

Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales
(INTEMA)

POLIMEROS NATURALES COMO MATERIALES PARA ENVASES DE ALIMENTOS

Trabajo de tesis presentado por:

Ing. Mariana Pereda

Para optar por el grado académico de:

Doctor en Ciencia de Materiales

Directora: **Dra. Mirta I. Aranguren**

Co-Directora: **Dra. Norma E. Marcovich**

Marzo 2010



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a la Dra Mirta I. Aranguren y a la Dra Norma E. Marcovich por haberme guiado y acompañado a lo largo de estos años, brindándome no sólo apoyo académico sino calidad humana, alentándome y apoyándome constantemente.

A mi comisión asesora: Dra. Miriam Castro, Dra. Sara Roura y Dra Roxana Ruseckaite por el seguimiento de este trabajo y por los valiosos aportes realizados para la mejora del mismo.

A Josefa Martucci, una gran compañera y amiga, por sacrificar gran parte de su tiempo para ayudarme desinteresadamente, compartiendo sus conocimientos conmigo durante todos estos años.

A mis compañeros de la División Polímeros, especialmente a Oscar, Juano, Diana, Ile, Vero, Sil, Walter, Mirna, Cintia, Lore y Lea, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando más los necesitaba.

A Raquel Fernández, por su compañerismo y amistad incondicional, que se mantiene a pesar de la distancia. A Ilona y Andrés por guiarme, ayudarme y acompañarme haciendo que se acortaran los kilómetros que me separaban de Mar del Plata.

A la UNMdP, la SeCyT y el CONICET por el financiamiento de este trabajo.

Y por último:

Al resto de mis amigos, en especial a Rober, Ale, Marina, Lau, Mariana y Facundo, quienes me brindaron su apoyo y comprensión durante estos años.

A Lucas, por su amor permanente y su comprensión sobre todo durante este último tiempo.

A mi familia, y en especial a mis padres, por ayudarme a realizar mis sueños y enseñarme que con perseverancia y esmero todo es posible.

Resumen

En los últimos años ha aumentado firmemente el interés por el uso de proteínas para la producción de materiales considerados *verdes* debido a su carácter renovable y biodegradable. El caseinato de sodio es un producto proteico de bajo precio, fácilmente disponible, no-tóxico y altamente estable que además presenta propiedades termoplásticas y de formación de películas debido a su naturaleza de ovillo al azar y a su capacidad de formación de interacciones intermoleculares débiles. Sin embargo, las películas basadas en proteínas tienen dos grandes desventajas cuando se las compara con las películas basadas en polímeros sintéticos: propiedades mecánicas pobres y elevada sensibilidad al agua.

El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar películas biodegradables basadas en caseinato de sodio para ser utilizadas como recubrimientos o envases para alimentos. Se aplicaron diferentes alternativas para lograr mejoras en las desventajas mencionadas en el párrafo anterior.

En primer lugar se utilizó la plastificación con glicerol como método para obtener películas más flexibles y extensibles. Sin embargo, esta mejora resultó acompañada de un detrimento en la resistencia mecánica y de las propiedades de absorción y de permeabilidad al vapor de agua. Se seleccionó entonces, la concentración glicerol que resultó suficiente para obtener películas flexibles evitando una excesiva plastificación.

En segundo lugar se entrecruzaron las películas plastificadas de caseinato de sodio mediante dos tratamientos: uno químico y otro térmico. Se seleccionó glutaraldehído (GTA) como agente químico, demostrando que el nivel de entrecruzamiento aumenta a medida que se incrementa la concentración de GTA. Sin embargo, aunque el módulo y la resistencia en tracción aumentaron con el agregado de GTA, se observaron mejores propiedades que las de la película sin entrecruzar sólo a contenidos de GTA mayores al 10% en peso. La hidrofiliidad global tampoco se redujo con la utilización de este agente químico. Por otra parte, se optimizaron las condiciones de tratamiento térmico seleccionando el menos agresivo (6 hs a 95°C) que permitió la obtención de una red suficientemente entrecruzada y con buena capacidad de deformación. Este tratamiento demostró ser efectivo para mejorar la estabilidad térmica y reducir la hidrofiliidad, ésta última reflejada en las mediciones

de absorción de agua y permeabilidad, aumentando además la integridad de las películas en ambiente acuoso, en comparación con las películas control de caseinato de sodio. Se concluyó señalando que el entrecruzamiento inducido por tratamiento térmico es una alternativa valiosa y atractiva para mejorar las propiedades de las películas basadas en caseinato de sodio, y sin las complicaciones inherentes asociadas con el uso de GTA, tóxico a altas concentraciones.

Por otro lado, se desarrollaron películas de caseinato de sodio combinadas con un carbohidrato. Se seleccionó quitosano debido a sus ventajosas propiedades: biodegradable, biocompatible, antimicrobiano y no tóxico; pero sobre todo debido a sus grupos amino cargados de manera positiva a $\text{pH} < 6.5$, que le permiten interactuar y formar redes tridimensionales con los grupos aniónicos carboxilo del caseinato. La película caseinato-quitosano presentó mejores propiedades mecánicas (tracción e impacto) y menor contenido de humedad de equilibrio, con respecto a las películas puras de quitosano y de caseinato.

Las películas de caseinato control, quitosano y mezcla se aplicaron, como recubrimientos o envolturas, sobre distintos alimentos: queso cheddar, zanahoria y salame. Se observó que tanto el quitosano como la mezcla inhiben sustancialmente el crecimiento de bacterias mesófilas, psicrótrofas, hongos y levaduras, debido al potencial del quitosano como agente antimicrobiológico, cuya actividad no se ve reducida al combinarse con el caseinato. La biodegradación en suelo de la película compleja también resultó marcadamente reducida, en comparación con la de la película control de caseinato. En síntesis, las caracterizaciones de estas películas complejas fueron todas coincidentes en indicar que se desarrollan interacciones muy fuertes entre las cadenas de quitosano y caseinato, lo cual resultó, en general, en mejores propiedades finales que las presentadas por los constituyentes individuales.

Por último y con el objetivo de reducir el carácter hidrofílico de las películas de caseinato, se incorporaron sustancias hidrofóbicas a las mismas. Se obtuvieron emulsiones estables sin la necesidad del agregado de un agente emulsificante, debido al carácter anfifílico del caseinato. Se seleccionó aceite de tung como agente lipídico y se evaluó su efecto sobre la absorción y permeabilidad al vapor de agua, propiedades ópticas y mecánicas de las películas. El contenido de aceite de tung afectó la respuesta mecánica de las películas, aumentando la resistencia en tracción y el módulo elástico, pero disminuyendo la extensibilidad. Esto se explