.6 se puede observar que la transición resultó más definida en las películas de Q que en las entrecruzadas con ácido tánico. Asimismo, la incorporación de AT en la formulación produjo un corrimiento de la T_g hacia valores mayores. En el mismo sentido, Krumova y col. (2000) encontraron que el

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

entrecruzamiento de películas de polivinilalcohol con hexametilen-diisocianato aumentó la T_g , siendo este efecto dependiente de la concentración de agente entrecruzante. Además, Peña y col. (2010) trabajando con matrices de gelatina encontraron que la adición de taninos generó un aumento de la T_g , atribuyendo este hecho a las interacciones, principalmente por puente de hidrógeno.

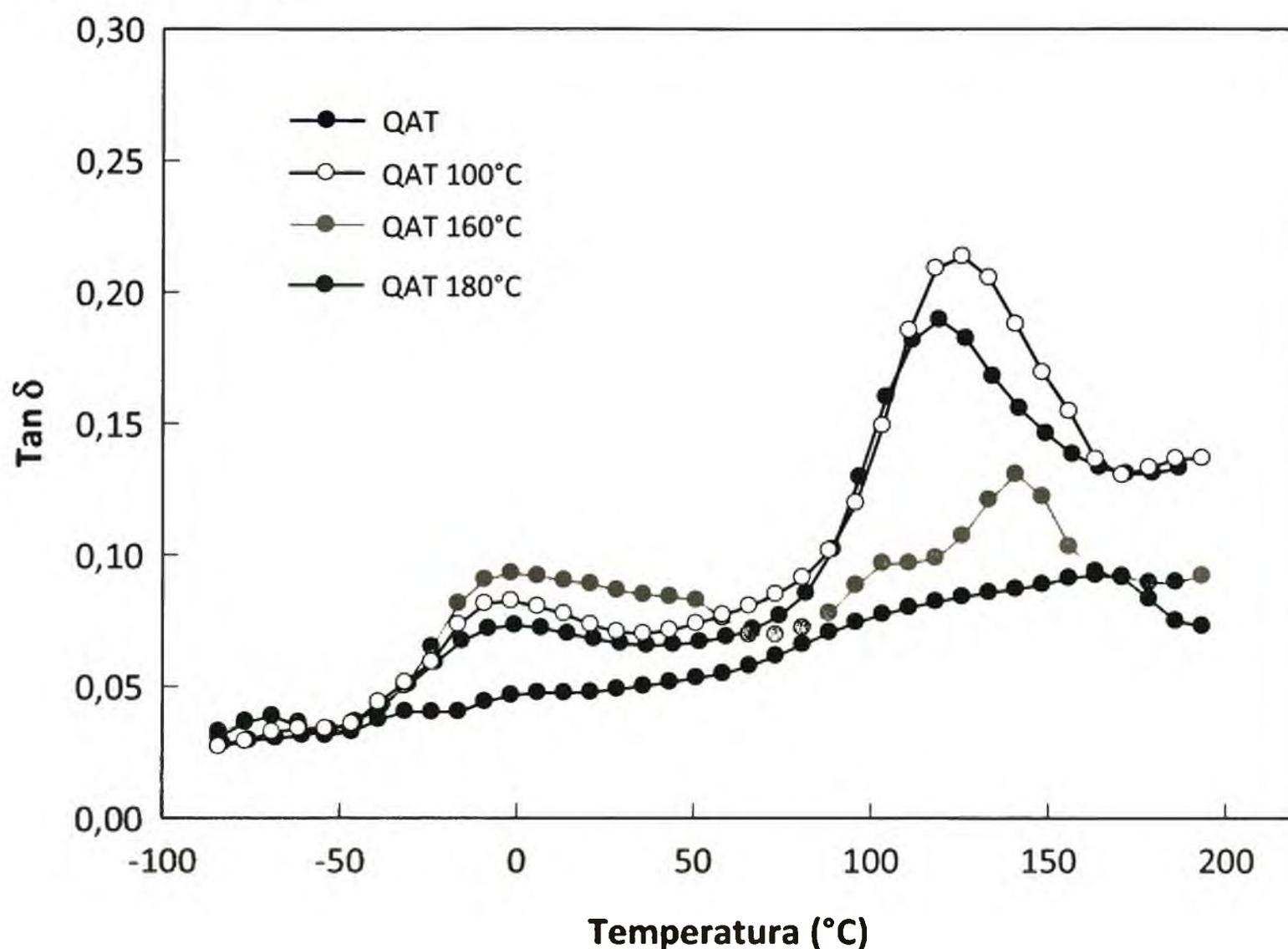


Figura 5.6 Efecto de la temperatura de curado sobre el espectro dinámico mecánico de películas de QAT curadas durante 30 min.

Independientemente de las condiciones de curado, se observó un efecto marcado del AT evidenciado a través de las señales asociadas a las relajaciones del material, las cuales fueron menos definidas (Figura 5.6 y 5.7). Esto podría explicarse considerando la restricción de los movimientos de las cadenas laterales debido al aumento de la densidad de la matriz entrecruzada (Krumova y col., 2000).

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

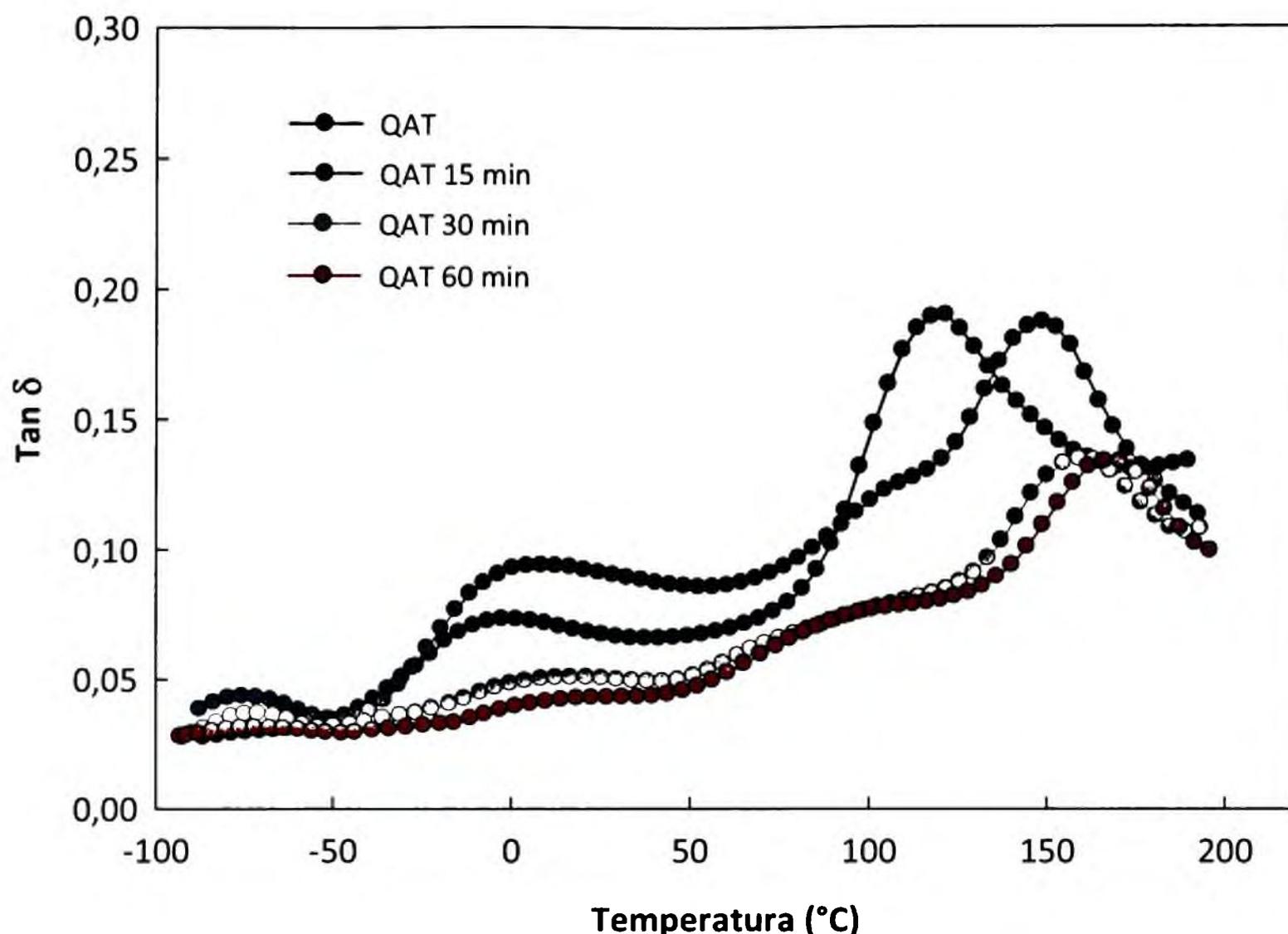


Figura 5.7 Efecto del tiempo de curado sobre el espectro dinámico mecánico de películas de QAT curadas a 160°C.

5.4.1.4 Propiedades fisicoquímicas y de barrera

Con el fin de evaluar el efecto producido por el tratamiento térmico de las películas, se determinó la permeabilidad al O₂ para la condición de 160°C-30 min. Se observó que el curado de las películas de Q no modificó significativamente ($p > 0,05$) los valores de permeabilidad respecto a los obtenidos para el control ya informados en el Capítulo 4, siendo de $6,07 \cdot 10^{-13}$ y $5,74 \cdot 10^{-13}$ ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), respectivamente. En el mismo sentido, el curado de las películas de QAT no modificó significativamente ($p > 0,05$) los valores de permeabilidad en comparación con las películas control QAT.

La Tabla 5.2 muestra las propiedades fisicoquímicas y de barrera al vapor de agua de películas a base de quitosano sin tratar y curadas a diferentes temperaturas durante 30 min. El agregado de AT así como el tratamiento térmico de las películas mejoró las propiedades de barrera, obteniéndose los valores más bajos de PVA a una temperatura de curado de 180°C para formulaciones que incluían AT. El valor de PVA para estas matrices mostró una

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

reducción del 62% respecto al control QAT, mientras que el tratamiento térmico de las películas de Q disminuyó los valores de PVA un 55% respecto a las películas sin tratar. El curado redujo el contenido de humedad de las películas, independientemente de su formulación, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras tratadas a 160 y 180°C (Tabla 5.2).

Por otro lado, los contenidos de humedad de las películas de Q y QAT se redujeron en promedio un 22,5% y 25,4%, respectivamente, luego del curado a 180°C tal como se muestra en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Efecto del tratamiento de curado a distintas temperaturas durante 30 min sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas de quitosano con y sin agregado de ácido tánico.

Temperatura de curado	Composición de las películas	Humedad (g agua/ 100 g película)	PVA $\times 10^{11}$ (g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)	Hinchamiento (%)
Sin tratamiento	Q	17,37 (0,80) ^a	10,82 (0,42) ^a	487,63 (23,12) ^a
	QAT	17,53 (0,39) ^a	9,41 (0,34) ^b	641,93 (25,10) ^b
100°C	Q	18,26 (0,48) ^a	5,86 (0,40) ^c	385,96 (18,76) ^c
	QAT	17,00 (0,87) ^a	5,67 (0,58) ^c	418,16 (22,81) ^c
160°C	Q	13,64 (0,39) ^b	5,49 (0,66) ^c	226,53 (11,71) ^d
	QAT	13,85 (0,71) ^b	5,09 (0,48) ^c	148,27 (3,36) ^e
180°C	Q	13,45 (0,10) ^b	5,70 (0,44) ^c	152,96 (3,26) ^e
	QAT	13,08 (0,59) ^b	3,57 (0,04) ^d	126,34 (7,88) ^e

* Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

Los valores de capacidad de hinchamiento (%) de las matrices desarrolladas en agua destilada se muestran en la Tabla 5.2. Las películas QAT exhibieron un valor más alto que las

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

de Q debido a su mayor capacidad para retener las moléculas de agua a través de enlaces puente de hidrógeno. Sin embargo, las películas sometidas a un tratamiento térmico evidenciaron una absorción de agua significativamente más baja ($p < 0,05$) que las muestras sin tratar (Tabla 5.2). El análisis de los resultados obtenidos para las películas curadas indicó que las matrices tratadas a 100°C mostraron los valores más altos de hinchamiento. Además, las muestras curadas a 160 y 180°C presentaron una menor capacidad de absorción de agua, exhibiendo las de QAT curadas los valores más bajos (Tabla 5.2). Resultados similares fueron informados por Ghosh y col. (2009) y por Kim y col. (2002) para películas a base de proteínas de caseína y de soja, respectivamente.

Fernández-Saiz y col. (2009) señalaron que las alteraciones moleculares que sufren las películas de quitosano con el tratamiento térmico a diferentes temperaturas generan materiales con una coloración más intensa y resistentes al agua. De acuerdo con Ritthidej y col. (2002) al aumentar la temperatura de curado se forman enlaces amidas con la posterior eliminación de agua y consecuente disminución de los grupos hidrofílicos disponibles.

Por otro parte, Murray y Dutcher (2006) trabajando con películas preparadas por disolución del quitosano en ácido acético al 5% encontraron que el tratamiento térmico entre 150 y 200°C causó una disminución del hinchamiento de la matriz y del grado de desacetilación (DD) del quitosano. Los resultados obtenidos sugieren que por acción de la temperatura se producirían cambios en la estructura, compatibles con la conversión del quitosano en un material con características similares a la quitina. Una explicación análoga fue propuesta por Toffey y Glasser (1998), quienes determinaron las propiedades de matrices a base de quitosano preparadas en ácido acético al 10% y posteriormente curadas a diferentes temperaturas. Resulta necesario resaltar que el presente trabajo la concentración de ácido acético utilizada para disolver el polvo de Q fue de 1,5%.

Por otro lado, tanto el entrecruzamiento como el curado de la matriz disminuyeron la solubilidad de las películas de Q en agua. El aumento de la temperatura de curado llevó a valores de solubilidad muy bajos, siendo en todos los casos inferiores al 3%. El comportamiento observado para las películas de QAT curadas podría explicarse teniendo en cuenta las consideraciones realizadas por Peña y col. (2010) cuando analizaron el efecto producido por los taninos en matrices de gelatina, previamente mencionadas.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

También se realizaron ensayos de solubilidad en HCl 0,3 M. Como era de esperar las películas control de Q se disolvieron por completo. Sin embargo, las muestras de QAT bajo las mismas condiciones sólo lo hicieron parcialmente, ya que se observaron fragmentos remanentes de película. Estos resultados nuevamente son indicativos de las interacciones establecidas entre el Q y el AT, demostrando su acción entrecruzante, y consistente con los resultados obtenidos por FTIR descritos en el Capítulo 4. Asimismo, también se observó que las películas curadas de Q y QAT inmersas en HCl sólo exhibieron una solubilidad parcial, conservando los fragmentos sus características estructurales, y observándose mayor tamaño en el caso de las películas QAT curadas (Figura 5.8). Los resultados de disolución en medio ácido son importantes ya que en aplicaciones farmacológicas como la liberación controlada de drogas las películas podrían proteger al componente activo incorporado.

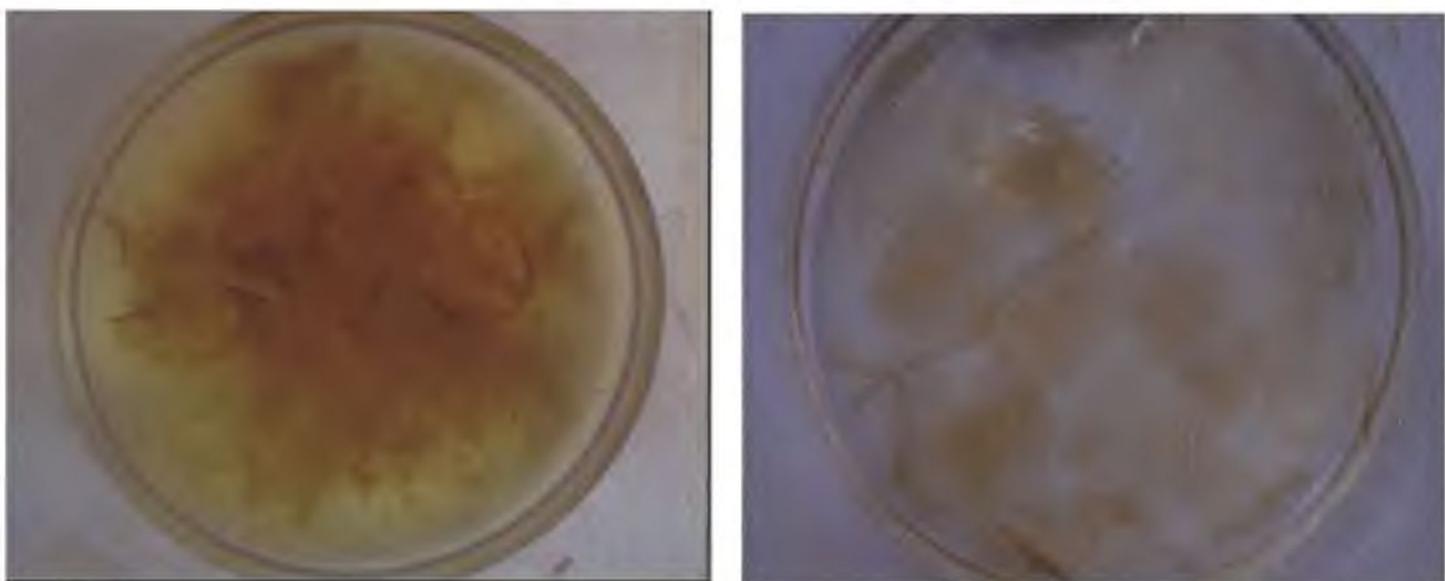


Figura 5.8 Fotografías correspondientes a películas de Q y QAT curadas a 160°C durante 30 min luego de 48 hs de inmersión en solución de HCl 0,3M.

Respecto a los atributos de color, el parámetro b^* asociado con el color amarillo de las películas, evidenció los cambios ocasionados por el tratamiento de curado. El mismo se intensificó con la temperatura; el valor b^* de las películas tratadas a 180°C duplicó los valores obtenidos para el tratamiento a 160°C y resultó diez veces mayor que los obtenidos para películas curadas a 100°C. Las fotografías que se observan en la Figura 5.9 evidencian los cambios mencionados.

De acuerdo con Martínez Urreaga y la de Orden (2006), el tratamiento de las películas a temperaturas superiores a 100°C causa la formación de nuevos cromóforos

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

ocasionando la intensificación del color amarillo de los materiales. Resultados similares fueron encontrados por Gennadios y col. (1996) en películas curadas a base de proteínas de soja.

Wongpanit y col. (2005) estudiaron las propiedades de derivados a base de quitosano y quitina curados por microondas y señalaron que con el aumento en la severidad de las condiciones de tratamiento las películas exhibieron un color más intenso. Los autores explicaron estos resultados considerando que la cadena principal de estos polisacáridos está constituida por unidades de glucosamina, y que el tratamiento térmico de la matriz así como la presencia de humedad en los materiales podría inducir reacciones de pardeamiento químico o reacciones de Maillard.

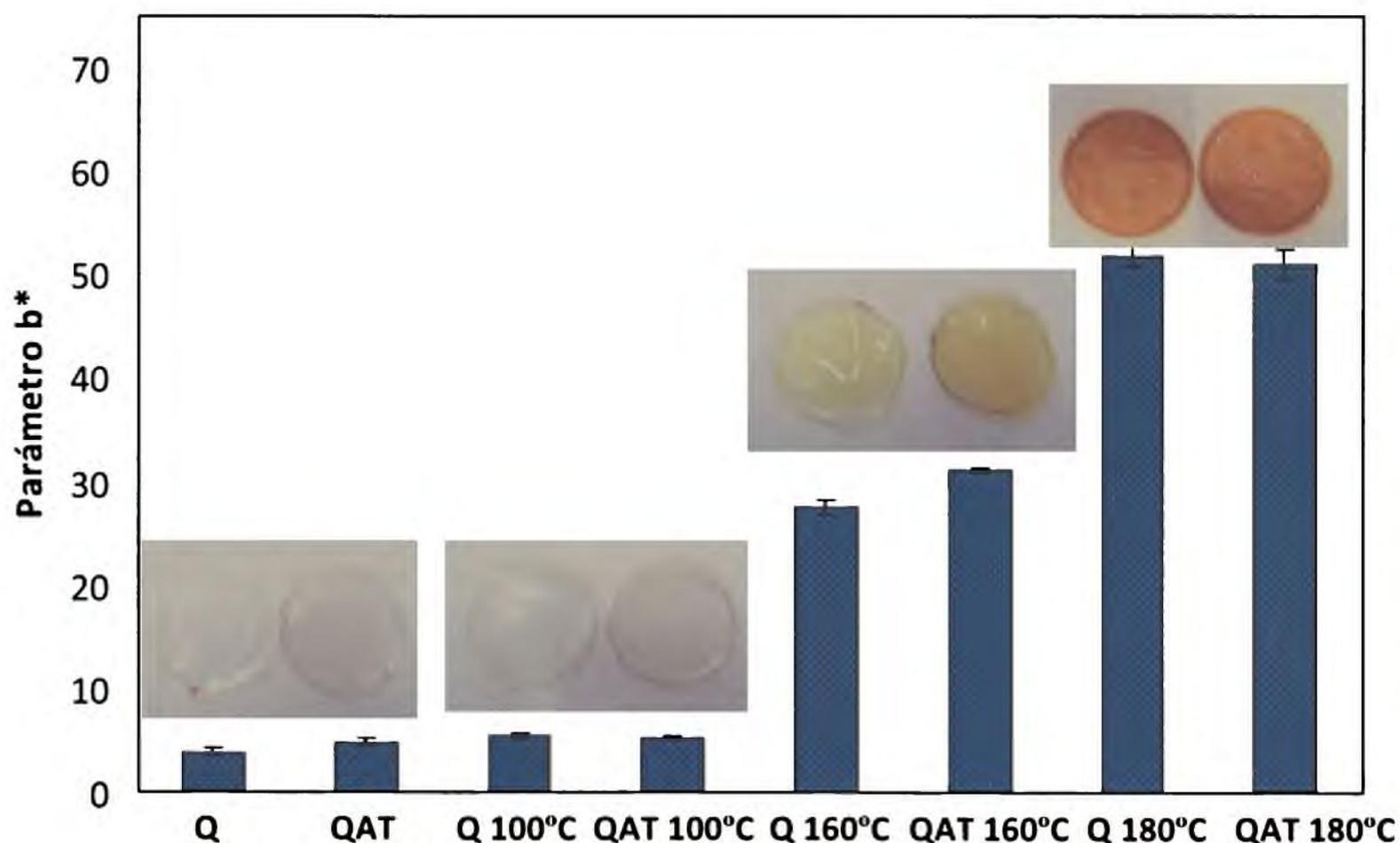
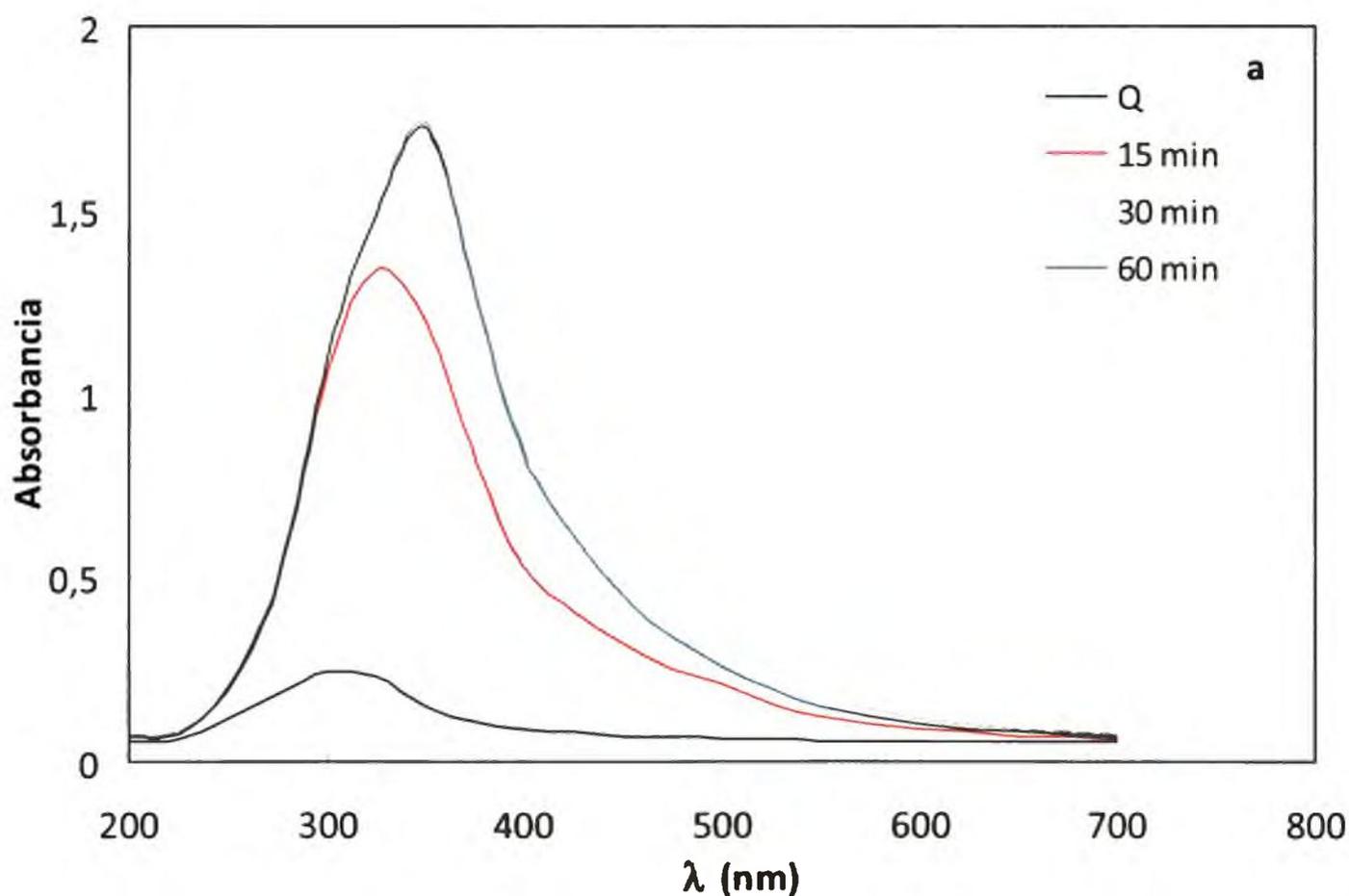


Figura 5.9 Parámetro de color b* determinados para películas de Q y QAT sometidas a diferentes condiciones de curado (tiempo-temperatura).

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

También se evaluó la capacidad de absorción de luz UV de las películas control y tratadas a 160°C durante diferentes tiempos, propiedad que resulta importante para definir las posibles aplicaciones de las mismas. En la Figura 5.10 se muestra el espectro en la región del UV-Visible. Todas las películas desarrolladas resultaron ser barreras a la luz UV ya que en las de Q se observó un pico de absorción a 300 nm, mientras que las de QAT presentaron un corrimiento del máximo a 325 nm, evidenciando interacciones entre ambos componentes de la matriz. Efectos similares fueron informados por Cao y col. (2007) y por Peña y col. (2010).

En las matrices curadas se observó un desplazamiento del máximo a 350 nm. Asimismo, se observó un notable aumento en la intensidad del pico de absorción con el tiempo de curado (Figura 5.10) hasta los 30 min, no presentándose diferencias en los espectros para tratamientos más prolongados. Martínez Urreaga y de la Orden (2006) analizaron los espectros de absorción de UV-Visible de películas compuestas por quitosano y celulosa tratadas térmicamente e informaron resultados similares.



Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

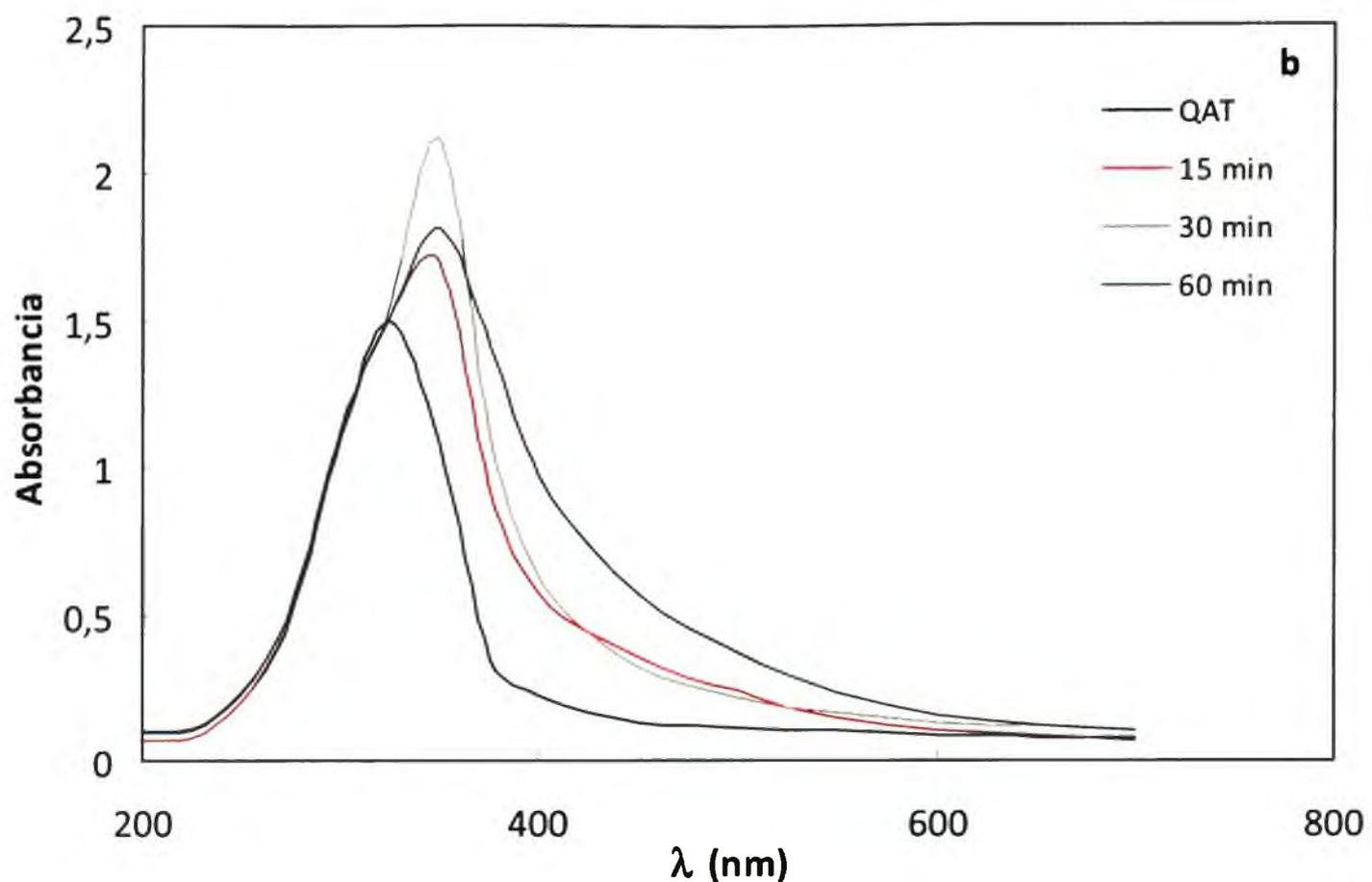


Figura 5.10 Espectro en la región del UV-Visible de películas de: (a) Q curadas y (b) QAT curadas, a 160°C en función del tiempo de curado.

En la Figura 5.11 se presentan los ángulos de contacto de las películas a base de quitosano, siendo para el Q control de 88,4. Almeida y col. (2010) informaron un ángulo de contacto de 95 y atribuyeron estos resultados a la hidrofobicidad de las cadenas de quitosano.

El ángulo de contacto de las películas QAT fue inferior a las de Q, estos resultados podrían atribuirse a la posible exposición de sitios hidrofílicos de las moléculas de AT en la superficie del material. Zhang y col. (2010) encontraron una tendencia similar para matrices de gelatina con AT y atribuyeron los menores valores de estos materiales a la naturaleza hidrofílica de los segmentos del AT. Por otra parte, las muestras curadas de Q y QAT presentaron los mayores valores de ángulo de contacto lo que sugiere que el entrecruzamiento por acción del tratamiento térmico jugó un rol significativo en la disminución de las características hidrofílicas de la superficie del material.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

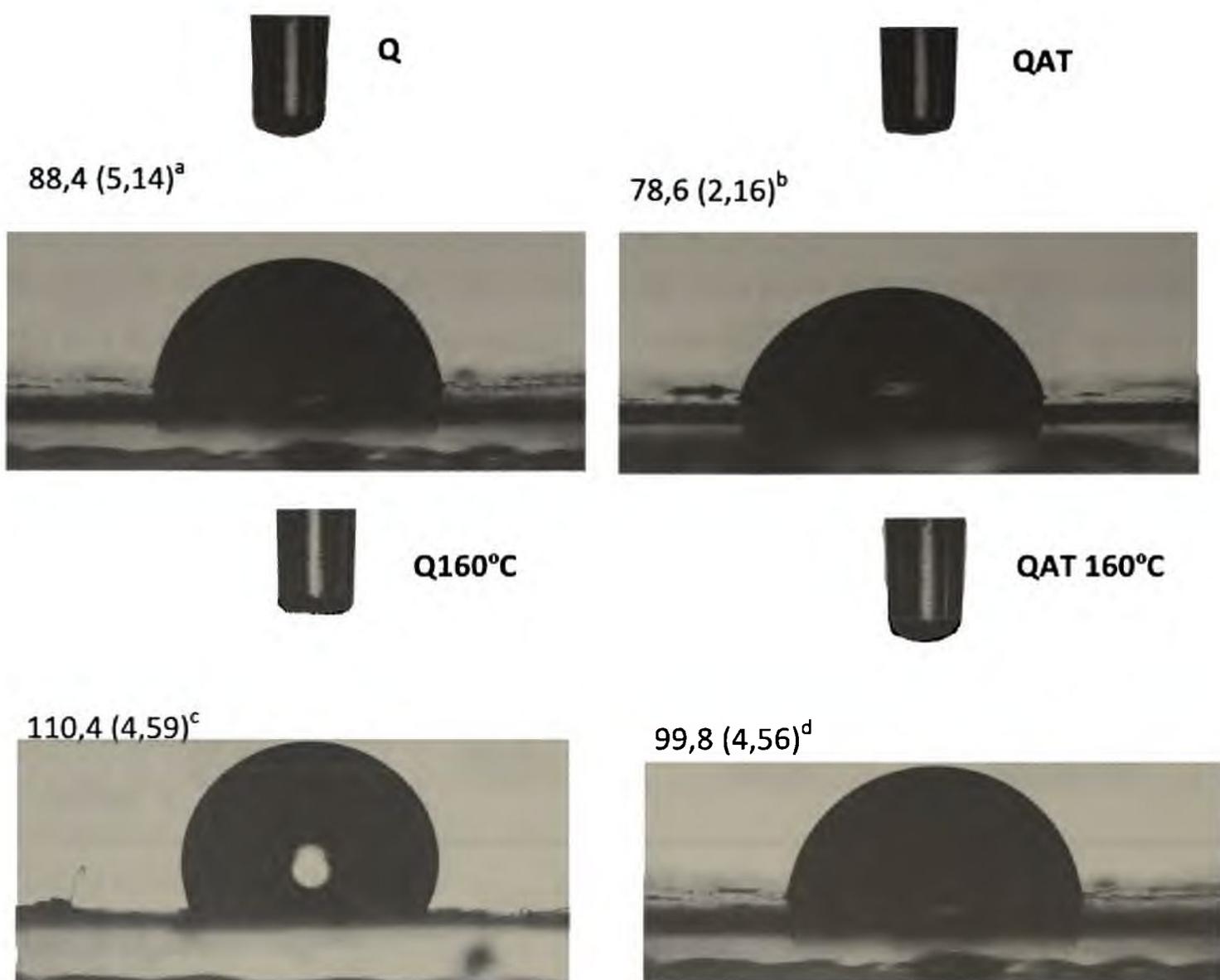


Figura 5.11 Medición del ángulo de contacto estático de una gota de agua en la superficie sólida de películas de Q y QAT y matrices curadas a 160°C durante 30 min. Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

5.4.1.5 Propiedades mecánicas

El agregado de AT en las formulación simultáneamente con el curado aumentó los valores de esfuerzo significativamente ($p < 0,05$) con el tiempo de tratamiento hasta los 30 min respecto de las películas de Q curadas, sin modificar la elongación del material. La Figura 5.12 muestra los valores de esfuerzo en función del tiempo de curado a 160°C para películas de Q y QAT. Se observó un aumento de la resistencia del material asociado al desarrollo de una matriz entrecruzada debido al tratamiento térmico. Como era de esperar, estos resultados siguieron la misma tendencia que los obtenidos por DMA. Los valores de elongación disminuyeron un 16% respecto de los controles (Q-QAT) para las películas curadas durante 30 min (Tabla 5.3). Sin embargo, la exposición a mayores tiempos de tratamiento no modificó significativamente los valores de elongación ($p > 0,05$).

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

En la Tabla 5.3 se presentan los parámetros obtenidos a partir de los perfiles mecánicos de las matrices analizadas, también se muestran los valores de E' a 20°C obtenidos a partir de los espectros mecánicos por DMA. Los valores del módulo elástico y de almacenamiento aumentaron con el agregado de AT y con el curado de la muestra, obteniéndose los valores más altos para las películas QAT curadas. Módulos elásticos del mismo orden fueron informados por Zhang y col. (2010) quienes determinaron el E' a 20°C obteniendo un valor de 2720 MPa para películas sólo de gelatina y de 3040 MPa para películas de gelatina con AT.

Tabla 5.3 Propiedades mecánicas de películas curadas a 160°C durante 30 min *

	Composición de las películas	Módulo elástico (MPa) ¹	Elongación (%) ¹	Módulo de almacenamiento E' (MPa) ²
Control/sin tratamiento	Q	20,37 (1,38) ^a	6,10 (0,04) ^a	2660,5 (6,36) ^a
	QAT	39,30 (2,29) ^b	6,02 (0,06) ^a	2771,0 (26,87) ^b
160°C	Q	45,93 (2,17) ^c	5,06 (0,44) ^b	3031,5 (40,31) ^c
	QAT	52,30 (2,72) ^d	5,16 (0,48) ^b	3694,5 (12,02) ^d

¹: Parámetros obtenidos de los ensayos de tensión realizados en texturómetro.

²: Parámetro obtenido a partir del espectro mecánico analizado por DMA a una temperatura de 20°C.

*: Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

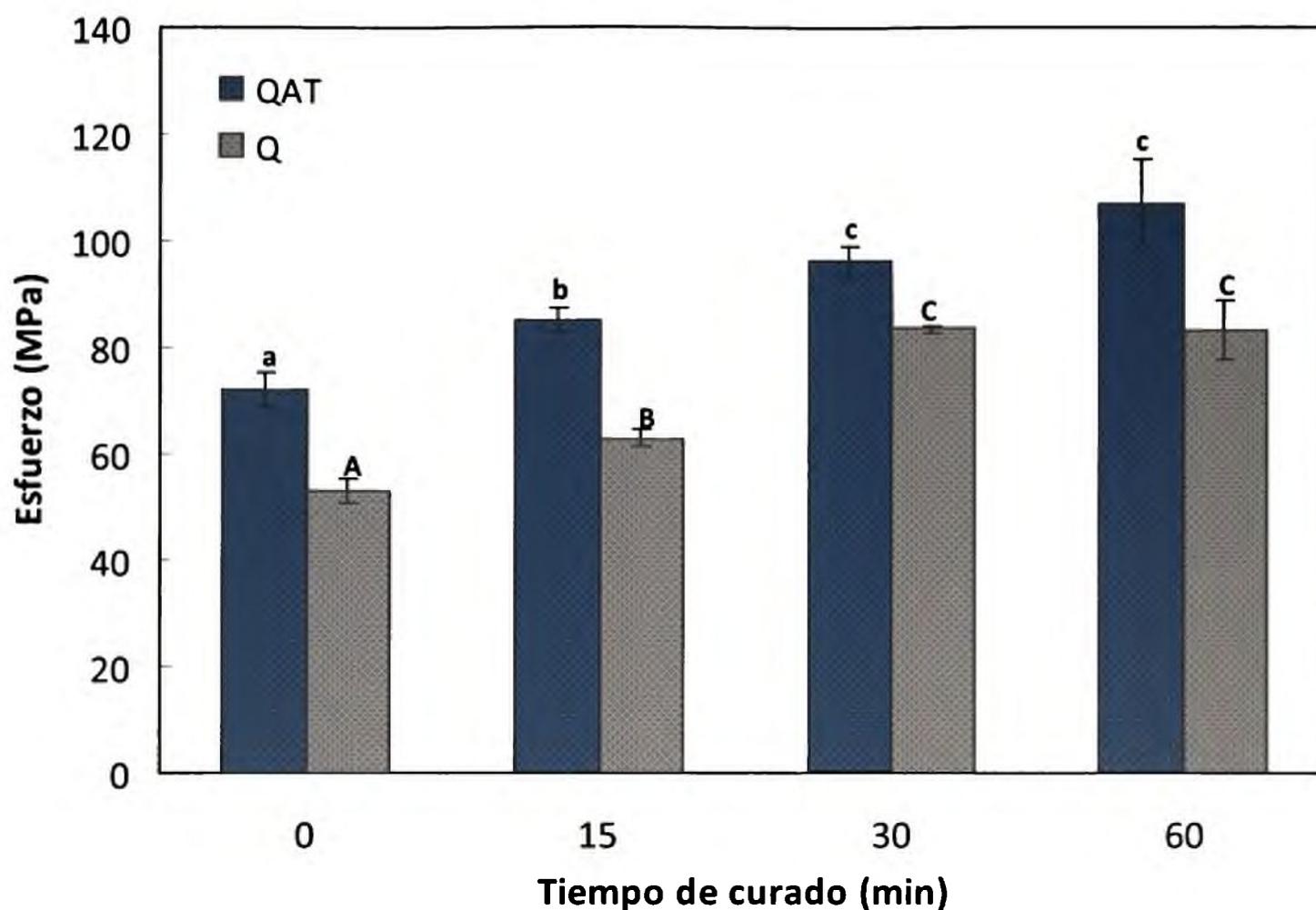


Figura 5.12 Propiedades mecánicas de películas de Q y de QAT curadas a 160°C durante diferentes tiempos de tratamiento. Letras distintas indican diferencia significativas para los distintos tiempos de tratamiento ($p < 0,05$)

5.4.1.6 Propiedades microestructurales y espectroscópicas

5.4.1.6.1 Observaciones microscópicas

La Figura 5.13 muestra las micrografías obtenidas por TEM y SEM. Como se ha descrito en el Capítulo 4 las películas de Q fueron homogéneas y presentaron una buena integridad estructural mientras que el agregado de AT evidenció una estructura de tipo irregular con *clusters* distribuidos al azar (Figura 5.13a y b). Sólomente con fines comparativos se muestran nuevamente las micrografías correspondientes a los controles.

Con el proceso de curado de las muestras se observó una estructura rugosa, con dominios distribuidos con cierta regularidad, formando bandas relativamente anchas (Figura 5.13c y d).

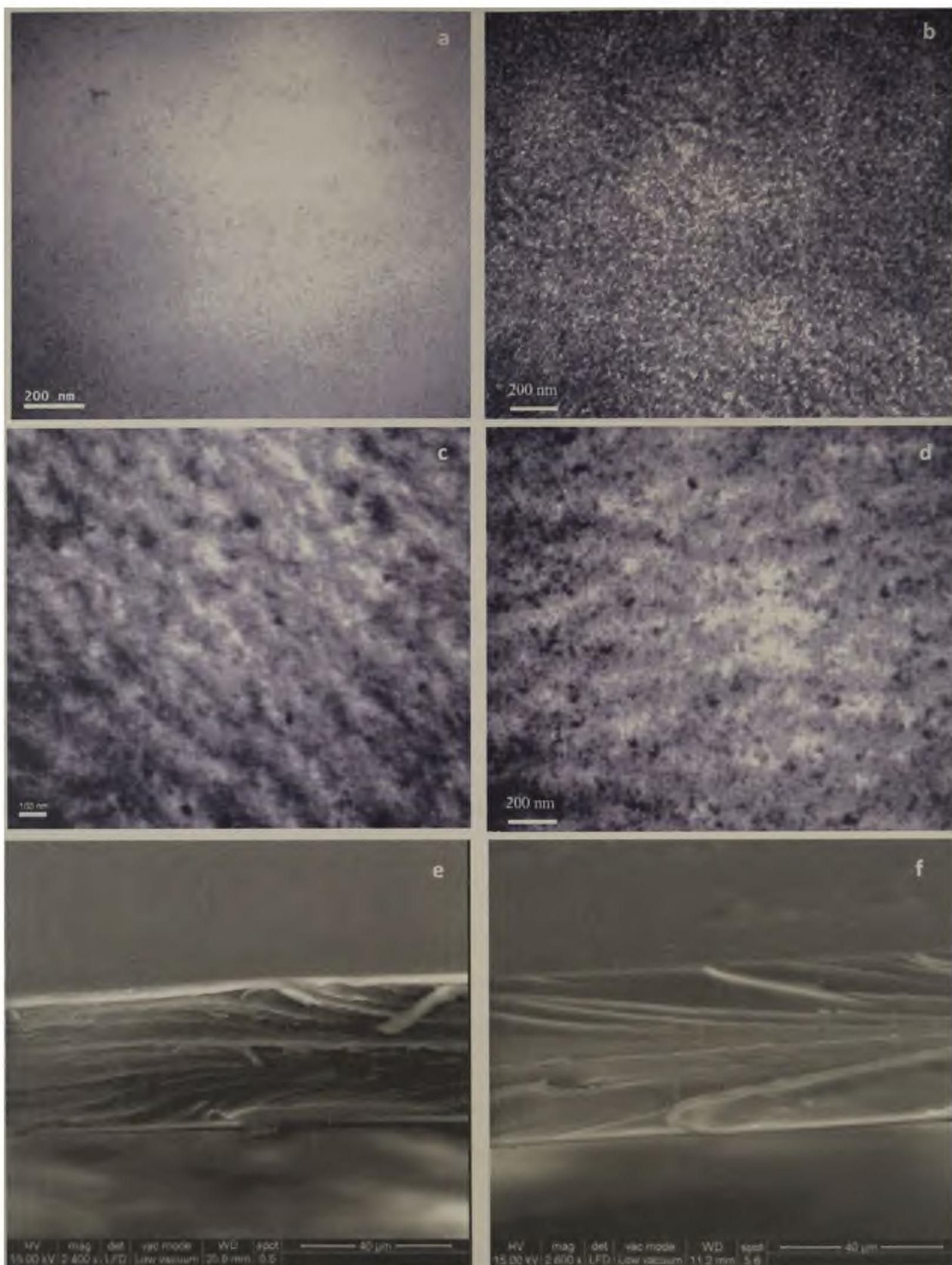
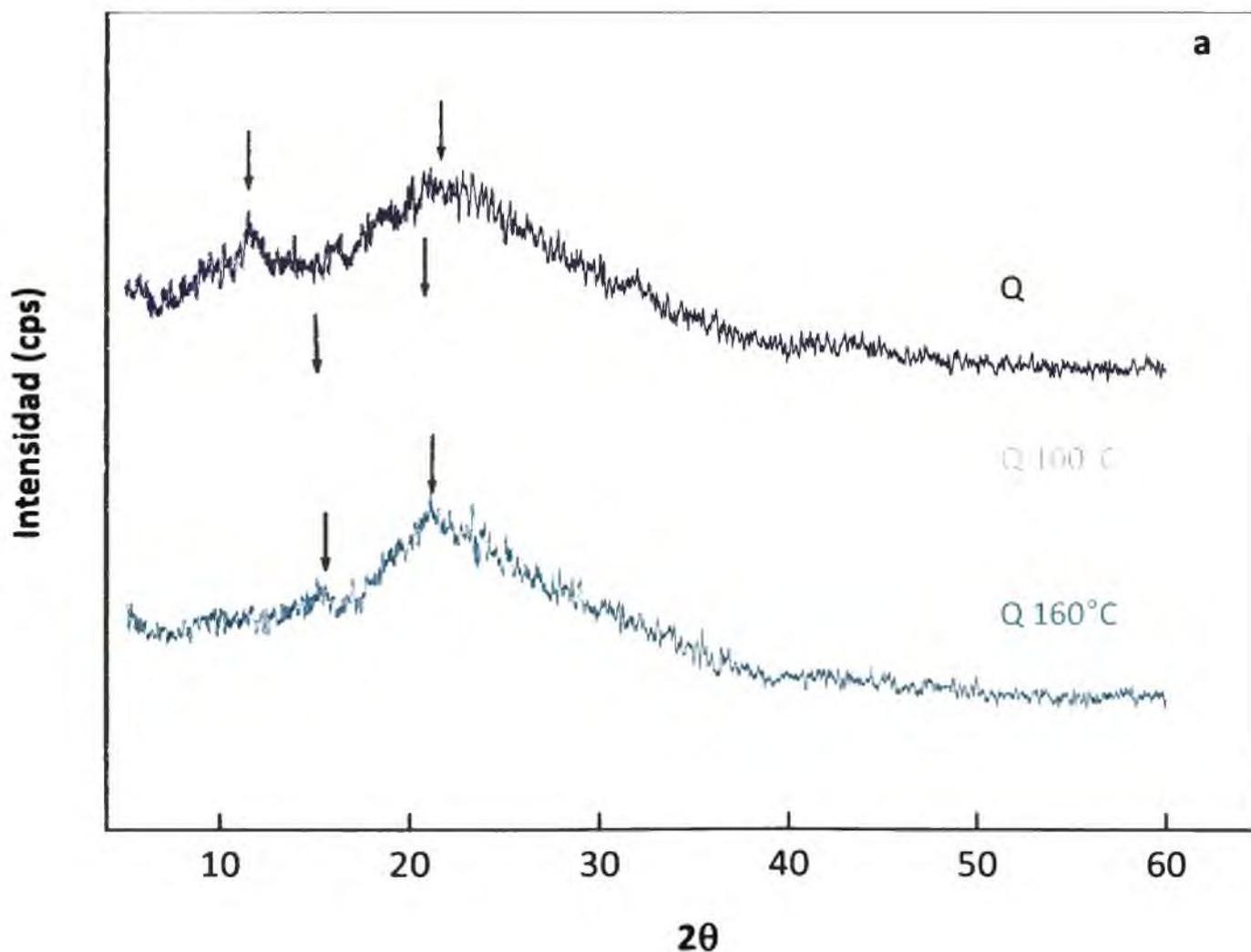
Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

Figura 5.13 Imágenes obtenidas por TEM de películas de: Q (a), QAT (b) y curadas Q160°C (c), QAT160°C (d). SEM de las películas Q (e) y QAT (f) tratadas a 160°C 30min

*Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado***5.4.1.6.2 Difracción de rayos X**

Los difractogramas obtenidos mediante análisis de rayos X de las películas de Q control (Figura 5.14a) mostraron dos picos característicos localizados a $2\theta = 11^\circ$ y 21° asociados a la conformación hidratada ("tendón") del quitosano, como ya se mencionó en el Capítulo 4. La adición de ácido tánico cambió el patrón hacia la conformación anhidra ("templada"), caracterizada por picos situados a $2\theta = 15^\circ$ y 21°

El curado de las películas de Q condujo a un cambio estructural similar al obtenido con el agregado del agente entrecruzante, independientemente de la temperatura utilizada (Figura 5.14a). Los difractogramas de las películas QAT tratadas a distintas temperaturas mostraron la desaparición del pico localizado a $2\theta = 15^\circ$ (Figura 5.14b). Estos resultados evidenciaron nuevamente el efecto sinérgico de ambos tratamientos. Una tendencia similar fue informada por Toffey y Glasser (1998), trabajando con películas de acetato de quitosano curadas.



Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

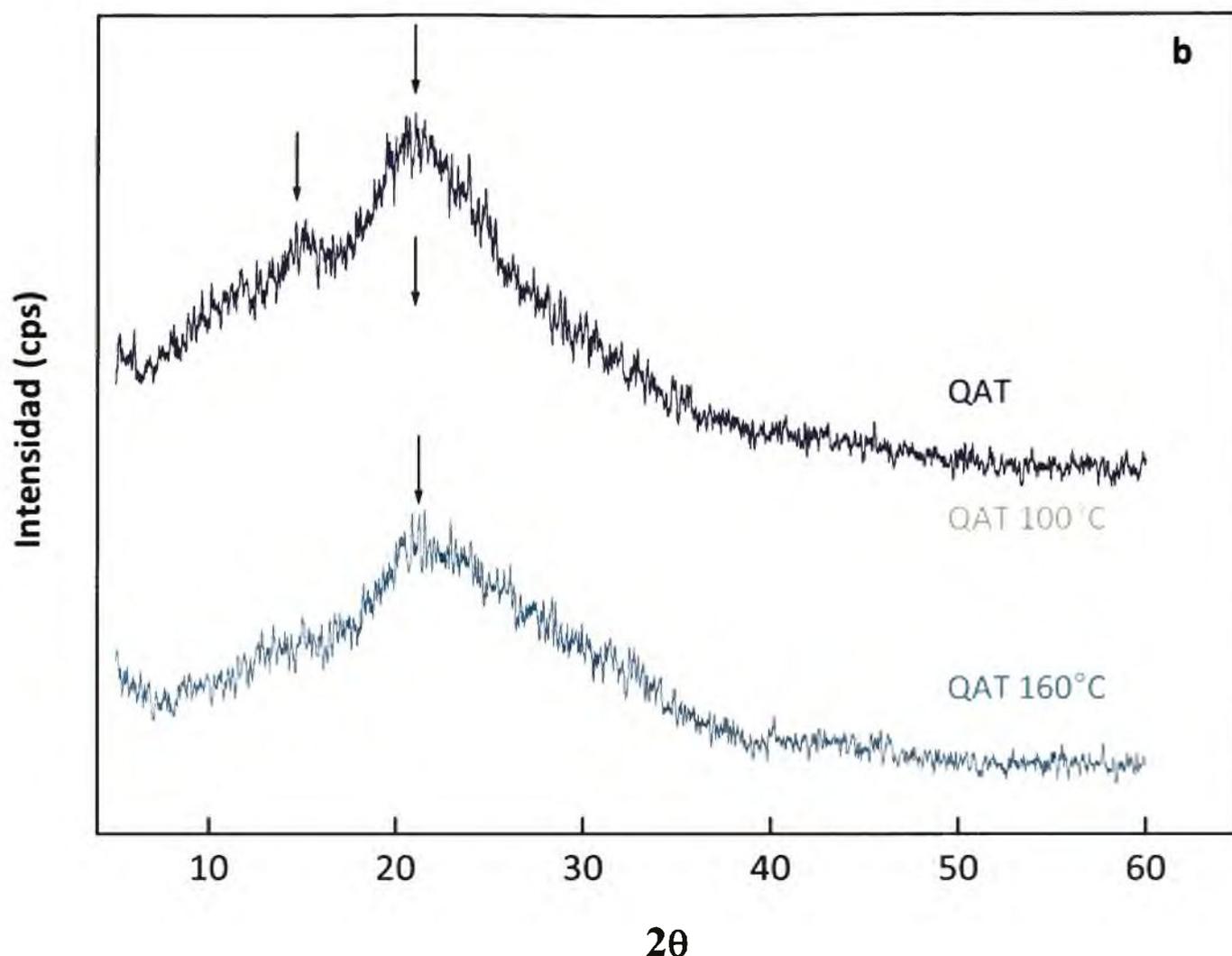


Figura 5.14 Difractogramas de rayos X de películas de: (a) Q control y curadas y (b) QAT sin tratar y curadas. Las muestras se trataron térmicamente durante 30 min a distintas temperaturas.

5.4.1.6.3 Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros obtenidos por FTIR de las películas de quitosano antes y después del tratamiento térmico evidencian una disminución significativa del grado de desacetilación de las muestras, determinado como se detalló en el Capítulo 1 del presente trabajo (Figura 1.12). El DD resultó ser menor en los casos en que las películas Q y QAT fueron sometidos a un proceso de curado, respecto de las matrices de Q y QAT sin tratar (Tabla 5.4). Los resultados obtenidos fueron similares a los informados por Murray y Dutcher (2006) y son consistentes con los obtenidos por difracción de rayos X.

*Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado***Tabla 5.4** Grado de desacetilación (DD) de las muestras control de Q y QAT y de películas curadas a distintas temperaturas durante 30 min.

Películas	DD (%) [*]
Q	74,5 (0,9) ^a
QAT	75,0 (1,2) ^a
Q 100°C	70,6 (1,2) ^b
QAT 100°C	62,3 (0,2) ^c
Q 160°C	69,1 (0,4) ^d
QAT 160°C	62,2 (1,1) ^c
Q 180°C	55,7 (0,7) ^e
QAT 180°C	44,1 (0,5) ^f

Valores calculados a partir de los espectros de FTIR de las películas. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras.

El proceso de curado produjo cambios en las ventanas espectrales FTIR asociados al agua en la región comprendida entre $3600-3000 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 5.15). Esta región se estrechó como consecuencia del proceso de deshidratación por la exposición a temperaturas elevadas de las matrices de Q y QAT.

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

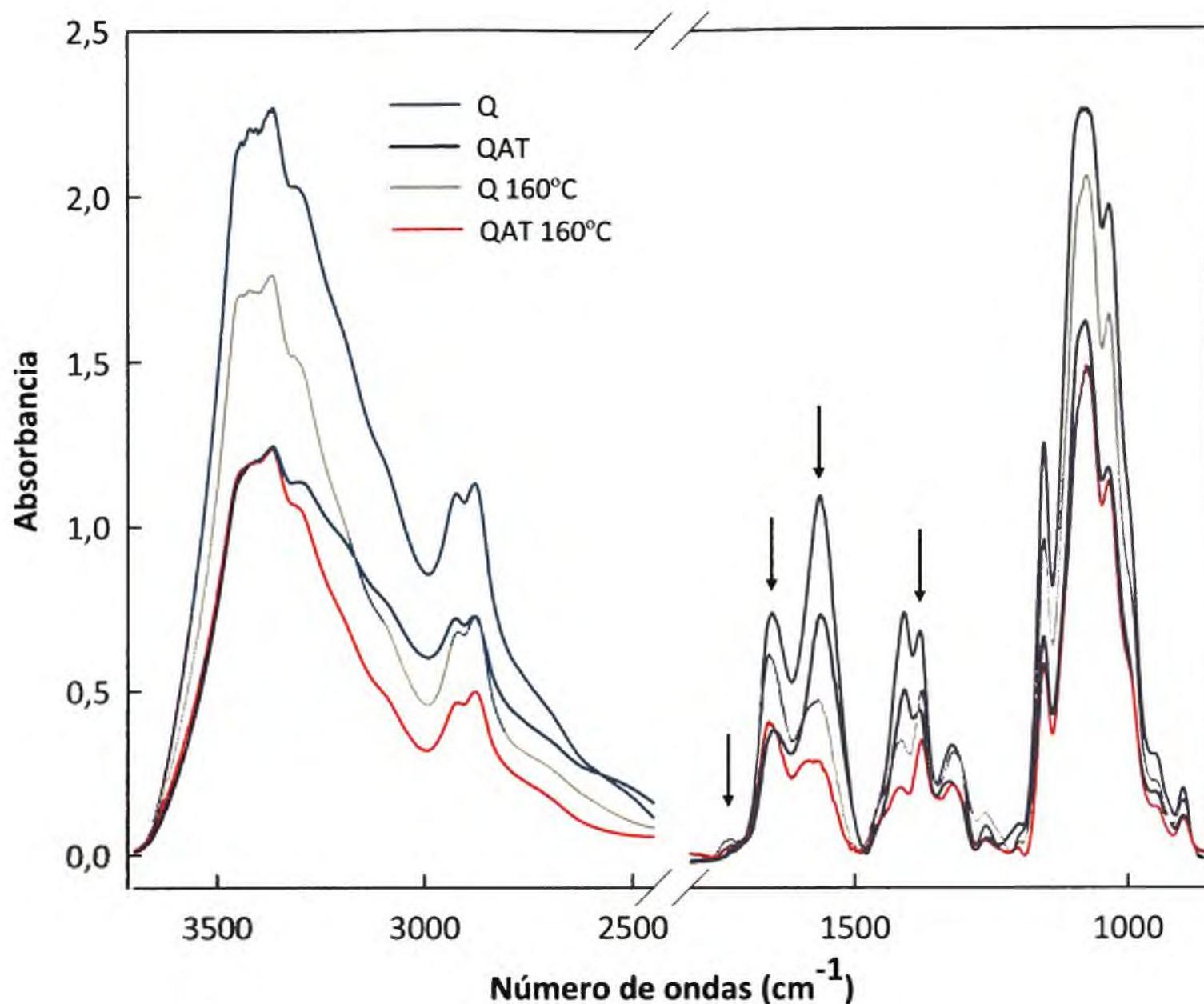


Figura 5.15 Espectros de FTIR de películas de Q y QAT sin tratar y curadas a 160°C durante 30 min en en la región comprendida entre 3700-850 cm^{-1} .

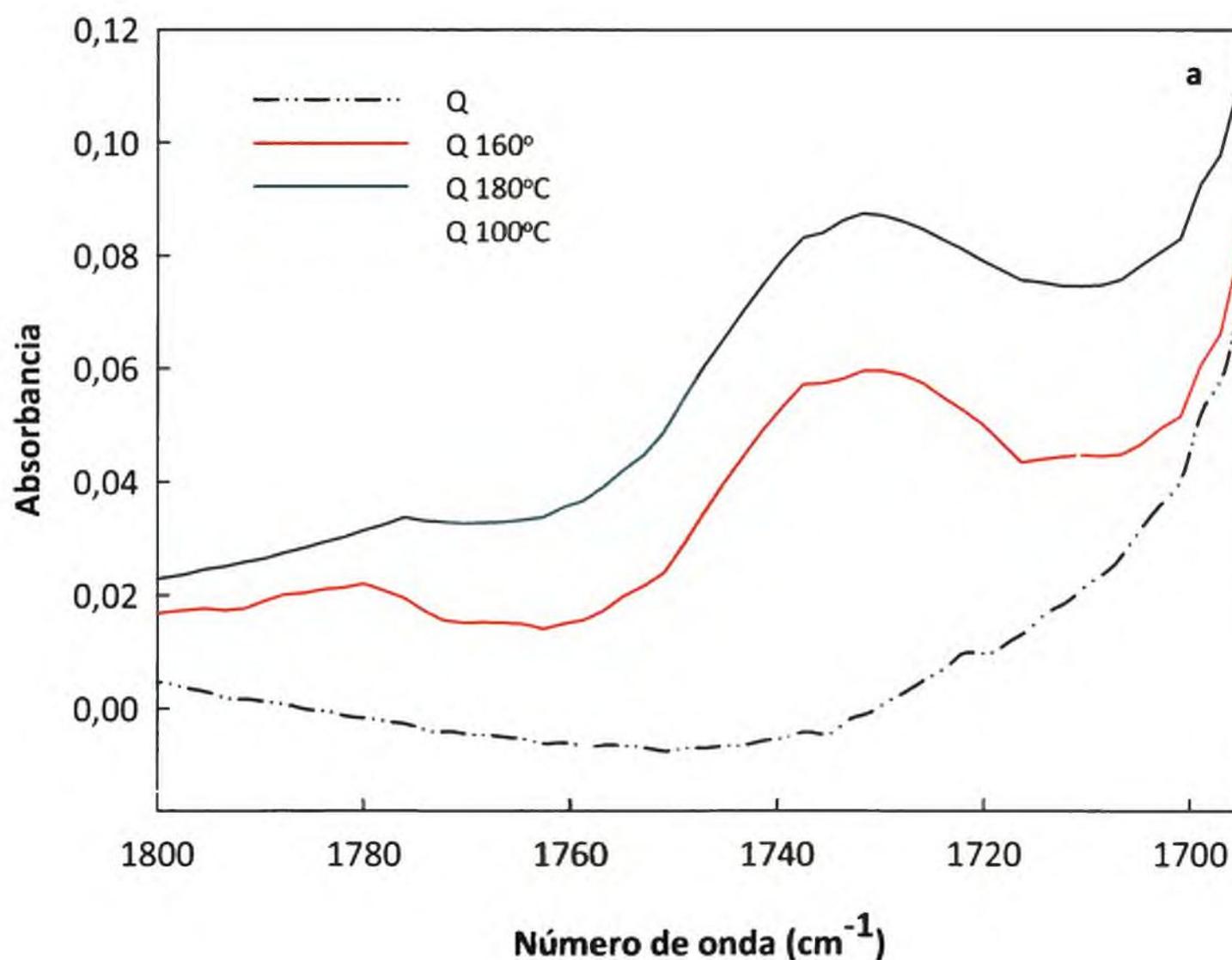
Otras bandas localizadas en la región 1700-1580 cm^{-1} experimentaron modificaciones similares debido al tratamiento térmico en comparación con los controles. Por otra parte, con el curado de las muestras también se observaron bandas distintivas de absorción a 1650 cm^{-1} y a 1560 cm^{-1} debido a los residuos de quitina, siendo este último asociado con la formación de grupos carboxilato. Martínez Urreaga y de la Orden (2006) y Zawadzki y Kaczmarek (2010) asignaron la banda localizada en 1640 cm^{-1} al agua físicamente adsorbida (agua ligada a la estructura).

La disminución de la intensidad de la banda localizada en 1560 cm^{-1} , tanto en las películas de Q y QAT tratadas evidenció la gradual desaparición de los grupos amino involucrados en la reacción de entrecruzamiento; estos resultados están en concordancia con los encontrados por Martínez Urreaga y de la Orden (2006).

Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

Asimismo, se observó que luego del curado la banda localizada en 1650 cm^{-1} exhibió un aumento relativo con respecto a la banda en 1158 cm^{-1} (estiramiento antisimétrica del puente C-O-C), lo que sugiere el aumento de nuevos grupos amida y/o imida (Figura 5.15), con la consiguiente disminución del grado de hinchamiento y la solubilidad en agua (Fernández-Saiz y col., 2009).

La banda situada en 1733 cm^{-1} asociada con el enlace éster se evidenció con el curado de las películas; su intensidad aumentó notoriamente con la temperatura de tratamiento. Resultados similares fueron informados por Coma y col. (2003); Martínez-Camacho y col. (2010) y por Murray y Dutcher (2006) (Figura 5.16a y b).



Modificación de la matriz de quitosano por tratamiento térmico: Curado

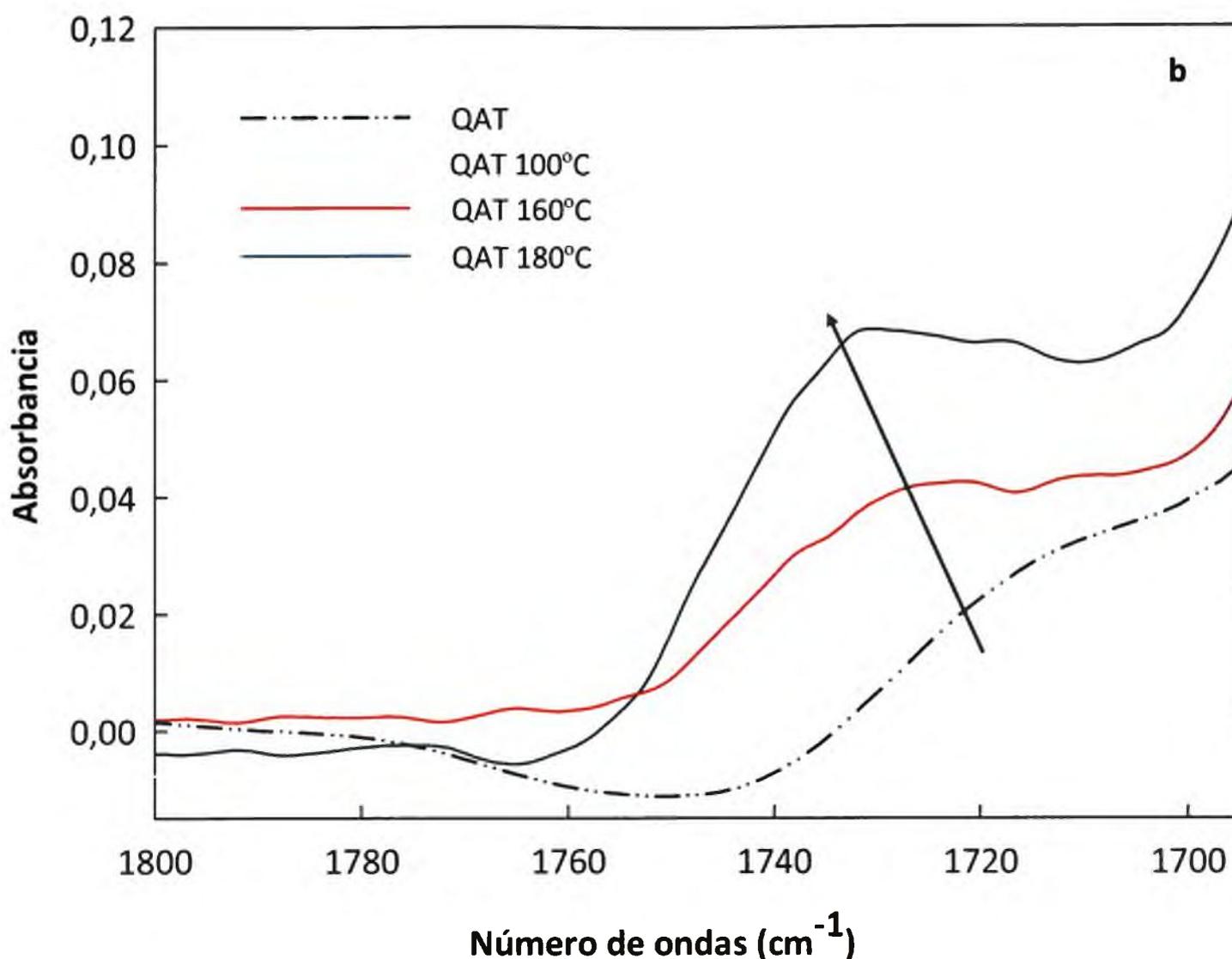


Figura 5.16 Espectros de FTIR de películas de: (a) Q y (b) QAT sin tratar y curadas a 160°C durante 30 min en la región comprendida entre 1800-1680 cm^{-1}

Haciendo una revisión del estudio realizado se puede señalar que para la comprensión de la dependencia del tiempo y la temperatura del proceso de curado es necesario establecer una relación entre la microestructura y las propiedades de las películas. Este conocimiento permitiría obtener materiales termoestables a base de quitosano con un comportamiento y propiedades predecibles. Los cambios observados por TEM de los materiales curados se correlacionaron con las modificaciones a escala molecular. Se obtuvo un mayor grado de acetilación, mejores propiedades de barrera, bajos valores de hinchamiento y de solubilidad, confirmando que el tratamiento térmico provocó cambios asociados a una mayor estabilidad. El tratamiento de curado efectuado en presencia de ácido tánico como agente entrecruzante aceleró las transformaciones producidas en la matriz, existiendo entre ambos procesos un efecto sinérgico.

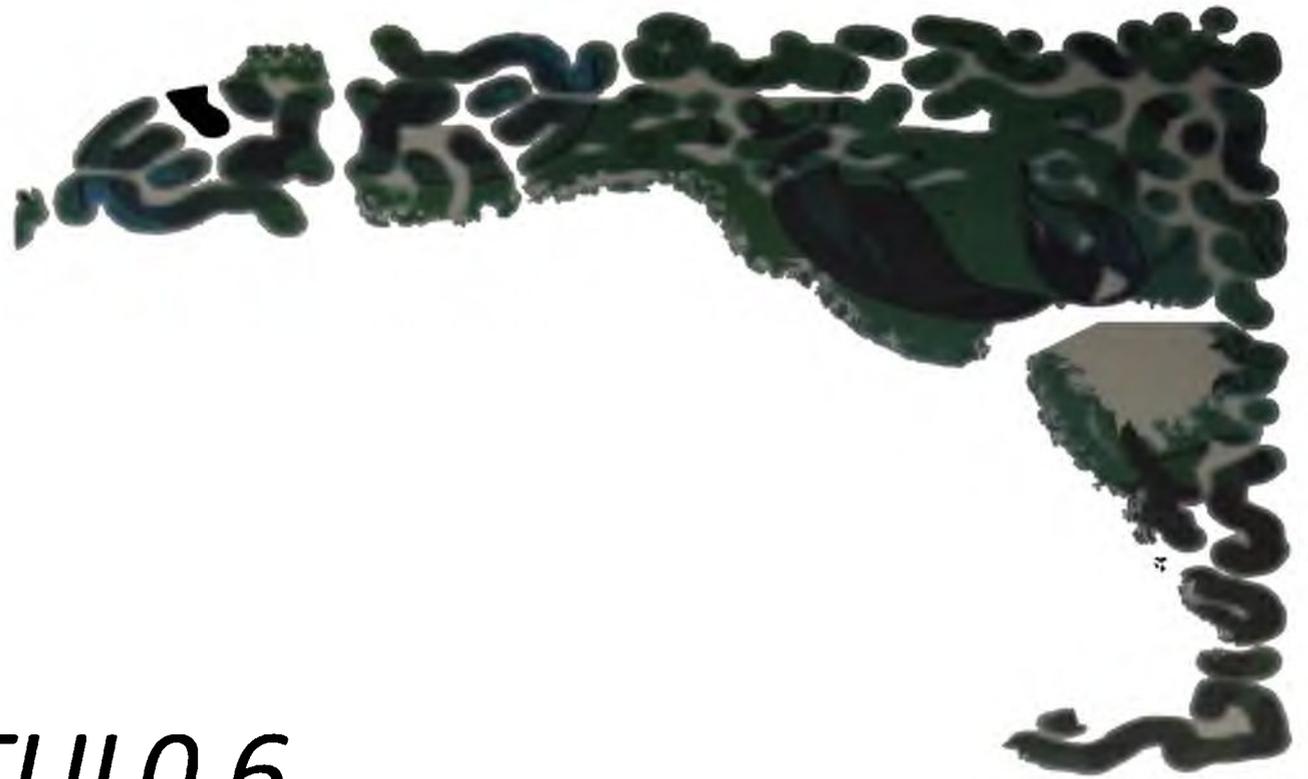
REFERENCIAS

- Aelenei N., Popa M.I., Novac O., Lisa G., y Balaita L. (2009).** Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1095-1102.
- Almeida E.V.R., Frollini E., Castellan A., y Coma V. (2010).** Chitosan, sisal cellulose, and biocomposite chitosan/sisal cellulose films prepared from thiourea/NaOH aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 80, 655-664.
- Balau L., Lisa G., Popa, M., I., Tura, V., y Melnig, V. (2004).** Physico-chemical properties of Chitosan films. *Central European Science Journals*, 2, 638-647.
- Cao N., Fu Y., y He J. (2007).** Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21, 575-584.
- Coma V., Sebti I., Pardon P., Pichavant F.H., y Deschamps A. (2003).** Films properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 51, 265-271.
- Fernandez-Saiz P., Lagarón J.M., y Oci M.J. (2009).** Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 3298-3307
- Gennadios A., Ghorpade V.M., Weller C.L., y Hanna M.A. (1996).** Heat Curing of Soy Protein Films. *Biological Systems Engineering Biological Systems Engineering: Papers and Publications*, 39, 575-579.
- Ghosh A., Azam Ali, M., y Dias G.J. (2009).** Effect of Cross-Linking on Microstructure and Physical Performance of Casein Protein. *Biomacromolecules*, 10, 1681-1688.
- Gu W., y Wu P. (2007).** FT-IR and 2D-IR spectroscopic studies on the effect of ions on the phase separation behavior of PVME aqueous solution. *Analytical Sciences*, 23, 823-827.
- Hasimi A., Stavropoulou K.G., Papadokostaki M., y Sanopoulou. (2008).** Transport of water in polyvinyl alcohol films: Effect of thermal treatment and chemical crosslinking. *European Polymer Journal*, 44, 4098-4107.
- Kim K.M., Weller C.L., Hanna M.A., y Gennadios, A. (2002).** Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 140-145.

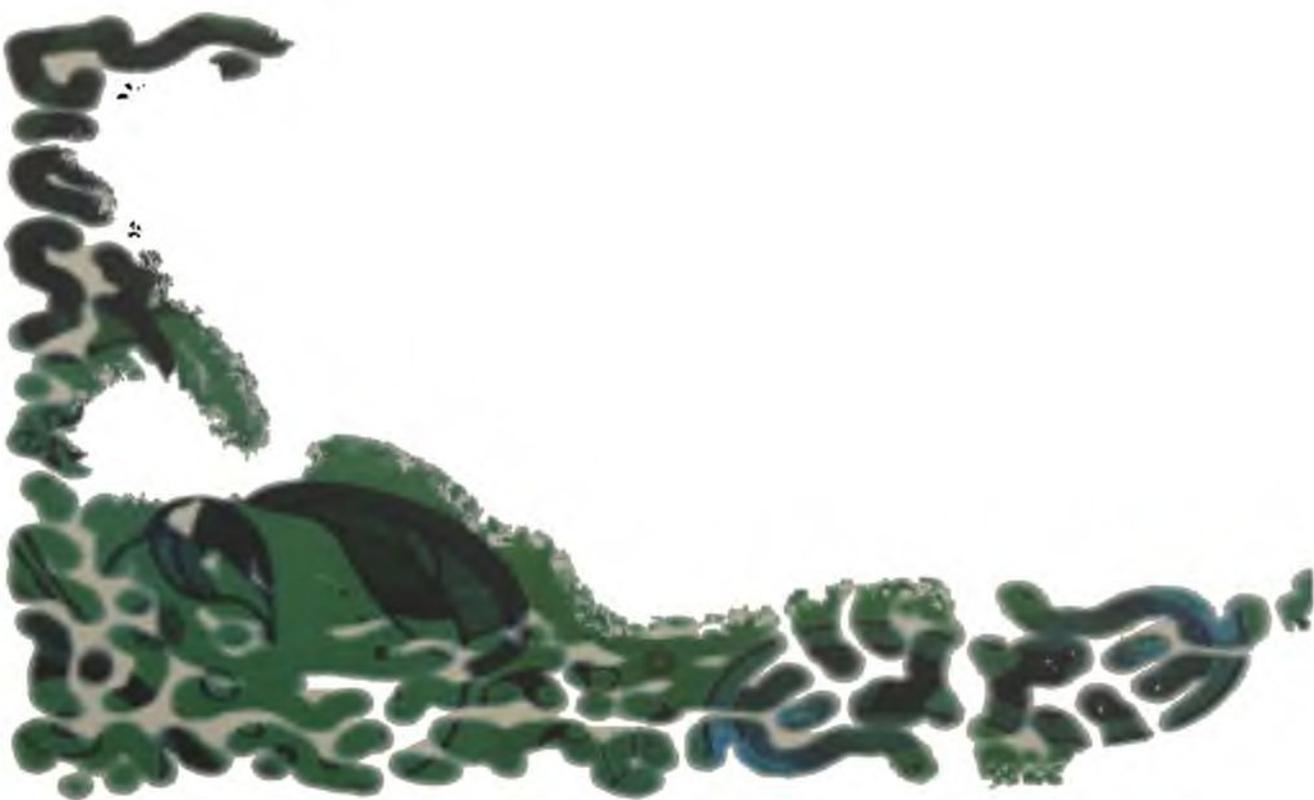
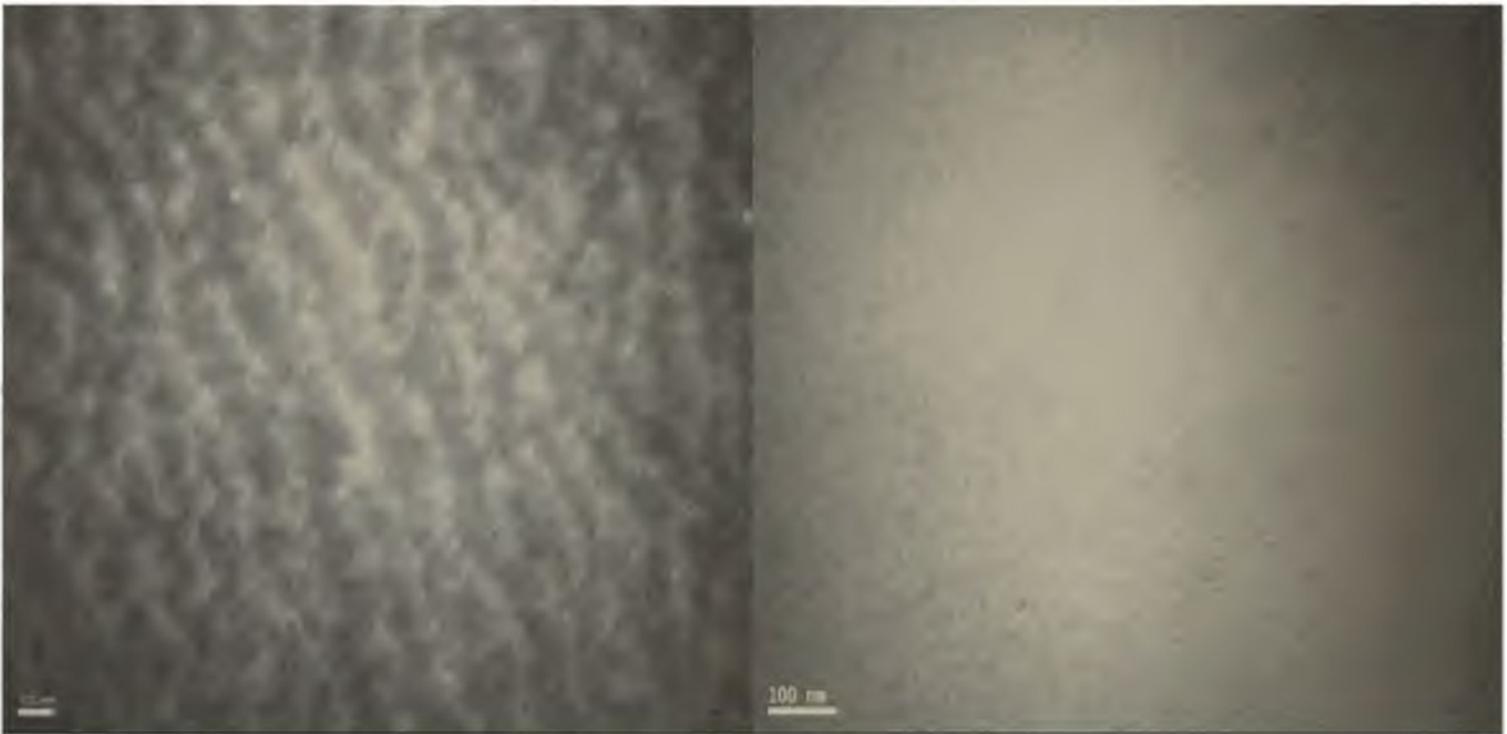
- Krumova M., López D., Benavente R., Mijangos C., y Pereña J.M. (2000).** Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol). *Polymer*, *41*, 9265-9272.
- Lim L.Y., y Wan L.S.C. (1995).** Heat treatment of chitosan films. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *21*, 839-846.
- Lin D, y Zhao Y. (2007).** Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *6(3)*, 60-75.
- Martínez-Camacho A.P., Cortez-Rocha M.O., Ezquerro-Brauer J.M., Graciano-Verdugo A.Z., Rodríguez-Félix F., Castillo-Ortega M.M., Yépiz-Gómez M.S., y Plascencia-Jatome M. (2010).** Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, *82*, 305-315.
- Martínez Urreaga J., y de la Orden M.U. (2006).** Modification of cellulose with amino compounds: A fluorescence study. *Carbohydrate Polymers*, *69*, 14-19.
- Martucci J.F., Vázquez A., y Ruseckaite R A. (2007).** Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite: Morphological and thermal studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *89(1)*, 117-122.
- Murray C.A., y Dutcher J.R. (2006).** Effect of changes in relative humidity and temperature on ultrathin chitosan films. *Biomacromolecules*, *7*, 3460-3465.
- Neto C.G.T., Giacometti J.A., Job A.E., Ferreira F.C., Fonseca J.L.C., y Pereira M. R. (2005).** Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, *62*, 97-103.
- Peniche-Covas C., Arguelles-Monal W., y San Roman J. (1993).** A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, *39*, 21-28.
- Peña C., Koro de la Caba, Eceiza A., Ruseckaite R., y Mondragon I. (2010).** Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresource Technology* *101*, 6836-6842.
- Ravi Kumar M.N.V., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., y Domb A.J. (2004).** Chitosan chemistry and pharmaceutical. *Chemical Reviews*, *104*, 6017-6084.

- Ritthidej G.C., Phaechamud T., y Koizumi T. (2002).** Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, 232, 11-22.
- Raquez J.M., Deléglise M., Lacrampe M.F., y Krawczak P. (2010).** Thermosetting (bio)materials derived from renewable resources: A critical review. *Progress in Polymer Science*, 35, 487-50.
- Rautio P, Bergvall UA, Karonen M, y Salminen J-P (2007).** Bitter problems in ecological feeding experiments: commercial tannin preparations and common methods for tannin quantifications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 257-62.
- Reddy N., y Yan Y. (2010).** Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 118, 702-711.
- Sapieha S., Pupo J.F., y Schreiber H.P. (1989).** Thermal degradation of cellulose-containing composites during processing. *Journal of Applied Polymer Science*, 37, 233-240.
- Toffey A., Samaranayake G., Frazier C.E., y Glasser W.G. (1996).** Chitin derivatives. I. Kinetics of the heat-induced conversion of chitosan to chitin. *Journal of Applied Polymer Science*, 60, 75-85.
- Toffey A., y Glasser W.G. (1998).** Chitin derivatives. II. Time-temperature-transformation cure diagrams of the chitosan amidization process. *Journal of Applied Polymer Science*, 73, 1879-1889.
- Toffey A., y Glasser W.G. (2001).** Chitin derivatives. III. Formation of amidized of chitosan. *Cellulose*, 8, 35-47.
- Villetti M. A., Crespo J. S., Soldi M. S., Pires A. T. N., Borsali R., y Soldi V. (2002).** Thermal degradation of natural polymers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67, 295-303.
- Wongpanit P., Sanchavanakit N., Pavasant P., Supaphol P., Tokura S., y Rujiravanit R. (2005).** Preparation and characterization of microwave-treated carboxymethyl chitin and carboxymethyl chitosan films for potential use in wound care application. *Macromolecular Bioscience*, 5, 1001-1012.
- Wurster D.E., Bhattacharjya S., y Flanagan D.R. (2007).** Effect of curing on water diffusivities in acrylate free films as measured via a sorption technique. *AAPS, American Association of Pharmaceutical Scientists*, 8, 152-157.
- Zawadzki J., y Kaczmarek H. (2010).** Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers*, 80, 394-400.

Zhang X., Do M.D., Casey P., Sulisto A., Qiao G.G., Lundin L., Lillford P., y Kosaraju S. (2010).
Chemical modification of gelatin by a natural phenolic cross-linker, tannic acid. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6809-6815.



CAPITULO 6



6.1 INTRODUCCION

El ácido ferúlico (4-hidroxi-3-ácido metoxicinámico) es un compuesto fenólico natural, que se encuentra en el salvado de arroz, trigo, cebada, tomate y café tostado (Figura 6.1). Surge del metabolismo de la fenilalanina y la tirosina por la vía del ácido siquímico en plantas; posee diversos efectos farmacológicos como antioxidante, antihiperlipidémico, antimicrobiano y anticancerígeno.

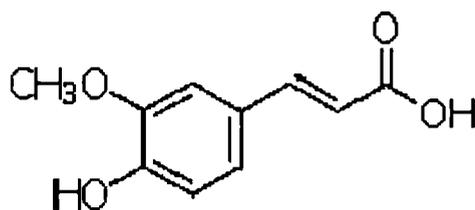


Figura 6.1. Estructura química del ácido ferúlico

El ácido ferúlico y sus dímeros son componentes ubicuos de las paredes celulares de las plantas. Este agente activo, es un componente de lignocelulosas, capaz de entrecruzar la lignina y los polisacáridos, proporcionando rigidez a las paredes celulares. El núcleo fenólico y la cadena lateral con enlaces conjugados, presente en la estructura del ácido ferúlico, forma fácilmente el radical fenoxi estabilizado por resonancia, que le otorga propiedades antioxidantes (Sebastian y col., 2009).

En este Capítulo se caracterizaron las películas activas antioxidantes formuladas con la adición de ácido ferúlico a efectos de evaluar las modificaciones producidas por el componente activo en las propiedades mecánicas, de barrera, térmicas, y estructurales.

6.2 MATERIALES

Las películas activas antioxidantes se prepararon con el agregado de ácido ferúlico (SIGMA-Aldrich, USA) a una matriz de quitosano con DD 75%. El peso molecular del compuesto es $194,18 \text{ g mol}^{-1}$ y el pKa 4,58.

6.3 MÉTODOLÓGÍA**6.3.1 Preparación de las películas activas**

Con el fin de determinar la concentración óptima de ácido ferúlico (AF) a ser incorporado en la matriz de quitosano (QAF) se ensayaron agregados del componente activo

de 25, 50, 75 y 100 mg/g Q. Las propiedades reológicas de las soluciones filmogénicas obtenidas se caracterizaron como se describió en el Capítulo 2.

Las películas se secaron en estufa a 37°C durante 36 hs y posteriormente se acondicionaron a 20°C y 65% HR. Las determinaciones se realizaron sobre películas almacenadas durante 30 días. A efectos comparativos, se utilizaron como control las películas de quitosano almacenadas durante igual período de tiempo (Q).

6.3.2 Estudio de las propiedades macroscópicas y fisicoquímicas de las películas activas

Las determinaciones del espesor de las películas, los ensayos de solubilidad en agua, así como la evaluación del color, las propiedades mecánicas y de barrera (permeabilidad al vapor de agua y al O₂) se realizaron de acuerdo a los métodos descritos en los Capítulos 2, 3 y 4.

También se evaluaron las propiedades de barrera al UV-Visible de las películas desarrolladas, registrándose el espectro de absorción en el rango 200-700nm en un espectrofotómetro Hitachi U1900 (Japón), empleando cubetas de cuarzo como se explicó previamente en el Capítulo 5. También se determinó el ángulo de contacto de las muestras siguiendo la metodología descrita en el mismo Capítulo.

6.3.3. Estudio de las propiedades microestructurales de las películas activas

Asimismo se estudiaron las propiedades microestructurales para analizar los cambios asociados con la incorporación del agente activo, empleándose microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). Las interacciones establecidas entre la matriz de quitosano y el AF se analizaron a través de FTIR y por espectroscopía de difracción de rayos X.

Las propiedades térmicas de la matriz activa se evaluaron mediante DMA, MDSC y TGA. Las condiciones experimentales de cada uno de los ensayos mencionados corresponden a las descritas en los Capítulos 2 y 5.

6.3.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el test de comparación de medias de Fisher (LSD) y de análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Systat (versión 10, USA). El nivel de significación usado fue 0,05.

6.4 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El agregado del compuesto activo no modificó el comportamiento reológico de las soluciones filmogénicas. Los valores de viscosidad de las soluciones de quitosano con la adición de ácido ferúlico (QAF) no difirieron significativamente ($p > 0,05$) de los valores obtenidos para la solución filmogénica de quitosano.

6.4.1 Caracterización de las películas activas antioxidantes formuladas con ácido ferúlico

6.4.1.1 Selección de la concentración de compuesto activo

En general las películas de Q con distintas concentraciones de AF mostraron una apariencia uniforme excepto con el agregado de 100 mg AF/g Q. Estas últimas matrices no se consideraron para los ensayos posteriores ya que presentaron superficies rugosas asociadas a la presencia de una excesiva cantidad de compuesto activo en la matriz, produciendo defectos y falta de homogeneidad en el material como puede observarse en la fotografía (Figura 6.2a). Asimismo las observaciones por SEM de la superficie de la matriz revelaron a nivel microscópico las imperfecciones del material ocasionados por el exceso de AF en las películas (Figura 6.2b).

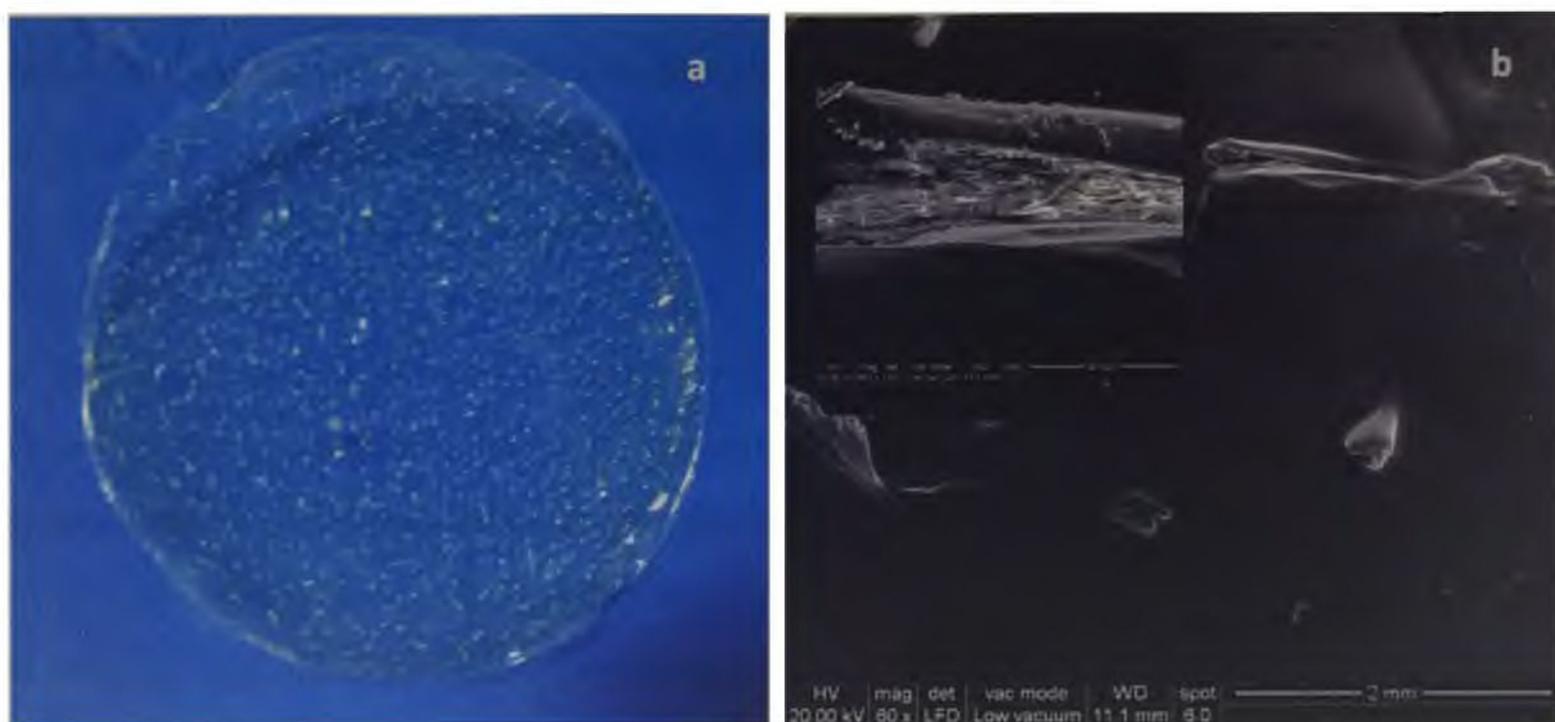


Figura 6.2 Imágenes (a) macroscópica y (b) micrografía obtenida por SEM de películas de quitosano con 100 mg AF/g Q.

El efecto producido por el agregado de AF sobre las propiedades de barrera al vapor de agua se muestra en la Figura 6.3.

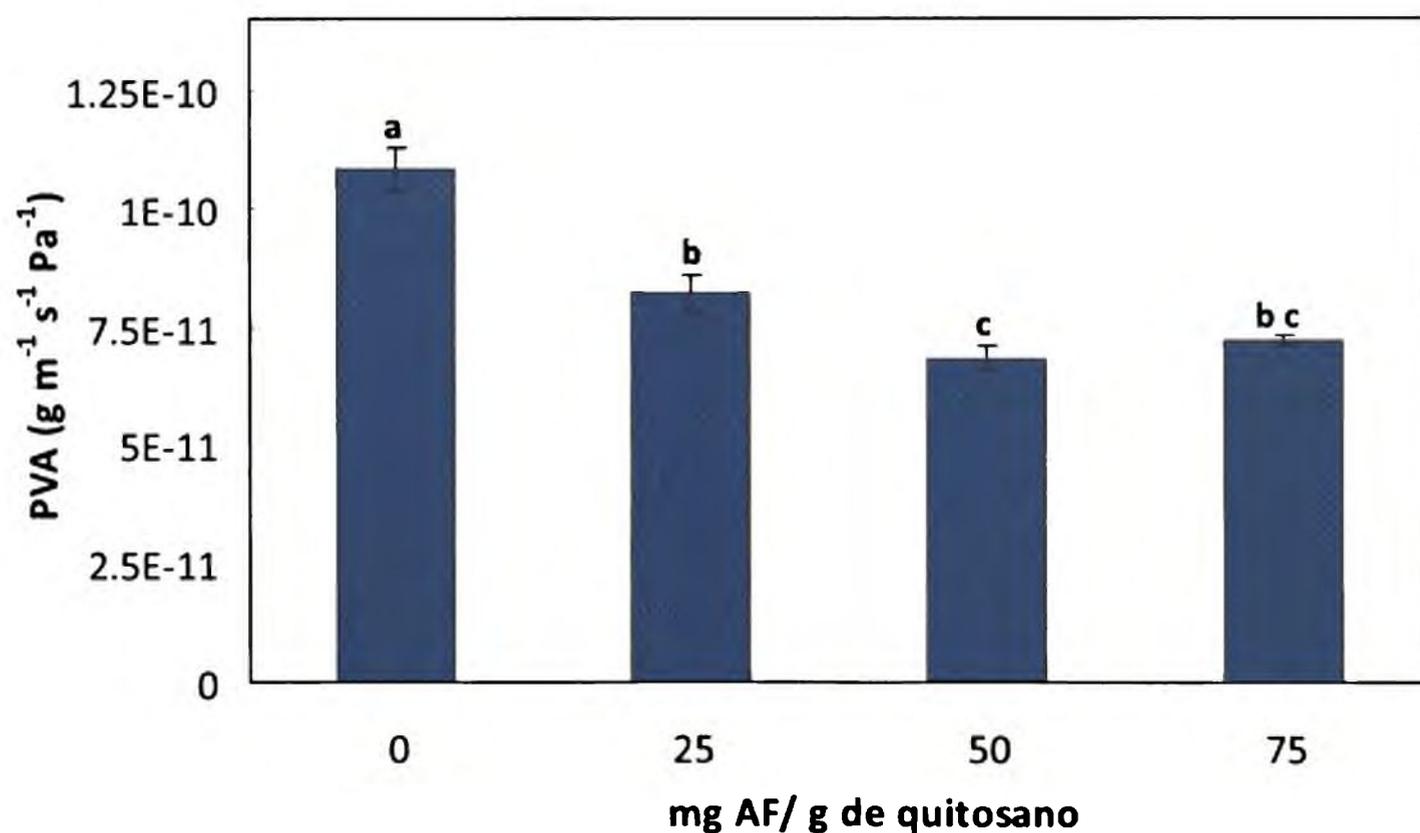


Figura 6.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas de quitosano con distintas concentraciones de componente activo (AF) incorporado en la matriz.

La adición de 50 mg AF/ g Q permitió obtener los valores más bajos de PVA, siendo las diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a las películas control.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ou y col. (2005), quienes estudiaron la influencia del ácido ferúlico en matrices obtenidas a partir de aislados de proteína de soja, atribuyendo la disminución en los valores de PVA a la formación de una estructura más compacta. Por otro lado, Cao y col. (2007) también encontraron esta tendencia en películas de gelatina.

En forma paralela, se realizaron ensayos con películas de Q y diferentes concentraciones de AF en el modo de tensión uniaxial en un DMA (Figura 6.4).

En base a los resultados obtenidos a partir del estudio de las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua, la concentración de ácido ferúlico seleccionada fue 50 mg/g Q.

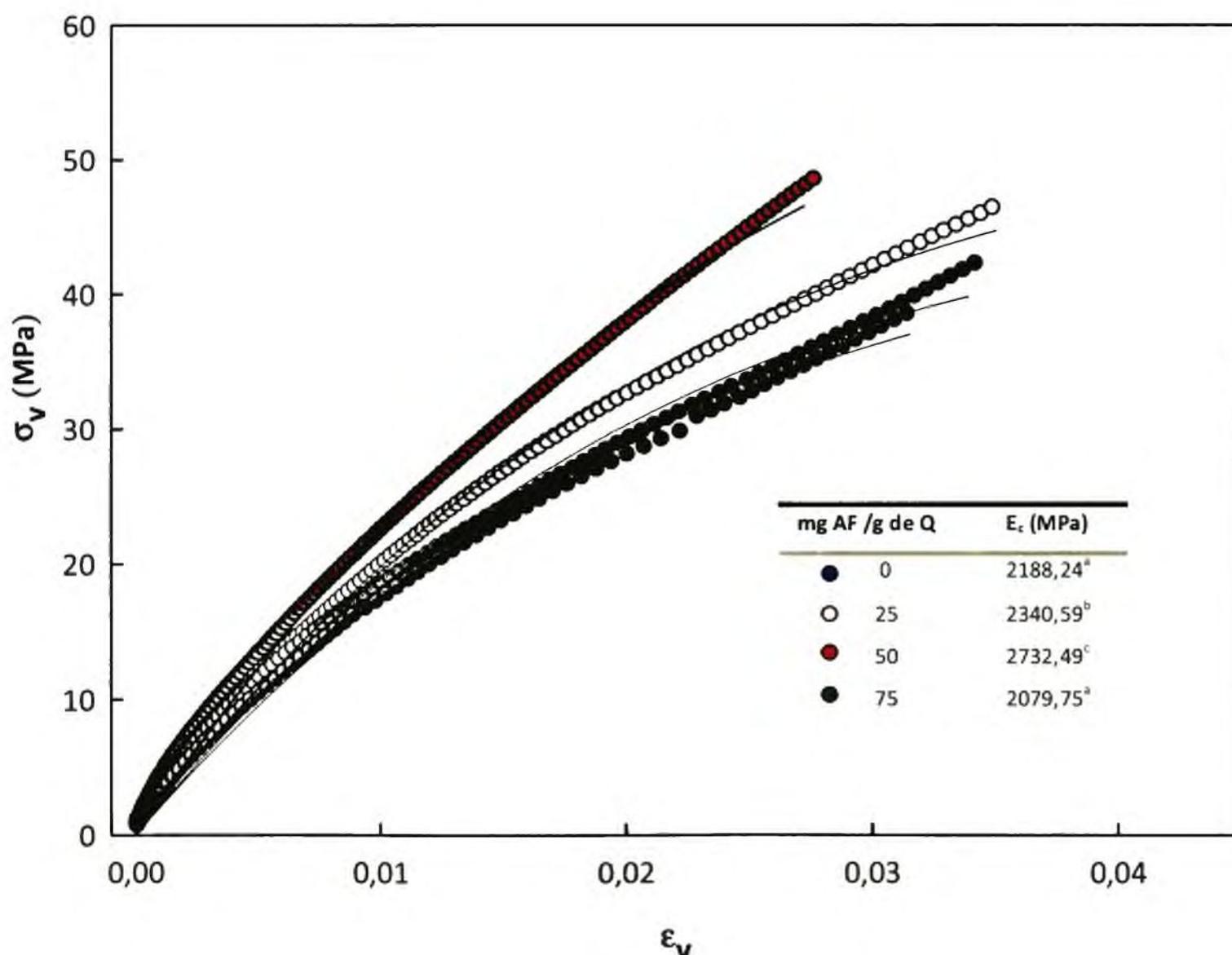


Figura 6.4 Curvas de esfuerzo (σ) en función de la deformación relativa (ϵ) de películas de Q con distintas concentraciones de AF. Los valores de la Tabla inserta corresponden al módulo elástico (E_c) calculados a partir de la Ec.2.4. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras.

Películas activas antioxidantes a base de quitosano

En todos los casos se obtuvo un buen ajuste de los datos experimentales ($r^2 > 0,99$). Los módulos elásticos se determinaron a partir de la Ec. 2.4 como se describió en el Capítulo 2. Como se puede observar en la Tabla inserta de la Figura 6.4, los valores de E_c aumentaron con la concentración de AF hasta 50 mg/g Q, mostrando diferencias significativas respecto de la película control de quitosano ($p < 0,05$). Sin embargo el agregado de 75 mg de AF/g de Q, generó matrices con una respuesta mecánica más débil y no se observaron diferencias en los valores de E_c en comparación con los obtenidos para las películas control ($p > 0,05$). Estos resultados se correlacionaron con la disminución en la homogeneidad de la matriz con el incremento de la concentración de componente activo (Figura 6.2).

La incorporación de 50 mg AF/g Q aumentó los valores de resistencia a la ruptura en alrededor de un 14% respecto a las películas control, mientras que los valores de elongación presentaron una ligera disminución posiblemente asociado a una restricción del movimiento de las cadenas poliméricas. El incremento en los valores de esfuerzo podría atribuirse a la formación de una red estable a causa de las interacciones promovidas por la incorporación del ácido ferúlico. Diversos autores también informaron aumentos en la resistencia a la ruptura evaluada en matrices a base de proteínas de soja y de gelatina atribuyendo los resultados a un posible efecto reticulante del AF (Cao y col., 2007; Ou y col., 2005).

De acuerdo a Mathew y Abraham (2008), la disminución de la resistencia del material con concentraciones mayores que 50 mg AF/g Q podría atribuirse a un exceso de ácido ferúlico. La mayor relación compuesto activo/polímero debilitaría las uniones debido a la gran cantidad de grupo oxhidrilos libres los cuales pueden promover interacciones con grupos oxidrilos similares y por ende reducir las fuerzas de atracción.

6.4.1.2 Propiedades fisicoquímicas y de barrera al O₂

Las matrices de QAF seleccionadas (50 mg AF/g Q) presentaron una coloración ligeramente amarillenta luego del almacenamiento, debido probablemente a reacciones que ocurren en la matriz de quitosano intensificadas con el transcurso del tiempo. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el color de las muestras en presencia de AF, obteniéndose un valor promedio del parámetro de cromaticidad b^* de 13,2, es decir 29% superior a los valores obtenidos para el control.

Los ensayos de solubilidad a 20°C indicaron que el agregado del compuesto activo no modificó el porcentaje de solubilidad de las películas de Q, siendo aproximadamente del 11%.

Como fue descrito en el Capítulo 5, otra metodología que permite la caracterización de un material es la medición del ángulo de contacto. Estas determinaciones permiten estudiar el grado de humectación e hidrofiliicidad superficial de los materiales, parámetros que son importantes ya que influyen en propiedades como la adhesividad, así como en la liberación de las moléculas del compuesto activo incorporadas en una matriz.

La Figura 6.5 muestra la medición del ángulo de contacto de gotas de agua depositadas sobre películas de quitosano con y sin agregado de AF. La incorporación de ácido ferúlico incrementó la hidrofiliicidad del material; los valores determinados fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

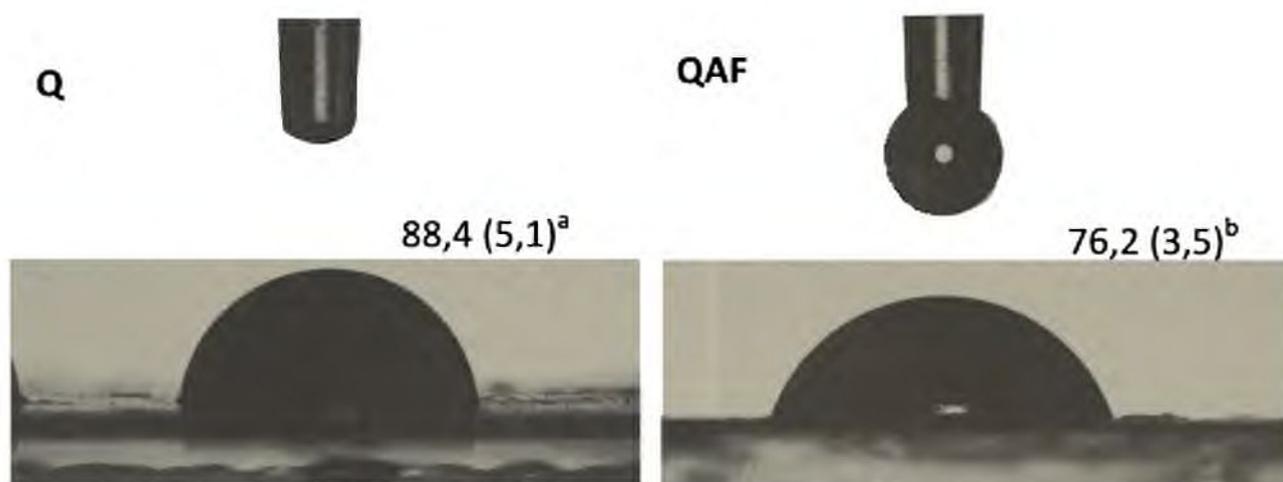


Figura 6.5 Medición del ángulo de contacto estático de una gota de agua en una superficie sólida plana.

Es conocido que el AF presenta un pico de absorción en el UV a 322 nm (Cao y col., 2007; Sebastian y col., 2009); por esta razón las películas desarrolladas resultaron ser barreras a la luz UV, observándose el pico de absorción entre 308 y 342 nm.

Con el agregado de AF se obtuvo una disminución significativa ($p < 0,05$) en los valores de permeabilidad al O_2 respecto a los valores para las películas de Q, siendo $2,95 \cdot 10^{-13}$ y $5,73 \cdot 10^{-13}$ ($\text{cm}^3 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$), respectivamente. Esta reducción del 48,5% nuevamente indicaría la compactación de la matriz en presencia de AF, en relación con los resultados obtenidos para otras propiedades.

Estos materiales poseen buenas propiedades de barrera al O₂ permitiendo aplicaciones específicas como puede ser la conservación de frutos frescos. El mecanismo por el cual estas películas conservan la calidad de frutas y vegetales es debido a sus propiedades de barrera a los gases, produciendo una atmósfera modificada alrededor del producto que reduce la disponibilidad de O₂, y por consiguiente la tasa de respiración de frutas y vegetales prolongando así la vida útil del producto (Du y col., 1997; Romanazzi y col., 2002).

6.4.1.3 Propiedades microestructurales

El análisis microestructural por TEM de las películas proporcionó información relevante acerca de la disposición y de la interacción del Q y el AF en la conformación de la matriz.

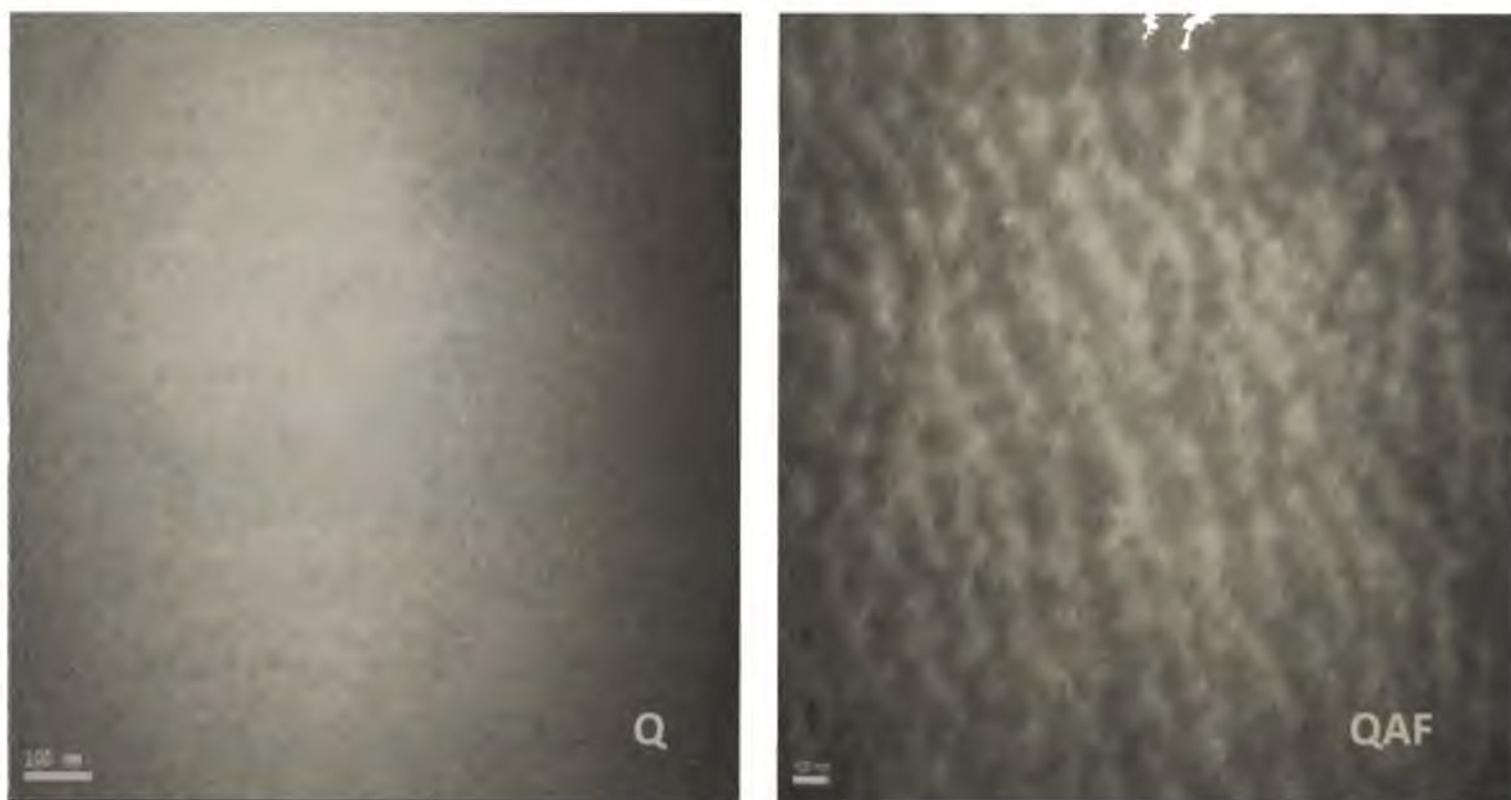


Figura 6.6 Micrografías obtenidas por TEM de películas de quitosano (Q) y de películas aditivadas con ácido ferúlico (QAF).

En la Figura 6.6, las micrografías obtenidas por TEM muestran que la matriz polimérica presentó una orientación preferencial con zonas o dominios distribuidos siguiendo una alineación posiblemente asociada al tipo de interacciones establecidas entre el compuesto activo y la matriz de quitosano.

Películas activas antioxidantes a base de quitosano

Asimismo los ensayos de caracterización microestructural por SEM permitieron observar matrices homogéneas, compactas, que no evidenciaron cambios visibles respecto a las películas control, como puede observarse en la Figura 6.7.

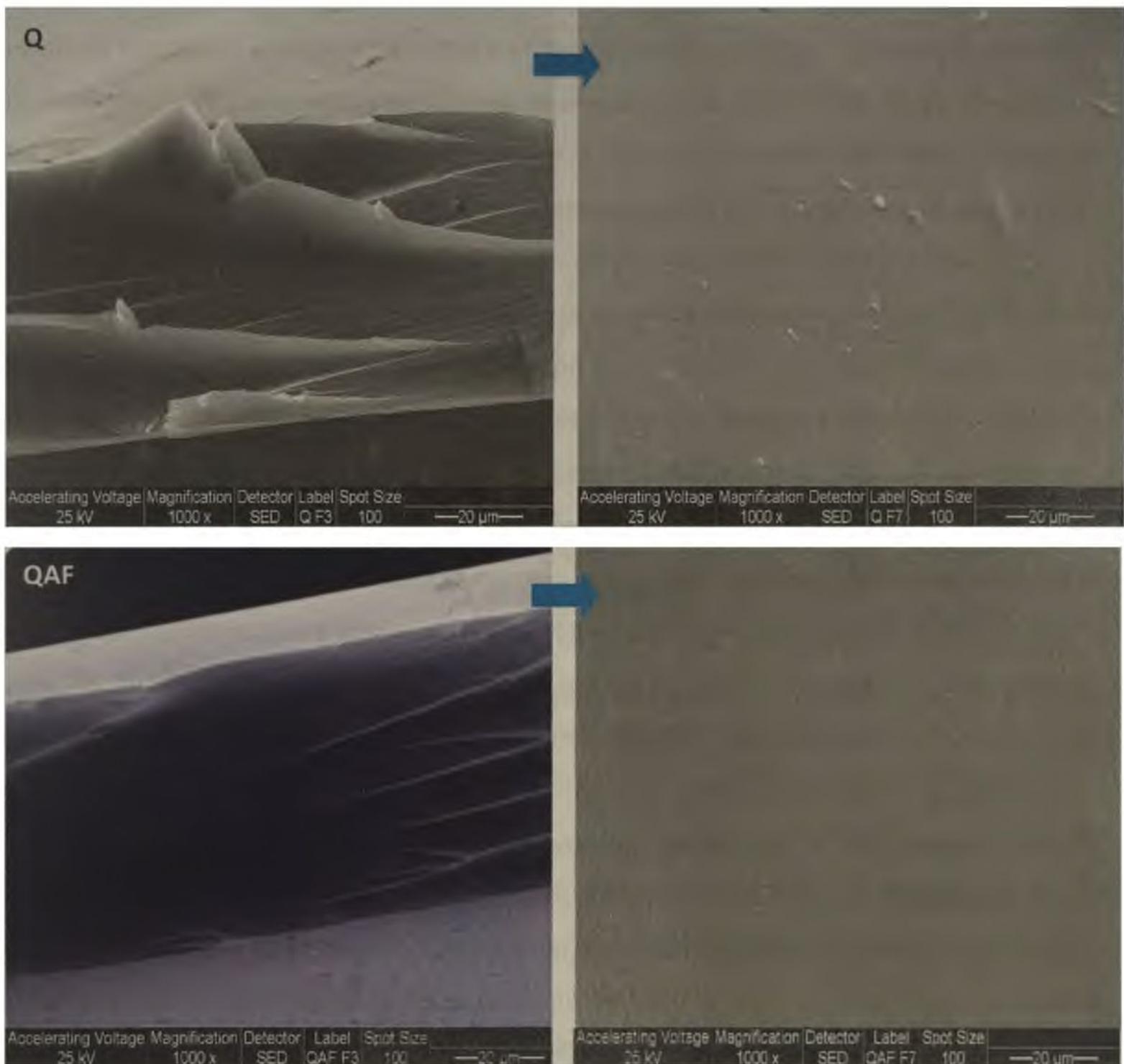


Figura 6.7 Micrografías obtenidas por SEM de secciones transversales y superficies de películas de Q y películas QAF con 50 mg AF/g Q. La escala utilizada se muestra en las micrografías.

6.4.1.4 Estudio de las propiedades térmicas y espectrosópicas

Los termogramas obtenidos por TGA de las películas de Q y QAF almacenadas durante 30 días evidenciaron una descomposición en dos etapas (Figura 6.8). Los valores de pérdida de peso inicial registrada alrededor de 100°C correspondieron a la evaporación del agua tal como se describió en el Capítulo 5. Estos valores se compararon con el contenido de humedad de las películas determinados en estufa a 105°C y los mismos resultaron similares. El agregado de AF en la matriz de Q disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el contenido de humedad, siendo los valores obtenidos a partir del análisis termogravimétrico 19,35 y 16,83% para las películas de Q y QAF, respectivamente.

El análisis de las muestras por DSC evidenció un pico a una temperatura de alrededor de 125°C (T_p) asociado a la evaporación del agua presente en la matriz de quitosano con y sin ácido ferúlico (Figura 6.9). Las diferencias encontradas en las entalpías entre las muestras coincidieron con los hallazgos mencionados anteriormente respecto del contenido de humedad de los materiales (ver Tabla inserta en la Figura 6.8). De acuerdo con Neto y col. (2005) los polisacáridos, por lo general poseen una fuerte afinidad por el agua y por lo tanto, pueden hidratarse con facilidad, generando macromoléculas con estructuras desordenadas. Por lo tanto, las diferencias en los valores de entalpía asociada a la transición endotérmica evidenciadas por DSC y la posición de los picos relacionados con la pérdida de agua observados por TGA, podrían reflejar cambios físicos y moleculares causados por la interacción del AF con las cadenas poliméricas del quitosano. Un examen detallado de la Figura 6.8 revela que las diferencias encontradas en el % de pérdida de masa, así como las temperaturas de inicio de los picos, podrían indicar que estos sistemas difirieron en su capacidad de retención de agua así como en la fuerza de interacción agua-compuesto activo-polímero.

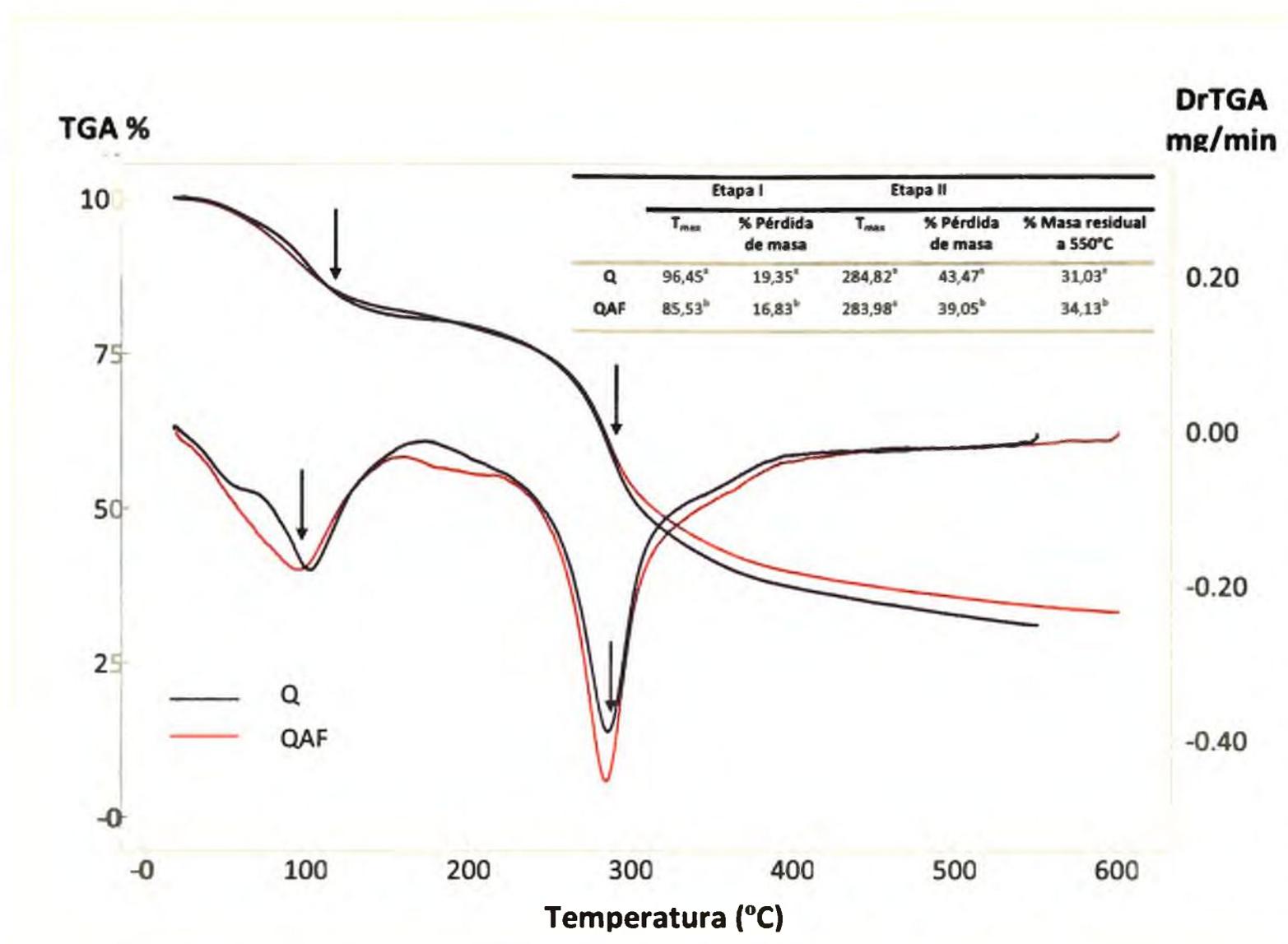


Figura 6.8 Termogramas obtenidos por TGA de muestras de Q y películas QAF. Los valores informados en la Tabla corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A partir de los ensayos de TGA fue posible determinar las temperaturas de degradación de los materiales, las cuales se correlacionaron con los resultados obtenidos por DSC. El análisis de la derivada de los termogramas (TGA) no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) en las temperatura de descomposición de las muestras, ya que los picos máximos se evidenciaron a 284 y 285°C, para las película de Q y QAF, respectivamente (Figura 6.8). Por DSC tampoco se observaron diferencias significativas en los valores de temperatura de degradación (T_d) (Figura 6.9). Estos resultados pusieron en evidencia que el agregado del componente activo no afectó la estabilidad térmica de las matriz polimérica. Sin embargo, la pérdida de peso involucrada en esta etapa, (comprendida entre 200 y 400°C) fue inferior en las películas QAF respecto de las películas control, siendo 39,0 y 43,4%, respectivamente.

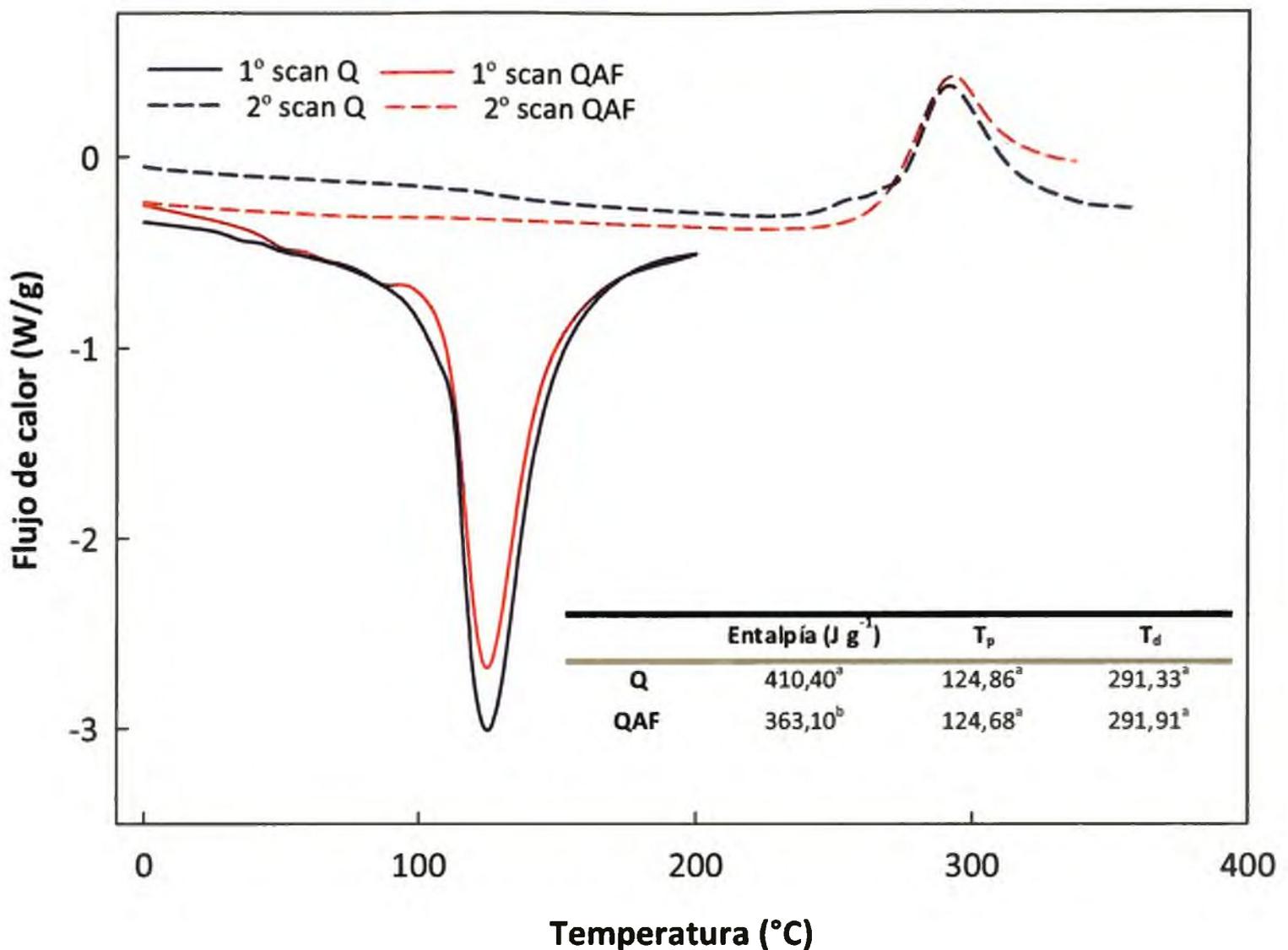


Figura 6.9 Termogramas obtenidos por DSC para muestras de Q y de QAF. Los valores informados en la Tabla corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A efectos de complementar el estudio de las propiedades térmicas del material también se realizaron ensayos en un DMA. En la Figura 6.10 se muestra el perfil dinámico mecánico de las muestras, revelando que el agregado de AF produce una atenuación de la relajación β asociada con la movilidad de los segmentos de la cadena polimérica.

Asimismo, se produjo un descenso brusco de los valores del módulo de almacenamiento acompañado de un aumento de los valores de $\tan \delta$, definiendo la temperatura de transición vítrea a 125°C. La T_g del material es mayor respecto a los valores obtenidos para las películas de Q. Esto podría explicarse teniendo en cuenta un menor contenido de humedad de las películas sumado a las interacciones del quitosano con el compuesto activo, debido a sus grupos funcionales (oxidrilos y grupos carboxilos). Estos resultados se sustentaron con los estudios realizados por FTIR (Figura 6.11).

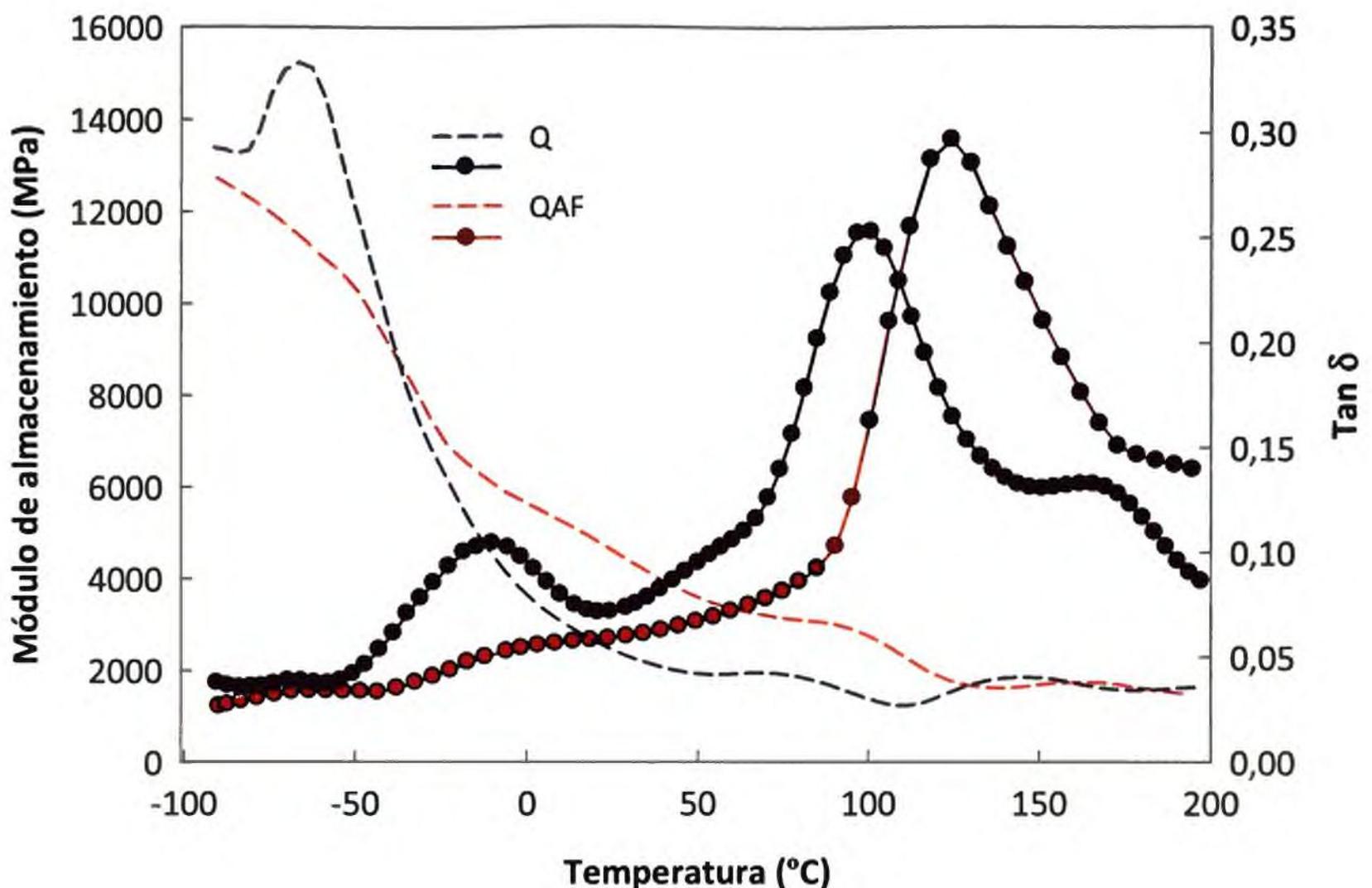


Figura 6.10 Análisis dinámico mecánico de películas de quitosano con (QAF) y sin ácido ferúlico (Q) para una frecuencia fija de 5 Hz.

Por otra parte, cuando se realizaron ensayos de DSC de las películas en el modo temperatura modulada se observó en la curva de la componente reversible del flujo de calor la temperatura de transición vítrea a 124,3°C, valor similar al obtenido por DMA.

López de Dicastillo y col. (2011) trabajando con películas de etilen vinil alcohol (EVOH) aditivadas con extracto de té verde como compuesto activo obtuvieron un aumento en los valores de T_g , indicando un incremento de la rigidez respecto de la película control de EVOH. Los autores atribuyeron el efecto a las interacciones de los grupos OH del polímero con el agente activo, resultando en un aumento de las fuerzas entre cadenas y la energía de cohesión.

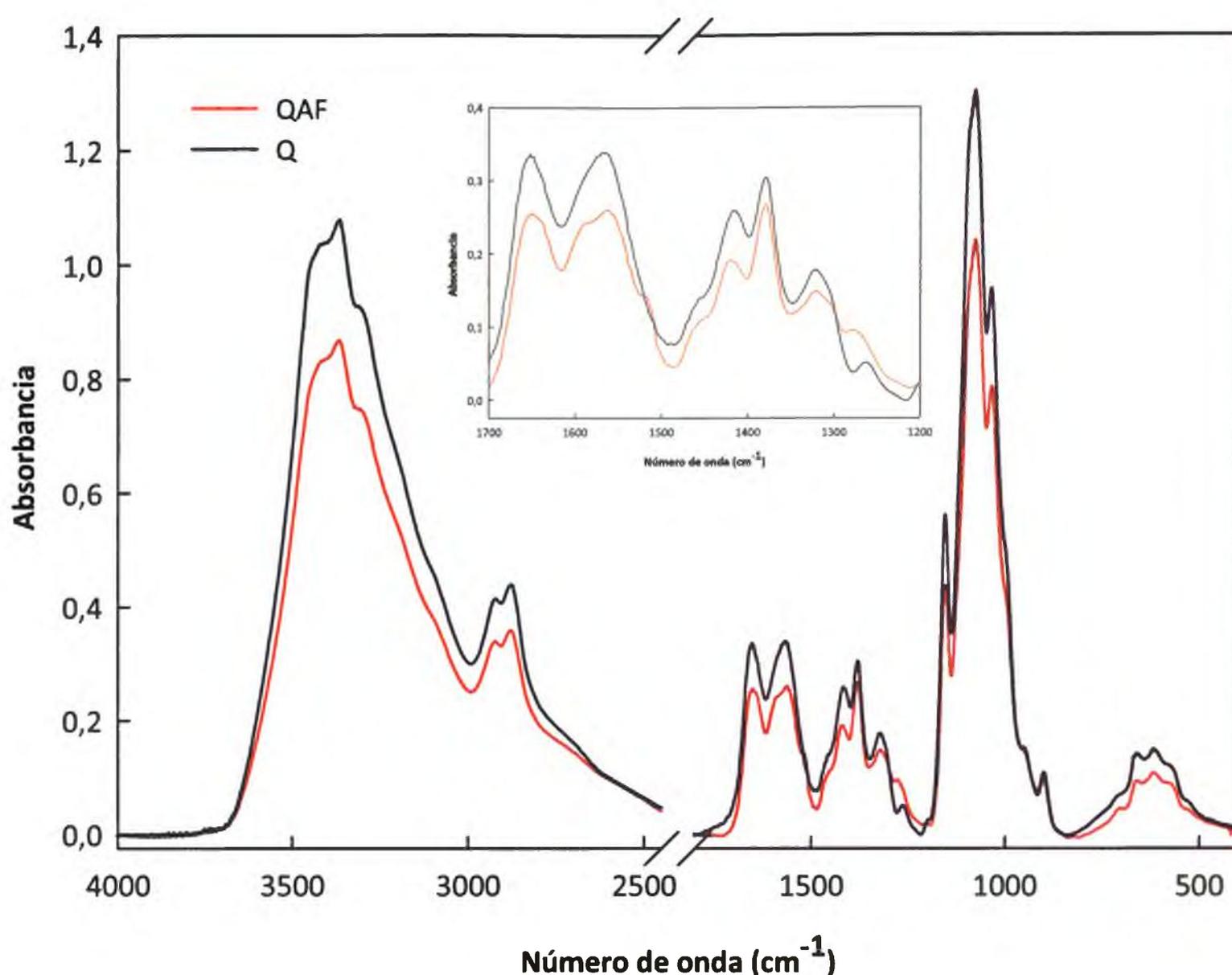


Figura 6.11 Espectros de FTIR obtenidos para muestras de Q y QAF. La región comprendida entre $1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ se muestra ampliada.

Asimismo, los estudios por FTIR revelaron los cambios ocasionados por la incorporación de AF en la matriz de quitosano. En la Figura 6.11 se muestran los espectros de absorción de Q y QAF, evidenciándose una amplia banda en la región comprendida entre $3600\text{ y }3000\text{ cm}^{-1}$ con un mínimo a 3460 cm^{-1} , que sustentaría las diferencias encontradas en el contenido de humedad de las películas.

Para una mayor claridad en la identificación de los cambios ocasionados por el AF se muestra en la Figura 6.11 la región comprendida entre $1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ampliada.

Se pudo observar que el AF produjo el corrimiento de algunos picos previamente identificados en las películas control de Q. Este efecto resultó similar al cambio producido por el agregado de ácido tánico (Capítulo 4), ya que ambos aditivos pueden interactuar con

la matriz, principalmente a través de uniones puente de hidrógeno. Por la estructura molecular que posee el AF es capaz de formar este tipo de uniones a través de sus grupos-OH y C=O.

El espectro FTIR de las películas QAF evidenció la aparición de dos hombros localizados a 1590 y 1516 cm^{-1} los cuales se deben a las vibraciones del esqueleto aromático C-C, característicos del ácido ferúlico (Sebastian y col., 2009; Yu y col., 2010). El pico a 1320 cm^{-1} debido a la amida III se redujo debido al agregado del ácido, de acuerdo a Wang y col. (2008).

Los análisis de DRX permitieron analizar el efecto producido por la incorporación del compuesto activo en la matriz de Q. Mathew y Abraham (2007) y Yu y col. (2010), analizando los patrones de difracción del ácido ferúlico, observaron que los mismos eran característicos de una sustancia cristalina. El patrón de difracción de rayos X de la película de Q muestra tres picos difusos localizados a $2\theta = 11,4, 18,7$ y $22,4^\circ$ (Figura 6.12). Si bien la cantidad adicionada de AF a la matriz de Q fue baja, su presencia intensificó los picos del patrón propios de la película control. Este hecho podría ser explicado debido a un cierto reacomodamiento u ordenamiento de las moléculas involucradas en la interacción del polímero con el agente activo. El AF puede inducir la formación uniones puente hidrógeno inter e intramoleculares dando lugar a la formación de una estructura con un ordenamiento diferente, como pudo observarse a través del TEM (Figura 6.6). Estos resultados podrían explicar las diferencias encontradas tanto en las propiedades de barrera al vapor de agua como al O_2 .

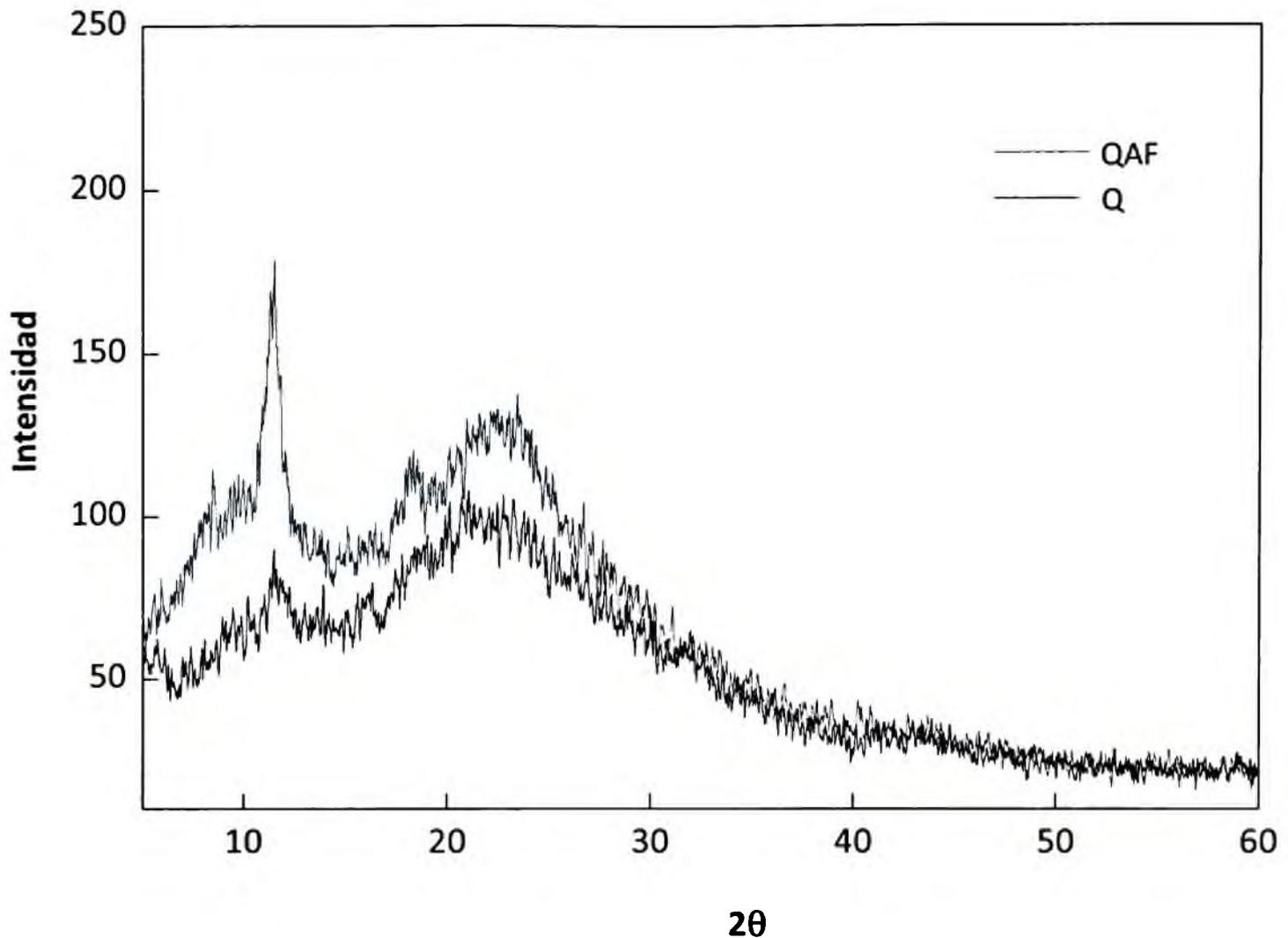
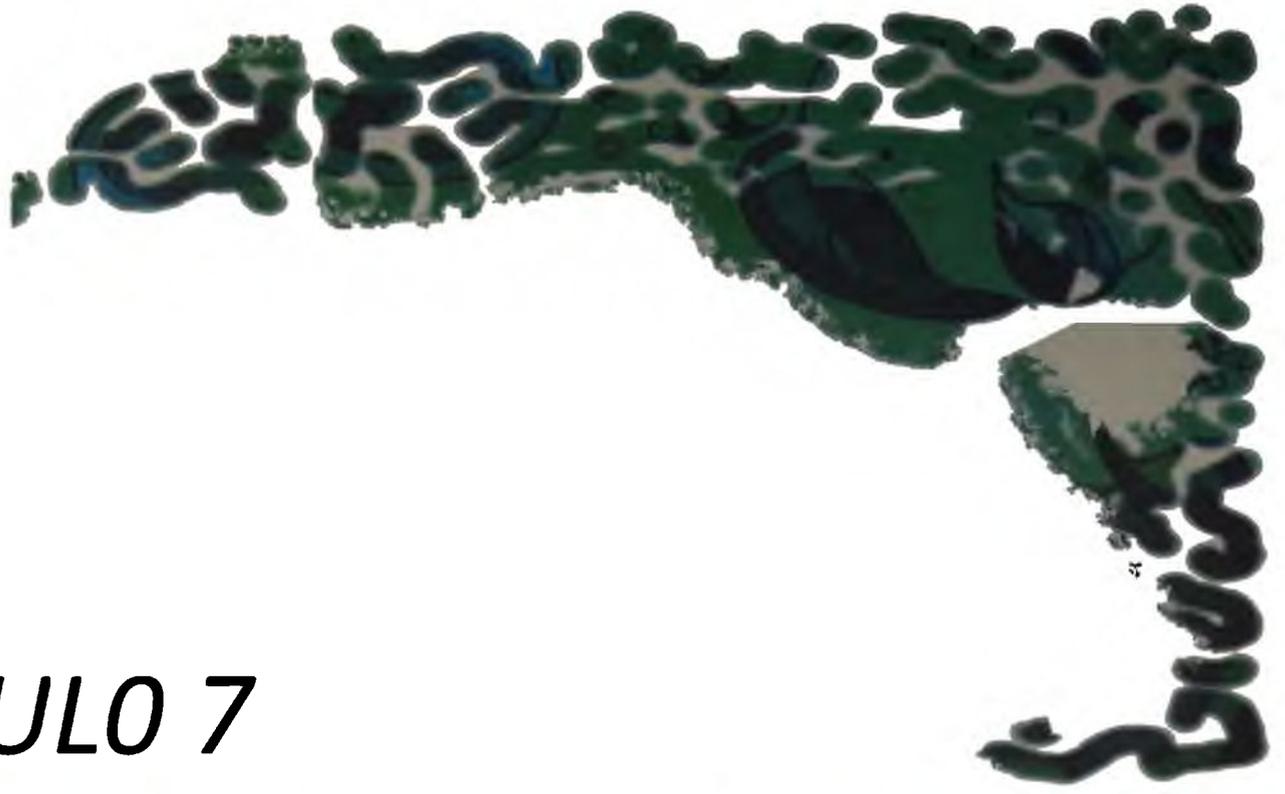


Figura 6.12 Patrón de difracción de rayos X de películas de quitosano con (QAF) y sin ácido ferúlico (Q).

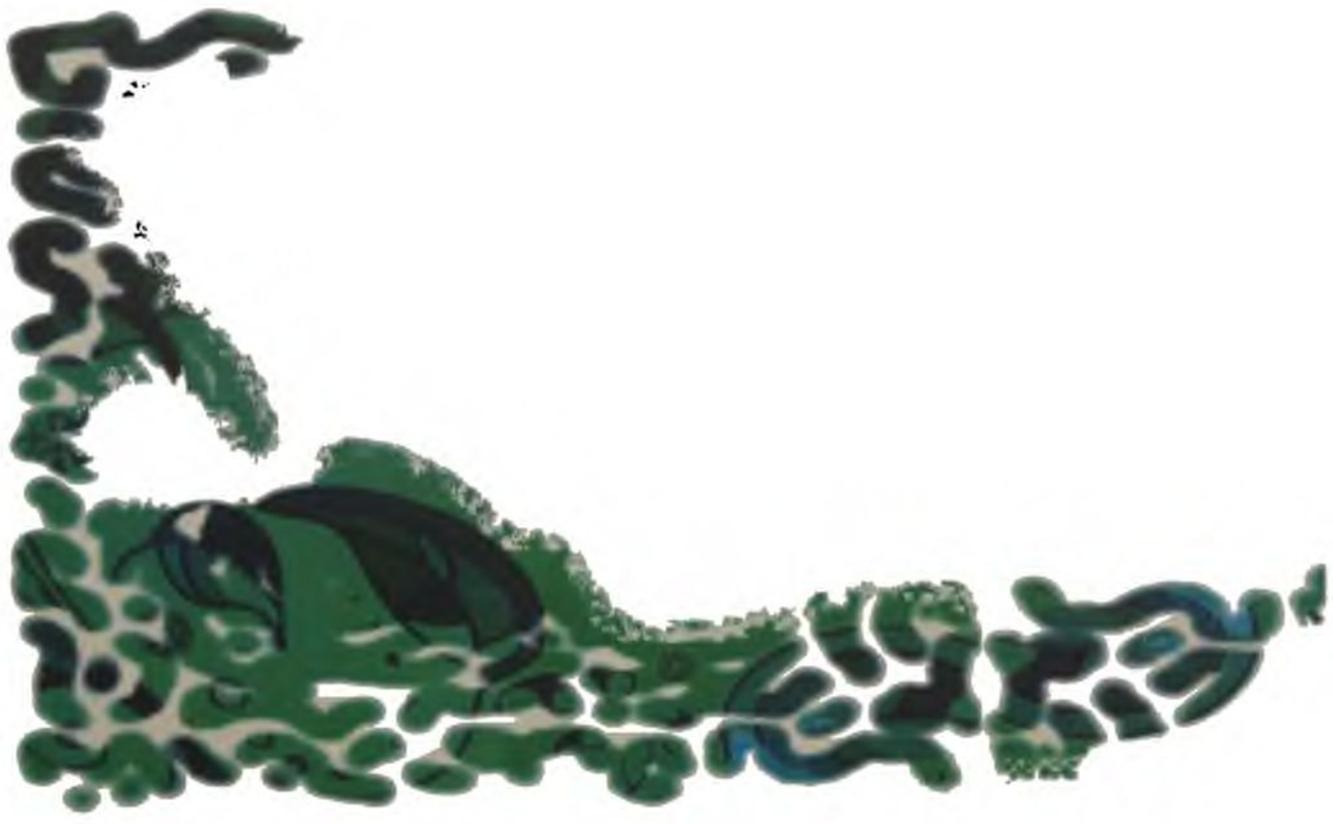
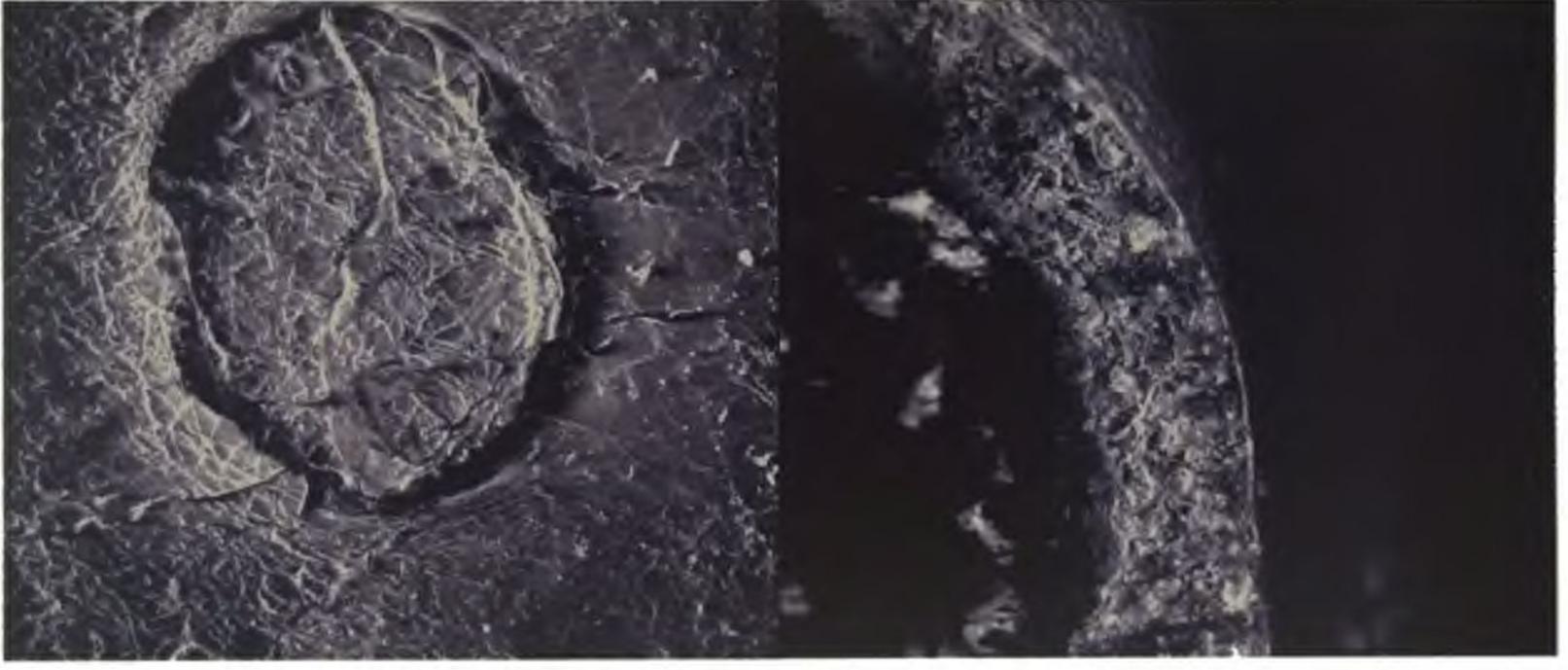
Examinando los resultados obtenidos en el análisis de las interacciones entre el quitosano y el ácido ferúlico se demostró que el ácido se incorporó en la matriz del polímero. El agregado de este componente activo modificó las propiedades de barrera, mecánicas, térmicas y estructurales de las películas de quitosano, provocando una disminución del contenido de humedad y de la permeabilidad al vapor de agua y al O_2 , un aumento de la resistencia y una modificación a nivel estructural evidenciado por TEM. Asimismo se demostró que las películas con AF resultaron ser barreras a la luz UV.

REFERENCIAS

- Cao N., Fu Y., y He J. (2007).** Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21, 575-584.
- Du J., Gemma H. y Iwahori S. (1997).** Effects of Chitosan Coating on the Storage of Peach, Japanese Pear, and Kiwifruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66,(1), 15-22.
- López de Dicastillo C., Nerín C., Alfaro P., Catalá R., Gavara R., y Hernández-Muñoz P. (2011).** Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7832-7840.
- Mathew S., y Abraham T.E. (2007).** Physico-chemical characterization of starch ferulates of different degrees of substitution. *Food Chemistry*, 105, 579-589.
- Mathew S., y Abraham T.E. (2008).** Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826-835.
- Ou S., Wang Y., Tang S., Huang C., y Jackson M.G. (2005).** Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70(2), 205-210.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Hipólito, A., Di Venere, D. y Salerno, M. (2002).** Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67, 1862-1867.
- Sebastian S., Sundaraganesan, N., y Manoharan S. (2009).** Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of ferulic acid by density functional study. *Spectrochimica Acta Part A*, 74, 312-323.
- Yu D-G., Yang J-M., Branford-White C., Lu P., Zhang L., y Zhu L-M. (2010).** Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 400, 158-164.
- Wang S., Gao Z., Chen X., Lian X., y Zhu H. Zheng J., y Sun L. (2008).** The anticoagulant ability of ferulic acid and its applications for improving the blood compatibility of silk fibroin. *Biomedical Materials*, 3, 1-5.



CAPITULO 7



7.1 INTRODUCCIÓN

Los envases plásticos de origen sintético son materiales obtenidos mediante reacciones de polimerización a partir de derivados de petróleo; poseen diversas propiedades que permiten moldearlos y adaptarlos a diferentes formas y numerosas aplicaciones. Estos materiales han hecho un gran aporte para solucionar muchas necesidades de la sociedad, pero con el crecimiento poblacional, ha aumentado notablemente la cantidad de residuos generados y por ende la demanda de materias primas. Se estima que en el mundo se producen más de 50 millones de toneladas de plásticos por año. En Europa el consumo de plásticos anual por persona es de 60 kg en comparación con 80 kg en EEUU. Con esta tendencia se espera un aumento continuo de la demanda de éstos materiales en el futuro inmediato. En este sentido, el consumo responsable es uno de los aspectos trascendentes que contribuyen en gran medida al paradigma del Desarrollo Sustentable, impulsado por numerosos organismos internacionales.

Como es sabido, los envases plásticos son resistentes a la biodegradación, así la contaminación del medio ambiente ocasionada por el descarte y la acumulación de estos materiales se ha convertido en una problemática de alcance mundial.

En este contexto surgen nuevas alternativas como el uso de polímeros biodegradables derivados de fuentes renovables, a fin de disminuir el impacto ambiental que genera el uso de los polímeros sintéticos, y de encontrar aplicaciones que reemplacen las ya existentes. Esta tendencia está impulsada por las tecnologías modernas que proporcionan herramientas para estudiar las relaciones entre la estructura y las propiedades del material desarrollado. Dado que el sector científico e industrial está focalizando la atención en el desarrollo de materiales biodegradables, el desafío actual consiste en diseñar materiales con estabilidad estructural y funcional durante su almacenamiento y su empleo, pero susceptibles a la degradación microbiana (Alvarez y col., 2006).

El término ***degradación*** de polímeros se refiere a los procesos inducidos por la luz solar, calor, humedad, hongos, bacterias y otros agentes que conducen a una modificación y al debilitamiento de la estructura del polímero (Mohee y col., 2008).

El término **biodegradación** se aplica a las transformaciones y al deterioro del polímero ocasionado por la acción de organismos vivos. El proceso de biodegradación está catalizado por la acción de hongos, bacterias, o por enzimas secretadas por los mismos. Como consecuencia de dicho proceso el polímero sufre un cambio en su estructura química con modificaciones apreciables de sus propiedades macroscópicas y microestructurales, como cambios en la coloración de las matrices, formación de poros, grietas, con la aparición de zonas predominantemente rugosas. La biodegradación ocurre inicialmente por colonización superficial del polímero por la acción de hongos y bacterias. La afinidad de los microorganismos por la superficie del material depende de diversos factores tales como su porosidad, rugosidad y textura superficial.

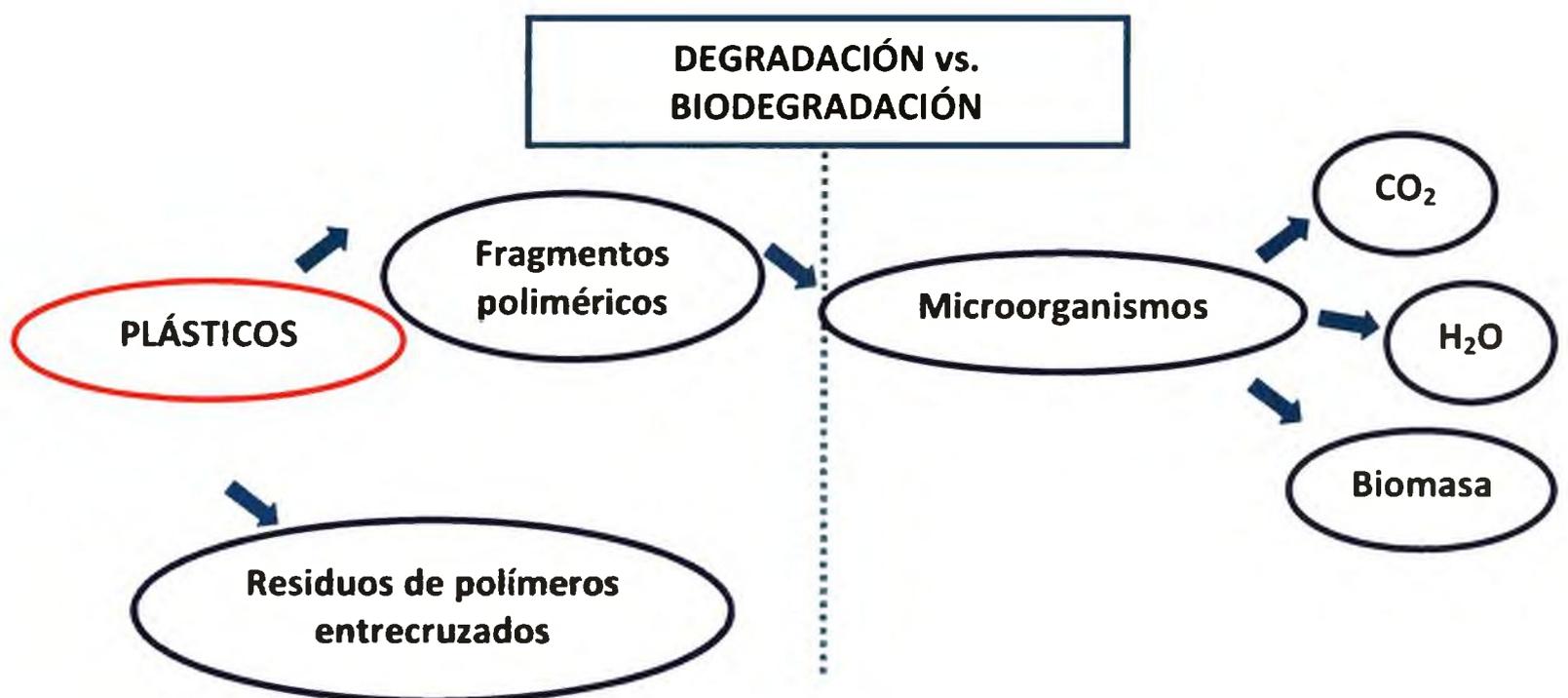


Figura 7.1 Esquema del proceso de degradación versus el proceso de biodegradación, adaptado de Mohee y col. (2008).

Los polímeros naturales se caracterizan por ser biodegradables; el principal requisito de este tipo de polímeros es que contengan grupos lábiles en sus cadenas que puedan romperse fácilmente por acción de un agente externo de naturaleza física o química. En el caso del almidón los enlaces α 1-4 son susceptibles del ataque por las amilasas y los enlaces α 1-6 por las glucosidasas; la celulosa es atacada por las peroxidases, secretadas por algunos hongos, y por endo y exoenzimas producidas por bacterias, mientras que la quitina es degradada por la acción de las quitinasas de acuerdo a lo estudiado por Makarios-Laham y

Lee (1995). Entre los polímeros sintéticos biodegradables se destacan la policaprolactona (PCL), un poliéster alifático biodegradable cuyas propiedades permiten su potencial aplicación en el campo de la medicina y agricultura (Ludueña y col., 2012), los poliésteres como el ácido poliglicólico, el cual se degrada por simple hidrólisis en ambientes acuosos, y la policaprolactona, que es biodegradada por la acción de hongos.

Existen normas tanto en Estados Unidos como en Europa que establecen las metodologías para evaluar la velocidad de los procesos de degradación y de biodegradación de envases plásticos así como de biopolímeros en general.

En Estados Unidos se utiliza la ASTM D6400-99 “Especificación Standard para los plásticos compostables” que es una norma que establece los requerimientos y especificaciones del ensayo y la norma ASTM D5988-03 “Método de ensayo standard para la determinación de la degradación aeróbica de los materiales plásticos en condiciones controladas de compostaje” que establece el procedimiento para medir la degradación aeróbica de los materiales.

En Europa se utiliza la UNE 13432:2001/AC “Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación” y la norma ISO 14855-1:2005 “Determinación de la biodegradación aeróbica final y desintegración de materiales plásticos en condiciones de compostaje controladas”, que describe el procedimiento del análisis.

Si bien los materiales objeto de este estudio son reconocidos como polímeros naturales por su fuente de obtención y se asumen como biodegradables, las investigaciones referidas a la biodegradación de películas a base de quitosano son hasta el momento escasas. Por este motivo, se consideró que el estudio de la biodegradación de los materiales desarrollados era imprescindible (Figura 7.1).

En general, los métodos de ensayo determinan la biodegradabilidad total y el grado de desintegración del material degradado bajo condiciones que simulan un proceso de compostaje aeróbico intensivo. Los productos finales de la biodegradación aeróbica del material son: dióxido de carbono, agua, sales minerales, y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

Existen en bibliografía diferentes métodos para evaluar la biodegradabilidad de las películas. Entre ellos, se destacan la determinación del CO₂ generado a intervalos regulares

bajo condiciones estrictamente controladas, con el fin de determinar la producción del gas debido a la acción de microorganismos. El porcentaje de biodegradación se estima mediante la relación entre el CO₂ generado a partir del material ensayado y la cantidad teórica máxima que puede producirse a partir del material evaluado (Rimdusit y col., 2008). Otros métodos empleados para evaluar la biodegradación de un material consisten en realizar un seguimiento del cambio en el peso molecular promedio del polímero con el tiempo de exposición (Zhang y col., 1996); esta metodología no pudo ser aplicada en el presente trabajo ya que de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1 se requiere que el material se solubilice completamente.

La normalización de las pruebas de biodegradabilidad enfrenta un problema que es inherente a cualquier intento de simulación ambiental *in vitro*. Cuando se pretende integrar en el laboratorio el mayor número de variables, buscando reflejar la complejidad real de los fenómenos naturales, disminuye también la posibilidad de construir métodos reproducibles y por lo tanto susceptibles de normalización. Así, las pruebas de biodegradabilidad normalizadas deben contar con metodologías experimentales simples y al mismo tiempo aproximarse lo más posible a los fenómenos que realmente suceden en la naturaleza (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004).

Otro de los aspectos que deben tenerse en cuenta son las modificaciones químicas producidas en las películas, como los tratamientos que ocasionan la reticulación de la matriz permitiendo obtener una malla estable y más resistente al proceso de biodegradación (Weian y col., 2005; Rimdusit y col., 2008). Se esperaría que matrices con estructuras más densas requirieran más tiempo para biodegradarse, ya que bajo estas condiciones las enzimas son menos accesibles a los grupos hidrolizables.

En este Capítulo se evaluó la biodegradación de los diferentes sistemas desarrollados, estudiando el efecto producido por el agregado de aditivos con distintas funcionalidades, y la influencia del tratamiento térmico aplicado.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Evaluación de la biodegradación en suelo de las películas poliméricas de quitosano

Biodegradación de matrices a base de quitosano

El estudio de la biodegradación de las películas poliméricas se realizó teniendo en cuenta la metodología descrita en la Norma ASTM D5988-03, y realizando los experimentos bajo condiciones análogas a las ambientales.

Teniendo en cuenta las múltiples modificaciones realizadas sobre la matriz de quitosano resulta imprescindible analizar la influencia de las mismas sobre el grado y la velocidad de la biodegradación. Por esta razón, se seleccionaron películas con diferentes aditivos y tratamientos, entre ellos el agregado de glicerol como plastificante, ácido tánico como agente entrecruzante y ácido ferúlico incorporado en la matriz de quitosano como un compuesto activo antioxidante, empleando como control de todas las formulaciones ensayadas las películas de quitosano. Asimismo, se evaluó el efecto de las modificaciones estructurales inducidas por el proceso de curado a 160°C durante 30min de las películas de quitosano con y sin agregado de AT sobre la biodegradación de las muestras.

Para desarrollar los ensayos se prepararon películas de 4 cm de diámetro, con espesores en el rango de 45-50 μm . Las muestras se colocaron en un soporte constituido por una malla plástica, se enterraron en recipientes a una profundidad 5 cm desde la superficie a fin de asegurar la degradación aeróbica. Como medio degradante se utilizó la propia microflora presente el suelo utilizado. Las características fisicoquímicas y la composición de la tierra utilizada se indican a continuación: humedad: 17-19%, cenizas: 76-79%, relación C/N: 11,5, materia orgánica: 3,5-4,5%, pH: 7 y conductividad eléctrica: 0,5-1 mS cm^{-1}

De acuerdo a la metodología descrita en la Norma ASTM D5988-03 se adicionó 1 g de compost cada 25 g de tierra. Las características fisicoquímicas y la composición del compost utilizado fueron: humedad: 35-40%, cenizas: 40-45%, relación C/N: 7,7, materia orgánica: 15-20%, pH: 6,2 y conductividad eléctrica: 1,1 mS cm^{-1}

Los recipientes se acondicionaron a una temperatura y una humedad relativa controlada de 20°C y 50%, respectivamente, tomadas como condiciones ambientales medias. En todos los casos las películas se regaron frecuentemente con un rociador. Similares condiciones fueron utilizadas por Ludueña y col. (2012) evaluando la biodegradabilidad de envases compuestos por policaprolactona y fibras de lignocelulosa.

Variación de peso: La medida de la variación de peso se realizó para evaluar si las películas expuestas a un medio propicio para su biodegradación, sufrían pérdidas de masa

como consecuencia de dicho proceso. La variación de peso a los diferentes tiempos de ensayo se cuantificó gravimétricamente.

La pérdida de peso (%) se determinó una vez que las muestras fueron desenterradas de acuerdo con la Ec. 7.1. Las muestras se limpiaron con un cepillo cuidadosamente para no dañar su estructura y minimizar los errores asociados a cuantificar masa debida a la presencia de partículas ajenas a la matriz.

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final})}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. 7.1}$$

Estudios morfológicos. Los estudios de la morfología de las películas degradadas se realizaron por microscopía electrónica de barrido con un SEM FEI QUANTA 200 con la microsonda EDX que detecta el espectro de emisión de rayos X de cada elemento generado por el haz de electrones al incidir sobre la muestra, midiendo la concentración de los elementos y permitiendo un análisis químico. Esta herramienta se utilizó para detectar la presencia de componentes propios del suelo en las muestras.

La ventaja de este equipo, a diferencia de las observaciones realizadas con el otro microscopio descrito en Capítulos anteriores, es que no requiere el metalizado previo de las muestras.

Se evaluaron distintos tiempos de exposición para hacer un seguimiento del grado de avance de la degradación de los materiales. En todos los casos se realizaron determinaciones del color de las muestras, de acuerdo a la metodología previamente descrita en el Capítulo 3. Se realizaron inspecciones visuales de las películas luego de haberlas extraído de los recipientes a los distintos tiempos de ensayo y se tomaron fotografías de las mismas.

7.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.3.1 Estudio de las propiedades macroscópicas

En la Figura 7.2 se muestra la evolución de la pérdida de peso para cada una de las muestras ensayadas, hasta un tiempo de ensayo de 150 días.

Es importante señalar que esta técnica no es precisa, debido a los errores asociados, a la misma, sobre todo en las etapas avanzadas del ensayo. Al determinar la pérdida de peso de las muestras de Q, QP y QAF los restos de tierra y biomasa que quedaron incrustadas en

la matriz resultaron difíciles de quitar sin provocar el daño de la muestra, llevando a errores en la determinación del peso. A pesar de esto, se pudo realizar un análisis cualitativo de las muestras. Valores similares de pérdida de peso fueron informados por Ludueña y col. (2012).

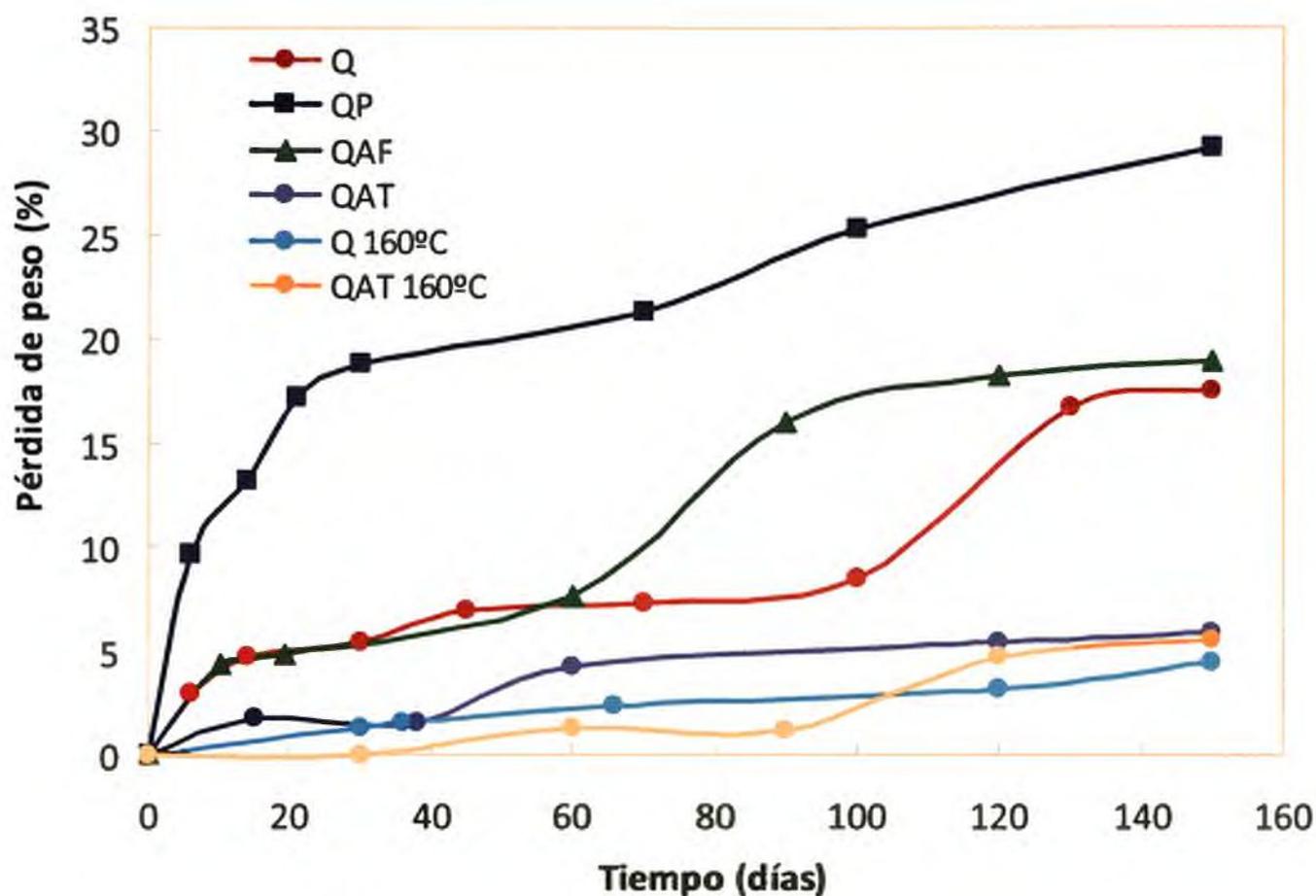


Figura 7.2 Evolución de la pérdida de peso en función del tiempo de películas a base de quitosano expuestas en un medio degradante. Los valores informados corresponden al promedio de dos repeticiones.

En la Figura 7.2 se puede observar que la velocidad de degradación disminuyó en presencia del ácido tánico (QAT) y más aún en las películas tratadas térmicamente (Q160°C, QAT160°C). Esta tendencia puede explicarse teniendo en cuenta que la matriz, ya sea por la presencia del agente entrecruzante o por el curado de la misma, evidenció mayor estabilidad debido a la menor disponibilidad de los grupos susceptibles al ataque microbiano. Esto se puede relacionar con los resultados obtenidos en el Capítulo 5, donde se explicó que por acción de la temperatura se produjeron cambios en la estructura, que serían compatibles con la conversión del quitosano en un material con características similares a la quitina. Asimismo, Xu y col. (1996) observaron un aumento de la tasa de biodegradación de las películas de quitosano sobre la transformación de las películas de quitina.

Otro de los cambios observados, tanto en el caso de las muestras control Q como en las películas de quitosano con plastificante (QP) fue la contracción de la matriz en aproximadamente un 10%.

En todos los casos se detectaron cambios significativos en el color respecto del original de las muestras previo al ensayo. En la Figura 7.3 se puede observar la diferencia de color de las muestras (ΔE) luego de 1 mes de incubación respecto de las películas al inicio del ensayo ($t=0$). Con la exposición de las películas al medio degradante los valores de ΔE aumentaron significativamente ($p < 0,05$), siendo este efecto más pronunciado en el caso de las películas que incluían ácido tánico en su formulación.

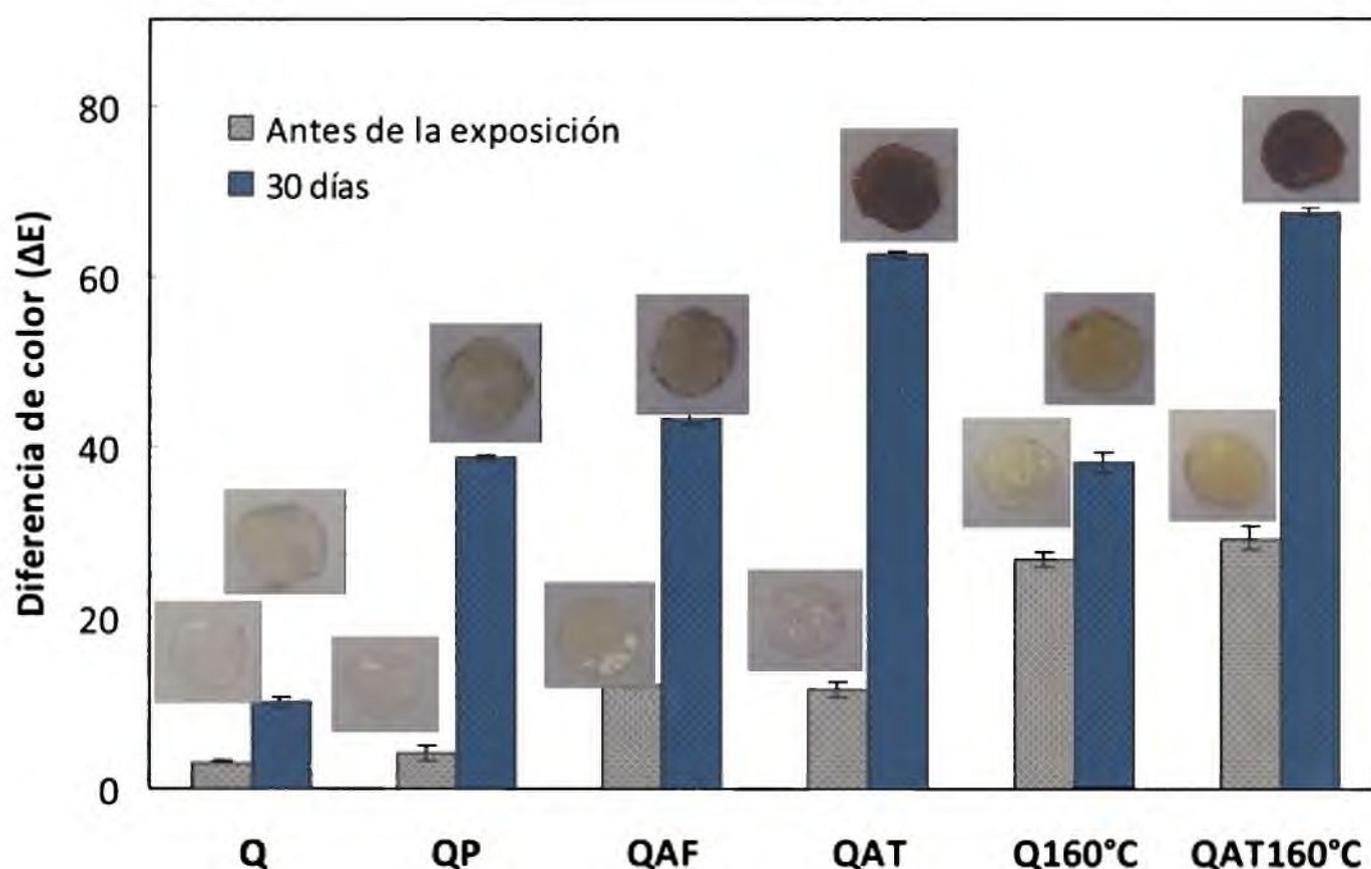


Figura 7.3 Diferencia de color de las películas antes de la exposición ($t=0$) y luego de 30 días de exposición al medio degradante.

El parámetro de cromaticidad b^* fue el más afectado en el caso de las películas de Q control, QP, y QAF así como las curadas Q160°C. En el caso de las matrices entrecruzadas con AT, como las curadas QAT160°C, la luminosidad L y también los parámetros a^* y b^* se vieron alterados. Estos últimos resultados estuvieron asociados a la intensificación de la coloración amarronada de las películas producto de la adición del agente reticulante (Figura 7.3).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en los atributos de color de las muestras para mayores tiempos de exposición.

Las muestras expuestas al proceso de biodegradación sufrieron cambios evidentes en la textura a tiempos cortos, luego aparición de pequeños poros en las muestras Q y QP y un notable aumento de la rugosidad sobre todo en las muestras de Q, QP y QAF.

Luego de 30 días de ensayo, las películas de Q que inicialmente eran transparentes, débiles, flexibles y de color ligeramente amarillo, intensificaron su color y se convirtieron en frágiles, a pesar de no haberse registrado variaciones importantes en el peso de las muestras. Estos cambios producidos resultaron signos evidentes de que el quitosano había sido objeto de las etapas primarias de la degradación por el medio degradante al que se lo expuso. Resultados similares fueron encontrados por Xu y col. (1996). En contraste con las muestras de Q y QAF, las películas QP evidenciaron mayor pérdida de peso luego de los 150 días de incubación. Estos cambios resultaron menos marcados en las matrices QAT, Q160°C y QAT160°C (Figura 7.2).

7.3.2 Estudio de las propiedades morfológicas

Las Figuras 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8 y 7.9 muestran la morfología de la superficie y de los cortes transversales de las películas parcialmente degradadas. Se pueden observar las imágenes obtenidas por SEM luego de 1 mes de exposición y en los estadíos finales del ensayo (150 días) de los distintos tipos de muestras analizadas. Se observó que independientemente de la formulación, con el tiempo de exposición al medio degradante, se intensificó el ataque de la matriz por la flora microbiana propia del suelo. En algunos casos, se presentan en las micrografías de las superficies las zonas magnificadas para resaltar claramente la presencia de micelios de hongos recubriendo la superficie de la película.

Los estudios morfológicos por SEM fueron complementarios de los ensayos de variación de peso e inspección visual, dado que ayudaron a corroborar la existencia de la transformación que se estaba desarrollando, permitiendo una evaluación detallada del proceso de biodegradación. En los casos menos susceptibles al ataque microbiano como las películas entrecruzadas con AT así como las sometidas al proceso de curado, estas observaciones microscópicas resultaron de una invaluable ayuda para revelar una

prominente colonización de las muestras por filamentos de hongos en los estadíos iniciales, ya que no presentaban signos de deterioro microbiológico por simple observación visual. A este tiempo sólo fue posible detectar cambios en las propiedades ópticas y de textura. Resultados similares fueron informados por Alvarez y col. (2006). Wu (2005) también empleó la microscopía electrónica de barrido para seguir la evolución de la degradación de su sistema trabajando bajo condiciones favorables a bacterias aerobias termófilas.

Las micrografías del corte de las películas de Q revelaron la formación de cavidades distribuidos al azar los cuales se agudizaron con el tiempo de incubación de las muestras (Figura 7.4). Resultados similares fueron informados por Kuo y col. (2006) quienes evaluaron la biodegradación de mezclas de quitosano y nylon. Zhang y col. (1996) estudiaron la biodegradación de matrices a base de celulosa por SEM a distintos tiempos de exposición y también encontraron una estructura porosa con signos evidentes de degradación debido a la presencia de micelios de hongos en la superficie

En los casos de las películas Q, QP y QAF se observa a partir de los espectros EDX la presencia de sílice proveniente de partículas de suelo incrustadas en la matriz las cuales no pudieron ser removidas luego de su extracción. Estos resultados concuerdan con la mayor afinidad de algunas películas con el agua lo que podría explicar este comportamiento en comparación con las matrices entrecruzadas (QAT) y curadas (Q160°C-QAT160°C).

Biodegradación de matrices a base de quitosano

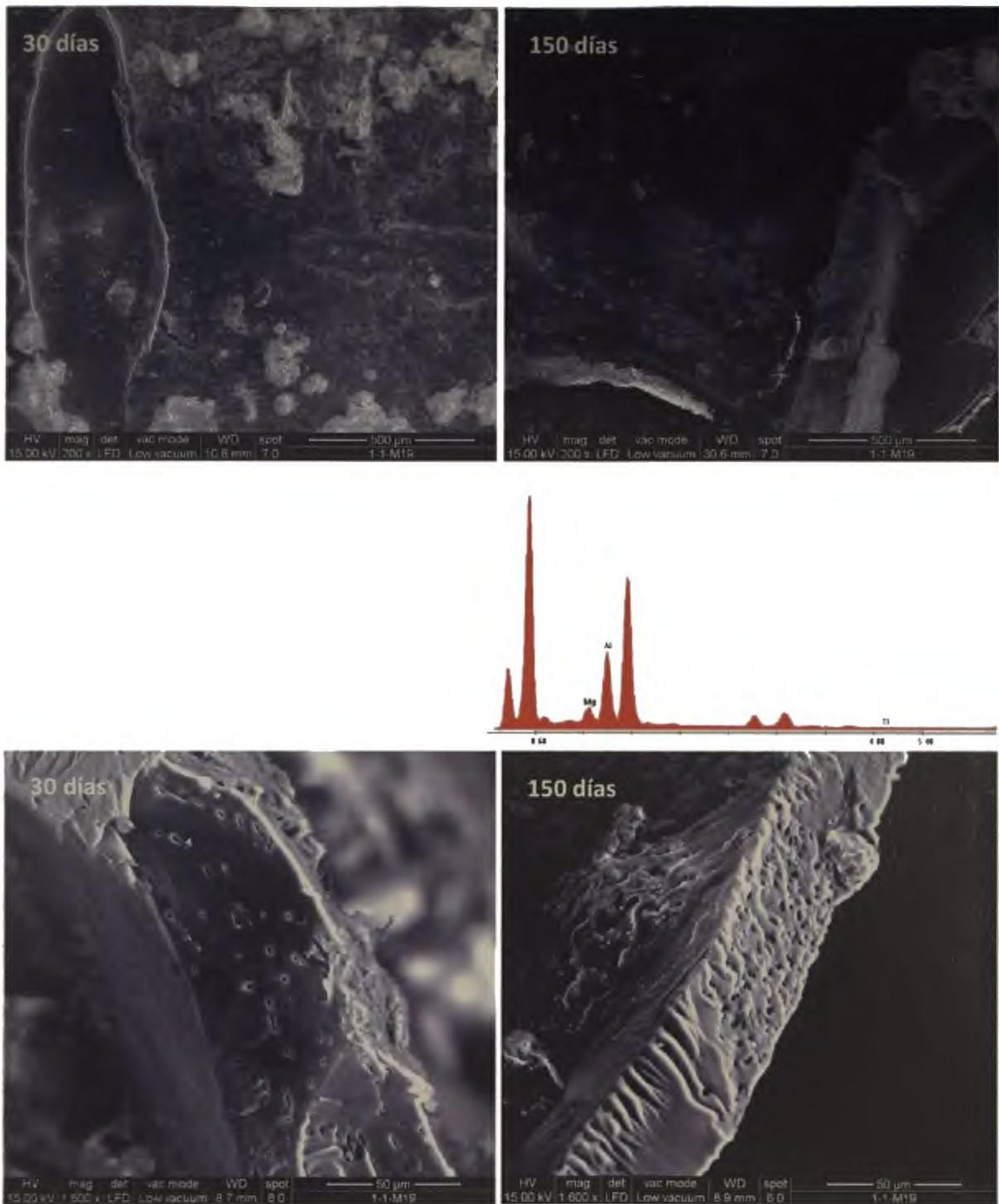


Figura 7.4 Morfología superficial y del corte trasversal de películas de Q luego de 30 y 150 días de exposición al medio degradante. Se muestra el espectro EDX de las partículas incrustadas en la superficie. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

Biodegradación de matrices a base de quitosano

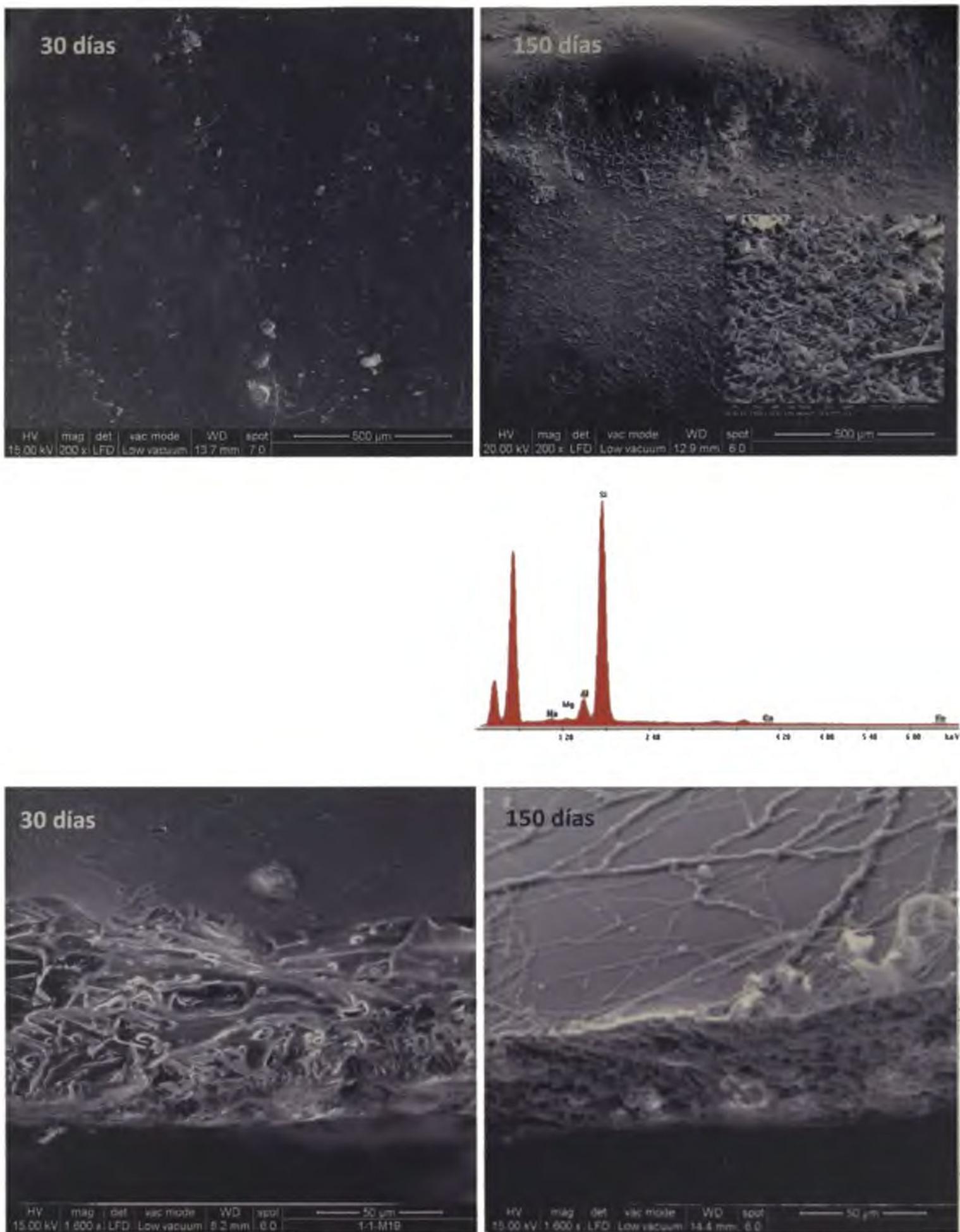


Figura 7.5 Morfología superficial y del corte trasversal de películas de QP luego de 30 y 150 días de exposición al medio degradante. Se muestra el espectro EDX de las partículas incrustadas en la superficie. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

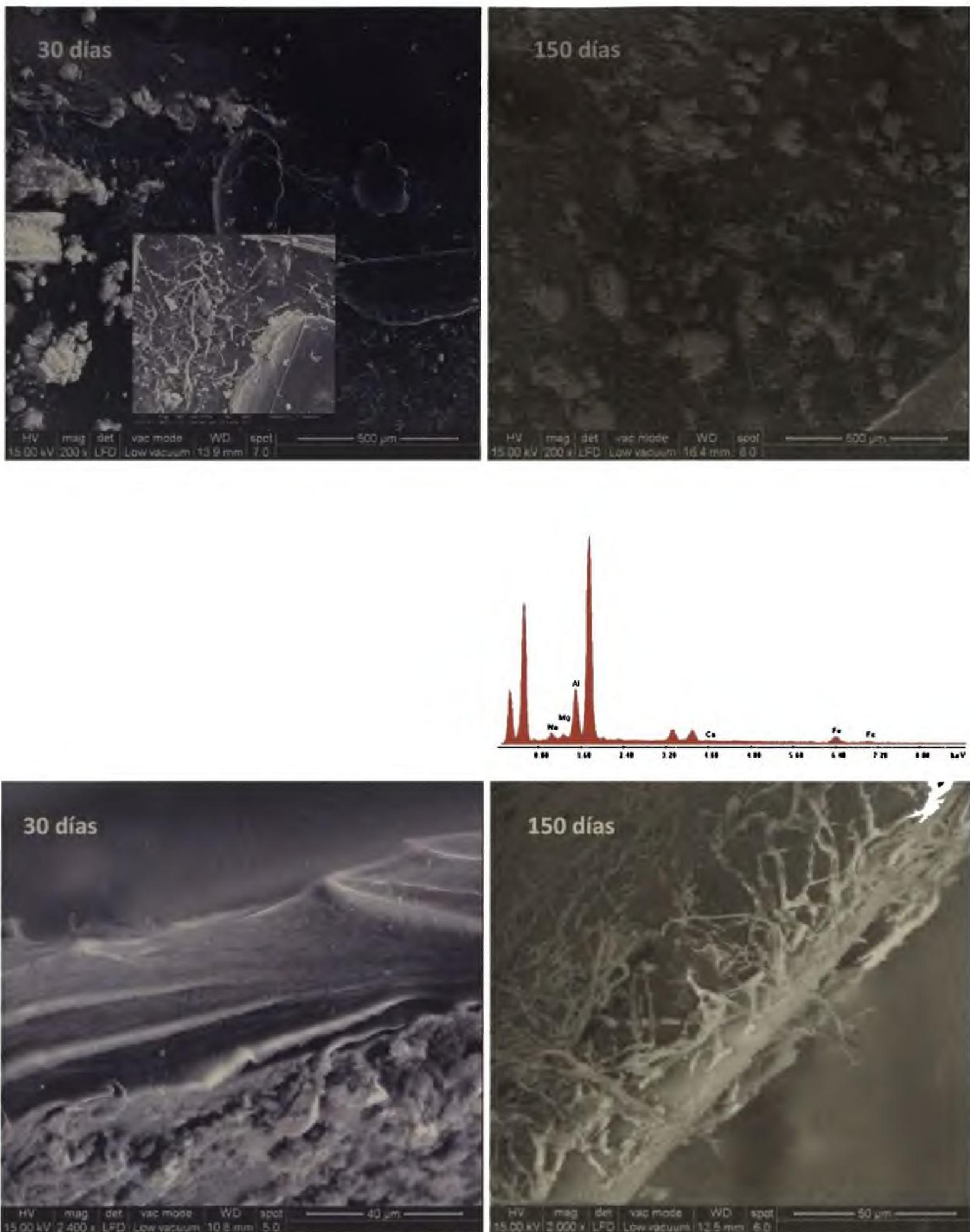


Figura 7.6 Morfología superficial y del corte trasversal de películas de QAF luego de 30 y 150 días de exposición al medio degradante. Se muestra el espectro EDX de las partículas incrustadas en la superficie. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

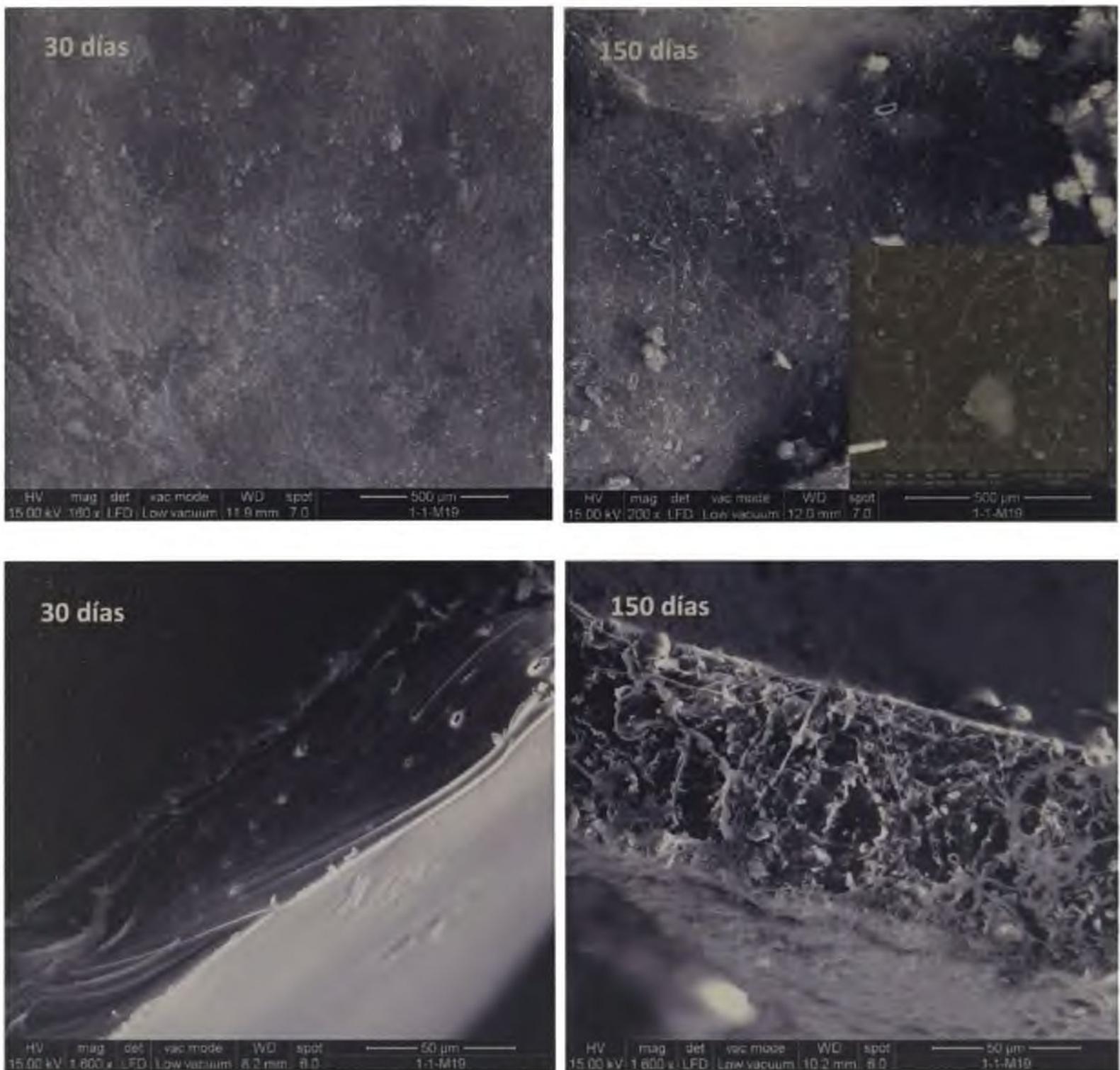
Biodegradación de matrices a base de quitosano

Figura 7.7 Morfología superficial y del corte trasversal de películas de QAT luego de 30 y 150 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

Biodegradación de matrices a base de quitosano

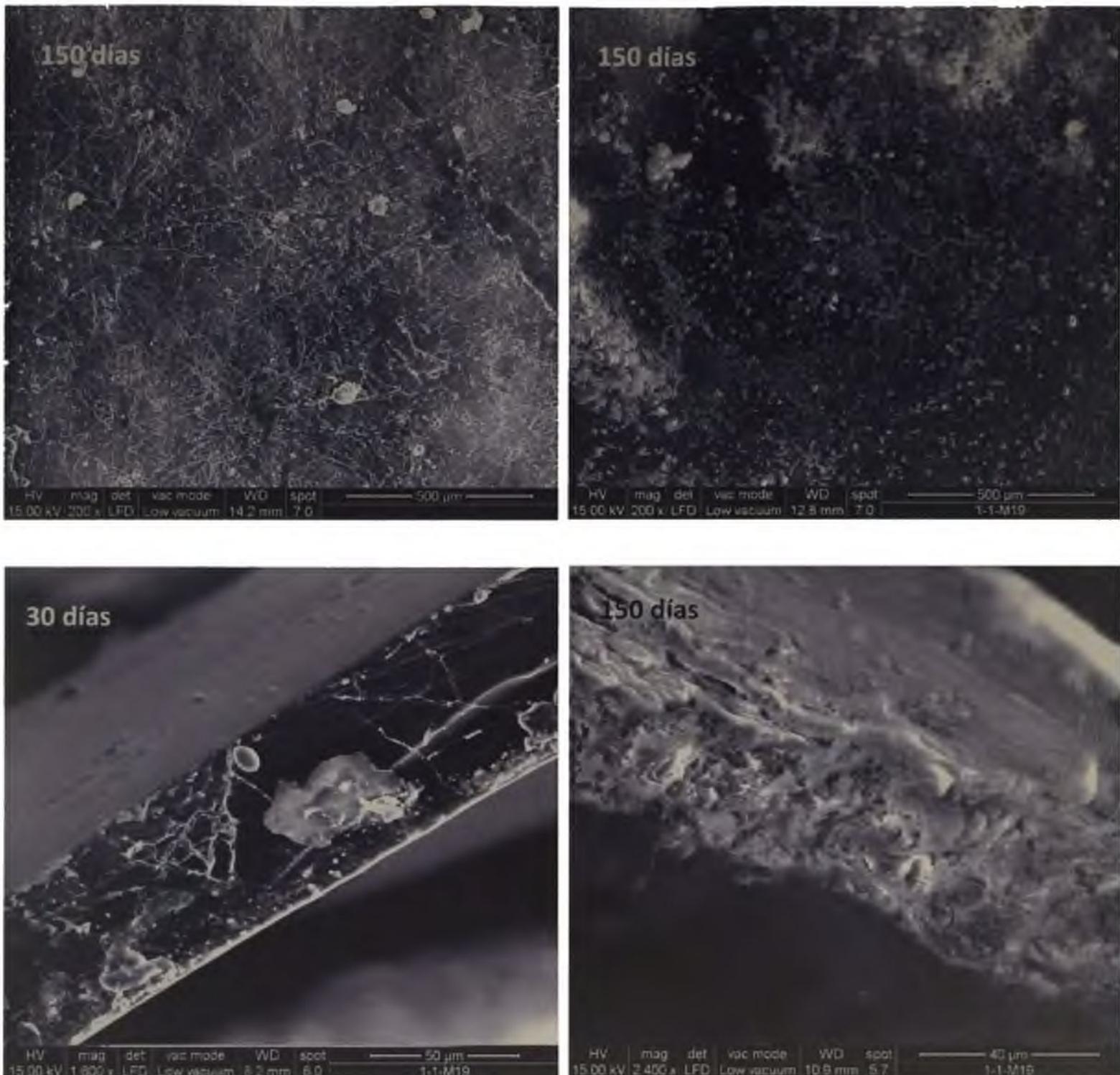


Figura 7.8 Morfología superficial y del corte trasversal de películas de Q 160°C 30 min luego de 30 y 150 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

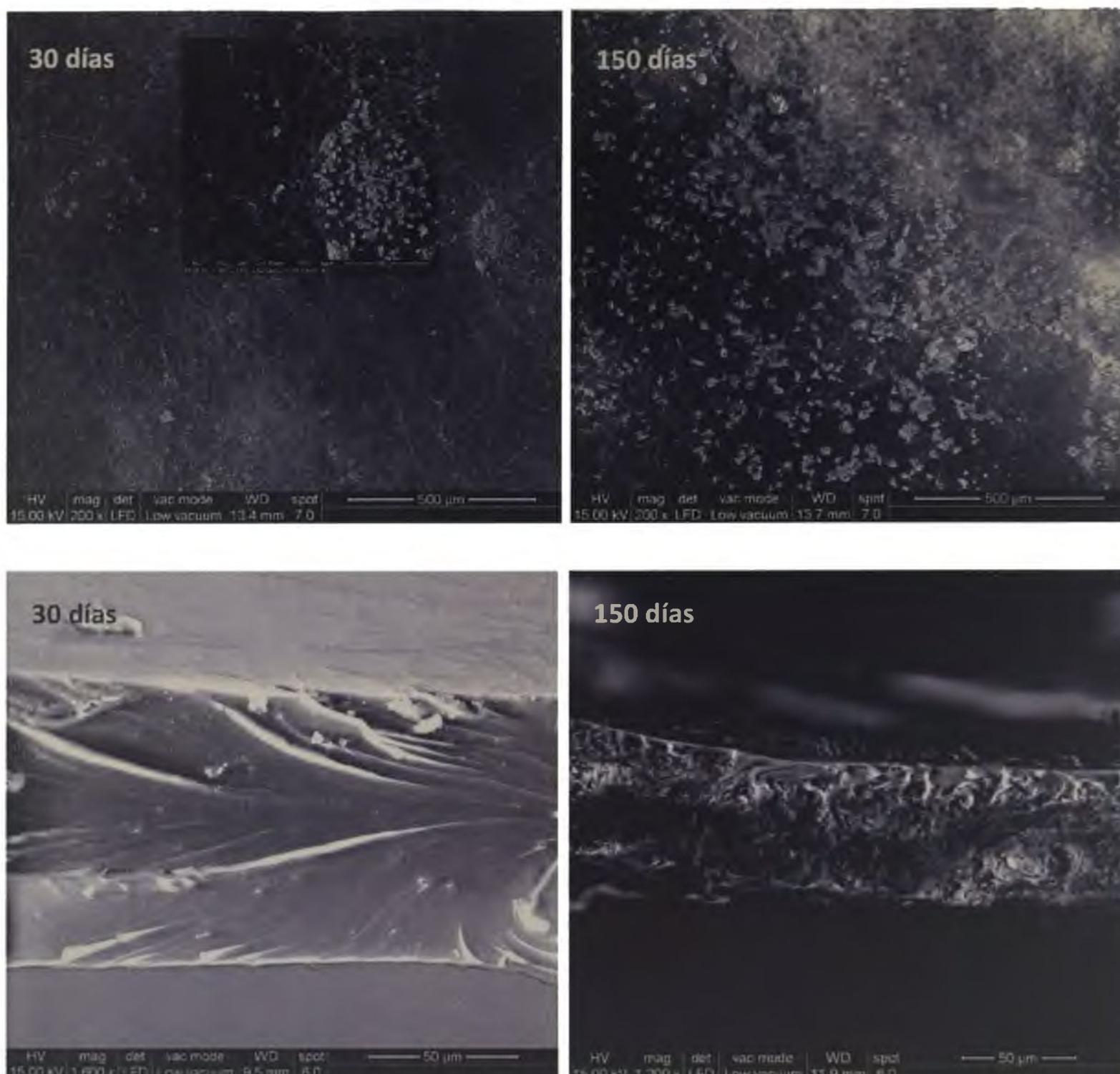
Biodegradación de matrices a base de quitosano

Figura 7.9 Morfología superficial y del corte trasversal de películas de QAT 160°C 30 min luego de 30 y 150 días de exposición al medio degradante. El aumento utilizado se muestra en las micrografías.

La difusión de agua en el suelo como consecuencia del regado de las muestras causa una degradación hidrolítica del material. La capacidad que tiene la matriz para absorber agua es un parámetro importante que influye significativamente en la biodegradación de un material, debido que al aumentar dicha capacidad se facilita la acción de las enzimas que convierten al polímero en fragmentos más pequeños y asimilables por los microorganismos presentes en el medio. El agua penetra en la matriz polimérica provocando el hinchamiento,

y la ruptura de uniones puentes de hidrógeno intermoleculares, causando la hidratación de las moléculas y finalmente la hidrólisis de los enlaces inestables.

De acuerdo con Ludueña y col. (2012) el principal mecanismo de escisión de las cadenas durante la biodegradación es la hidrólisis enzimática y química (Grima y col., 2000), entonces el proceso de biodegradación será dependiente de la disponibilidad de agua que promueve el ataque microbiano y la hidrólisis de la matriz (Alvarez y col., 2006; Zhao y col., 2008). La naturaleza amorfa de la matriz podría ser considerada la principal responsable del patrón de degradación para los materiales biodegradables.

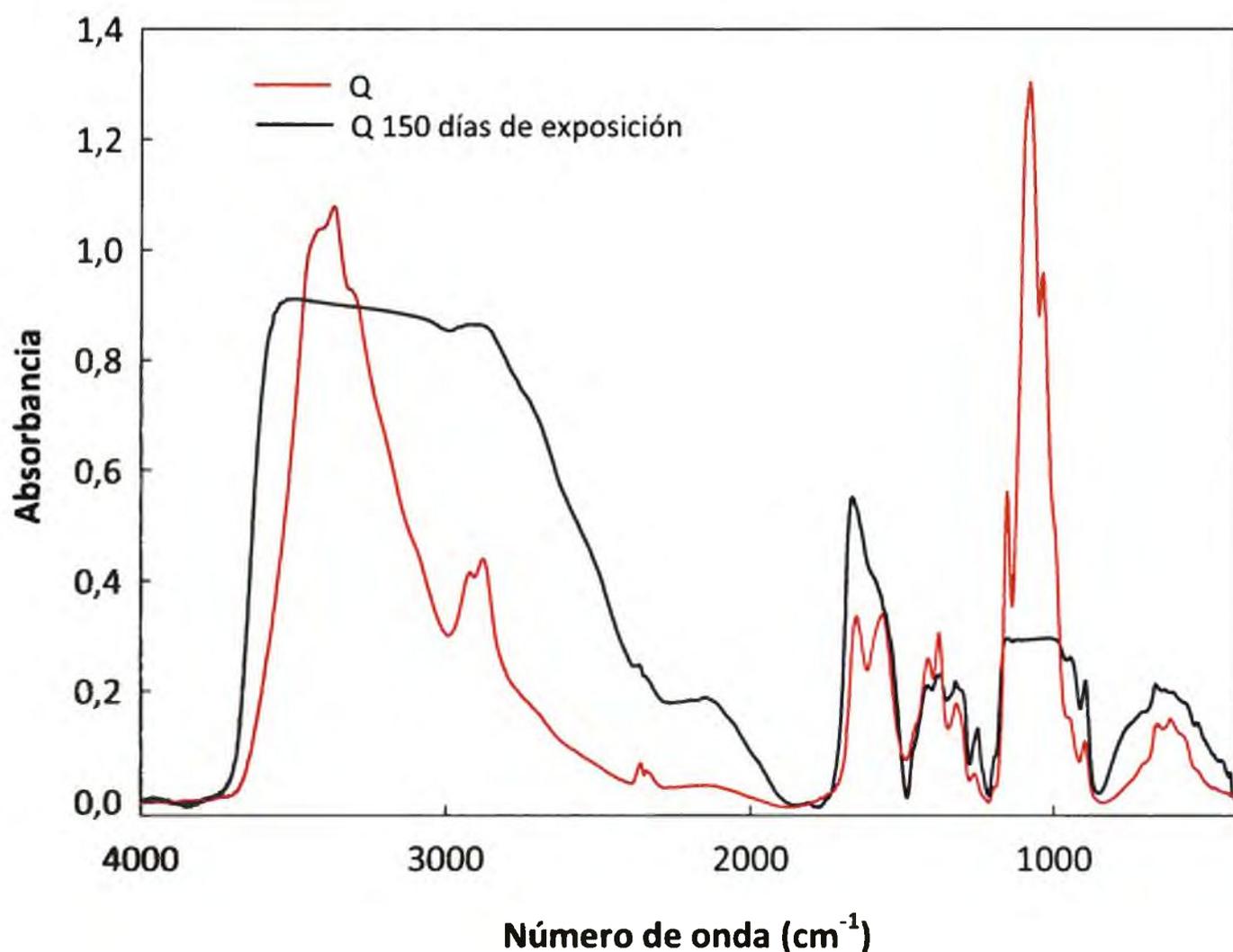


Figura 7.10 Espectro de FTIR de una muestra de Q luego de 150 días de exposición respecto de una muestra control de Q.

Diversos factores influyen en la degradación hidrolítica de los polímeros, entre ellos la naturaleza de los grupos funcionales presentes. Como ya se dijo, existe una correspondencia entre los fenómenos que dependen del transporte de agua en la matriz, existiendo entonces una relación directa entre la sensibilidad del grupo a la hidrólisis y la degradabilidad del polímero. Asimismo, propiedades como la permeabilidad al agua y

solubilidad del material dependen en gran medida del carácter hidrofílico de los grupos funcionales presentes en la matriz, del número de éstos, y de su accesibilidad. De acuerdo a Weian y col. (2005) y Rimdusit y col. (2008), la disminución de la permeabilidad también estaría relacionada con la disminución de la biodegradación. La PVA de las películas de Q se redujo con la adición del agente entrecruzante AT y en consecuencia también lo hizo la biodegradación.

Después de 150 días de exposición el espectro de FTIR de la películas de Q (Figura 7.10) muestra que las bandas perdieron definición o desaparecieron, demostrando que esta técnica también puede ser usada para seguir o comprobar el proceso de biodegradación. Las regiones más comprometidas fueron las relacionadas con las uniones O-H y N-H, y con los residuos de glucosamina, consecuentemente la distorsión de los espectros puede explicarse considerando la remoción preferencial de algunos grupos por la acción microbiana.

Haciendo un resumen de los resultados obtenidos, se puede remarcar que si bien la determinación de la pérdida de peso no resultó ser una técnica precisa cuantitativamente, fue de utilidad desde el punto de vista cualitativo en simultáneo con el estudio de la morfología de las matrices por SEM, que permitió complementar y corroborar el análisis de los resultados.

Tanto el entrecruzamiento como el curado de las matrices tuvieron influencia sobre la extensión del proceso de biodegradación lo que confirma una mayor estabilidad de la matriz. Asimismo, también se observó un efecto sinérgico de ambos tratamientos, ya que los dos procesos en simultáneo retardaron aún más la visualización de la biodegradación. Esto sin duda estuvo relacionado con la mayor dificultad que ofrecieron estas matrices al acceso de humedad, debido a un aumento de su carácter hidrofóbico, y consecuentemente al ataque fúngico y a todas aquellas reacciones mediadas por la presencia de agua.

REFERENCIAS

- Alvarez V.A., Ruseckaite R.A., y Vázquez A. (2006).** Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. *Polymer Degradation and Stability*, 91, 3156-3162.
- ASTM D5988-03** Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation in Soil of Plastic Materials or Residual Plastic Materials After Composting.
- Grima S., Bellon-Maurel V., Feuilloley P., y Silvestre F. (2000).** Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: A review of environmental and physicochemical parameter settings in laboratory simulations. *Journal of Polymers and the Environment*, 8(4), 183-195.
- Kuo P-C., Sahu D., y Yu H.H. (2006).** Properties and biodegradability of chitosan/nylon 11 blending films. *Polymer Degradation and Stability*, 91, 3097-3102.
- Ludueña L., Vázquez A., y Alvarez V. (2012).** Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 87, 411-421.
- Makarios-Laham I., y Lee T-C. (1995).** Biodegradability of chitin- and chitosan-containing films in soil environment. *Journal of Polymers and the Environment*, 3(1), 31-36.
- Mohee R., Unmar G.D., Mudhoo A., y Khadoo P. (2008).** Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Management*, 28, 1624-1629.
- Rimdusit S., Jingjid S., Damrongsakkul S., Tiptipakorn S., y Takeichi T. (2008).** Biodegradability and property characterizations of methyl cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, 72, 444-455.
- Vázquez-Rodríguez G., y Beltrán-Hernández R.I. (2004).** Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. Una revisión. *Interciencia*, 29 (10), 568-573.
- Weian Z., Wei L., y Yue F. (2005).** Synthesis and properties of a novel hydrogel nanocomposites. *Material Letters*, 59, 2876-2880.
- Wu C-S. (2005).** A comparison of the structure, thermal properties, and biodegradability of polycaprolactone/chitosan and acrylic acid grafted polycaprolactone/ chitosan. *Polymer*, 46, 147-155.

- Xu J., McCarthy S.P., Gross R.A., y Kaplan D. (1996).** Chitosan film acylation and effects on biodegradability. *Macromolecules*, 39, 3436-3440.
- Zhang L., Liu H., Zheng L., Zhang J., Du Y., y Feng H. (1996).** Biodegradability of regenerated cellulose films in soil. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 35, 4682-4685.
- Zhao Q., Tao J., Yam R.C.M., Mok A.C.K., Li R.K.Y, y Song C. (2008).** Biodegradation behavior of polycaprolactone/rice husk eco-composites in simulated soil medium. *Polymer Degradation and Stability*, 93, 1571-1576.



CAPITULO 8



PARTE I**PELÍCULAS ACTIVAS ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS****8.1.1 ANTECEDENTES GENERALES DE ENVASES ACTIVOS**

La posibilidad de controlar la formulación de las películas permite incorporar componentes como agentes antimicrobianos y/o antioxidantes, los cuales modifican la funcionalidad de los envases ampliando sus potenciales aplicaciones y transformándolos en activos (Cuq y col., 1995, Tharanathan, 2003). Este es un concepto innovador que puede ser definido como un tipo de envase en el que la película, el producto y el medio o entorno interactúan para prolongar la vida útil y mejorar la seguridad, manteniendo las cualidades del producto (Suppakul y col., 2003).

Los envases activos han sido utilizados en la preservación de una amplia variedad de alimentos con diferentes mecanismos de deterioro que limitan su vida útil. El envasado activo tiene como finalidad incrementar el tiempo de conservación de los alimentos y preservar o potenciar sus propiedades organolépticas. Para ello se liberan sustancias de interés (antimicrobianos, antioxidantes, aromas) y/ o se retiran compuestos indeseables (oxígeno, etileno, olores) del producto envasado o de su entorno (Ahvenainen, 2003; Dutta y col., 2009; López-de-Dicastillo y col, 2012; Soares y Hotchkiss, 1998; Vermeiren y col., 1999).

Así, los envases activos controlan varios aspectos que pueden jugar un papel importante en la determinación de la vida útil de los alimentos envasados tales como, procesos fisiológicos (respiración de frutas y hortalizas frescas), procesos químicos (oxidación lipídica), procesos físicos (endurecimiento del pan, deshidratación), aspectos microbiológicos (deterioro ocasionado por la acción de microorganismos).

8.1.1.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS DESARROLLADAS

El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que estando presente en una concentración baja comparada con la de un sustrato oxidable, retarda o inhibe la oxidación de dicho sustrato, ya que es capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones que son captados por estos (Fennema, 1996). En el caso de los alimentos, la oxidación es una de las mayores causas de deterioro en

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

productos con alto contenido graso, causando rancidez, pérdida de la calidad nutricional, color, sabor y textura.

En relación al uso de polifenoles naturales como antioxidantes, diversos autores han recopilado distintos trabajos referidos a su utilización e interpretación de mecanismos de acción de estas sustancias (Brand-Williams y col., 1995; Moure y col., 2001; Paixão y col., 2007).

Por otra parte, según las reacciones químicas involucradas, los ensayos de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: i) transferencia de un átomo de hidrógeno y ii) transferencia de un electrón desapareado. La mayoría de los mecanismos de transferencia de un átomo de hidrógeno se aplica a un esquema de reacción competitiva en el cual el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peróxidos generados.

En los ensayos de determinación de la actividad antioxidante mediante espectroscopía se emplean reactivos que al interactuar con el antioxidante problema provocan una disminución de la absorbancia proporcional a la concentración remanente y la actividad antioxidante del compuesto en estudio. Existen diversos métodos para medir la capacidad antioxidante cuyos resultados brindan una información limitada del mecanismo propio de la reacción involucrada (Antolovich y col., 2002; Gülcin y col., 2010; Moure y col., 2001). Entre los distintos métodos existentes se destacan el ensayo de TEAC (Capacidad antioxidante expresada en equivalentes Trolox) basado en la captación por los antioxidantes del radical catión ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)) generado en el medio de reacción. Por otro lado, el ensayo de DPPH es un método rápido y sencillo y a diferencia del ensayo TEAC no es necesario preparar previamente el reactivo ya que el DPPH se comercializa en la forma de radical y sólo requiere su disolución.

Otros ensayos son los de Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC) y Poder antioxidante de reducción del Fe⁺³ (FRAP). Esta última técnica fue desarrollada por Benzie y Strain (1996) como método de medida de la capacidad antioxidante plasmática, y posteriormente aplicada a muestras de alimentos.

Uno de los métodos más empleados para la determinación de polifenoles totales es el de Folin Ciocalteu, siendo este ensayo un ejemplo típico de transferencia de un electrón desapareado (Paixão y col., 2007). Los valores relativos obtenidos por esta técnica

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

generalmente correlacionan bien con los demás métodos cuando se comparan muestras similares (Singleton y col., 1999).

Cómo ya se ha mencionado, los antioxidantes pueden ser incorporados en las matrices poliméricas, las que actúan como vehículo eficiente del aditivo específico. En este sentido, varios investigadores han informado la liberación de compuestos con propiedades antioxidantes de los materiales de envase. Wessling y col. (1999, 2001) estudiaron la difusión de butilhidroxitolueno (BHT), y de α tocoferol incorporados en polietileno de baja densidad (LDPE) y en polipropileno (PP), liberados en medios simulantes de alimentos grasos; Torres-Arreola y col. (2007) destacaron el retraso de la oxidación de lípidos y la desnaturalización de proteínas debido a la incorporación de BHT en matrices de LDPE. Sin embargo, el BHT presenta una desventaja en cuanto a su nivel de toxicidad ocasionando un riesgo para la salud del consumidor. Hoy en día, la tendencia a reducir el uso de aditivos sintéticos en los envases ha focalizado el interés en su sustitución por antioxidantes naturales.

Sin embargo, existe poca información acerca de la influencia de los agentes antioxidantes naturales en matrices biodegradables (Ou y col., 2005; Cao y col., 2007; Mathew y Abraham, 2008). El desarrollo de películas biodegradables a base de quitosano con un compuesto antioxidante como el ácido ferúlico o ácido tánico constituye una opción innovadora en el área de envases activos.

El ácido ferúlico es un ácido hidroxicinámico natural como se desarrolló en el Capítulo 6, posee reconocidas propiedades antioxidantes asociadas a la actividad de los grupos hidroxilo presentes en su estructura (Ou y Kwok, 2004; Ou y col., 2005; Mathew y Abraham, 2008).

Por otra parte en el Capítulo 4, la estructura y diversas propiedades del ácido tánico ya han sido descritas. El ácido tánico es un aditivo con demostradas propiedades antioxidantes, reconocido como GRAS por la FDA, por lo que puede ser incorporado como compuesto activo en los alimentos dependiendo del tipo de producto.

8.I.1.3 CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS DESARROLLADAS

Tanto la calidad como la seguridad alimentaria están estrechamente relacionadas con el crecimiento microbiano, siendo la principal causa de deterioro que limita la vida útil de un alimento.

En general, los antimicrobianos deben ser: efectivos contra un amplio espectro de microorganismos patógenos en tiempos breves de contacto, ser eficientes en bajas concentraciones, estables en las condiciones de almacenamiento previstas, no deben descomponerse y/o emitir sustancias tóxicas que puedan causar alteraciones en las características organolépticas del producto, y deben cumplir con la legislación vigente respecto de la dosis o concentración de aditivo permitida (Kong y col., 2010).

Appendini y Hotchkiss (2002) establecieron una clasificación de diferentes tipos de envases antimicrobianos de acuerdo a la tecnología a partir de la cual se pueden desarrollar, incluyendo:

- ❖ **Incorporación de pastillas y sobres con agentes antimicrobianos los cuales pueden ser colocados sueltos o adheridos en el interior de los envases.** Entre ellos se utilizan absorbedores de oxígeno, amortiguadores de humedad y generadores de etanol.
- ❖ **Incorporación de agentes antimicrobianos directamente en la matriz polimérica.** Se han aplicado comercialmente para la liberación de drogas, pesticidas, en ingeniería de tejidos, implantes quirúrgicos, productos farmacéuticos y otros dispositivos biomédicos. Sin embargo son pocas las aplicaciones disponibles actualmente vinculadas con la preservación de los alimentos.
- ❖ **Incorporación de agentes antimicrobianos adsorbidos a la superficie del polímero** para aditivos que no toleran las temperaturas utilizadas en el procesamiento de los materiales poliméricos, como fungicidas en ceras usadas para la protección al deterioro de frutas y verduras o ácido sórbico en recubrimientos para envolver embutidos y quesos.
- ❖ **Inmovilización de los agentes antimicrobianos en la matriz mediante enlaces iónicos o covalentes** lo que permite una gradual liberación del compuesto activo al alimento.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

- ❖ **Utilización de polímeros que son inherentemente antimicrobianos** tales como el **quitosano** y la poli-L-lisina. Ambos polímeros policatiónicos son reconocidos por sus propiedades antimicrobianas. El quitosano es eficaz en la inhibición de hongos y levaduras, y de bacterias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) o Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*).

Existen en bibliografía numerosos trabajos de investigación que describen la utilización de agentes antimicrobianos para desarrollar películas activas, como por ejemplo, el agregado de sorbato de potasio en películas a base de kappa-carragenina (Choi y col., 2005) o de almidón de tapioca (Han y Floros, 1998). También se ha incorporado ácido sórbico en polímeros de celulosa (Silveira y col., 2007a) o en películas a base de proteínas de gluten de trigo y lípidos (Redl y col., 1996); asimismo se evaluó la influencia de este ácido en la conservación de masas (Silveira y col., 2007b). Por otra parte, Ouattara y col., (2000) estudiaron el perfil de liberación de ácido acético y propiónico desde películas antimicrobianas de quitosano.

En el presente estudio se estudió la capacidad antimicrobiana de las películas desarrolladas a base de quitosano. Además, dado que una de las posibles aplicaciones de estos materiales es el envasado de productos de pastelería, y que en estos alimentos el ácido propiónico, o sus sales, son los conservantes comúnmente utilizados, se formularon películas activas por disolución de quitosano en una solución de ácido propiónico.

8.1.1.4 ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS INCORPORADOS EN MATRICES POLIMÉRICAS

El diseño y aplicación de polímeros como soportes para la vehiculización, regulación y dosificación controlada de componentes es actualmente uno de los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de materiales activos.

En general, el perfil de liberación depende de la geometría del sistema, de la naturaleza del polímero utilizado, del área, del espesor de la película, así como del tipo y características del componente activo (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995). En

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

consecuencia, la cinética de liberación está condicionada por las propiedades de la matriz polimérica (geometría, peso molecular, cristalinidad y temperatura de transición vítrea) y por las propiedades del propio compuesto activo (concentración inicial, interacciones agente activo-polímero, presión osmótica y solubilidad del compuesto activo incorporado). Existen otros factores que influyen, como las características del medio en el que se va a realizar el ensayo de liberación, el pH y la temperatura. La combinación y control de todos estos parámetros permitirá la obtención de sistemas de liberación controlada apropiados para cada aplicación según sus requerimientos.

La liberación de un componente activo desde una matriz polimérica procede según diferentes mecanismos: liberación desde la superficie de la partícula, difusión a través de la matriz hinchada y liberación debido a la erosión del polímero. En la mayoría de los casos, el agente activo puede ser liberado al medio por uno o por varios mecanismos actuando en forma simultánea (Ritger y Peppas, 1987). De los sistemas de liberación controlada de compuestos activos estudiados, los más representativos son mostrados en la Figura 8.1.

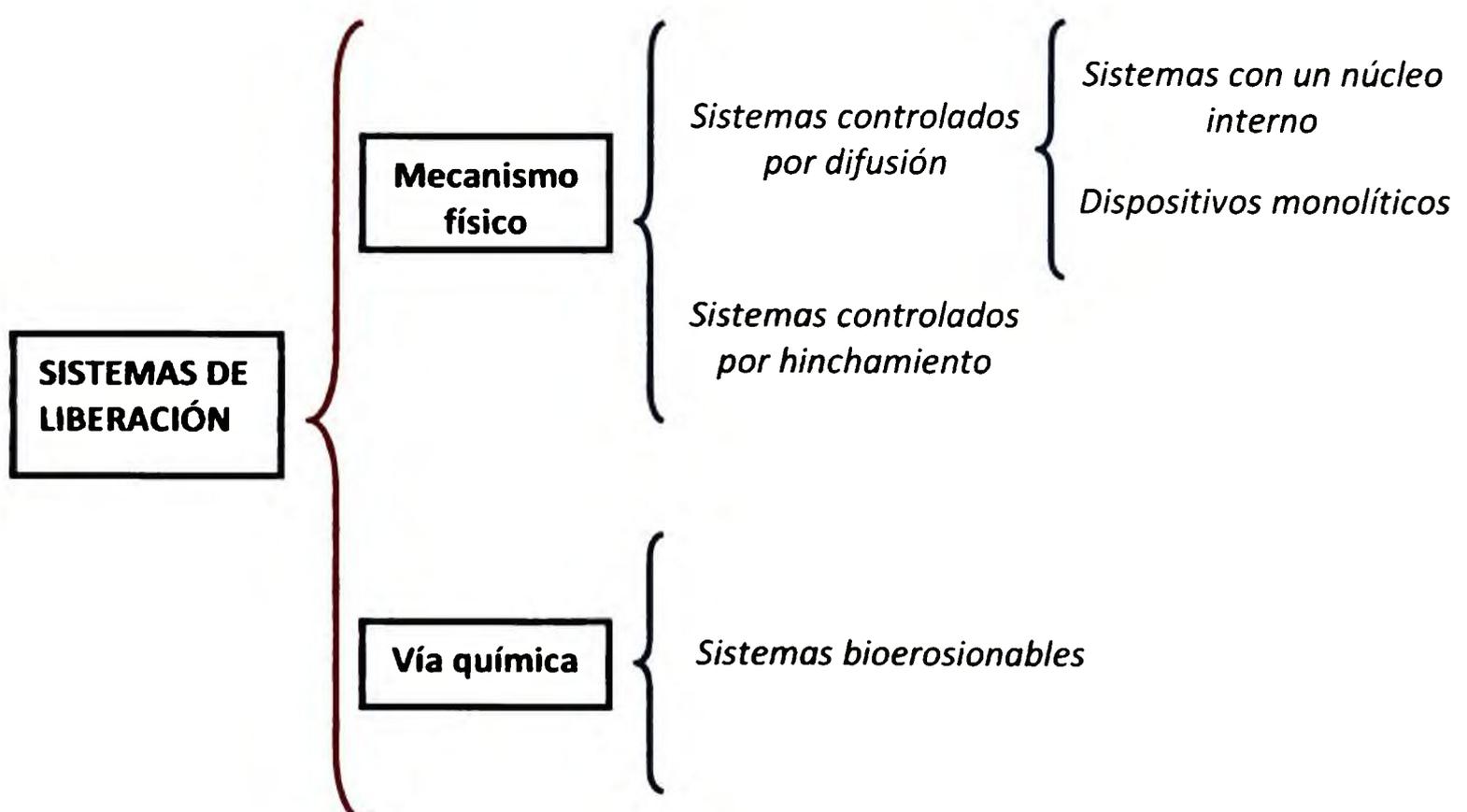


Figura 8.1 Clasificación de los sistemas de liberación controlado de compuestos activos.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

El quitosano es un biopolímero ampliamente utilizado en investigación en sistemas biomédicos y farmacéuticos de liberación controlada de agentes activos capaces de establecer interacciones específicas con la matriz polimérica. La matriz de quitosano posee gran capacidad de absorción de agua (hinchamiento), asociado a su carácter hidrofílico que resulta muy apropiado para su utilización como materiales soporte de principios activos. Esto se debe no sólo a su alto grado de hinchamiento, sino también a la presencia de grupos funcionales en el polímero, apropiados para interactuar activamente con el componente activo incorporado en su estructura.

Para el estudio de la cinética de liberación del componente activo de la matriz de quitosano, en este trabajo de Tesis se consideró que el aditivo se encontraba homogéneamente distribuido o disperso en la matriz polimérica, y que la liberación del compuesto tendría lugar por un mecanismo combinado, con predominio de la difusión Fickiana a cortos tiempos de contacto. Los principales pasos involucrados en el proceso de liberación cuando el componente activo se encuentra disuelto en la matriz se muestran en el esquema presentado en la Figura 8.2.

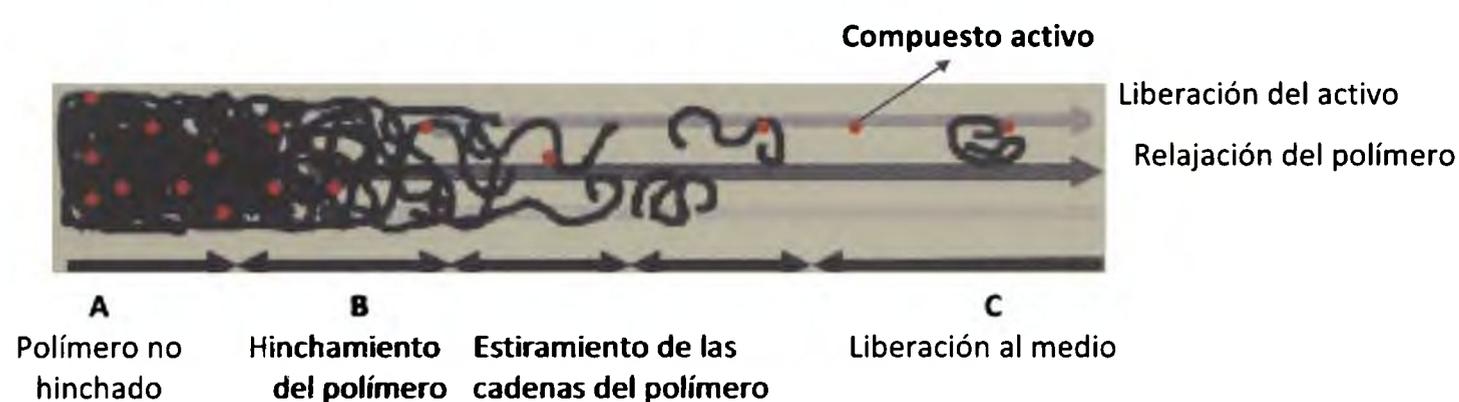


Figura 8.2 Representación esquemática del proceso de difusión controlado por el hinchamiento.

8.1.1.5 DIFUSIÓN DE AGENTES BIOACTIVOS A TRAVÉS DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA

En la Figura 8.3 se observa una representación gráfica de los diferentes sistemas de liberación, entre los cuales se pueden distinguir dos grandes grupos:

8.1.1.5.1 Sistemas controlados por mecanismos físicos

En el caso de sistemas con unión física entre el polímero y el agente activo, los tipos más representativos son los sistemas controlados por la difusión, o los sistemas controlados por el disolvente y en consecuencia por el grado de hinchamiento.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Sistemas controlados por difusión. La cantidad de componente activo que llega a una zona determinada de aplicación se realiza mediante un fenómeno de difusión del compuesto, ya sea directamente a través de la estructura molecular del polímero o a través de macro o microporos. Sin embargo, el caso más frecuente es aquel en que el control por difusión es una combinación de ambos mecanismos. Los sistemas que controlan la dosificación por un mecanismo de difusión pueden presentarse en dos formas bien diferenciadas:

- ❖ *Sistemas con un núcleo interno* que contiene el compuesto activo. Consisten en un núcleo central de agente activo rodeado por una membrana polimérica delgada, homogénea y no porosa (Figura 8.3a). El principio activo está contenido dentro de una capa de polímero, la cual puede hincharse o no en el medio de disolución donde se aplica (Korsmeyer y Peppas, 1981; Peppas y Franson, 1983). El transporte del componente activo al exterior se da por la disolución del soluto en la interfase soluto/polímero y su posterior difusión hacia el exterior a través de los segmentos macromoleculares bajo la influencia de un gradiente de concentración que sigue la primera ley de Fick (Langer y Peppas, 1983).
- ❖ *Sistemas matrices o dispositivos monolíticos.* El compuesto activo se encuentra uniformemente distribuido en un soporte de polímero sólido (Figura 8.3b). La migración hacia el medio se produce por difusión molecular a través del soporte o a través de microporos existentes en la matriz polimérica. En este caso, la interpretación del fenómeno de difusión puede realizarse utilizando la segunda ley de Fick.

Sistemas controlados por el disolvente. Son matrices poliméricas donde la liberación es controlada por la penetración de un disolvente, vía ósmosis o hinchamiento.

Sistemas controlados por hinchamiento. Son sistemas monolíticos en los que el compuesto activo se encuentra disperso en un soporte de polímero hidrófilo, entrecruzado o no, el cual se hincha cuando se pone en contacto con un medio acuoso (Figura 8.3c). Estos sistemas que permiten que la liberación proceda a velocidad constante (Langer y Peppas, 1981, 1983; Siepmann y Peppas, 2011) se denominan *hidrogeles* y han despertado gran interés principalmente en la industria farmacéutica (Michalak y Mucha, 2012). En estos sistemas el grado de hinchamiento (y por tanto la cantidad de componente activo liberada)

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

depende del balance hidrofílico/hidrofóbico de la matriz polimérica y del grado de entrecruzamiento. La migración del compuesto activo al medio acuoso desde un sistema de esta naturaleza implica un proceso de absorción de agua y otro simultáneo de desorción del compuesto bioactivo por un mecanismo de difusión controlado por el hinchamiento que sufre la matriz polimérica.

Así, se puede afirmar que uno de los aspectos más complejos en el campo de la tecnología de la liberación controlada, reside en el desarrollo de matrices capaces de liberar el agente activo a velocidad constante durante un tiempo determinado. Las películas de quitosano son una alternativa prometedora ya que son materiales hidrofílicos capaces de hincharse liberando el compuesto incorporado.

8.1.1.5.2 Sistemas controlados por mecanismos químicos*Sistemas bioerosionables*

En estos sistemas la liberación del compuesto activo está controlada por la degradación o disolución de la matriz polimérica (Figura 8.3 d).

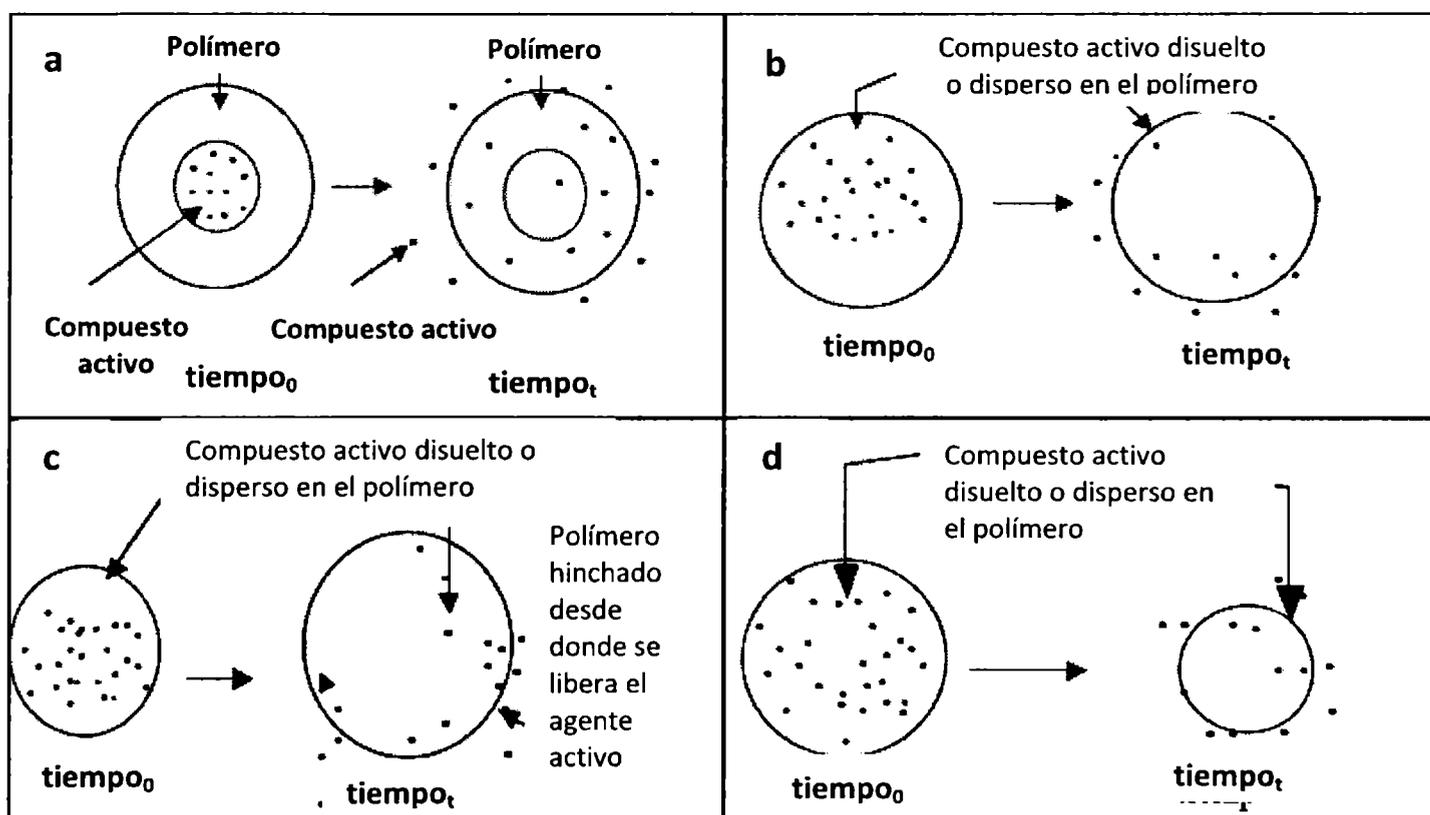


Figura 8.3. Sistemas de liberación controlada de compuestos activos a partir de una matriz polimérica: (a) liberación controlada con núcleo interno de agente bioactivo; (b) sistema monolítico de liberación controlada; (c) sistema monolítico de liberación controlada por hinchamiento; (d) sistema bioerosionable.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

La incorporación de diferentes agentes activos en la matriz de quitosano modifica la funcionalidad de las películas pudiendo afectar las propiedades de las mismas. En el Capítulo 6 se caracterizaron las películas de quitosano con la adición de ácido ferúlico, mientras que en el Anexo B se presentan los resultados referidos al estudio de las propiedades fisicoquímicas, microestructurales, mecánicas y de barrera de las películas formuladas con quitosano y ácido propiónico.

La capacidad de películas a base de quitosano como matrices soportes para incorporar sustancias con actividad específica (antioxidante-antimicrobiano) fue usada con el fin de controlar la liberación del agente a un medio líquido y/o a un sistema alimentario real.

En este contexto, los objetivos propuestos para el Capítulo fueron:

- ❖ Cuantificar mediante la metodología que corresponda, el compuesto activo difundido/liberado en cada medio.
- ❖ Determinar la capacidad antioxidante de las películas activas aditivadas con ácido tánico y ácido ferúlico (AF), y la capacidad antimicrobiana de películas de quitosano con ácido tánico y ácido propiónico (APr).
- ❖ Conocer el mecanismo de liberación de los diferentes tipos de compuestos activos empleados y modelar matemáticamente la cinética de dicho proceso.

8.1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este Capítulo se utilizó quitosano (SIGMA, EEUU) con un grado de desacetilación del 75% para la formulación de las películas.

Se adicionaron ácido ferúlico (SIGMA-Aldrich, EEUU) y ácido tánico (Anedra, Argentina) como agentes antioxidantes.

8.1.2.1 ESTUDIO DEL PERFIL DE LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS INCORPORADOS**8.1.2.1.1 Preparación de las películas activas antioxidantes**

Se prepararon películas de quitosano con 50 mg AF/g Q. La selección de la concentración del AF se realizó en base a las propiedades de los materiales desarrollados y

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

descriptos en el Capítulo 6. Además, dada la naturaleza polifenólica del ácido tánico usado como agente entrecruzante de la matriz de quitosano en el Capítulo 4, las películas con agregado de AT también fueron objeto de estudio. A tal fin, se prepararon películas con 40 mg AT/g Q de acuerdo a la concentración seleccionada y estudiada en el Capítulo 4.

8.1.2.1.2 Polifenoles totales cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu (FC)

La determinación de polifenoles totales liberados de la matriz de quitosano en función del tiempo se realizó utilizando el método de *Folin-Ciocalteu* (Schlesier y col., 2002). Esta técnica está basada en la oxidación de los grupos fenólicos con los ácidos fosfomolibdénico y fosfotungsténico, con formación de un complejo verde-azulado, el cual tiene un máximo de absorbancia a 725 nm.

Muestras de películas activas de 4 x 4 cm con un espesor promedio de 50 μm , conteniendo ácido tánico o ferúlico se sumergieron en un volumen de 200 ml de solvente agua destilada-alcohol en una relación 1:1. La elección de este medio de liberación se debió a la solubilización parcial en agua de los agentes activos durante las pruebas preliminares realizadas. De acuerdo con Isaza Martínez (2007) dado el carácter polar de los compuestos fenólicos, las mezclas de agua:alcohol resultan eficientes para su extracción.

Para cuantificar los componente activos a distintos tiempos se tomaron 0,2 ml de solución y se colocaron en un tubo de ensayo conteniendo 2ml de Na_2CO_3 2% (p/v), se dejó en reposo durante 2 minutos y a continuación se agregaron 0,2 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1). Se agitó mediante vórtex y, luego de un tiempo de reacción de 30 minutos, se procedió a la medida de absorbancia.

Se construyeron curvas de calibración con los patrones de ácido ferúlico y de ácido tánico solubilizados en el medio de liberación agua:alcohol. A partir de una solución madre de concentración 0,015 y 0,020 mg/ml de AT y AF, respectivamente, se realizaron diluciones sucesivas con el medio solvente y se midió la absorbancia a 725 nm. Todas las medidas se efectuaron por duplicado.

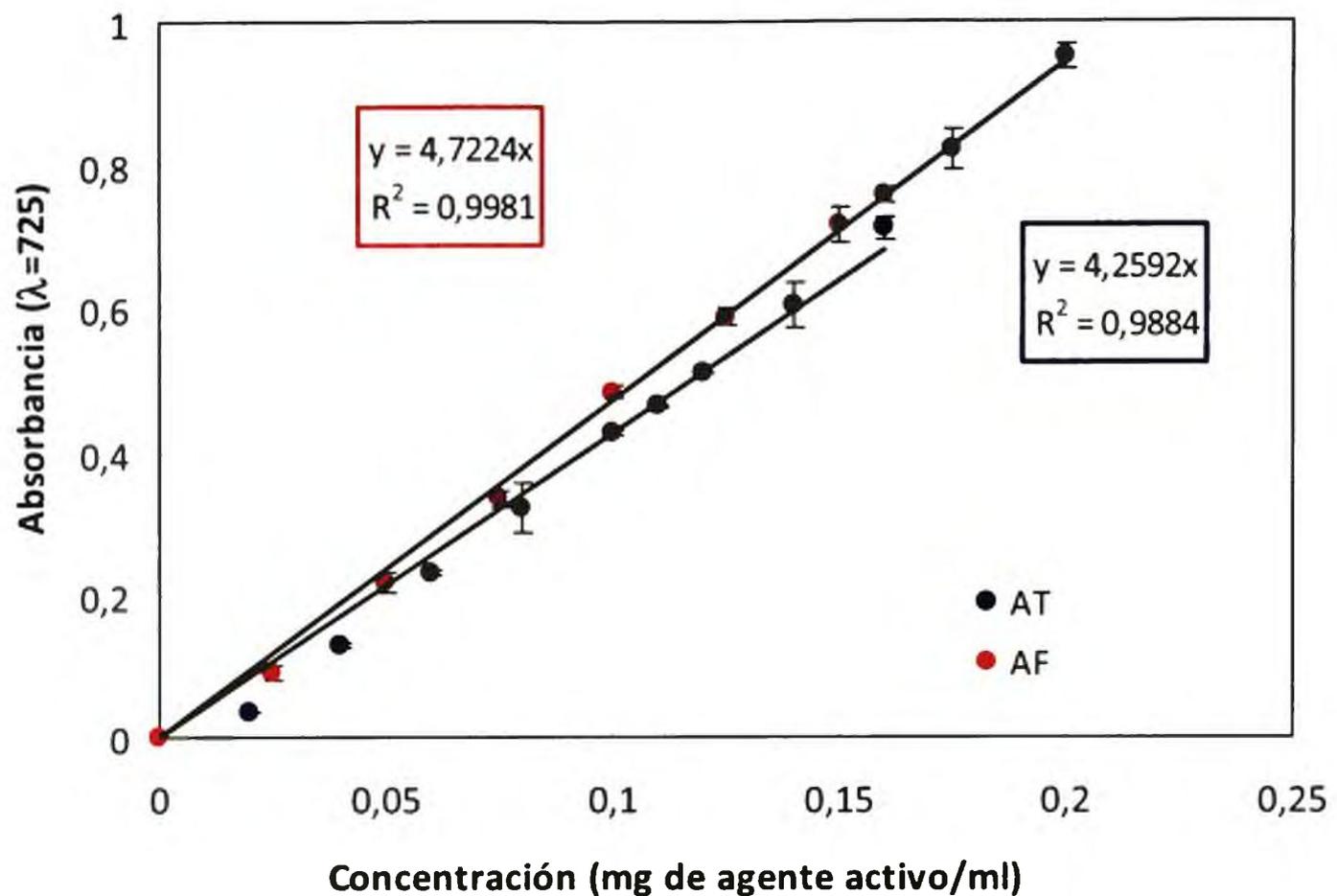


Figura 8.4 Curva patrón de ácido tánico y de ácido ferúlico. La medida de absorbancia se realizó a 725 nm.

En la Figura 8.4 se muestran las curvas de calibración obtenidas, a partir de las cuales fue posible dosificar la cantidad de compuesto activo liberado.

8.1.2.1.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los componentes activos incorporados en la matriz por DPPH

La actividad antioxidante fue determinada usando el radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH•) (Sigma-Aldrich, EEUU) como radical libre. Se siguió el protocolo de Brand Williams y col. (1995) con ligeras modificaciones, empleando como medio de reacción una solución de etanol. La reducción del DPPH• se puede monitorear experimentalmente mediante la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica mientras ocurre la reacción. En su forma estable el radical absorbe a 515 nm. Al combinarse con un antioxidante (AH) u otra especie radical (R•) el compuesto sufre una reducción y la absorción desaparece debido a la siguiente reacción:

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano



La disminución de la concentración del DPPH• es una medida de la capacidad antioxidante total del compuesto ensayado.

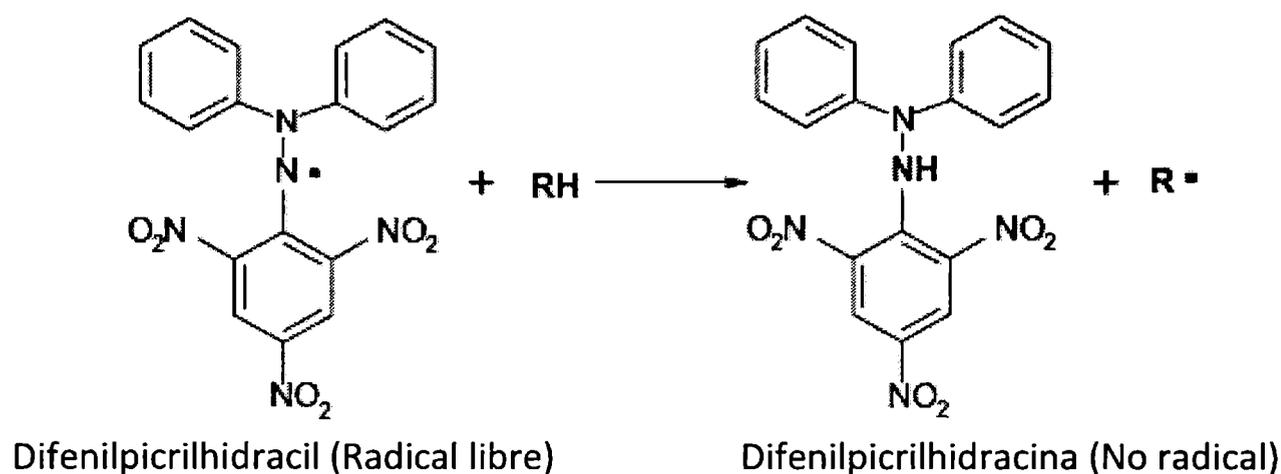


Figura 8.5 Estructura del DPPH y su reducción por acción del antioxidante RH.

La Figura 8.5 muestra en forma molecular desarrollada la reacción con formación de radicales libres R• y la reducción del radical DPPH.

Para la determinación se preparó una solución de DPPH• con una concentración de 25 mg DPPH•/l etanol. Para identificar el máximo de absorbancia se hizo un barrido en el rango de longitud de onda entre 400 y 700 nm. Como se observa en la Figura 8.6 el máximo se encontró a 517 nm, por lo que la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras se evaluó a esta longitud de onda. Este resultado concuerda con lo informado por Gülçin y col. (2010), quienes también emplearon etanol para la disolución del radical y hallaron la máxima absorción a la misma longitud de onda.

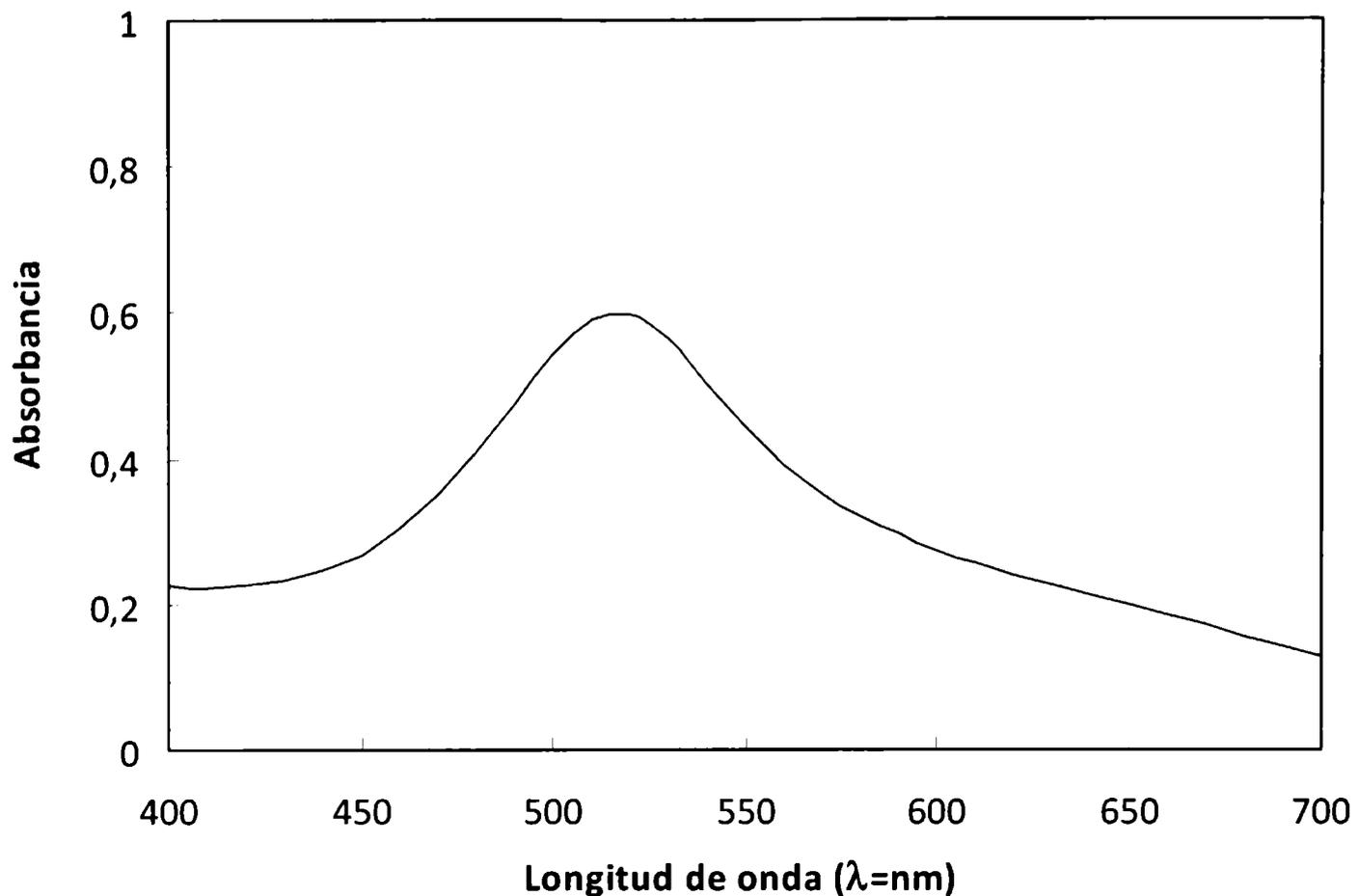


Figura 8.6 Espectro de absorción del radical DPPH• disuelto en etanol para identificar el máximo de absorbancia.

Las determinaciones de liberación de AF y AT en el medio solvente alcohol: agua (1:1) se hicieron en función del tiempo. Para el ensayo se adicionaron 100 µl de cada muestra a 3,9 ml de la solución de DPPH•-etanol. La disminución en la absorbancia fue determinada a 517 nm después de 30 y 60 minutos hasta que la reacción alcanzó un estado estacionario.

8.1.2.1.4 Correlación entre técnicas de determinación de antioxidantes

Se propuso obtener una relación entre la técnica de polifenoles totales mediante Folin-Ciocalteau y la de actividad antioxidante mediante el radical DPPH•.

8.1.2.2 PELICULAS ACTIVAS ANTIMICROBIANAS

8.1.2.2.1 Películas estudiadas

Para evaluar la capacidad antimicrobiana se usaron las películas a base de quitosano descritas y caracterizadas en los Capítulos anteriores. Teniendo en cuenta lo expuesto a lo largo de este estudio se seleccionaron películas de quitosano recién preparadas, o sea con ácido acético incluido en la matriz, y películas de Q almacenadas durante 30 días (controles).

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Asimismo se evaluaron matrices de Q sometidas a un proceso posterior de curado a 160°C durante 30 min con el fin de determinar si los cambios estructurales generados por el tratamiento térmico influían en la capacidad antimicrobiana inherente del polímero. También se analizaron películas de Q con agregado de AT, ya que de acuerdo a algunos autores el ácido tánico confiere propiedades antimicrobianas (Scalbert, 1991).

El estudio de la capacidad antimicrobiana de las películas se completó utilizando matrices con ácido propiónico en una concentración del 2,5 y 5% (v/v) como alternativas a las películas habitualmente preparadas con ácido acético. Esta formulación se preparó para evaluar la acción combinada del quitosano y el APr, para su posterior aplicación en productos de pastelería. Las películas se utilizaron inmediatamente después de haber sido preparadas.

8.1.2.2 Agente antimicrobiano cuantificado por HPLC

Para los ensayos de liberación del agente antimicrobiano se utilizó ácido propiónico Sigma-Aldrich (calidad cromatográfica, >99%). La liberación del compuesto activo antimicrobiano se realizó en una solución buffer fosfato (pH= 6,5) a 4 y 20°C, condiciones elegidas a efectos de simular las condiciones reales del sistema alimentario seleccionado como matriz para aplicar la película activa antimicrobiana (productos de pastelería, específicamente discos de masas), cuya descripción y análisis se detallará en la Parte II del Capítulo para evitar introducir aquí variables adicionales.

Se cortaron piezas de películas de 4 × 4 cm, se colocaron en un soporte constituido por una malla plástica, se sumergieron en 200 ml de la solución buffer y se mantuvieron bajo agitación constante. Se tomaron muestras a distintos tiempos de ensayo y las concentraciones de ácido propiónico se determinaron por HPLC en fase reversa (Agilent Waters, EEUU). Se utilizó una solución de ácido sulfúrico 0,009 N, con un caudal de 0,7 ml min⁻¹ a una presión de 700 psi. Se inyectaron 30 µL de muestra en una columna Aminex HPX-87H (BIORAD, EEUU) operada a 60°C; la detección se realizó a 214 nm.

Teniendo en cuenta que el ácido propiónico es altamente volátil, y que parte del mismo se pierde durante el proceso de secado, se cuantificó la concentración remanente, inmediatamente de finalizada la etapa de secado de las películas siguiendo la metodología

descrita para dosar el compuesto activo por HPLC. Todas las medidas se efectuaron por triplicado.

8.1.2.2.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas

Existen una serie de microorganismos llamados indicadores cuya presencia en los alimentos advierte respecto de una inadecuada manipulación de la materia prima o eventual contaminación, con la consiguiente existencia de un peligro para la salud del consumidor. Por ello se evaluó la capacidad inhibitoria de las películas desarrolladas sobre alguno de estos microorganismos. *S. aureus* es reconocido como resultado de la inadecuada manipulación de operadores mientras *Salmonella spp.* es un microorganismo patógeno que debe estar ausente en alimentos y ha sido asociado a intoxicaciones alimentarias graves.

Por otra parte, debido a la naturaleza de las masas es de esperar que los microorganismos predominantes sean hongos y levaduras, por ello se utilizó en este trabajo *Penicillium spp.* y *Candida spp.*, para completar la evaluación de las características antimicrobiana de las películas.

Preparación de inóculos

Cepas aisladas de *S. aureus*, *Salmonella spp.* y *Penicillium spp.* se cultivaron en un caldo nutritivo TSB (Caldo Triptona Soja). En el caso de *Candida spp.* se utilizó caldo nutritivo como medio de cultivo. Todas las cepas fueron incubadas a 37°C durante 12 hs hasta alcanzar una concentración de 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹, determinada a partir de la densidad óptica (DO) de las soluciones. También se prepararon diluciones 1:10 de estos inóculos con agua peptona (Oxoid) al 1 % estéril para alcanzar una concentración de 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹.

Protocolo para determinar capacidad antimicrobiana de las películas

La determinación de la actividad antimicrobiana de las películas activas se llevó a cabo empleando el método de difusión en agar descrito por Pranoto y col. (2005). En el ensayo de difusión en agar, las películas antimicrobianas se colocaron en un medio de agar sólido con el microorganismo de prueba.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Los inóculos anteriormente descritos se ensayaron empleando discos de películas de 1 y 3 cm de diámetro los cuales se colocaron presionándolos de forma que se asegurara el contacto con la superficie del agar. El espesor promedio de las películas estudiadas fue de 45µm.

Los discos fueron depositados sobre cajas de Petri con PCA (Merck) para los ensayos con bacterias y con Agar Malta para hongos y levaduras, previamente sembrados con 100 µl del inóculo correspondiente. Todas las muestras se incubaron a 37°C. Los ensayos se realizaron por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

En todos los casos se realizaron observaciones visuales, se tomaron fotografías y se midieron las zonas inhibitorias de las películas a las 24, 48, 72 y 94 hs de incubación. El método puede ser cuantitativo si se determina el diámetro del halo de inhibición que rodea a las películas. Para determinar las zonas de inhibición se usaron las fotografías, las que fueron procesadas con un software específico Image J. El área de inhibición se calculó restando el área de la película del área total de inhibición. La diferencia se informó como área de inhibición (mm²), tal como fue determinado por Padget y col. (1998).

8.1.2.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de resultados se utilizó el software Systat® (Versión 10.0). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de significación p=0,05. También se empleó el programa para el cálculo de regresiones lineales y no lineales.

8.1.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**8.1.3.1 DIFUSIÓN DE AGENTES BIOACTIVOS A TRAVÉS DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA****8.1.3.1.1 Modelado matemático del proceso de liberación**

El modelo comúnmente utilizado para estudiar el proceso difusivo es el propuesto por las leyes de Fick. La primera ley de Fick se basa en la hipótesis de que la velocidad de transferencia de la sustancia que difunde a través de la unidad de área de una sección es proporcional al gradiente de concentración medido en forma normal a dicha sección:

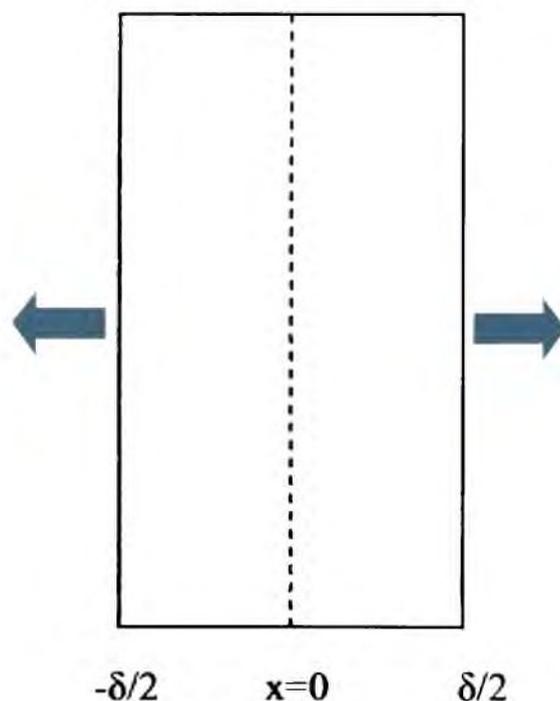
Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

$$F = D \frac{\partial C}{\partial x} \quad 8.1$$

donde,

F es la *velocidad de transferencia* del agente activo por unidad de área de la sección perpendicular a la dirección de flujo, C es la *concentración* de la sustancia que difunde, x es la *dirección espacial normal* a la sección y D el *coeficiente de difusión*. En muchos casos este coeficiente se puede considerar constante.

Sin embargo, la Ec.8.1 es válida sólo para el caso de medios isotrópicos, en los que la estructura y las propiedades de difusión son las mismas en cualquier punto del sistema relativo a una posición de referencia. En un medio no isotrópico, las propiedades difusivas dependen de la dirección en que se midan y por lo tanto, el coeficiente de difusión no se puede considerar constante.



Considerando que una de las etapas de la liberación del componente activo está relacionada con la transferencia de materia, se puede aplicar la segunda ley de Fick para la difusión en una sola dirección

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad 8.2$$

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Las condiciones de contorno para una placa plana de espesor δ son:

$$\begin{array}{lll} t=0 & -\delta/2 < x < \delta/2 & C=C_0 \\ t>0 & x=\pm \delta/2 & C=C_1 \end{array}$$

donde,

t es el tiempo expresado en segundos, δ el espesor de la película, C_0 es la concentración inicial de la sustancia que difunde y C_1 es la concentración de dicha sustancia en el medio de liberación.

La solución para estado no estacionario tiene la forma de una serie trigonométrica

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} e^{-\frac{(2n+1)^2}{\delta^2} Dt} \quad 8.3$$

siendo M_t la cantidad total de la sustancia que difunde a tiempo t y M_∞ la cantidad correspondiente a tiempo infinito

A tiempos cortos se puede considerar la solución para un medio semi-infinito

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\delta^2} \right)^{1/2} \left[\frac{1}{\pi^{1/2}} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \operatorname{ierfc} \frac{n\delta}{2\sqrt{Dt}} \right] \quad 8.4$$

donde,

ierfc es la función error integrada en x

Simplificando la expresión para pequeños tiempos se llega a la Ec.8.5

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{Dt}{\pi \delta^2}} \quad 8.5$$

La expresión indica que la difusión Fickeana en una película delgada está caracterizada por una dependencia inicial del transporte de la sustancia con el $t^{1/2}$. La aproximación de tiempos cortos es válida hasta la liberación del 60% del total de la sustancia capaz de difundir.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Para sistemas que se hinchan en contacto con el medio en el que el componente activo difunde, la solución se puede escribir teniendo en cuenta el aporte del proceso difusivo que se rige por la ley de Fick y el hinchamiento sufrido por la matriz.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \sqrt{t} + k_2 t \quad 8.6$$

Para la etapa de difusión del compuesto activo que sigue la ley de Fick, la ecuación indica que la masa correspondiente al 60% del total del componente capaz de difundir se puede expresar como una constante multiplicada por la raíz cuadrada del tiempo. Para la segunda etapa, Caso II, la fracción másica varía linealmente con el tiempo.

Korsmeyer y col. (1983) desarrollaron un modelo semi-empírico sencillo que relaciona la liberación del compuesto activo con el tiempo a través de una ecuación exponencial. Estos autores estudiaron que en ocasiones el mecanismo de difusión se desvía de la ley de Fick, siguiendo un comportamiento anómalo o no Fickiano. Es un modelo especialmente útil cuando se desconoce el mecanismo de liberación o cuando ésta ocurre por más de un mecanismo.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad 8.7$$

donde,

k es una constante y **n** es el exponente difusional indicativo del mecanismo de transporte. Esta ley de la potencia fue introducida por primera vez en el campo farmacéutico (Peppas, 1985).

Como ya se dijo el modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas se considera válido siempre y cuando de principio activo liberado sea inferior al 60%, es decir que M_t/M_∞ debe ser $< 0,6$. En esta ecuación se combinan dos procesos, uno debido al transporte del componente activo que obedece a las leyes de Fick y el otro a la expansión dinámica del sistema, que involucra la transición del estado vítreo al gomoso (Transporte Caso II). Según los valores que tome **n** se pueden definir distintos mecanismos de transporte o liberación (Peppas, 1985).

Valores de $n > 0,5$ se asocian a un mecanismo de difusión anómalo (no Fickiano). En particular, cuando $n = 1$, se trata de la cinética de orden cero. De acuerdo a estudios

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

realizados por Peppas (1985) este mecanismo es considerado un caso límite de transporte no Fickiano, denominándolo Transporte Caso II. En este caso, el transporte del soluto se realiza a velocidad constante debido a que el frente de hinchamiento del polímero avanza de forma constante, siendo controlado por la relajación de las cadenas poliméricas. El agua que penetra en el sistema actúa como plastificante disminuyendo la T_g del polímero y aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas debido a una disminución en las fuerzas atractivas, como se describió anteriormente.

Tabla 8.1 Resumen de los mecanismos de transporte de solutos dependiendo del exponente difusional n , adaptado de Pothakamury y Barbosa-Cánovas (1995)

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte del componente activo
0,5	<i>Difusión Fickeana</i>
$0,5 < n < 1$	<i>Transporte Anómalo</i>
1	<i>Transporte Caso II</i>
$n > 1$	<i>Transporte Supercaso II</i>

Cuando $0,5 < n < 1$ el proceso está dominado por procesos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas. Valores de $n > 1$ aparecen usualmente cuando los tiempos de liberación son muy elevados y a este tipo de transporte se lo denomina Transporte Supercaso II. Por último, valores de $n < 0,5$ se asocian a la presencia de poros en la matriz polimérica con la consiguiente difusión simultánea a través de la matriz hinchada y de los poros llenos de medio de disolución.

En la Tabla 8.1 se muestran los valores del exponente difusional para matrices con diferentes mecanismos de liberación. Ritger y Peppas (1987) investigaron la importancia del exponente difusional n para establecer métodos simples de análisis de los datos de liberación controlada en varias geometrías clásicas según puede observarse en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2 Valores del exponente difusional en el modelo empírico de Korsmeyer-Peppas para sistemas de distinta geometría, adaptado de Peppas y Sahlin (1989)

Geometría de la matriz	Sistema controlado por difusión (Caso I)	Sistema controlado por hinchamiento (Caso II)
<i>Lámina</i>	n = 0,5	n = 1
<i>Cilindro</i>	n = 0,45	n = 0,89
<i>Esfera</i>	n = 0,43	n = 0,85

8.1.3.1.2 Cinética de liberación de componentes activos antioxidantes

Para hallar los parámetros de la ecuación 8.7, en cada caso se determinó la fracción másica (M_t/M_∞) del compuesto activo liberado (AF o AT) y se procedió a la linealización mediante la aplicación del logaritmo decimal a las variables (Ec. 8.8 y Figura 8.7).

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log k + n \log t \quad 8.8$$

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

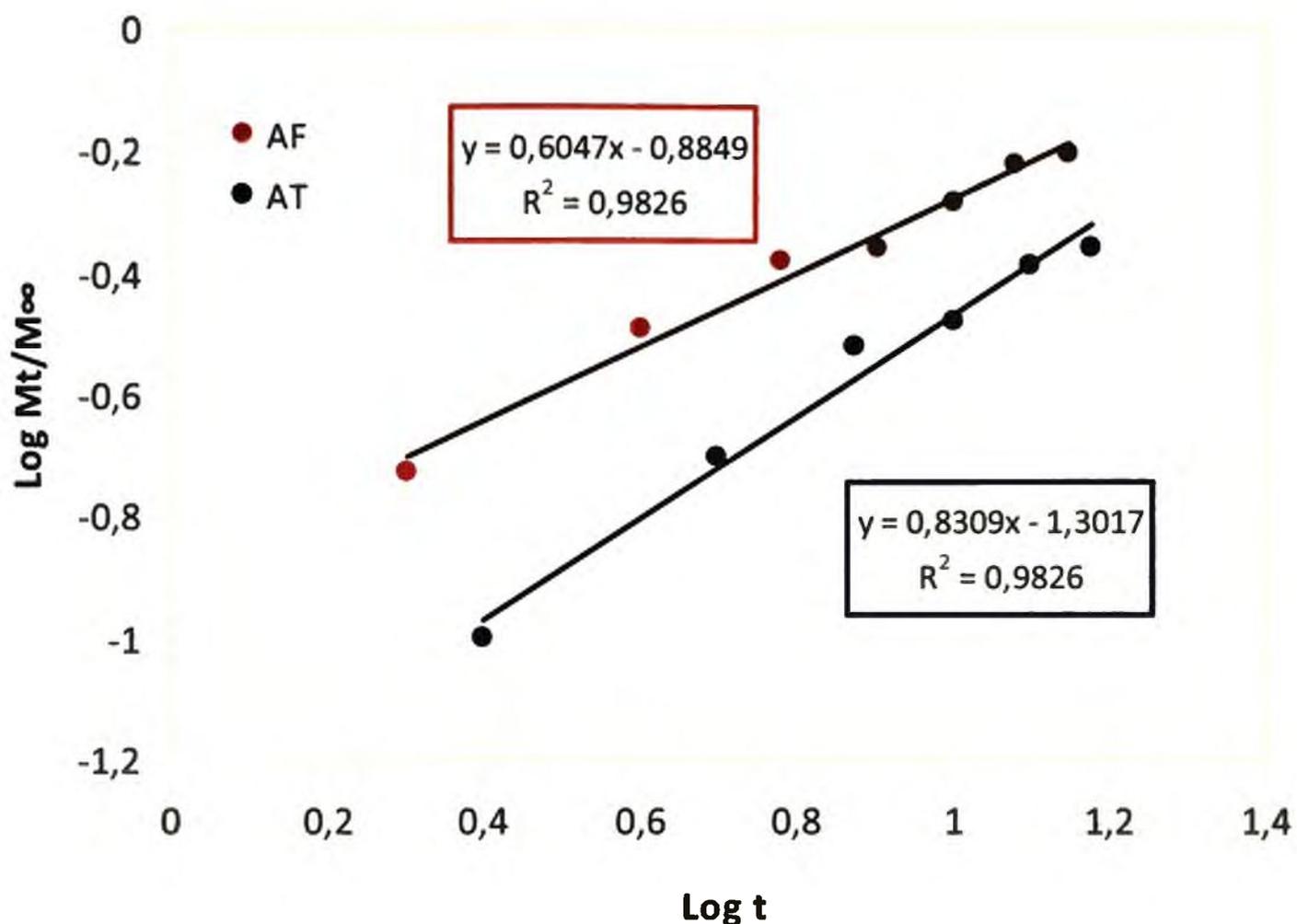


Figura 8.7 $\text{Log } (M_t/ M_\infty)$ en función del $\text{Log } t$ para los compuestos activos liberados (AT y AF). Los valores graficados corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado.

En la Tabla 8.3 se muestran los valores de n y k obtenidos de las pendientes y de las ordenadas al origen para ambos casos analizados.

Tabla 8.3 Parámetros cinéticos obtenidos de las curvas de liberación del AT y AF

Matriz soporte para liberación	Exponente de liberación n	k
QAT	0,83	0,052
QAF	0,60	0,133

En la Figura 8.8 se observa la cinética de liberación del ácido ferúlico y del ácido tánico de la matriz de quitosano, en función del tiempo. Asimismo se analizó la fracción del compuesto liberado de la película en función de la raíz cuadrada del tiempo. Como se puede ver en el inserto de la Figura 8.8 la dependencia no fue lineal, las curvas presentaron una

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

forma sigmoidea. Estos resultados evidenciaron que la liberación de ácido ferúlico y ácido tánico de la matriz de quitosano no respondió enteramente a una difusión regida por la ley de Fick (Peppas, 1985). Resultados similares fueron encontrados por Lim y Tung (1997) y por Ouattara y col. (2000). Los autores atribuyeron la forma sigmoidea de las curvas de liberación a la existencia de fenómenos de relajación lentos de la matriz polimérica, inducidos por el proceso de hinchamiento. Estos procesos de relajación están relacionados con los tiempos finitos que necesitan las cadenas macromoleculares para responder a la presión de hinchamiento osmótico y ordenarse para alojar las moléculas de solvente que penetran en su interior (Lee, 1985; Pepas y Franson, 1983).

Analizando los porcentaje de hinchamiento de la matriz de quitosano con AF y AT en el mismo medio en el que se efectuó la liberación (agua:alcohol) se encontraron valores de 752 y 564% respectivamente.

Tanto los valores de n hallados a partir de las curvas de liberación, superiores a 0,5 pero inferiores a 1, así como la forma sigmoidea de las curvas de fracción de compuesto activo liberada en función de la raíz cuadrada del tiempo, revelaron que el mecanismo de difusión fue anómalo.

En el caso del perfil de liberación de AF se observó que la misma fue completa, es decir la totalidad del componente activo presente en la matriz pasó al medio solvente luego de una hora de inmersión. No obstante, en el caso de las películas formuladas con ácido tánico (Figura 8.8) el perfil de liberación mostró que aún a tiempos prolongados de ensayo no hubo liberación completa del agente activo lo que confirma que parte del ácido tánico incorporado en la matriz quedó retenido en la misma. Estos resultados respaldaron los hallazgos de las modificaciones producidas por el ácido tánico como agente entrecruzante en las propiedades de las matrices a base de quitosano desarrolladas en el Capítulo 4.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

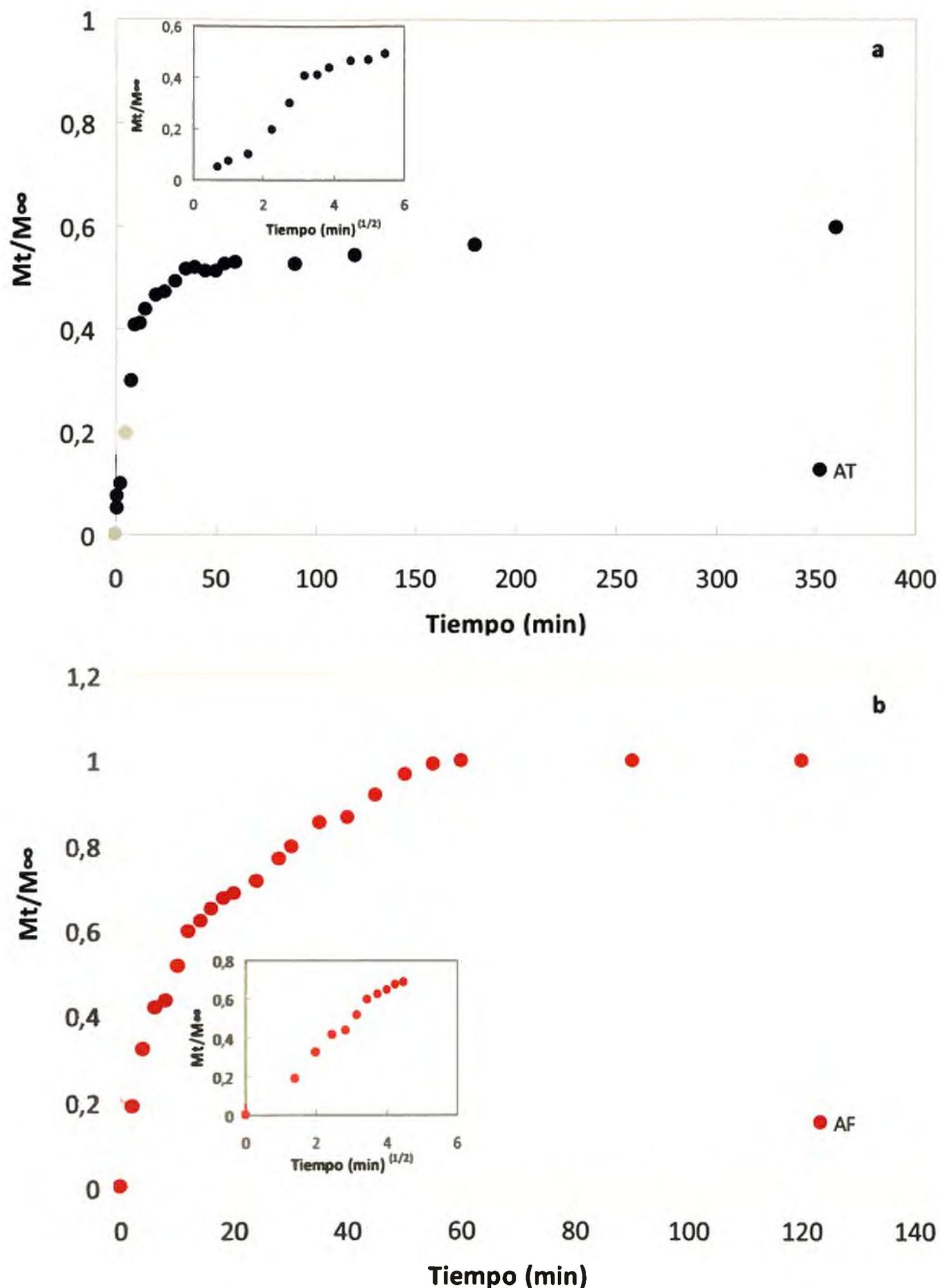


Figura 8.8 Perfil de liberación del: (a) ácido tánico (AT); y (b) ácido ferúlico (AF) de la matriz de quitosano en función del tiempo a temperatura ambiente en medio alcohol: agua. En el inserto se muestra la dependencia de M_t/M_∞ con $t^{1/2}$. Los valores graficados corresponden al promedio de medidas realizadas por triplicado.

8.1.3.1.2.1 Capacidad antioxidante de las películas activas

Una vez analizados los mecanismos y perfiles de liberación de los compuestos con capacidad antioxidante se procedió a evaluar el poder antioxidante de los mismos por el método de DPPH. La ecuación de ajuste para soluciones con distintas concentraciones de DPPH• en el rango de 0,005 a 0,025 (mg ml^{-1}) fue $y = 30,75x$. A efectos de determinar el EC_{50} , es decir la concentración de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial del radical al 50%, se prepararon soluciones de $0,15 \text{ mg ml}^{-1}$ y $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ para el ácido tánico y ferúlico, respectivamente, luego se realizaron las diluciones correspondientes y se permitió a la solución reaccionar con el radical hasta alcanzar el estado estacionario.

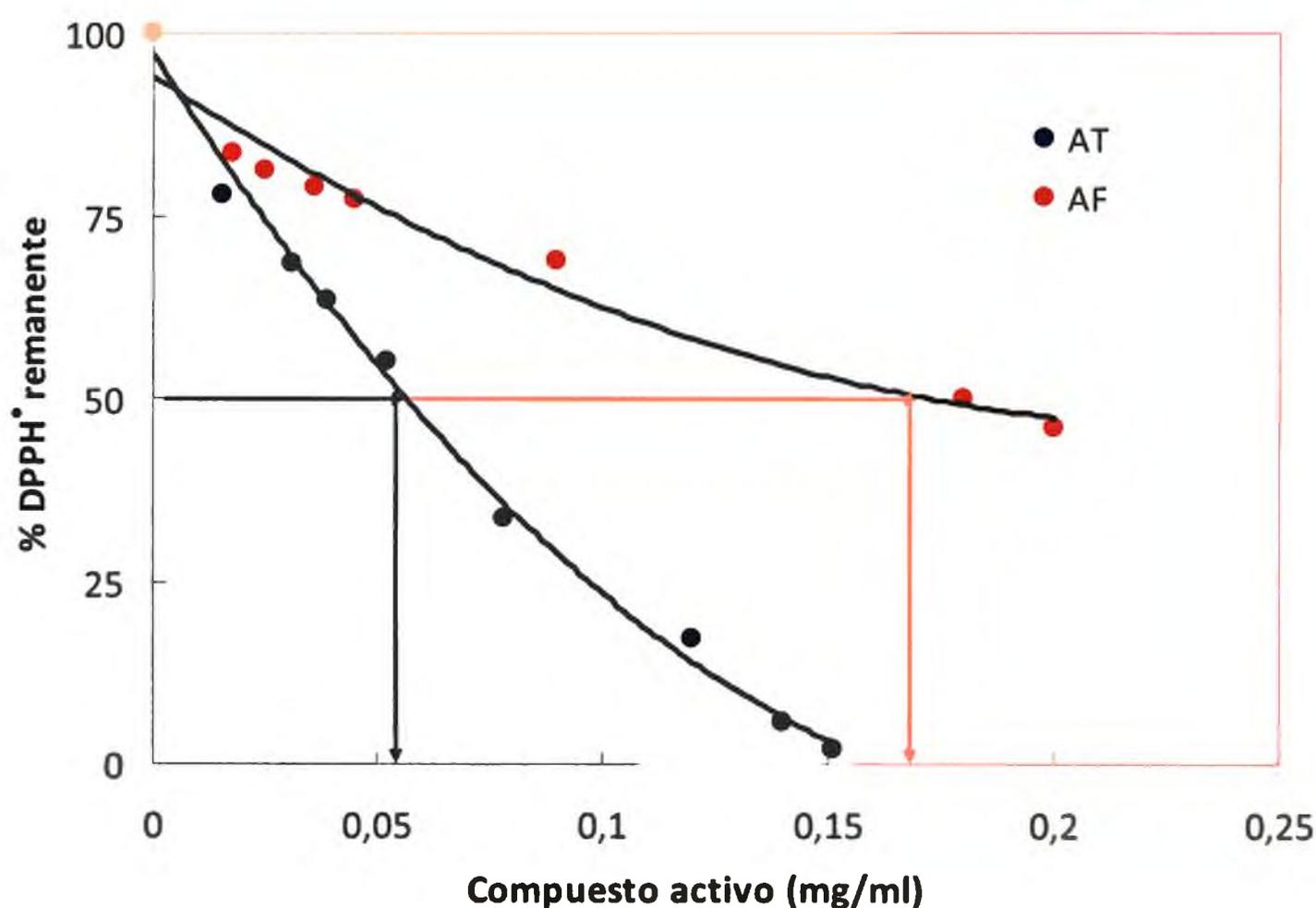


Figura 8.9 Curvas de DPPH• remanente en función de la concentración de AT y de AF.

Para cada concentración de componente activo se determinó el porcentaje de DPPH• remanente. La Figura 8.9 muestra el % de DPPH• remanente en función de los valores de concentración de AF o AT, estimándose el EC_{50} (g antioxidante/g DPPH•) para cada caso.

Las curvas obtenidas permiten señalar que se requirió menor concentración de ácido tánico en comparación con el ácido ferúlico para reducir la concentración inicial del radical.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Esto podría atribuirse a la presencia de múltiples grupos oxidrilos que posee en la estructura el ácido tánico responsables de su capacidad antioxidante.

Otra forma de calcular el efecto antioxidante es obteniendo el porcentaje de inhibición (%I) del radical:

$$\% I = \frac{(\text{Abs. blanco} - \text{Abs. muestra})}{\text{Abs. blanco}} \times 100 \quad \text{Ec. 8.9}$$

A partir de la ecuación 8.9 se pudieron calcular los porcentajes de inhibición de los compuestos activos liberados considerando los valores asintóticos de los perfiles de liberación. Se obtuvo un 55% de inhibición del radical para las películas de quitosano con AT y un 18% para las que contenían AF. Estos resultados fueron consistentes con el mayor poder antioxidante del ácido tánico obtenido a través del cálculo del EC₅₀.

8.1.3.1.2.2 Relación entre las técnicas de Folin-Ciocalteu y DPPH•

Se analizó la relación existente entre las técnicas de determinación de polifenoles totales mediante Folin-Ciocalteu (FC) y la de actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH• para ambos ácidos. Se graficó el porcentaje de DPPH• remanente en función de la absorbancia de la muestra medida en el ensayo de FC. Como se observa en la Figura 8.10 se obtuvieron dos rectas que ajustaron satisfactoriamente los datos experimentales. Esta correlación es de utilidad teniendo en cuenta que la técnica de FC es más sencilla, requiere de menos tiempo de ensayo y es de menor costo en comparación con el método de DPPH•.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

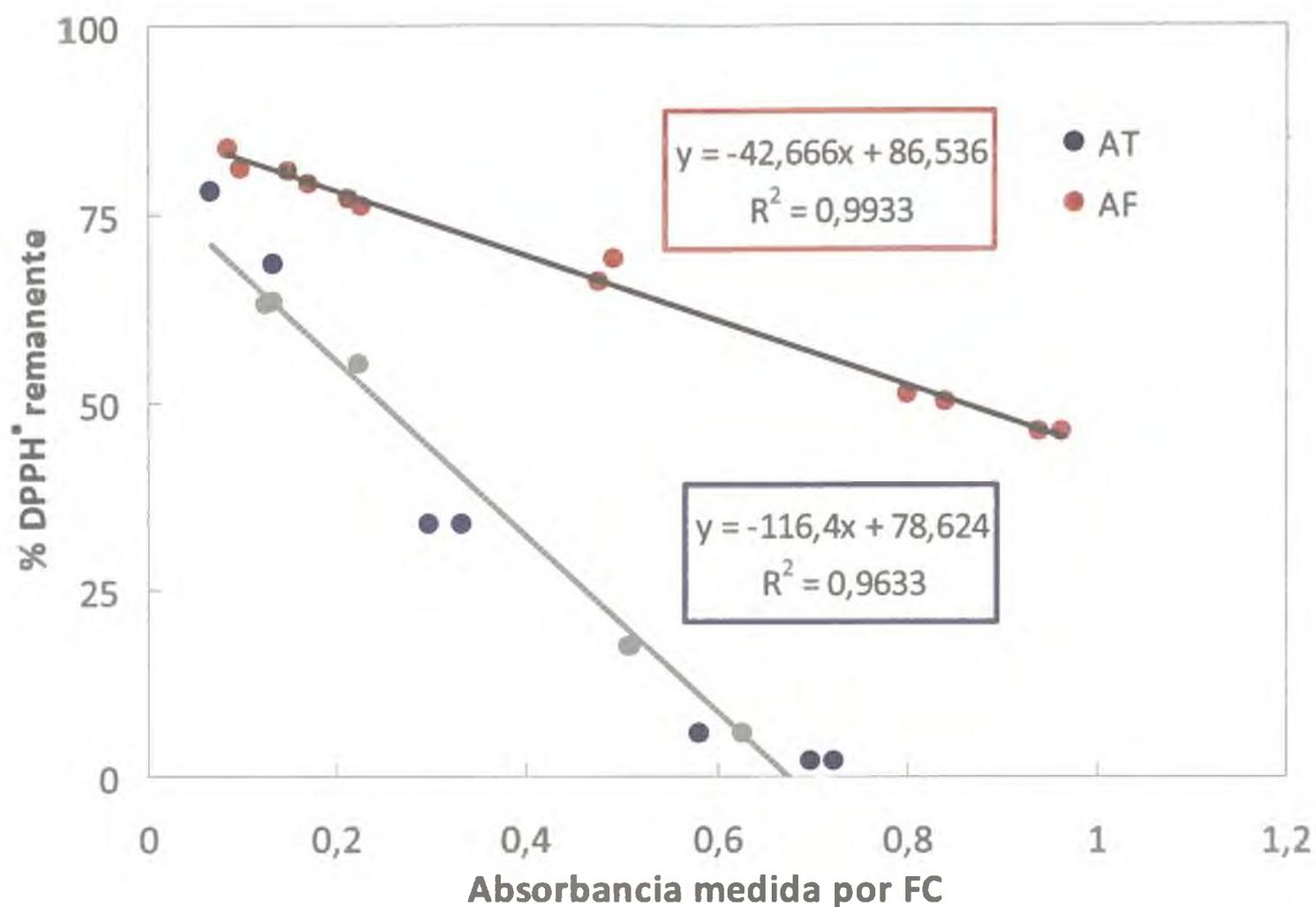


Figura 8.10 Correlación entre los valores de DPPH• remanente y los valores de absorbancia de polifenoles totales determinados mediante Folin-Ciocalteu, para ácido tánico y ácido ferúlico.

8.1.3.1.3 Difusión de compuestos activos antimicrobianos

El ácido propiónico liberado se cuantificó mediante HPLC. A partir del cromatograma se determinó el tiempo de elución del ácido propiónico patrón utilizado, el cual se evidenció a los 14 min (Figura 8.11).

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

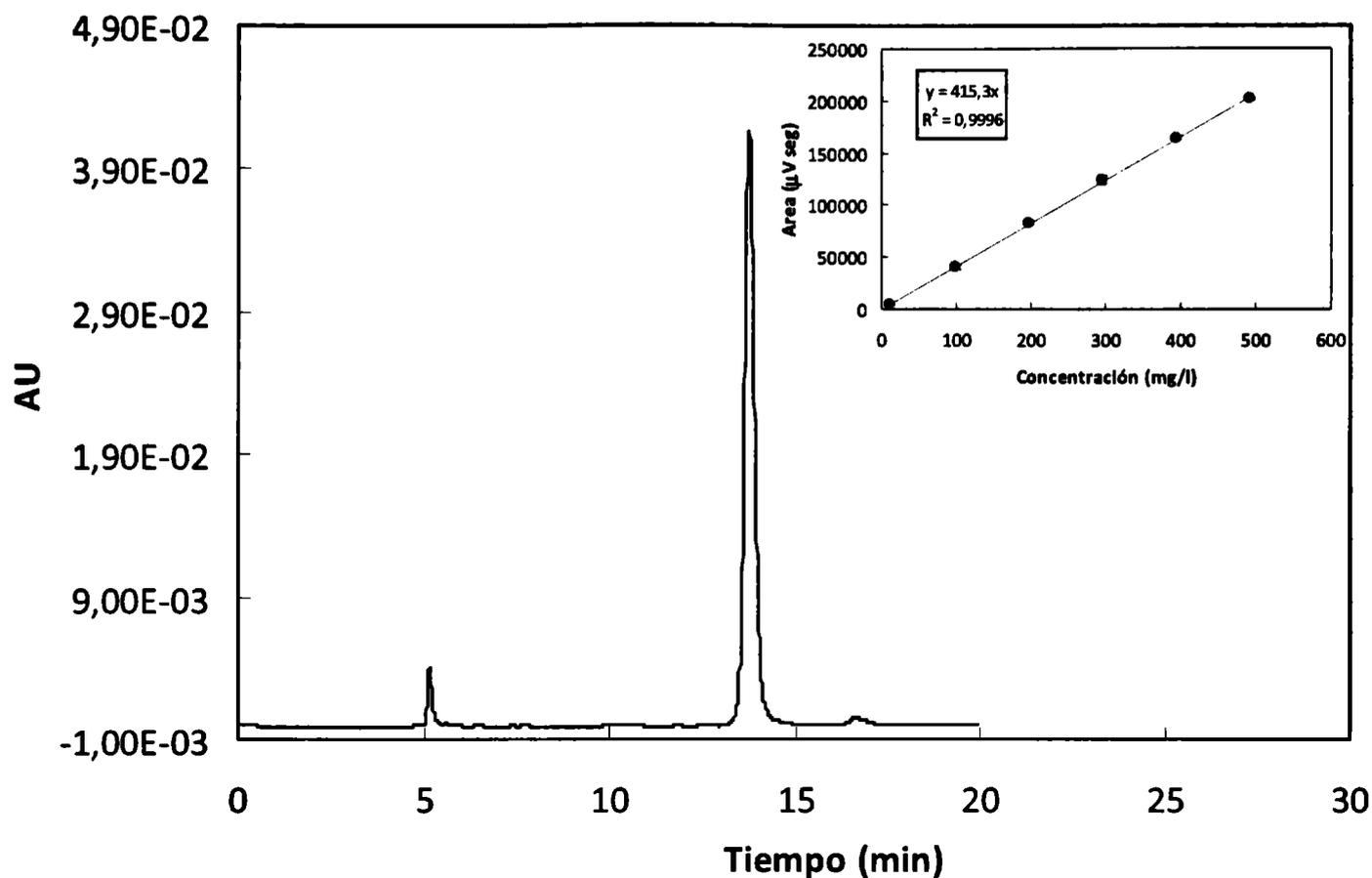


Figura 8.11 Perfil cromatográfico obtenido por HPLC de la solución de ácido propiónico. En el inserto se observa la curva patrón de ácido propiónico.

Mediante los estudios cromatográficos se pudo estimar la cantidad remanente de ácido propiónico luego del proceso de secado de las películas. Los resultados obtenidos evidenciaron que las películas formuladas con una concentración de APr del 5% (v/v) conservaron en promedio un 17% del ácido luego del secado, mientras que las preparadas con una concentración del 2,5% (v/v) un 11%. A partir de estos valores se pudo calcular la cantidad de APr presente en la película previo al ensayo de liberación del compuesto activo.

El estudio de la liberación del ácido propiónico en un medio líquido se realizó con el fin de determinar la eficiencia de liberación del compuesto antimicrobiano previo a la aplicación en el alimento. Asimismo, el pH del medio utilizado fue de 6,5 con el fin de simular las condiciones del producto alimenticio seleccionado para su aplicación.

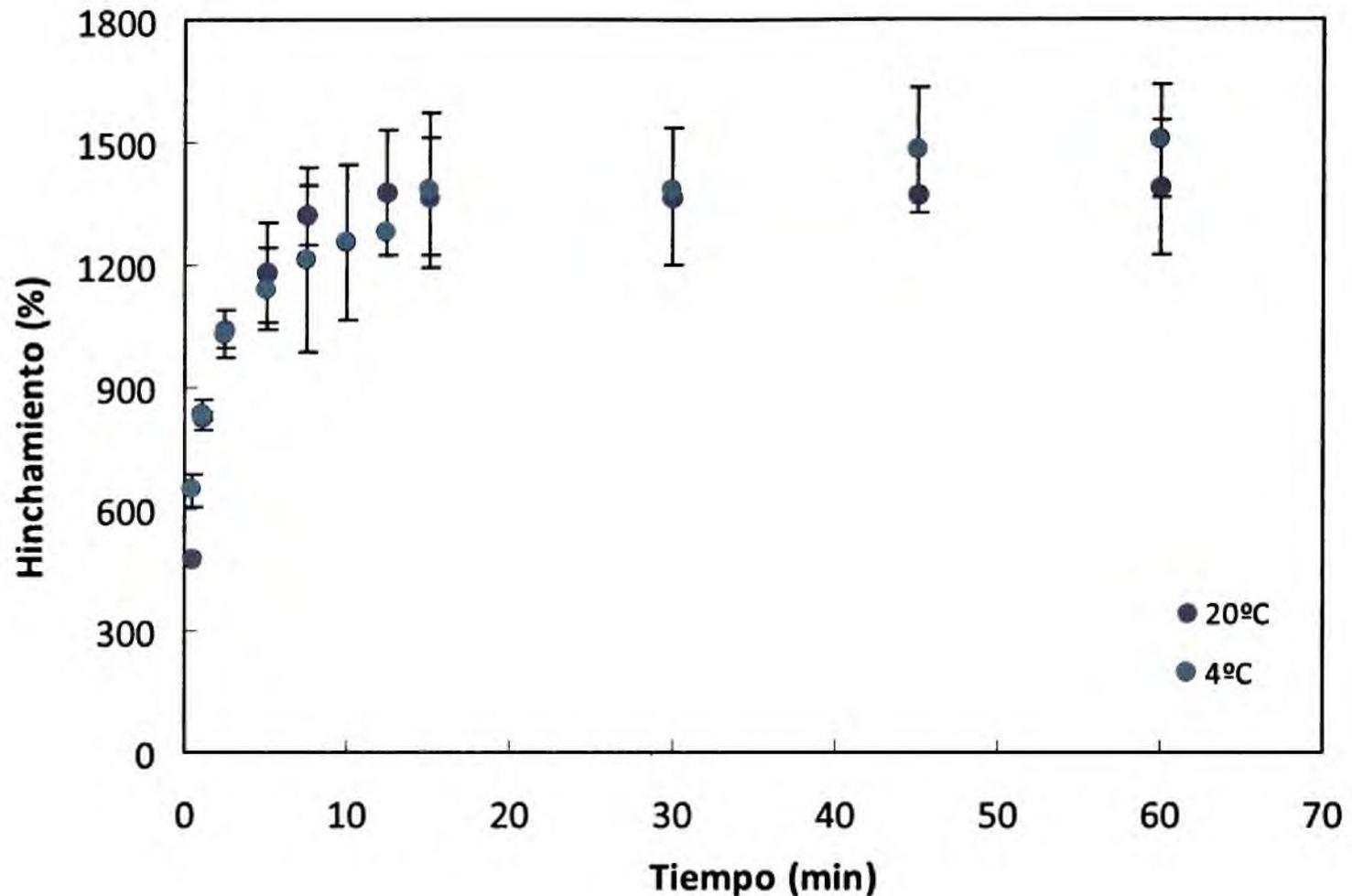


Figura 8.12 Porcentaje de hinchamiento de la matriz de quitosano con APr en función del tiempo a 4 y 20°C en un medio buffer fosfato a pH=6,5.

En la Figura 8.12 se muestra el grado de hinchamiento del material con el tiempo. Se observó que no hubo diferencias significativas con la temperatura a la que se realizó el ensayo ($p > 0,05$). Estos resultados fueron similares a los encontrados por Fajardo y col. (2010) quienes analizaron la liberación de natamisisina de películas de quitosano, en un medio buffer fosfato de pH 7,4 y obtuvieron valores de hinchamiento cercanos a 1015% a los 45 min de inmersión. Los autores señalaron que el proceso de liberación del compuesto activo fue controlado por la relajación de las cadenas poliméricas.

Las películas de quitosano con ácido propiónico en soluciones acuosas forman estructuras tridimensionales, débilmente entrecruzadas que absorben grandes cantidades de agua. El hinchamiento de estos sistemas está relacionado con la cantidad de grupos iónicos presentes en su estructura, así como el grado de ionización de los mismos. El comportamiento de estas matrices en medios acuosos tamponados a un valor de pH de 6,5, pueden resumirse como una primera etapa de difusión de agua en la estructura, un

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

pseudoequilibrio y una última etapa de disolución parcial de la matriz polimérica ya que estos valores de pH son cercanos al pKa del quitosano.

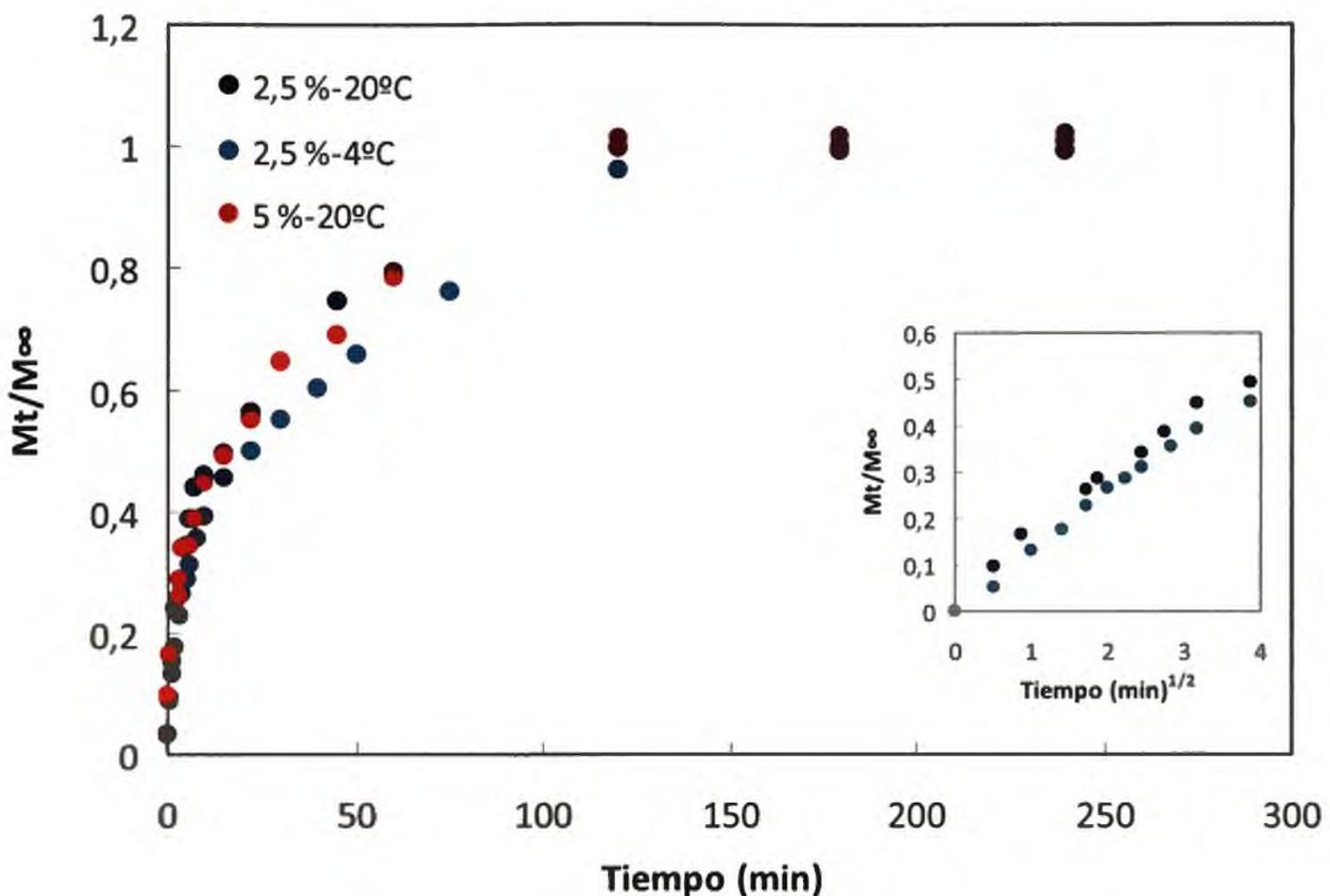


Figura 8.13 Perfil de liberación de ácido propiónico de matrices de quitosano efectuado a 4 y 20°C en un medio buffer fosfato pH = 6,5. En el inserto se muestra la dependencia de M_t/M_∞ con $t^{1/2}$ para matrices de quitosano con 2,5% de APr.

En general, cuando la matriz entra en contacto con un medio líquido la absorción del solvente hace que la matriz polimérica se hinche (Peppas y Brannon Peppas, 1994; Armand y col., 1987). De acuerdo con Lim y Tung (1997) el proceso de relajación polimérica es función del tiempo y ocurre como consecuencia del fenómeno de tensión ocasionada por el hinchamiento que se produce durante la difusión del líquido en el polímero. En el presente trabajo, se observó que independientemente de la concentración de ácido incorporado en la matriz, (2,5-5%) así como de la temperatura a la cual se realizó el ensayo de difusión (4-20°C) las muestras presentaron similares perfiles de liberación (Figura 8.13). Por otra parte, las porciones iniciales de las curvas de difusión fueron lineales con la raíz cuadrada del tiempo de difusión, indicando que el mecanismo principal de la liberación fue *difusión de tipo*

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Fickiana, como se observa en el inserto de la Figura 8.13. Asimismo, el cálculo de los parámetros a partir de la Ec. 8.8 arrojó un valor de n de 0,5, confirmando que la liberación del compuesto activo antimicrobiano estaría gobernada principalmente por la difusión (Figura 8.14). Estos resultados no concuerdan con los hallazgos de Ouattara y col. (2000), quienes encontraron que la liberación del ácido propiónico incorporado en la matriz de quitosano no estaba controlada sólo por difusión.

Por otra parte, el hinchamiento de equilibrio de la matriz se alcanzó después de aproximadamente 12 min; sin embargo el APr continuó liberándose durante un tiempo mucho más prolongado. De acuerdo a Karaaslam y col. (2010) este hecho sería una prueba más de que la liberación siguió un mecanismo combinado de difusión y relajación de las cadenas poliméricas, aún cuando al comienzo predominara uno de ellos.

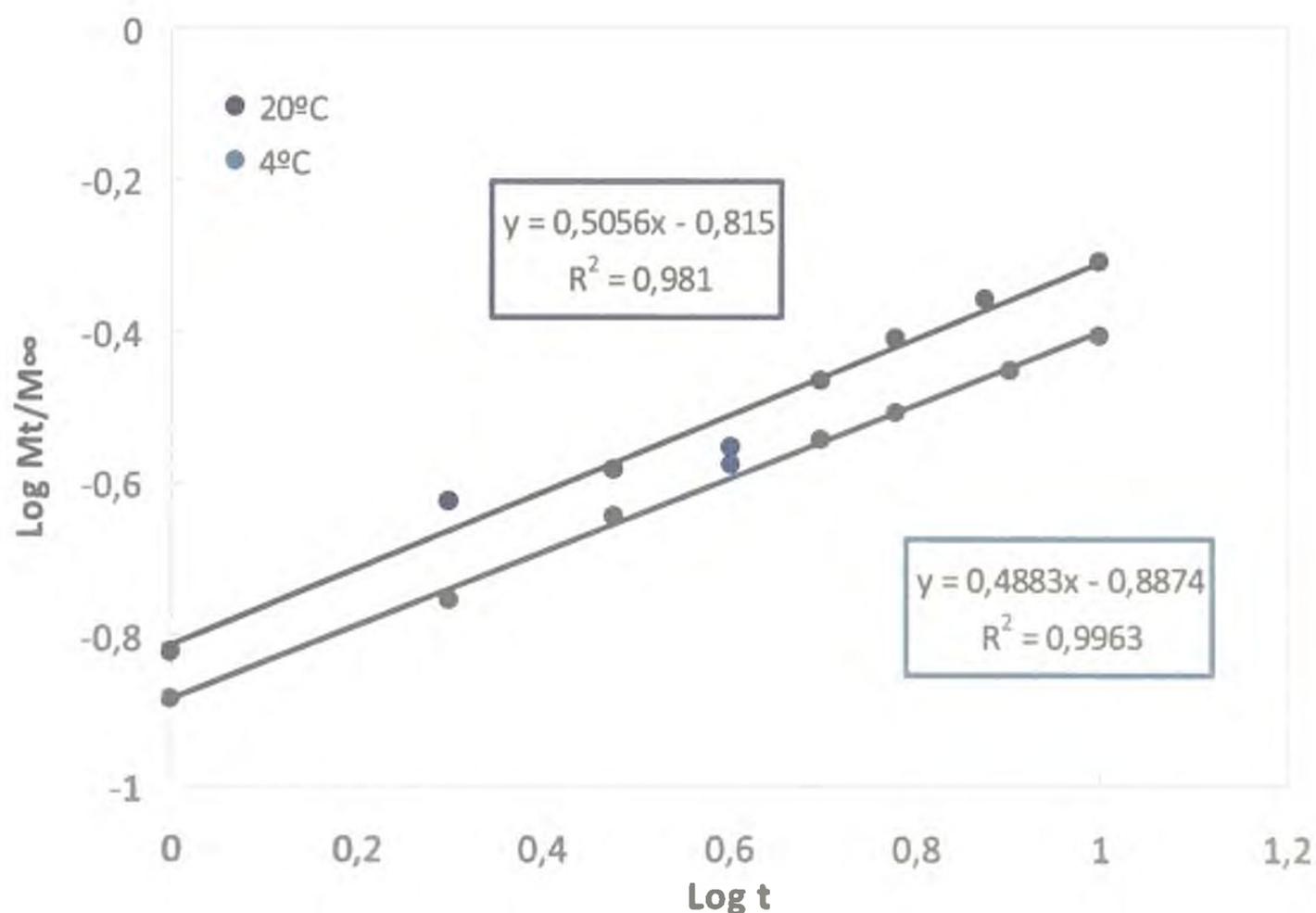


Figura 8.14 Log (M_t/M_∞) en función del Log t para el compuesto activo liberado (APr). Concentración de APr 2,5%.

8.1.3.1.4 Estimación de los coeficientes de difusión

Los datos experimentales de los perfiles de liberación a tiempos cortos de los componentes activos ensayados se modelaron con las Ec. 8.3 y 8.5; los resultados obtenidos

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

se presentan en la Tabla 8.4. En el caso de la Ec 8.3 se usó el programa Mathcad 7 Professional Mathsoft. Se propusieron valores de D y se obtuvieron valores predichos de M_t/M_∞ . Los valores de difusividad que llevaron a un mínimo la suma de los residuos al cuadrado fueron seleccionados por un procedimiento iterativo. Los residuos se determinaron como las diferencias entre los M_t/M_∞ experimentales y los calculados.

Tabla 8.4 Coeficientes de difusión de compuesto activos antioxidantes y antimicrobianos incorporados en la matriz de quitosano.

Formulación	Modelado matemático según Ec 8.5		D. 10^{10} ($m^2 s^{-1}$) *calculados a partir de Ec 8.3	
	r^2	D. 10^{10} ($m^2 s^{-1}$)		
QAPr	5,0% liberado a 20°C	0,988	1,32	4,5
	2,5% liberado a 20°C	0,993	1,36	3,8
	2,5% liberado a 4°C	0,998	1,11	3,6
QAF		0,997	1,95	5,5
QAT		0,959	0,83	2,8

*Mathcad 7 Profesional

Los coeficientes de difusión dependen del peso molecular de la sustancia difundida y del movimiento cooperativo de los segmentos de las cadenas poliméricas (Crank y Park, 1968; Reinhart y col., 1981). Por esta razón, las sustancias tienen coeficientes de difusión mayores en aquellos polímeros con menores fuerzas intermoleculares. Esto explicaría las diferencias encontradas en los coeficientes de difusión de AT y AF (Tabla 8.4), ya que estos compuestos activos interactúan con los grupos funcionales del quitosano como se ha discutido previamente en el Capítulo 4 y 6, diferenciándose en su grado de asociación a la matriz y su tamaño molecular. Existe en la literatura una gran variabilidad de valores de coeficientes de difusión informados para diferentes compuestos activos, sin embargo en la bibliografía consultada no hay trabajos relacionados con el estudio del perfil de liberación de

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

compuestos activos antioxidantes como el ácido tánico y el ácido ferúlico en películas de quitosano.

En el caso de los coeficientes de difusión del AP_r en matrices de quitosano, los valores obtenidos resultaron mayores que los informados por Ouattara y col. (2000), quienes estimaron coeficientes del orden de $3,2 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Estas diferencias podrían ser atribuidas a que estos autores utilizaron un compuesto hidrofóbico con el fin de retardar la liberación del antimicrobiano. Además, el quitosano empleado en la formulación de las películas tenía un grado de desacetilación (85%) mayor al utilizado en los ensayos de liberación del presente trabajo de Tesis (Q75). De acuerdo con Gupta y Jabrail (2006) matrices con mayor DD presentan estructuras poliméricas más compactas lo que permite controlar la dosificación del compuesto activo. En el mismo sentido, Fajardo y col. (2010) estimaron un coeficiente de difusión de natamisina de $3,60 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, liberada de matrices formuladas con quitosano con un DD de 90 %.

Los coeficientes de difusión obtenidos informados en la literatura para otras matrices biodegradables presentan un amplio espectro de valores. Choi y col. (2005) reportaron un valor de $2,6 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para películas de κ -carragenano con sorbato de potasio en tanto que Redl y col. (1996) obtuvieron coeficientes de difusión para películas de gluten y sistemas bicapa con cera de abeja de $7,6 \times 10^{-12}$ y $2,7 \times 10^{-16} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Para películas de proteína de suero se informaron valores entre $4,1$ y $9,3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, dependiendo de la formulación (Hasan y col., 2006).

Ambas ecuaciones (Ec. 8.3 y 8.5) permitieron ajustar satisfactoriamente los datos experimentales (Tabla 8.4) sólo para tiempos cortos, en que la liberación del complejo activo se mantuvo por debajo del 50-60%. Los coeficientes de difusión fueron calculados a partir de las ecuaciones derivadas de la ley de Fick. Si bien la Ec.8.3 es la solución completa y la Ec.8.5 solución simplificada obtenida de considerar al sistema inmerso como semi-infinito o sea para tiempos extremadamente cortos, ninguna de ellas representó exactamente el mecanismo a través del cual se produjo la liberación del compuesto activo. En realidad se trata de un proceso muy complejo en el que se combinan la difusión y el hinchamiento de la matriz y su dilucidación requeriría estudios y modelos más complejos. Además, ambas

ecuaciones consideran que el coeficiente de difusión del compuesto activo en la película se mantiene constante.

Así, en investigaciones futuras será necesario introducir en el modelo teórico un coeficiente de difusión variable que tenga en cuenta el hinchamiento de la matriz y los cambios morfológicos que experimentaron las películas hidrofílicas de quitosano.

8.1.3.2 Capacidad antimicrobiana de las películas activas

La capacidad antimicrobiana de las películas desarrolladas se evaluó a través del método de difusión en agar. En las Figuras 8.15 y 8.16 se observan las fotografías de los halos de inhibición correspondientes a *Salmonella spp.* y *Penicillium spp.*, mostrándose los resultados correspondientes a los dos inóculos testeados. Si bien se observó la formación de un halo de inhibición del desarrollo microbiano en las dos concentraciones de inóculos ensayadas, en algunos casos se visualizó mejor trabajando con la concentración de 10^7 - 10^8 UFC ml⁻¹ (Figuras 8.15 y 8.16).

Como muestra la Figura 8.15, todas las formulaciones ensayadas resultaron ser efectivas en la inhibición del crecimiento de *Salmonella spp.* (Gram-negativa), mientras que los ensayos realizados con *Penicillium spp.* demostraron que tanto las películas de Q almacenadas durante 30 días, las de QAPr, así como las matrices de Q curadas y las aditivadas con AT mostraron acción inhibitoria frente al desarrollo del hongo (Figura 8.16).

Aider (2010), trabajando en matrices a base de quitosano encontró que el contenido de humedad de las películas tiene un efecto significativo en sus propiedades bactericidas. Es por ello, que cuanto mayor sea la capacidad de hinchamiento de la matriz mayor será la acción antimicrobiana que presente. Como puede apreciarse en las fotografías tanto las películas de Q control como las que contenían APr (Figuras 8.15, 8.16 y 8.17) perdieron su integridad debido a su reciente preparación adoptando una estructura tipo gel (Lagaron y col., 2008) a diferencia de las matrices curadas y de las de QAT.

De acuerdo con Rabea y col. (2003) y Dutta y col. (2009) el quitosano posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana, presentando acción inhibitoria frente al desarrollo de diferentes hongos y levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Diferentes mecanismos han sido propuestos por diversos autores; la interacción

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

electrostática del quitosano se produciría (i) con grupos cargados negativamente presentes en los componentes de la membrana celular (fosfolípidos y proteínas), (ii) con aminoácidos localizados en la pared celular de las bacterias Gram-positivas, o (iii) con los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, afectando la integridad y la permeabilidad de la membrana (Chen y col., 1998; Raafat y Sahl, 2009). Por otra parte, Fernández-Saiz y col. (2006, 2009, 2010) fundamentaron el mecanismo de acción que explicaría el potencial del quitosano como agente antimicrobiano, y demostraron que el efecto biocida del polímero está relacionado con la liberación de fracciones de glucosamina protonadas al medio de cultivo.

El quitosano ejerce un efecto antifúngico por supresión de la esporulación y de la germinación de esporas (Hernández-Lauzardo y col., 2008). De acuerdo con Rabea y col. (2003) el contacto directo del quitosano con los hongos produce el debilitamiento y el hinchamiento de las hifas. Los autores atribuyeron su acción fungistática a su capacidad para inducir cambios morfológicos en la pared celular, así como su efecto en la reducción en el tamaño de las hifas y ramificaciones.

Para el caso de *S. aureus* y *Candida spp.* con una concentración de 10^8 - 10^9 UFC ml⁻¹, tanto las películas QAPr así como las que contenían AT inhibieron el desarrollo de los mismos (Figura 8.17); los halos de inhibición para *S. aureus* (Gram-positiva) fueron de 1,01 y 0,45 cm para QAPr y QAT y para *Candida spp.* de 0,99 y 0,69 para QAPr y QAT, respectivamente. La acción antimicrobiana del quitosano difiere entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, debido a las diferentes características superficiales de las células. En varios estudios, se encontró una mayor actividad antibacteriana sobre bacterias Gram-negativas respecto de las bacterias Gram-positivas (No y col., 2002; Chung y col., 2004), tendencia que también se observó en el presente trabajo.

La Tabla 8.5 muestra los halos de inhibición correspondientes a *Salmonella spp.* y *Penicillium spp.* para ambas concentraciones de inóculo y para las distintas formulaciones estudiadas. Tanto las películas QAPr como las de Q tratadas térmicamente inhibieron totalmente el desarrollo de *Penicillium spp.*

Como ya se ha abordado en Capítulos anteriores existen diferentes estrategias ya sea el entrecruzamiento mediante el agregado de agentes químicos como el AT o tratamientos

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

térmicos, que permiten mejorar las propiedades de los materiales así como la resistencia a su disolución en agua. Sin embargo, estas alternativas pueden alterar negativamente las propiedades antimicrobianas. El tratamiento térmico de la matriz de quitosano conduce a modificaciones químicas y estructurales, reduciendo la solubilidad del material en el medio de cultivo y en consecuencia las propiedades biocidas del mismo (Fernández-Saiz y col., 2009; 2010). Sin embargo, Kong y col. (2010) informaron la actividad antimicrobiana de derivados de quitosano productos de la reacción de Maillard.

El AT es un componente activo que posee potenciales propiedades antimicrobianas. Se ha comprobado que existen varios mecanismos que explican la toxicidad de los taninos, como la interacción de los taninos con enzimas o sustratos, así como su efecto directo sobre las membranas y su acción complejante de metales, sin embargo su modo de acción depende del microorganismo en cuestión (Scalbert, 1991). Se ha demostrado su capacidad antimicrobiana sobre diversos hongos filamentosos como *Penicillium spp.* y varias levaduras (Jacob y Pignal, 1972). Por otra parte, Chung y col. (1993) han informado el efecto bacteriostático y/o bactericida del ácido tánico sobre *Staphylococcus aureus*, y específicamente sobre *Salmonella enteritidis* y *Salmonella paratyphi*. En este estudio se demostró la capacidad antimicrobiana del AT en matrices de quitosano Tabla 8.5.

Así, los resultados obtenidos indicaron que tanto el agregado de ácido tánico como de ácido propiónico en la formulación de matrices de quitosano permiten ampliar el espectro de acción antimicrobiana respecto de las películas control de quitosano preparadas con ácido acético y almacenadas durante 30 días.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

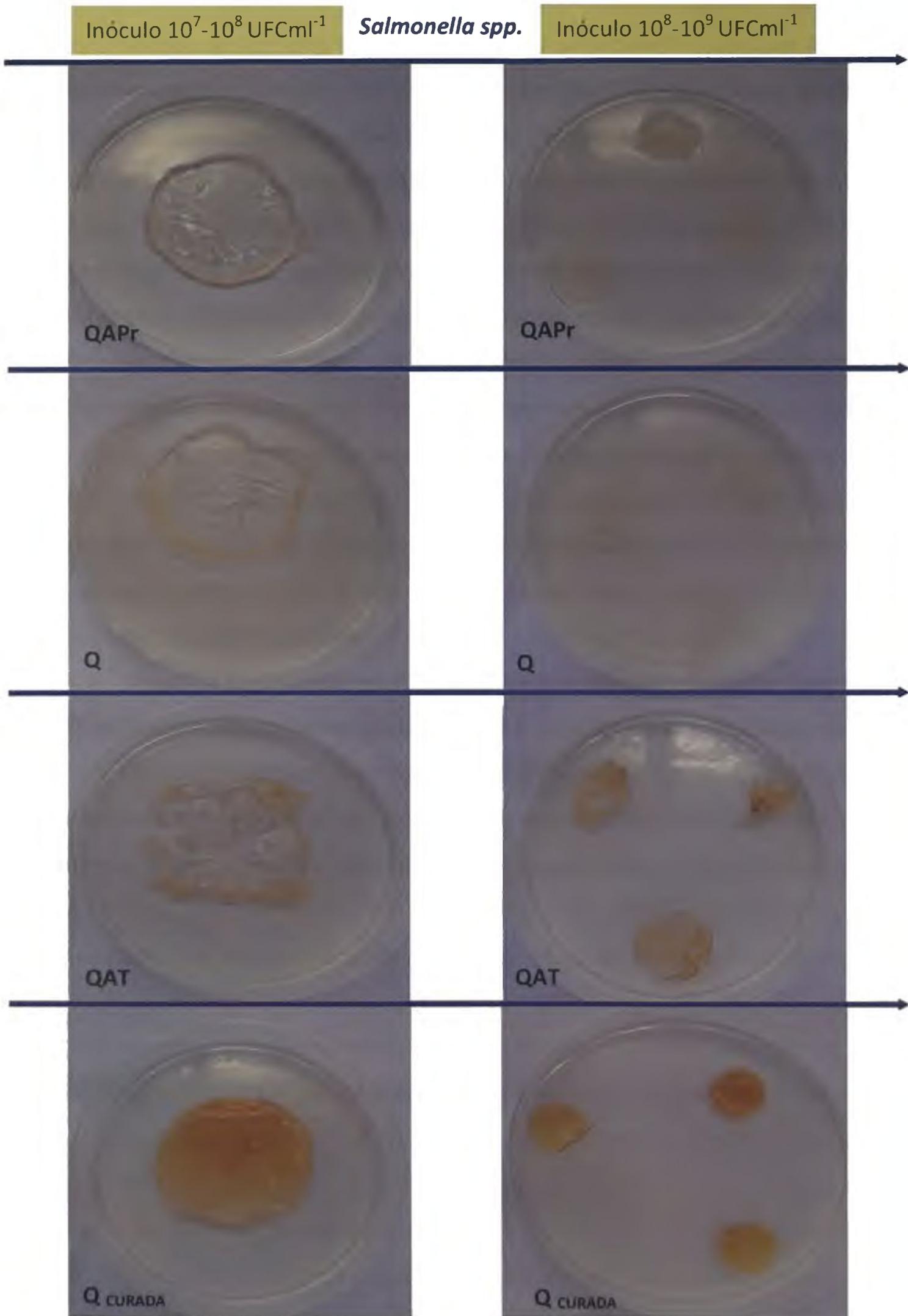


Figura 8.15 Capacidad de inhibición del desarrollo de *Salmonella spp.* en matrices a base de quitosano.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

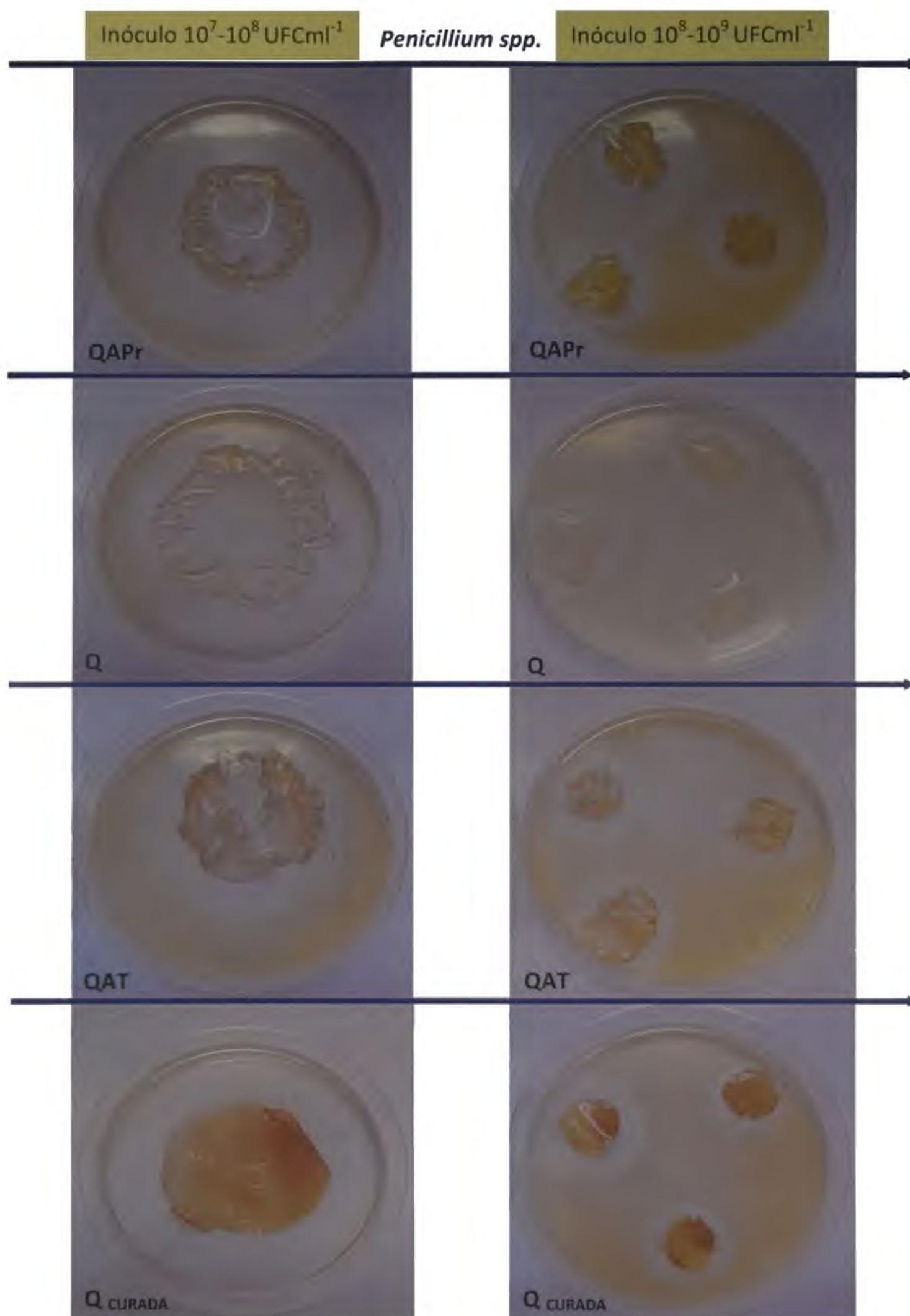


Figura 8.16 Capacidad de inhibición del desarrollo de *Penicillium spp.* en matrices a base de quitosano

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

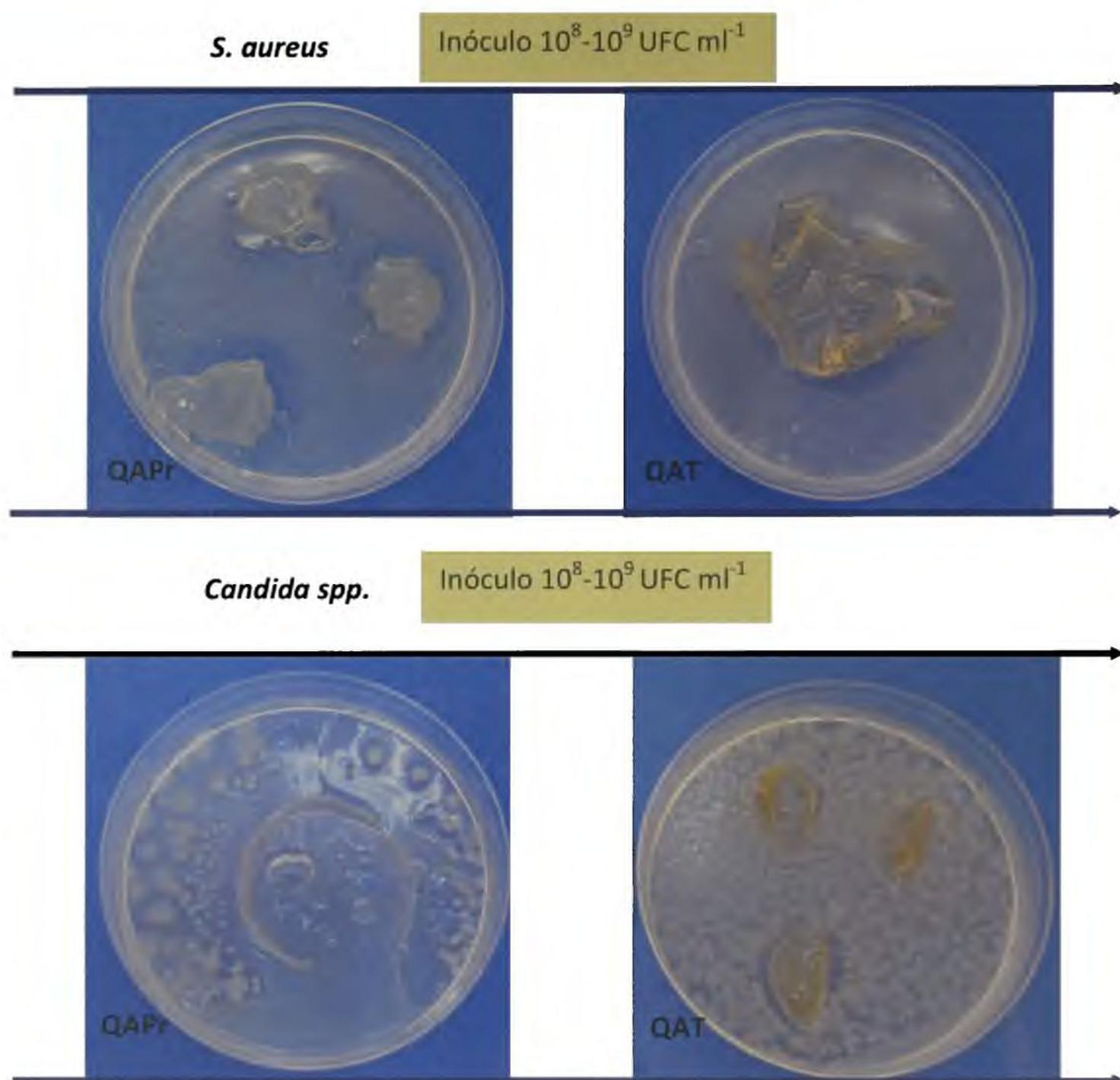


Figura 8.17 Capacidad de inhibición del desarrollo de *S. aureus* y *Candida spp.* en matrices a base de quitosano

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Tabla 8.5 Medidas de los halos de inhibición desarrollados por componentes de distintas formulaciones de películas frente a la inoculación de *Salmonella spp.* y *Penicillium spp.**

Formulación	HALOS DE INHIBICIÓN (cm)	
	Inóculo 10^7 - 10^8 UFC ml ⁻¹	Inóculo 10^8 - 10^9 UFC ml ⁻¹
	<i>Salmonella spp.</i>	
Q	1,33 (0,06) ^a	0,93 (0,04) ^a
QAPr	1,99 (0,08) ^b	1,20 (0,08) ^b
Q _{Curada}	1,17 (0,08) ^c	1,13 (0,07) ^b
QAT	1,41 (0,08) ^d	0,97 (0,07) ^a
<i>Penicillium spp.</i>		
Q	1,48 (0,07) ^a	0,75 (0,06) ^a
QAPr	<i>Inhibición total</i>	1,47 (0,08) ^b
Q _{Curada}	<i>Inhibición total</i>	1,17 (0,09) ^c
QAT	1,95 (0,06) ^b	1,09 (0,13) ^c

* Letras diferentes en cada columna para *Salmonella spp.* y *Penicillium spp.* indican diferencias significativas entre las muestras ensayadas (p<0,05).

PARTE II**8.II.1 APLICACIÓN DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS ANTIMICROBIANAS**

Las películas activas de quitosano formuladas con ácido propiónico (QAPr) se aplicaron como *separadores* entre discos de masas con el fin de extender la vida útil del producto combinando las propiedades antimicrobianas del quitosano y del ácido orgánico incorporado. Este agente activo, como resultado de un fenómeno de transferencia de materia se libera de la película hacia la masa debido a un gradiente de concentración. El sistema alimentario al que se hace referencia se encuentra descrito en el Capítulo IX: **“Alimentos Farináceos, cereales, harinas y productos derivados”** del Código Alimentario Argentino, bajo el título **“Productos de Fideería”** El artículo 722 establece la definición de los discos de masa en los siguientes términos: **Art. 722** - (Res 687 del 27-08-98). *“Con la denominación de Masa o Tapa para empanadas, pasteles, tortas fritas, pascualina o similares, se entiende el producto no fermentado obtenido por el empaste y amasado mecánico de harina, agua potable con o sin sal, con o sin grasas comestibles, manteca y/o margarina y la adición facultativa del propionato de sodio y/o calcio en cantidad no superior al 0,25% (expresada en ácido propiónico) y/o de ácido sórbico y/o sus sales de sodio, potasio y/o calcio en cantidad no superior al 0,05% (expresada en ácido sórbico), referidas a producto terminado; fraccionadas generalmente en forma circular de diferentes tamaños”*

La FDA (Food & Drugs Administration, EEUU) define a un conservante químico como aquel compuesto que cuando se adiciona a un alimento, generalmente en pequeñas cantidades, tiende a prevenir o retardar su deterioro. Por su solubilidad, sabor y baja toxicidad los ácidos orgánicos de cadena corta, como el ácido acético, benzoico, cítrico, propiónico y sórbico son los más utilizados como conservantes o acidificantes. El ácido propiónico es un compuesto sintetizado químicamente reconocido como GRAS capaz de actuar como agente antimicrobiano.

El empleo de sustancias antimicrobianas en el desarrollo de materiales que dosifiquen controladamente el componente activo desde el envase hacia el alimento, donde se mantiene en una concentración necesaria para inhibir el desarrollo de los microorganismos, puede ser una alternativa más eficiente que la adición directa del agente antimicrobiano en el producto. En la mayoría de los productos frescos o procesados, la

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

contaminación microbiana se produce con mayor intensidad en la superficie, por lo tanto, los alimentos requieren especialmente a ese nivel un efectivo control microbiológico.

La aplicación de las películas activas propuesta en el presente trabajo tiene la ventaja de incorporar el agente antimicrobiano en la matriz de quitosano sin afectar la formulación del producto.

8.II.1.1 Características del mercado

En la provincia de Buenos Aires, sólo el consumo de tapas para empanadas supera los 45 millones de docenas por año (Fuente: La Nación, octubre de 2010), lo que equivale a unas 13.500 toneladas al año (considerando envases de peso neto igual a 300 g).

El mercado de discos de masa se halla altamente atomizado; además de distribuir los productos de origen nacional, cada provincia e inclusive muchas localidades, cuentan con marcas locales.

El consumo argentino per capita de tapas frescas (discos de masa para empanadas ó pascualinas) de 1996/ 1997, calculado por el INDEC a través de su Encuesta Nacional del Gasto de los Hogares fue estimado en 1,4 Kg/hab/año, siendo al momento el único dato estadístico oficial disponible. Es sabido que en particular los discos de masa para empanadas, tartas y pasteles constituyen productos tradicionales y distintivos de la gastronomía argentina.

El objetivo propuesto para la segunda parte de este Capítulo fue:

- ❖ Estudiar la potencial aplicación de las películas activas desarrolladas a un producto de pastelería, evaluando su eficiencia en la extensión de la vida útil del producto.

8.II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

8.II.2.1 Preparación de la masa

Dado que los productos disponibles en el mercado contienen conservantes (sales de propionato, benzoato y sorbato) fue necesario preparar masas sin preservadores con el fin de evaluar la influencia de la liberación del ácido propiónico incorporado en la matriz de quitosano en la vida útil del producto.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Los ingredientes utilizados en la formulación de la masa se detallan a continuación: harina Tipo 0000, margarina, NaCl y agua.

Para la preparación de la masa se mezclaron los ingredientes secos, posteriormente se adicionó agua hasta obtener una masa. La misma se amasó en forma manual, se envolvió en un film de polietileno y se mantuvo refrigerada (4°C) durante aproximadamente 1 hora. Luego la masa se colocó en una bandeja de acrílico especialmente diseñada y se extendió hasta obtener una lámina de 3 mm de espesor. Para el ensayo se cortaron discos de masa de 40 mm de diámetro.

8.II.2.2 Caracterización de masas respecto a un control comercial

Como control se usaron tapas de empanadas marca Fargo, adquiridas en el mercado local.

Humedad

La humedad de las masas se determinó por el método indirecto como se describió en el Capítulo 2.

pH

El pH inicial de la masa se evaluó mediante un peachímetro con un electrodo para sólidos (HACH, EEUU).

Actividad acuosa a_w

La actividad acuosa de las masas se determinó con un higrómetro Aqualab (Decagon, USA) a 20°C como se describió en el Capítulo 2.

Color

El color de las masas obtenidas se determinó siguiendo la metodología detallada en el Capítulo 3.

Test de punción

Los ensayos de punción se realizaron en un TAXT2i Textura Analyzer (Stable Micro Systems, Reino Unido) conectado con una computadora, que controla el instrumento y efectúa el análisis de los datos obtenidos, mediante el Asistente de Textura Exceder software suministrado por Texture Technologies Corp. Se realizaron seis mediciones en distintas secciones de la masa y se informó el valor promedio obtenido.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Para el ensayo se utilizó una sonda cilíndrica de 2 mm de diámetro a una velocidad constante de 1 mm s^{-1} . Las pruebas se realizaron con discos de masa de 40 mm de diámetro y 3 mm de espesor. La fuerza máxima a la ruptura (F_{max}) se determinó a partir de las curvas obtenidas.

Análisis dinámico-mecánico

Para estos análisis se utilizó un equipo DMA 2980 marca TA Instruments, utilizando una mordaza *dual cantilever* en el modo multifrecuencia. Las dimensiones de las muestras fueron 60 mm de largo, 13 mm de ancho y 3 mm de espesor. Las condiciones de análisis fueron: calentamiento de -100 a 50°C a una velocidad de 5°C min^{-1} y frecuencias de: 1, 3, 5 y 10 Hz, a una amplitud fija de 5.

8.II.2.3 Diseño del producto

En la Figura 8.18 se esquematiza el diseño del sistema constituido por tres discos de masas y dos películas QAPr como *separadores* de las mismas. Como ya se explicó previamente las matrices preparadas con ácido propiónico al 2,5 y 5% retuvieron 11 y 17% del mismo después del secado, respectivamente. Este sistema, constituido por los discos de masas y las películas biodegradables se envasó con un material sintético PD 960 a base de polietileno. Este material, de $75 \mu\text{m}$ de espesor formado por multicapas, reconocido por su estabilidad frente al termosellado, es empleado especialmente para el envasado de alimentos frescos refrigerados.

Como control primario se emplearon discos de masa con separadores PD 960 (CRYOVAC®) a base de polietileno, Por otra parte, como control secundario se usaron como *separadores* películas de quitosano previamente almacenadas durante 30 días a efectos de evaluar la capacidad antimicrobiana inherente del biopolímero.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

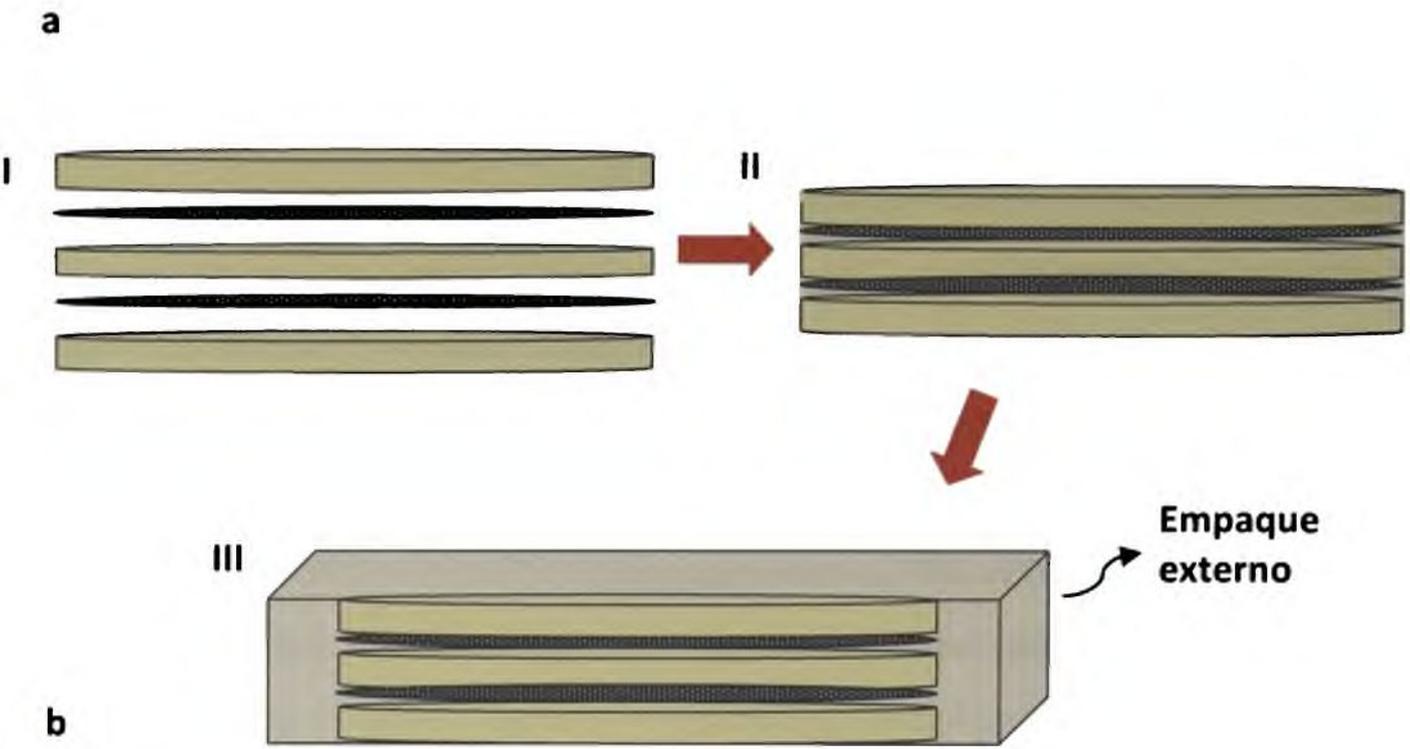
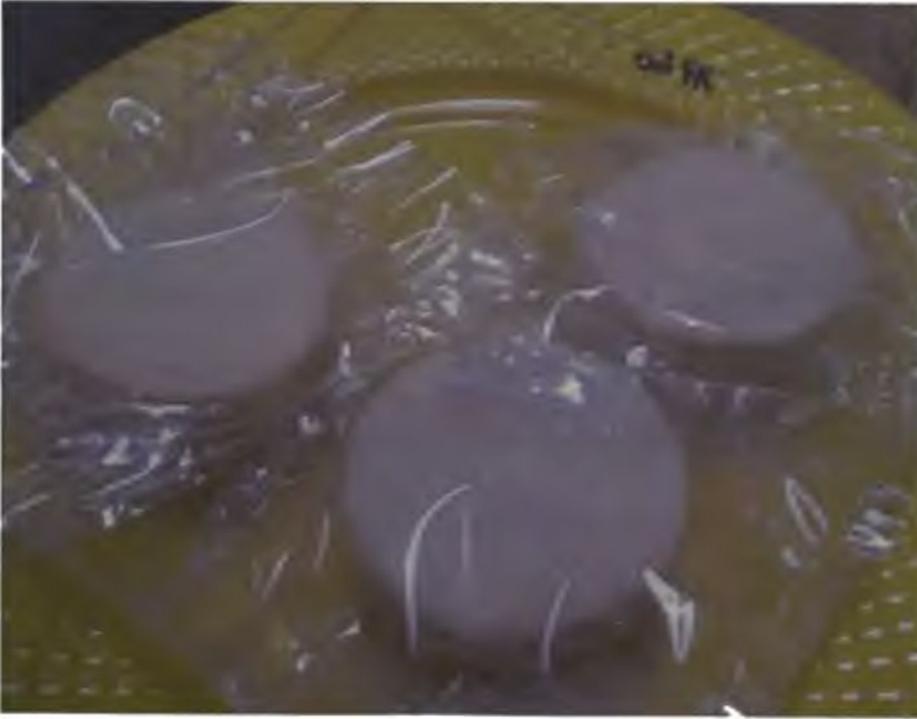


Figura 8.18 (a) Representación esquemática de las etapas involucradas en el desarrollo del sistema masa/película/masa, (b) masas en contacto con QAPr y envase externo PD 960 a tiempo inicial (t=0).



8.II.2.4 Determinación del contenido de ácido propiónico en masas

El contenido de ácido propiónico transferido a las masas desde las películas QAPr se determinó después de 1 y 7 días de haber permanecido en contacto a una temperatura de almacenamiento refrigerado de 4°C. El protocolo seguido para determinar el APr en las masas se describe a continuación: se disolvieron los discos de masas en una solución buffer fosfato de pH 6,5. La solución se filtró empleando filtros descartables de 0,45 µm y se procedió a cuantificar el compuesto antimicrobiano liberado mediante HPLC en fase reversa como se describió previamente en la Parte I del presente Capítulo. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Para calcular el porcentaje de ácido propiónico liberado a las masas se consideró la concentración cuantificada en las mismas respecto de la cantidad remanente en las películas con las que permanecieron en contacto para los dos tiempos ensayados.

8.II.2.5 Evaluación de la vida útil del producto

Los sistemas formulados y los controles se almacenaron a 4°C; a los 7, 14, 20, 26 y 30 días de almacenamiento se tomaron muestras de las masas y se realizó el recuento de hongos y levaduras. Para realizar los ensayos a cada tiempo, se tomaron 10 g de la masa, se homogeneizaron en un Stomacher Seward Modelo 400 (Inglaterra) con 90 ml de agua peptona estéril al 1%. Se sembraron 100 µl del homogenato o diluciones necesarias en medio YGC (Yeast extract Glucose Cloramphenicol, Merck) y las placas se incubaron 8 días a 30°C. Los recuentos de microorganismos viables se determinaron por conteo del número de colonias formadas, expresándose los resultados como UFC g⁻¹ masa. Las determinaciones realizaron por duplicado.

El desarrollo fúngico en las masas fue modelado aplicando la ecuación de Gompertz (Zwietering y col., 1990; Giannuzzi y col., 1998).

$$\log N = y_0 + a \cdot \exp\left(-e^{-\left(\frac{x-x_0}{b}\right)}\right) \quad \text{Ec. 8.}$$

donde,

N representa los recuentos microbianos al tiempo **t**

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

y_0 corresponde a los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente, a número de ciclos logarítmicos de crecimiento, x_0 tiempo requerido para alcanzar la velocidad máxima de crecimiento (días), x tiempo genérico expresada en días y b velocidad relativa de crecimiento a tiempo x_0 (1/día). Para estimar los parámetros del modelo se utilizó el programa Sigma Plot versión

8.II.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**8.II.3.1 Caracterización de la masa**

En La Tabla 8.6 se muestran los valores obtenidos de los parámetros estudiados para la caracterización de la masa preparada sin conservantes a tiempo inicial y la masa comercial Fargo.

Tabla 8.6 Caracterización de la masa preparada y de un producto comercial marca Fargo*

DETERMINACIONES	Preparada		Comercial	
Humedad % (b.h)	23,04 (0,52) ^a		20,21 (0,44) ^b	
pH	pH _{inicial} = 6,57 (0,22) ^a		4,57 (0,03) ^b	
a_w a 25°C	0,937 (0,01) ^a		0,947 (0,003) ^a	
Color	L	82,25 (0,79)	L	84,53 (0,29)
	a	-1,97 (0,16)	a	-1,81 (0,10)
	b	15,32 (0,83)	b	15,39 (0,38)
F_{max} (N)	0,63 (0,03) ^a		0,14 (0,008) ^b	
T_g (°C)	25		18	
Contenido de ácido propiónico (APr)			0,16 g APr/100 g de masa (0,02)	

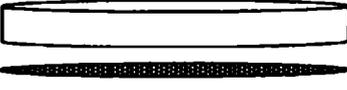
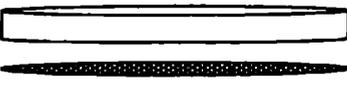
* Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las muestras ensayadas ($p < 0,05$).

8.II.3.2 Aplicación de las películas activas antimicrobianas a discos de masas

Si bien las pruebas preliminares se realizaron ensayando dos concentraciones de ácido propiónico (2,5 y 5%) cuando se cuantificó la concentración del agente antimicrobiano en la masas la concentración del 5% se descartó ya que excedía la dosis máxima permitida (0,25 g de APr/ 100 g de producto) de ácido propiónico establecido por el CAA.

A los siete días de almacenamiento el pH de las masas disminuyó a 5,5 en promedio. Esta disminución fue consecuencia de la liberación del ácido propiónico desde la matriz de quitosano. Como se observa en la Tabla 8.7 los porcentajes de hinchamiento difieren entre sí dependiendo de la ubicación de las películas en el sistema, es decir, superior(S) o inferior (I), y del tiempo de almacenamiento. Estas diferencias pueden explicarse considerando que la película superior no estuvo sometida al mismo peso que la inferior y por ende la capacidad de hinchamiento en este caso estuvo menos restringida.

Tabla 8.7 Valores de hinchamiento de las películas en contacto con las masas y de ácido propiónico liberado a las masas, expresados en porcentaje *

SISTEMA	DÍA 1		DÍA 7	
	% Hinchamiento de QAPr	% APr liberado	% Hinchamiento de QAPr	% APr liberado
 1	113,46 (1,45) ^a	42,14	136,34 (5,03) ^a	87,43
 2	109,13 (0,12) ^b		121,95 (1,57) ^b	
 3				

*Valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

8.II.3.3 Evaluación de la vida útil del producto

El recuento de hongos y levaduras en función del tiempo de almacenamiento a 4°C en masas que estuvieron en contacto con los diferentes *separadores* QAPr y los controles Q y PD 960 se muestran en la Figura 8.19.

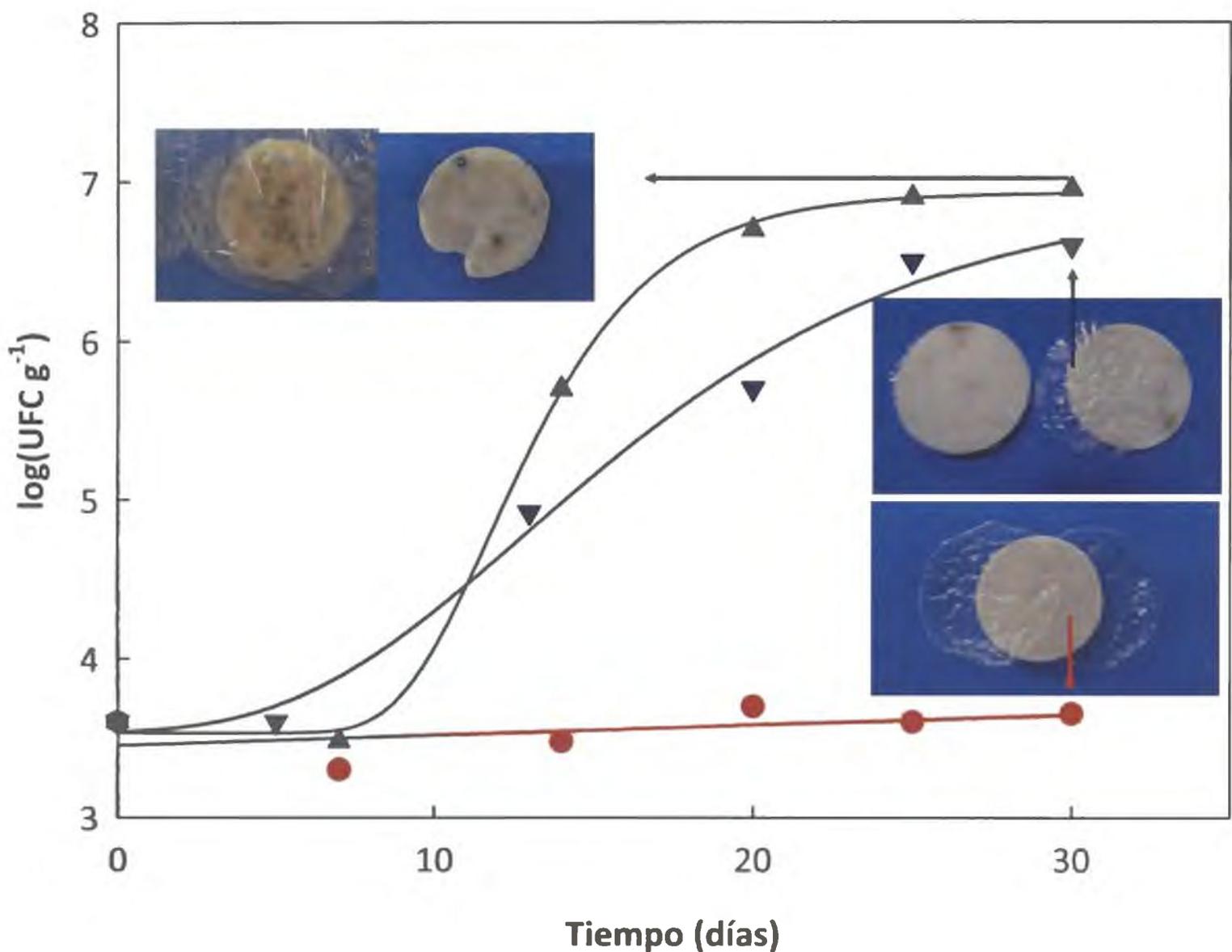


Figura 8.19 Desarrollo de hongos y levaduras en masas separadas con películas (●) QAPr, (▼) Q y (▲) control PD 960, almacenadas a 4°C. En los casos con separadores de Q y PD 960 se realizó el ajuste con el modelo de Gompertz.

En la Figura 8.19 puede observarse que los recuentos de hongos y levaduras desarrollados en las masas utilizando películas sintéticas PD 960, aumentaron rápidamente llegando a 10^7 UFC g⁻¹ a los 20 días con un marcado aspecto de desarrollo fúngico que lo vuelve rechazable por el consumidor, tal como se observa en las fotografías insertas en la Figura 8.19, correspondientes a los 30 días de almacenamiento de las muestras.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Pudo observarse que tanto en el control sintético como en las masas almacenadas con quitosano el desarrollo microbiano siguió una cinética de tipo sigmoidea, en consecuencia su desarrollo pudo ser modelado aplicando la ecuación de Gompertz (Zwietering y col., 1990). Se obtuvo un coeficiente de correlación de la regresión de 0,998 y 0,999 para el control PD 960 y para el quitosano, respectivamente. Los parámetros hallados pueden observarse en la Tabla 8.8

Tabla 8.8. Parámetros estimados a partir de la ecuación de Gompertz, con los datos experimentales del desarrollo de hongos y levaduras en masas con diferentes películas como *separadores* entre masas*

Parámetros estimados a partir de Gompertz	PD 960	Q
a	3,39 (0,11)	3,30 (0,42)
b	2,85 (0,75)	5,99 (1,87)
x ₀	11,76 (0,62)	13,73 (1,14)
y ₀	3,53 (0,06)	3,54 (0,17)

*Valores entre paréntesis corresponden al error estándar.

El tiempo de vida útil de las masas fue definido como el tiempo requerido para que los recuentos microbianos (en este caso hongos y levaduras) alcancen niveles de 10^6 UFCg⁻¹ y ausencia de microorganismos patógenos.

Con la ecuación de Gompertz descrita anteriormente y los parámetros calculados fue posible estimar el tiempo en el cual los recuentos microbianos llegaron a 10^6 UFC g⁻¹ (Tabla 8.9).

*Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano***Tabla 8.9** Tiempo necesario para que los recuentos de hongos y levaduras alcancen un recuento de 10^6 UFC g^{-1}

Formulación	Tiempo de vida útil (días)
Control PD 960	15
Q	20
QAPr	>30

Las películas de quitosano presentaron una leve acción antimicrobiana en el desarrollo de hongos y levaduras en las masas almacenadas.

Para el caso de la muestra control los recuentos alcanzaron niveles de 10^6 UFC g^{-1} a los 15 días de almacenamiento a $4^{\circ}C$, mientras que las muestras de masas con películas control de quitosano sólo requirieron 20 días para lograr esos recuentos, presentando valores similares al control sintético al final del almacenamiento (30 días).

Cuando se analizaron las muestras en contacto con matrices de quitosano, la presencia de estas películas consiguió extender la vida útil, si bien se evidenció un mayor contenido microbiano que para el control a tiempos cortos. Los recuentos alcanzaron 10^6 UFC g^{-1} al cabo de 20 días. Por otra parte, las masas en contacto con las películas QAPr no alcanzaron niveles de 10^6 UFC g^{-1} durante todo el tiempo de almacenamiento (30 días), indicando que mediante la utilización de las películas activas como *separadores* fue posible duplicar la vida útil de las masas respecto al control (Tabla 8.9). Los recuentos microbianos se mantuvieron en fase de latencia, y no se observaron hongos ni levaduras visibles en las masas, no superando 10^4 UFC g^{-1} , guardando una estrecha relación con la capacidad antimicrobiana de las películas activas encontrada en los estudios expuestos en la Parte I de éste Capítulo. Los resultados presentados probarían la existencia de un sinergismo entre el quitosano y el ácido propiónico.

Liberación de compuestos activos de matrices a base de quitosano

Resumiendo, se observó que la liberación de los agentes antioxidantes y antimicrobianos estuvo controlada por dos mecanismos en paralelo, uno tipo fickiano y otro asociado al alto grado de hinchamiento de las matrices.

Asimismo las películas activas formuladas con APr combinaron la acción del ácido preservador y la capacidad antimicrobiana inherente del quitosano ya que fueron capaces de inactivar parcialmente o inhibir en su totalidad el crecimiento de los microorganismos estudiados. Esto se puso de manifiesto aún cuando las bacterias patógenas, hongos y levaduras fueron inoculados experimentalmente con concentraciones muy superiores a las que podrían encontrarse en los alimentos elaborados bajo buenas prácticas de manufactura (BPM). Los resultados obtenidos amplían las aplicaciones de estos materiales y constituyen un avance en la preservación de la inocuidad de los alimentos. La aplicación de las matrices QAPr a un sistema alimentario logró extender la vida útil del mismo en relación al uso de un material sintético.

REFERENCIAS

- Aider M. (2010).** Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- Ahvenainen R. (2003).** Active and intelligent packaging. In: R. Ahvenainen (Ed.), Novel food packaging techniques. Cambridge, England. Woodhead Publishing Ltd.
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S. y Robards K. (2002).** Methods for testing antioxidant activity. Critical Review. *The Analyst Journal*, 127, 183-198.
- Appendini P., y Hotchkiss J.H. (2002).** Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 113 -126.
- Armand J.Y., Magbard F., Bouzon J., Rollet J., Taverdet J.L. y Vergnaud J.M. (1987).** Modelling of drug release in gastric liquid from spheric galenic forms with eudragit matrix. *International Journal of Pharmaceutics*, 40, 33-41.
- Benzie I.F.F., y Strain J.J. (1996).** The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., y Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 28, 25-30.
- Cao N., Fu Y., y He J. (2007).** Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by feluric acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 575-584.
- Choi J.H., Choi W.Y., Cha D.S., Chinnan M. J., Park H. J., Lee D.S. y Park J.M. (2005).** Diffusivity of potassium sorbate in kappa-carrageenan based antimicrobial film. *Lwt-Food Science and Technology*, 38(4), 417-423.
- Chung K.-T., Stevens S.E., Jr., Lin W.-F., y Wei C.I. (1993).** Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 29-32.
- Chung Y-C., Su Y-P., Chen C-C., Jia G., Guang H-L., Wu J.C.G., y Lin J-G. (2004).** Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932-936.
- Cuq B., Gontard N. y Guilbert S. (1995).** Edible films and coatings as active active layers. En: Active food packaging. Rooney, M. L. (de.), Blackie Academic & Professional, UK, pp. 111-142.

- Dutta P. K., Tripathi S., Mehrotra G. K., Y Dutta J. (2009).** Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- Fajardo P., Martins J.T., Fuciños C., Pastrana L., Teixeira J.A., y Vicente A.A. (2010).** Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101, 349-356.
- Fennema O.R. (1996).** Food Chemistry; 3º. Edition, Marcel and Dekker Inc., New York.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M. J., y Lagaron, J. M. (2006).** Film forming and biocide assessment of high molecular weight chitosan as determined by combined ATR–FTIR spectroscopy and antimicrobial assays. *Biopolymers*, 83(6), 577-583.
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., y Ocio, M. J. (2009).** Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3298-3307.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M. J., y Lagaron, J. M. (2010).** Antibacterial chitosan-based blends with ethylene–vinyl alcohol copolymer. *Carbohydrate Polymers*, 80, 874-884.
- Giannuzzi L, Pinotti A. y Zaritzky N (1998).** Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 39, 101-110.
- Gülçin I., Huyut Z., Elmastas M., Aboul-Enein H.Y. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* 3, 43-53.
- Gupta K.C., y Jabrail F.H. (2006).** Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 66, 43-54.
- Han J. H., y Floros J.D. (1998).** Modeling the growth inhibition kinetics of Baker's yeast by potassium sorbate using statistical approaches. *Journal of Food Science*, 63(1), 12-14.
- Hasan S., Deniz S., y Murat O. (2006).** A Mathematical Model for Potassium Sorbate Diffusion Through Whey Protein Films. *Drying Technology: An International Journal*, 24(1), 21-29.
- Hernandez-Lauzardo, A.N., Bautista-Banos, S., Velazquez-del Valle, M.G., Mendez-Montecalvo, M.G., Sanchez-Rivera, M.M., y Bello-Perez, L.A. (2008).** Antifungal effects of

- chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73, 541-547.
- Isaza Martínez J.H. (2007).** Taninos o polifenoles naturales. *Scientia Et Technica*, 33, 13-18.
- Jacob F.H., y Pignal M.C. (1972).** Yeast-tannin interaction. I. Growth and survival of various yeast in tannin solutions. *Mycopathology Mycology Applied*, 48, 121.
- Karaaslam A.M., Tshabalala M.A., Buschle-Diller G. (2010).** Wood hemicellulose/chitosan-based semi-interpenetration network hydrogels: mechanical, swelling and controlled drug release properties. *BioResource*, 5(2), 1036-1054.
- Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E.M., Buri P., y Peppas N.A. (1983).** Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15, 25-35.
- Korsmeyer R.W., y 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(3), 211-227.
- Kong M., Chen X.G., Xing K., y Park H.J. (2010).** Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- Lagaron J., Fernández-Saiz P., y Ocio M. (2008).** Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55, 2554-2562
- Langer R.S., y Peppas N.A. (1981).** Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 2, 201-214.
- Langer R., y Peppas N. (1983).** Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: A review. *Journal of Macromolecular Science Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, 23, 61-126.
- Lee P.I. (1985).** Kinetics of drug release from hydrogel matrices. *Journal of Controlled Release*, 2, 277-288.
- Lim L-T, y Tung MA. (1997).** Vapor pressure of allyl isothiocyanate and its transport in PVDC/PVC copolymer packaging film. *Journal of Food Science*, 62, 1061-1066.

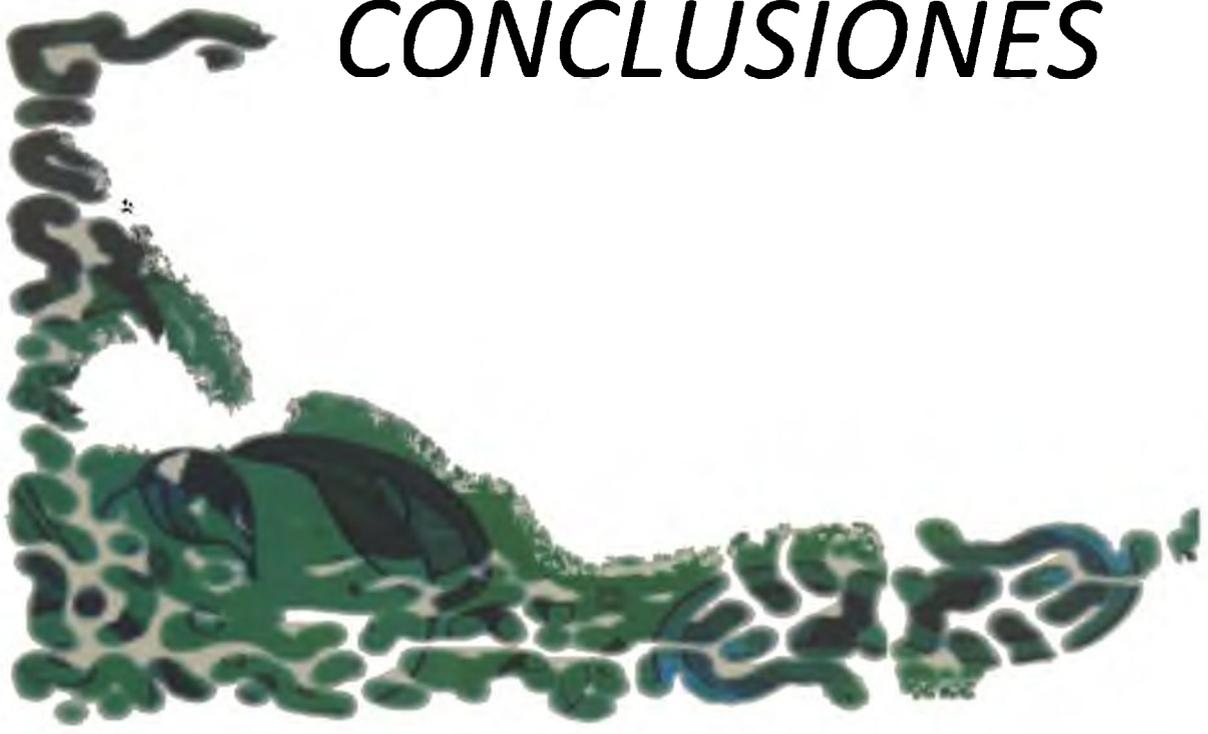
- López-de-Dicastillo C., Gómez-Estaca J., Catalá R., Gavara R., y Hernández-Muñoz P. (2012).** Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry*, 131, 1376-1384.
- Mathew S., y Abraham T.E. (2008).** Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826-835.
- Michalak I., y Mucha. M. (2012).** The release of active substances from selected carbohydrate biopolymer membranes. *Carbohydrate Polymers*, 38, 2432-2438.
- Moure K., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J., Dominguez H., Núñez M.J., y Parajó J.C.(2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- No H.K., Park N.Y., Lee S.H., y Meyers S.P. (2002).** Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.
- Ou S., y Kwok K.C. (2004).** Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261-1269.
- Ou S., Wang Y., Tang S., Huang C., y Jackson M.G. (2005).** Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70(2), 205-210.
- Ouattara B., DSimard R.E., Piette G., Gegin A., y Holley R.A. (2000).** Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, 65(5), 768-773.
- Paixao N., Perestrelo R., Marques J.C. y Câmara J.S. (2007).** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105, 204-214.
- Padgett T., Han I.Y., y Dawson P.L. (1998).** Incorporation of food-grade antimicrobial compound into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1330-35.
- Peppas N.A. (1985).** Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(4), 110-111.
- Peppas N.A., y Brannon-Peppas L. (1994).** Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods. *Journal of Food Engineering*, 22, 189-210.

- Peppas N.A., y Franson N.M. (1983).** The swelling interface number as a criterion for prediction of diffusional solute release mechanisms in swellable polymers. *Journal of Polymer Science Polymer Physics Edition*, 21, 983-997.
- Peppas N.A., y Sahlin J.J. (1989).** A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57, 169-172.
- Pothakamury U.R., y Barbosa-Cánovas G.V. (1995).** Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 397-406.
- Pranoto Y., Rakshit S.K., y Salokhe V.M. (2005).** Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT—Food Science and Technology*, 38, 859-865.
- Raafat D., y Sahl H.-G. (2009).** Chitosan and its antimicrobial potential-A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 186-201.
- Rabea E.I., Badawy M.E., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. (2003).** Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.
- Redl A., Gontard, N. y Guilbert, S. (1996).** Determination of sorbic acid diffusivity in edible wheat gluten and lipid based films. *Journal of Food Science*, 61(1), 116-120.
- Reinhart C.T., y Peppas N.A. (1984).** Solute diffusion in swollen membranes. Part II. Influence of crosslinking on diffusive properties. *Journal Membrane Science*, 18, 227-239.
- Ritger P. y Peppas N. 1987.** A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5, 37-42.
- Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Review Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- Schlesier K., Harwat M., Böhm V. y Bitsch R. (2002).** Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.
- Siepmann J., y Peppas N.A. (2011).** Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *International Journal of Pharmaceutics*, 418, 6-11.
- Silveira M.F.A., Soares N.F.F., Geraldine R.M., Andrade N.J., Botrel D.A. y Goncalves M.P.J. (2007a).** Active film incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation. *Food Control*, 18(9), 1063-1067.

- Silveira M.F.A., Soares N.F.F., Geraldine R.M., Andrade, N.J. y Goncalves M.P.J. (2007b).** Antimicrobial efficiency and sorbic acid migration from active films into pastry dough. *Packaging Technology and Science* 20(4), 287-292.
- Singleton V.L., Orthofer R., y Lamuela-Raventós, R.M. (1999).** Analysis of total phenols and Other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, Vol 299*, 152-178 (Oxidants and Antioxidants), Part A. Ed. Packer L. Academic Press, California.
- Soares N.F.F., y Hotchkiss J.H. (1998).** Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging. *Packaging Technology and Science*, 11, 9-18.
- Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K., y Bigger S. (2003).** Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal Food Science*, 68(2), 408-420.
- Tharanathan R.N. (2003).** Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology* 14, 71-78.
- Torres-Arreola W., Soto-Valdez H., Peralta E., Cardenas-López J.L., y Ezquerra-Brauer J.M. (2007).** Effect of a low-density polyethylene film containing butylated hydroxytoluene on lipid oxidation and protein quality of Sierra fish (*Scomberomorus sierra*) muscle during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6140-6146.
- Vermeiren L., Devlieguere F., Van Beest M., de Kruijf N., y Debevere J. (1999).** Developments in the active packaging of Foods. *Trend in Food Science and Technology*, 10, 77-86.
- Wessling C., Nielsen T., Leufven A., y Jagerstad M. (1999).** Retention of α -tocopherol in low-density polyethylene (LDPE) and polypropylene (PP) in contact with foodstuffs and food-simulating liquids, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1635-1641.
- Wessling C., Nielsen T., y Giacín J.R. (2001).** Antioxidant ability of BHT- and α -tocopherol-impregnated LDPE film in packaging of oatmeal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 194-201.
- Zwietering M.H., Jongenburger F.M., Roumbouts M., y Van't Riet K. (1990).** Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES GENERALES

El quitosano permitió el desarrollo de películas transparentes, homogéneas, con excelente integridad estructural. Las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua resultaron buenas no obstante tratarse de un polímero biodegradable y de marcado carácter hidrofílico. El grado de deacetilación del polímero influyó en forma significativa en las propiedades físicas.

Las modificaciones realizadas sobre la matriz original combinándolo con otro biopolímero como en el caso de la gelatina, para formar matrices compuestas y sistemas *bicapa* permitieron mejorar las propiedades de las películas, particularmente aquellas relacionadas con su afinidad por el agua (debidas a su carácter hidrofílico), que constituyen el principal desafío para su aplicación en el área de envases.

La implementación de otras modificaciones sobre la matriz de quitosano, tales como el entrecruzamiento con ácido tánico y el posterior tratamiento de curado, con o sin la presencia del ácido, permitieron modificaciones estructurales que llevaron a reducir la influencia de los procesos mediados por la presencia de agua, como el grado de hinchamiento, solubilidad, permeabilidad, entre otras, sin desmedro de las propiedades mecánicas o las relacionadas con la integridad de la película.

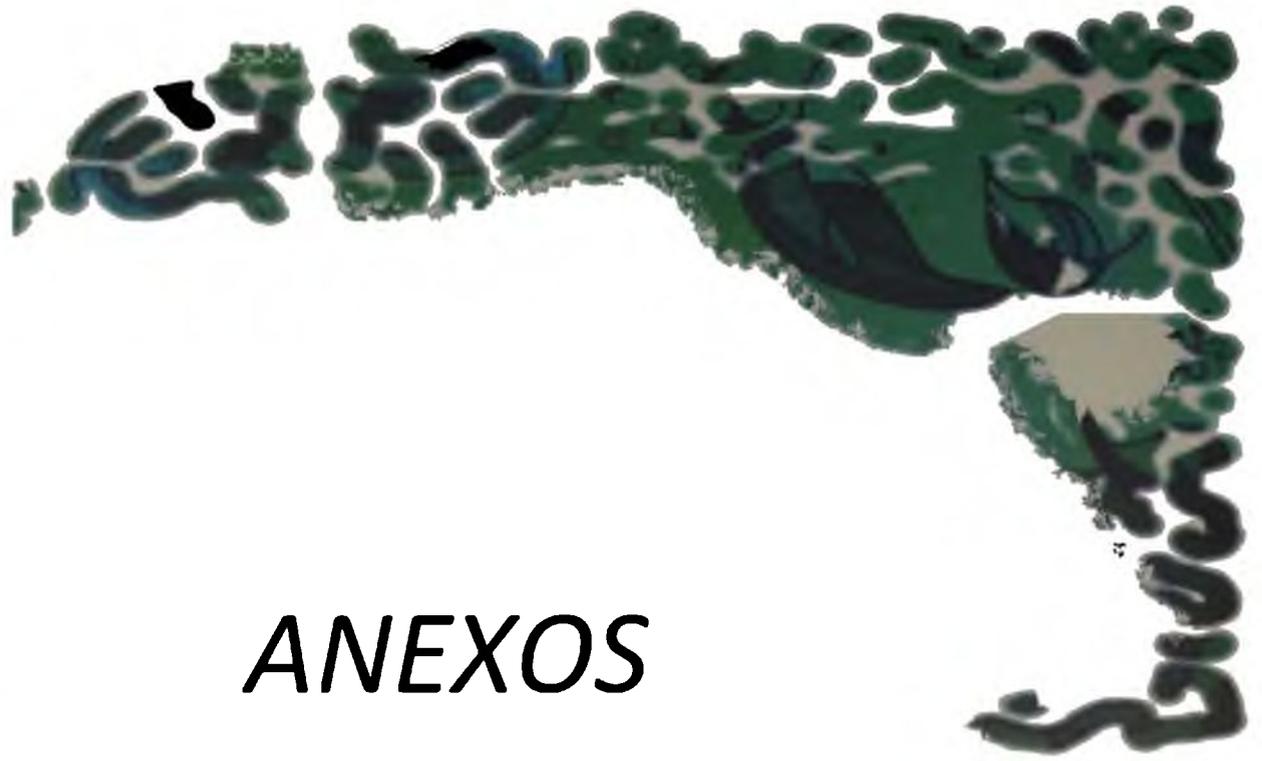
Un aspecto que debe ser contemplado es la existencia de los cambios que se produjeron en las películas luego del proceso de secado hasta alcanzar un estado estacionario en el cual las propiedades se estabilizaron. El tratamiento de curado por calentamiento a temperaturas mayores que la T_g permitió superar más rápidamente el estado transitorio, evolución que se aceleró aún más en presencia de ácido tánico.

Las modificaciones logradas sobre la matriz de quitosano tanto por agregado de ácidos ferúlico y tánico como por los tratamientos de curado no alteraron el carácter biodegradable del material, si bien se observaron diferencias en la cinética de degradación.

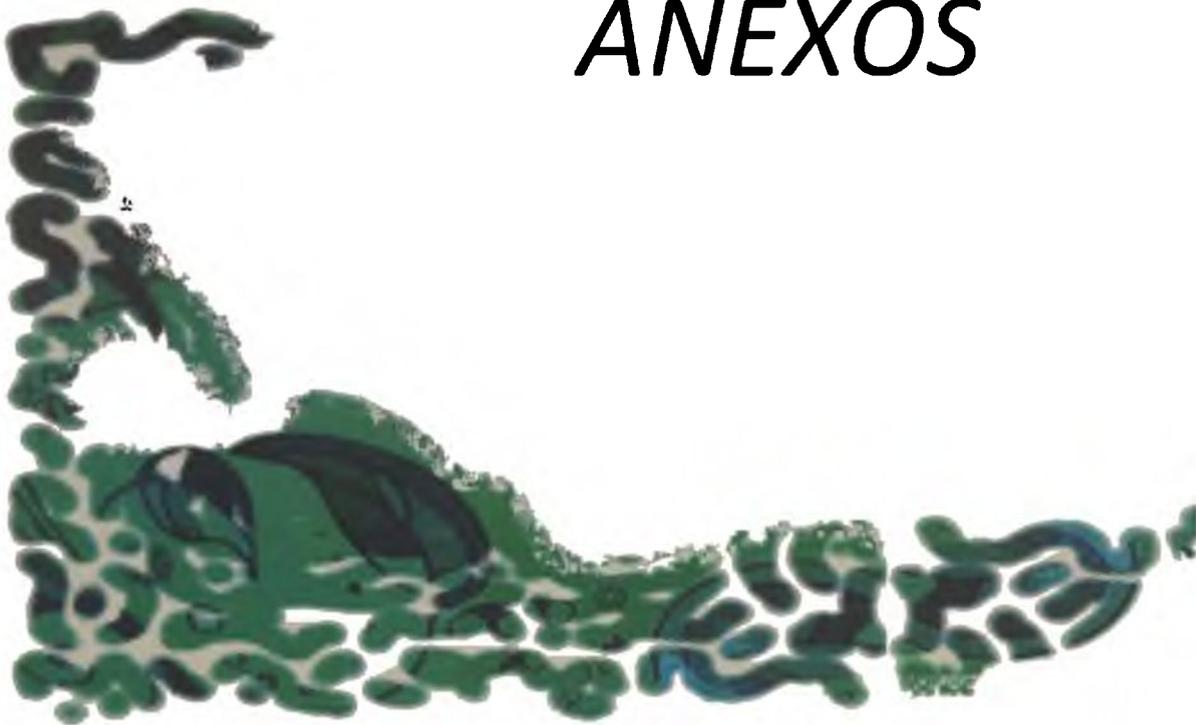
No obstante estar ampliamente difundido el carácter antimicrobiano del quitosano, se lo analizó y se lo tomó como control para cotejar los resultados de estudios realizados sobre otras películas modificadas. Se determinó que las matrices curadas no sólo no perdieron ese carácter, sino que actuaron aún más efectivamente en el caso de algunos microorganismos usados en los ensayos. La aplicación de las películas activas de quitosano con agregado de ácido propiónico a un sistema alimentario produjo una notable reducción del crecimiento microbiano, con respecto al uso de películas formuladas sólo con quitosano y al empleo de materiales sintéticos comerciales, permitiendo extender su vida útil.

La transformación de la matriz original en activa mediante la adición de ácido ferúlico y ácido tánico como agentes antioxidantes, y de ácido propiónico como compuesto antimicrobiano, resultó efectiva al desarrollarse procesos de liberación por formación de hidrogeles en medios líquidos. Los mecanismos de liberación de los ácidos fueron estudiados, comprobándose un comportamiento no-fickiano debido al hinchamiento de las matrices, este tipo de materiales es particularmente valorado en el área farmacéutica y biomédica.

A lo largo del presente trabajo de Tesis se demostró la versatilidad del quitosano en el desarrollo de películas con diferentes propiedades, asociado a la amplia variedad de modificaciones que pueden realizarse en su estructura. Así es posible obtener desde matrices con un comportamiento similar a la quitina, por medio del uso de altas temperaturas de curado hasta materiales que pueden ser utilizados en la liberación controlada de compuestos activos debido a su elevada capacidad de hinchamiento.



ANEXOS



ANEXO A

En este apartado se detallan los ensayos realizados para evaluar la evolución de las muestras luego del proceso de curado hasta alcanzar el estado estacionario, estudiando este estado transitorio del material por DSC y FTIR. El estado estacionario se definió como aquel en el cual las películas no experimentaron ningún cambio detectable en el tiempo en las propiedades microestructurales (Capítulo 5).

A modo de ejemplo se presenta la condición de curado de 160°C durante 60 min.

Estructura de la matriz bajo condiciones no estacionarias

Para analizar el proceso de estabilización estructural de la matriz, las propiedades de las películas inmediatamente después del tratamiento térmico a 160°C durante 60 min y a intervalos regulares de tiempo se estudiaron mediante DSC (Figura A1). Los termogramas de las películas recién curadas no exhibieron ningún pico asociado a un evento endotérmico, lo cual indicaría que la humedad residual fue removida debido al tratamiento térmico, independientemente de su composición. A medida que transcurrió el tiempo post-curado se observó la aparición de un pico endotérmico que se desplazó hacia temperaturas más bajas, el que se estabilizó alrededor de 125°C, una vez alcanzado el estado estacionario (Figura 1 a). Durante este período de transición la película absorbió humedad del ambiente hasta alcanzar el contenido de equilibrio, indicando una reorganización estructural de la matriz mediada por la presencia de moléculas de agua. El aumento observado en los valores de entalpía del pico confirmarían esta hipótesis (Figura A1).

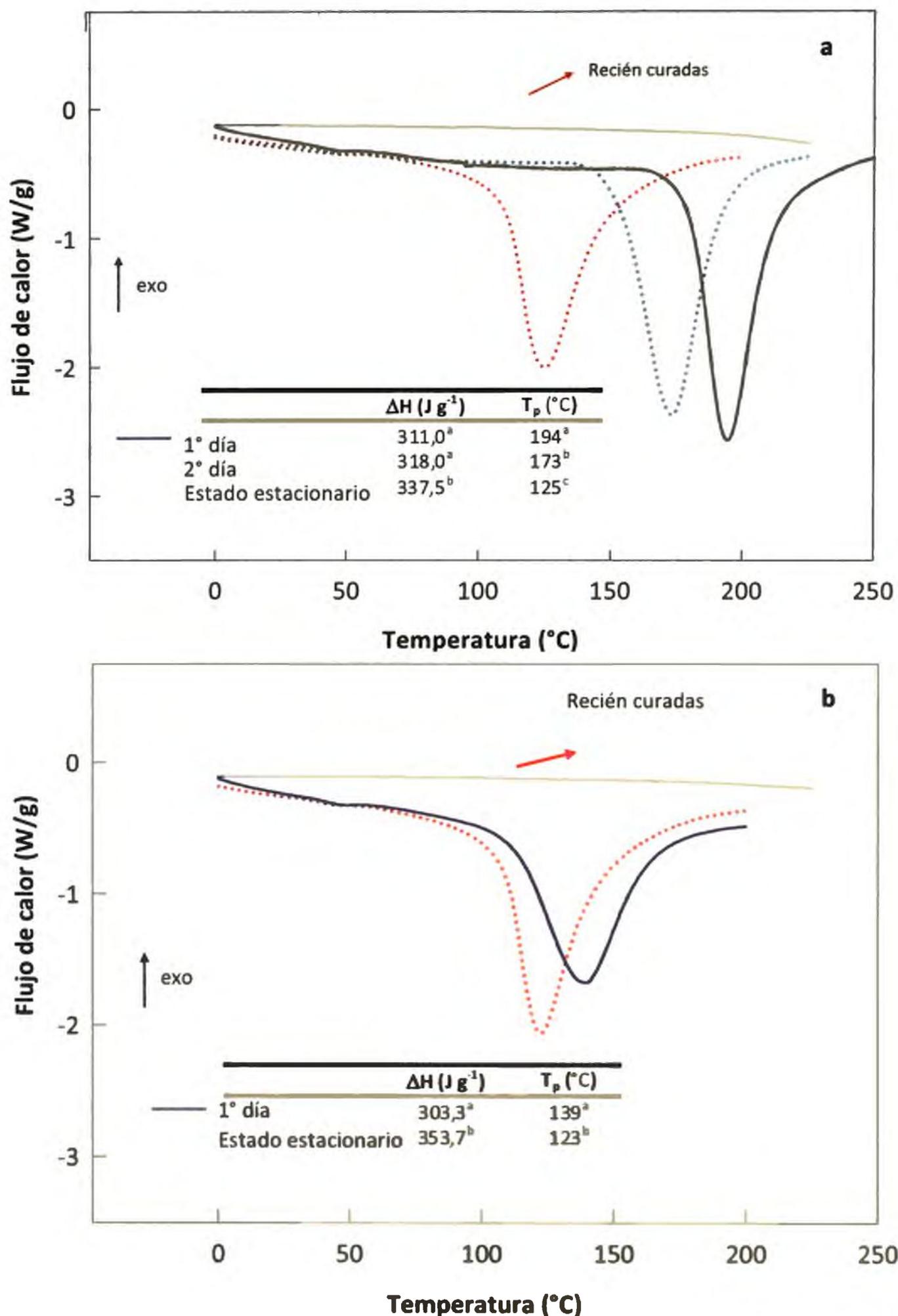


Figura A1 Termogramas obtenidos por DSC (1° scan) de las muestras recién curadas y a diferentes tiempos post-curado (transición) hasta alcanzar el estado estacionario de películas de: (a) Q y (b) QAT. Las muestras se trataron a 160°C durante 60 min. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, la presencia de ácido tánico podría facilitar la evolución hacia el estado estacionario ya que se alcanzó más rápidamente la estabilización de la estructura que en el caso de las películas de Q. Este hecho podría ser atribuido a la acción entrecruzante que ejerce el AT en la matriz de quitosano como ya se desarrolló en el Capítulo 4. Asimismo, se obtuvo una tendencia similar a la observada para Q respecto a los valores de entalpía en el proceso de transición (Figura A1b).

En ambos casos, una vez alcanzado el estado estacionario, los valores de entalpía asociados a la transición endotérmica de las películas tratadas fueron más bajos que aquellos obtenidos para las películas sin tratar. Estos resultados fueron consistentes con el contenido de humedad de las películas teniendo en cuenta que esta disminuyó un 17% para las películas de Q y 27% para las QAT, comparados con los obtenidos para las películas sin tratar.

A partir de los espectros obtenidos por FTIR se analizaron las ventanas espectrales asociadas al agua ($3600-3000\text{ cm}^{-1}$ y $1700-1580\text{ cm}^{-1}$) con el fin de monitorear los cambios microestructurales durante la transición. En el espectro de las películas de Q evaluadas inmediatamente después del proceso de curado, la región $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ se estrechó y los picos se definieron como consecuencia de la deshidratación de las películas a altas temperaturas (Figura A2a). Con el transcurso del tiempo luego del curado de la matriz esta región se fue ensanchando debido a la absorción de agua del material hasta que la muestra alcanzó el estado estacionario; estos resultados concuerdan con los obtenidos por DSC. Los espectros de las películas QAT no mostraron modificaciones en esta región independientemente del tratamiento de curado (Figura A2b).

La Figura A.2 muestra que las bandas localizadas a 2954 y 2908 cm^{-1} (asignadas en el Capítulo 4) de las películas de Q inmediatamente después del tratamiento térmico, mostraron desplazamiento hacia 2935 y 2892 cm^{-1} respectivamente. Sin embargo en el estado estacionario el espectro exhibió estos picos a mayor número de onda (2945 y 2908 cm^{-1}). En el caso de las películas QAT recién curadas, los picos localizados a 2945 y 2906 cm^{-1} experimentaron un ligero desplazamiento hacia 2929 y 2898 cm^{-1} con respecto a las muestras sin tratar, no observándose modificaciones posteriores.

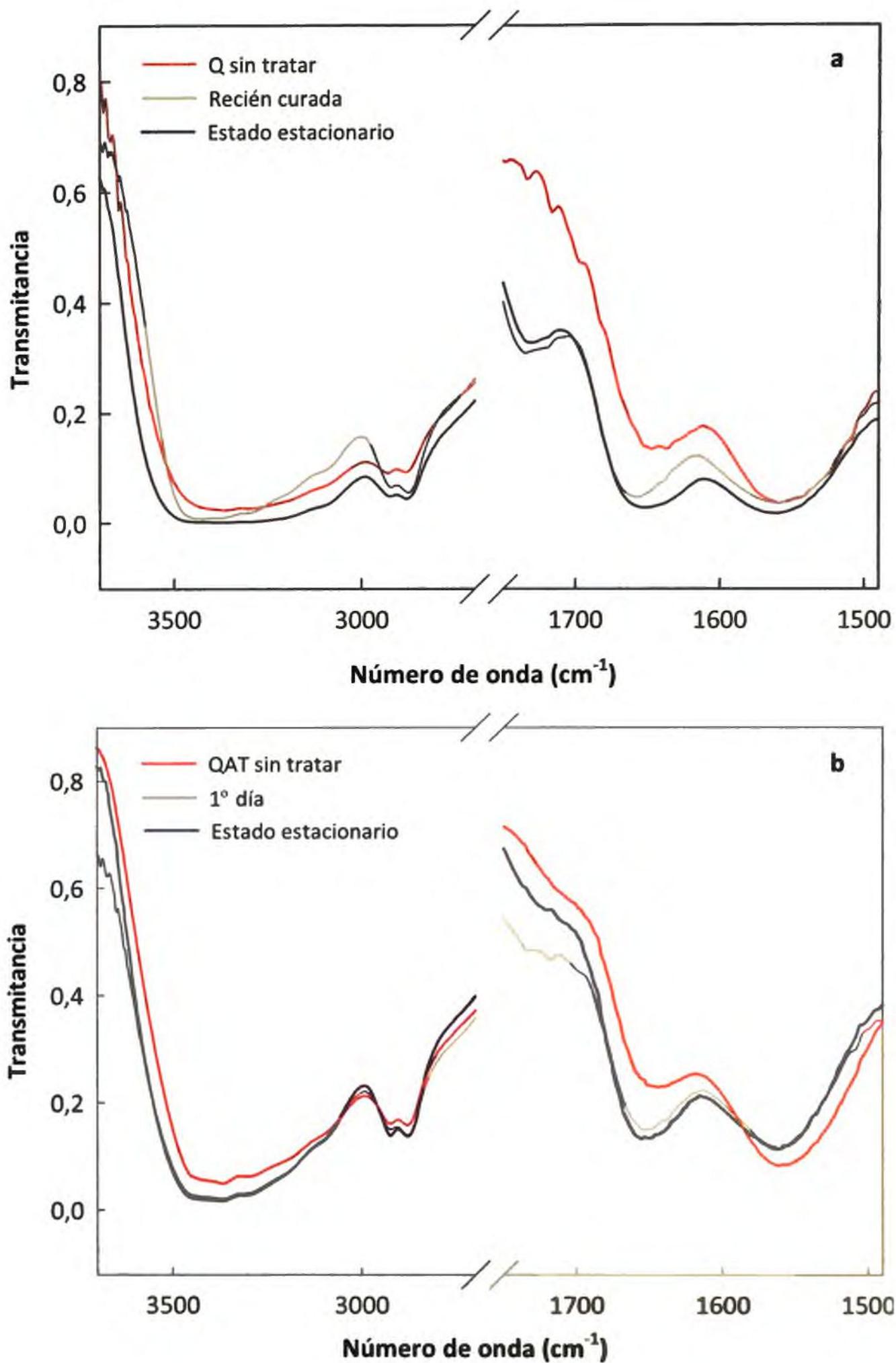


Figura A2 Espectros de FTIR de películas: (a) Q sin tratar y curadas a 160°C durante 60 min, y (b) QAT curadas a 160°C durante 60 min; se muestran en ambos casos las transiciones hasta alcanzar el estado estacionario.

Por otro lado, las bandas de absorción localizadas a 1652 cm^{-1} y 1560 cm^{-1} exhibieron una mayor definición luego del curado realizado en presencia de AT. Estos resultados evidenciarían que la presencia de ácido tánico en la formulación actuó no sólo como entrecruzante, sino también como agente estabilizante de la estructura debido a su función como acelerador del proceso de curado.

ANEXO B**Caracterización de las películas activas antimicrobianas formuladas con ácido propiónico**

Las películas de quitosano formuladas con ácido acético o propiónico visualmente no presentaron diferencias. Las películas fueron transparentes, suaves y homogéneas. Presentaron buena integridad y se removieron de las placas de moldeo fácilmente. Tampoco se observaron diferencias en cuanto al color.

De acuerdo con Zhong y col. (2011) las interacciones establecidas entre el quitosano y el tipo de ácido empleado en la solubilización del polielectrolito, pueden afectar las propiedades de las películas obtenidas.

Los ensayos de permeabilidad al vapor de agua indicaron que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de PVA respecto de las películas formuladas con ácido acético a tiempo inicial (QI). Se obtuvo un valor de $9,83 \cdot 10^{-11}$ ($\text{g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$) para las películas de quitosano con ácido propiónico (QAPr). Caner y col. (1998) estudiaron la influencia del tipo de ácido empleado para solubilizar el quitosano sobre las propiedades de barrera y las propiedades mecánicas. Los autores señalaron que empleando concentraciones de ácido del 1% en la preparación de las películas no había diferencias significativas en los valores de PVA entre las películas preparadas con ácido propiónico y ácido acético. Kim y col. (2006) encontraron una tendencia similar trabajando con concentraciones del 2% a pHs 3, 4 y 5.

Asimismo, las propiedades mecánicas evaluadas mediante ensayos de tensión uniaxial reflejaron que no hubo diferencias significativas en los valores obtenidos de esfuerzo y deformación entre las muestras QI control y QAPr, siendo los valores 38,8 MPa y 3,31% y 40 MPa y 3,76% para QI y QAPr, respectivamente. El modelo usado para estimar el módulo elástico ajustó satisfactoriamente los datos experimentales obteniéndose en promedio un E_c de 1722,69 MPa para QAPr y de 1641,44 para QI.

Las observaciones de las matrices realizadas por SEM no revelaron diferencias y tampoco los estudios efectuados mediante DRX.

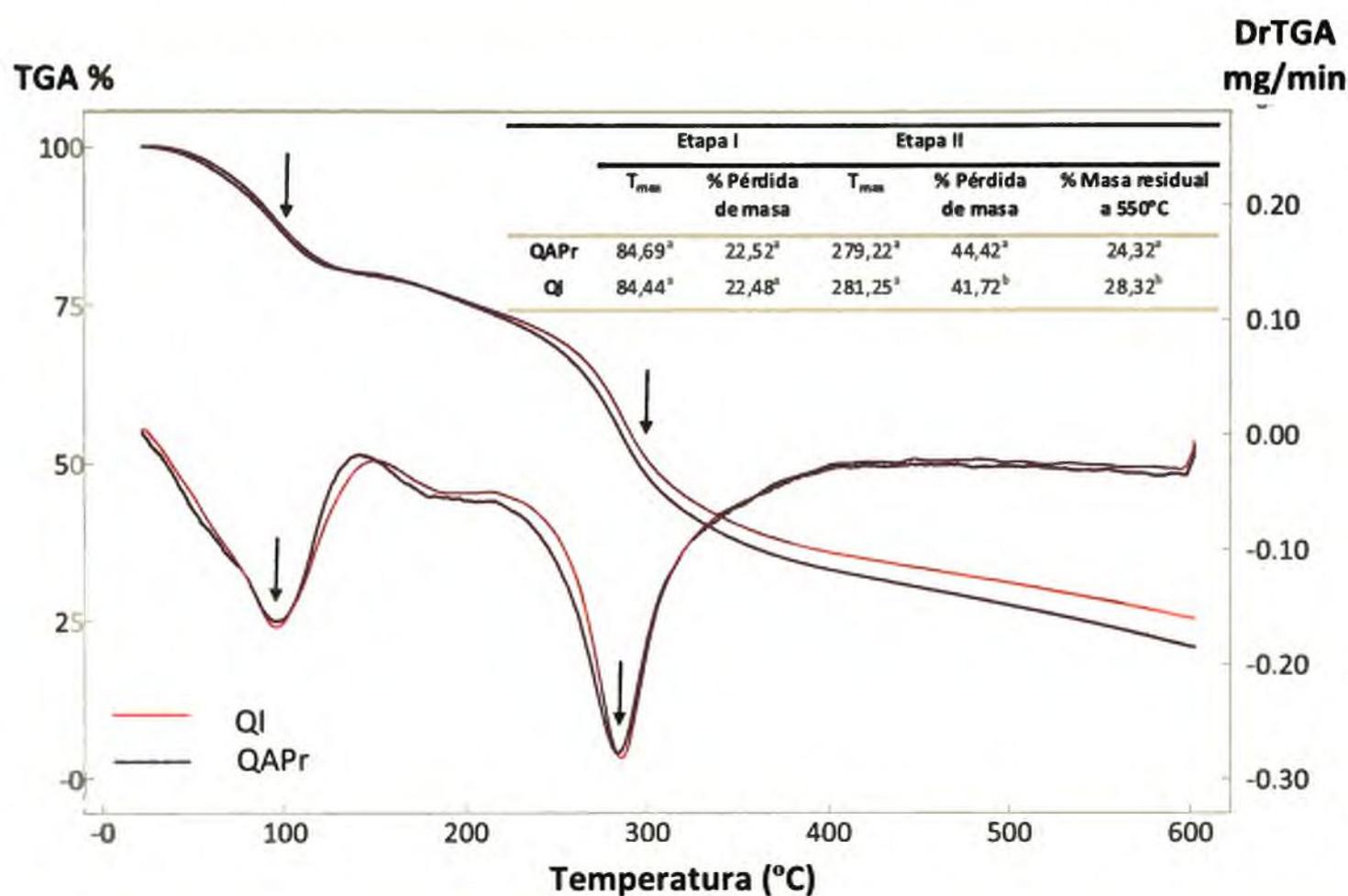


Figura B1 Termogramas obtenidos por TGA de muestras de quitosano (QI) y películas de quitosano formuladas con ácido propiónico (QAPr). Los valores informados en la Tabla corresponden al promedio de ensayos realizados por duplicado. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

A efectos de evaluar si existían diferencias en las propiedades térmicas del material cuando se utilizó ácido propiónico en lugar del ácido acético en la formulación se estudiaron los termogramas obtenidos por TGA. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la primera etapa asociada a la pérdida de agua del material y de las cantidades remanentes de ácido acético y propiónico luego del proceso de secado. Tampoco se manifestaron en el valor de la temperatura correspondiente a la descomposición del material (Figura B1).

Por medio de DSC se obtuvo un pico endotérmico en 125°C con una entalpía asociada de 426 J g⁻¹.

Para completar el estudio de las propiedades térmicas de las películas de Q formuladas con ácido propiónico y acético se realizaron ensayos por DMA (Figura B2). De acuerdo con Toffey y Glasser (2001) la relajación- α asociada a la temperatura de transición vítrea puede aparecer en el rango comprendido entre 60-93°C dependiendo el tipo de ácido empleado como solvente para preparar las películas a base de quitosano. Quijada-Garrido y

col. (2007) señalaron que la T_g también es dependiente del grado de neutralización luego del secado de las películas, o de los tratamientos térmicos empleados, lo que da lugar a discrepancias respecto de la temperatura a la cual tiene lugar la transición vítrea. Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, se podría explicar que el valor de T_g obtenido para películas de quitosano preparadas con ácido propiónico no difiere del hallado para las matrices preparadas con ácido acético, siendo el mismo de 120°C a tiempo inicial.

Por otra parte, Wu y col. (2001) informaron que para sistemas polímeros-moléculas pequeñas puede evidenciarse una nueva transición a temperaturas superiores a la T_g , asignada a la disociación de los enlaces de hidrógeno intermoleculares establecidos entre el polímero y el aditivo incorporado. Conforme a esta hipótesis podría justificarse la aparición de una transición a temperaturas por encima de la T_g , tal como se observa a partir de las curvas obtenidas por DMA para ambas películas a base de quitosano.

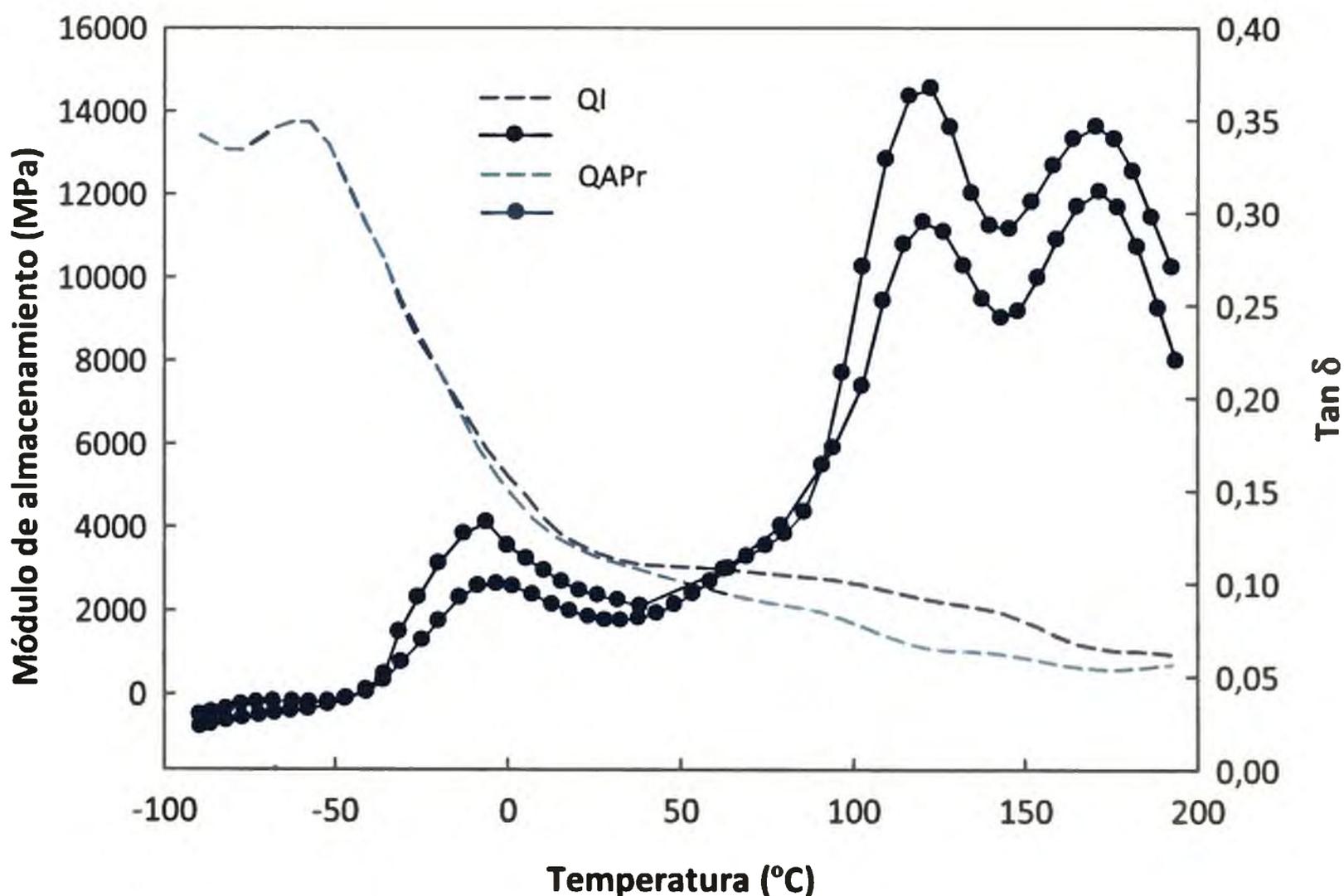


Figura B2 Análisis dinámico mecánico de películas de quitosano formuladas con ácido propiónico (QAPr) y con ácido acético (QI).

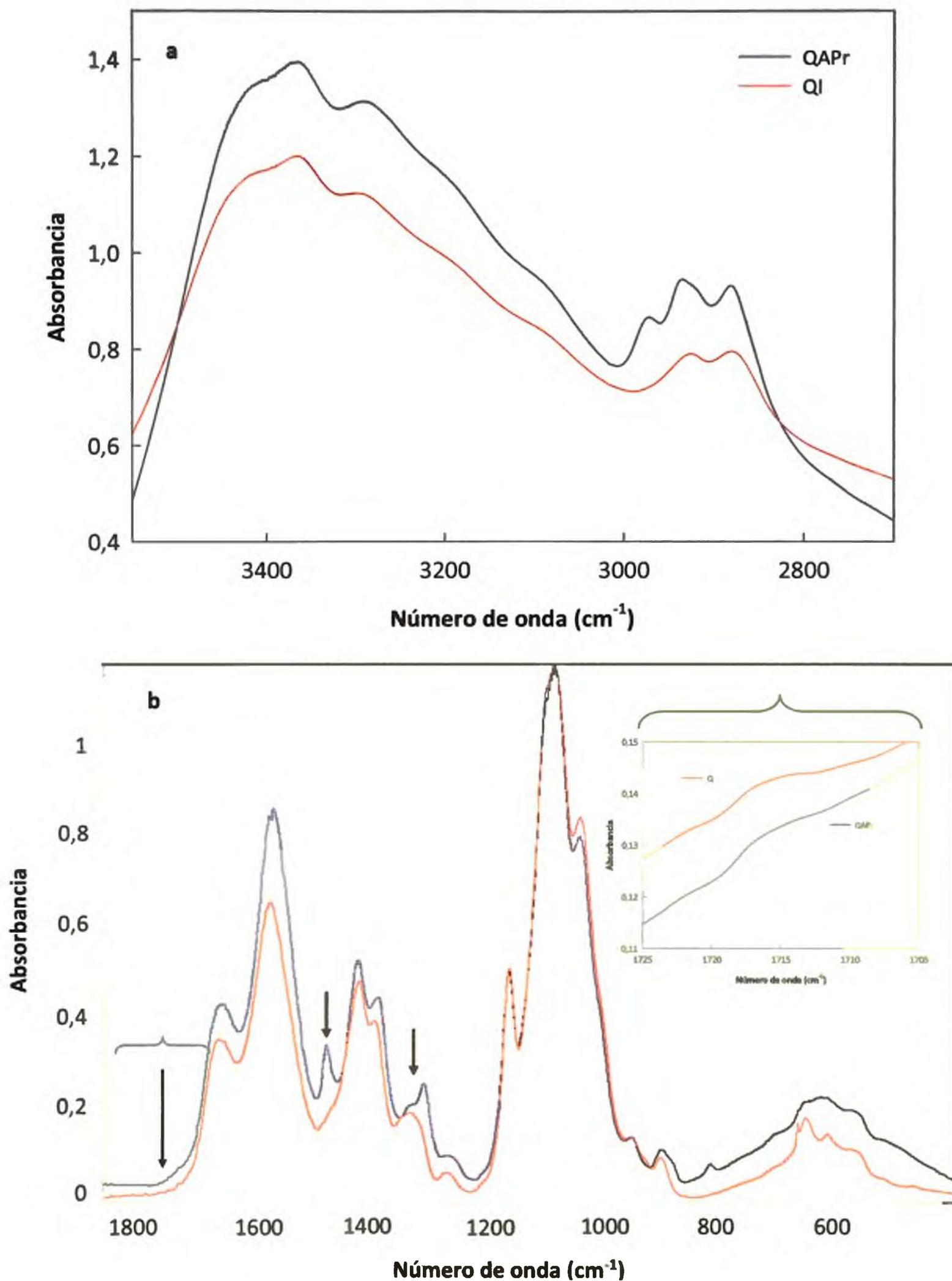


Figura B3 Espectros de FTIR obtenidos para muestras de QAPr y control QI. En ambos casos las muestras se ensayaron inmediatamente después del proceso de secado de las películas. (a) Región espectral comprendida entre 3550-2700 cm^{-1} ; (b) región 1750-400 cm^{-1} . En el inserto de la Figura se muestra ampliada la región 1725-1705 cm^{-1} .

Los espectros FTIR de las películas QI (control) y QAPr exhibieron bandas características de la presencia de los ácidos como las localizadas a 1420 y 1380 cm^{-1} (Wu y col. 2006). Ambos espectros también revelaron la aparición de una débil señal a 1715 cm^{-1} (correspondiente al modo de extensión del C=O). A efectos de visualizar dicha banda con mayor definición y corroborar su asignación se agregaron ácido acético y ácido propiónico con una concentración 10% (v/v), observándose un incremento en la intensidad de dicho pico como se puede apreciar en el inserto de la Figura B3b. Este pico fue informado por varios autores trabajando con películas de reciente preparación (Fernández-Saiz y col., 2009; Wu y col., 2005; Xu y col., 1996). La banda a 1240 cm^{-1} es característica de la interacción O-acilo (Hu y col., 2007).

Los espectros mostraron algunas diferencias como el desdoblamiento del pico a 1320 cm^{-1} , debido a la amida III de acuerdo con Kumirska y col. (2010), y la aparición de la banda a 1460 cm^{-1} , característica del grupo CH_2 . Por otra parte, Kim y col. (2006) observaron similares resultados en películas de quitosano preparadas con APr. Asimismo se evidenciaron corrimientos de los picos del QI localizados a 2922 (ν_{AS}) y 2872 cm^{-1} (ν_{S}) hacia 2930 y 2970 cm^{-1} en las matrices QAPr, debido al incremento en la longitud de la cadena de los derivados acilados (Figura B3a). Resultados similares fueron hallados por Hu y col. (2007) trabajando sobre matrices de quitosano.

REFERENCIAS

- Caner C., Vergano P.J., y 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.
- Fernández-Saiz P., Lagarón J. M., y Ocio M. J. (2009).** Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3298-3307
- Hu Y., Du Y., Yang J., Tang Y., Li J., y Wang, X. (2007).** Self-aggregation and antibacterial activity of N-acylated chitosan. *Polymer*, 48, 3098-3106.
- Kim K. M., Son J. H., Kim S-K, Weller C.L., y Hanna M.A. (2006).** Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *Journal of Food Science*, 71(3), 119-124.
- Kumirska J., Czerwicka M., Kaczyński Z., Bychowska A., Brzozowski K., Thöming J., y Stepnowski P. (2010).** Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8, 1567-1636.
- Quijada-Garrido I., Iglesias-González, V., Mazón-Arechederra, J. M., y Barrales-Rienda J.M. (2007).** The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol). *Carbohydrate Polymers*, 68, 173-186.
- Toffey A., y Glasser W.G. (2001).** Chitin derivatives III Formation of amidized homologs of chitosan. *Cellulose*, 8(1), 35-47.
- Wu C., Mori K., Otani Y., Namiki N., y Emi H. (2001).** Effects of molecule aggregation state on dynamic mechanical properties of chlorinated polyethylene/hindered phenol blends. *Polymer*, 42, 8289-8295.
- Wu Y., Seo T., Sasaki T., Irie S., y Sakurai K. (2006).** Layered structures of hydrophobically modified chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 63, 493-499.
- Xu J., McCarthy S.P., Gross R.A., y Kaplan D. (1996).** Chitosan film acylation and effects on biodegradability. *Macromolecules*, 39, 3436-3440.
- Zhong Y., Song X., y Li Y. (2011).** Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydrate Polymers*, 84, 335-342.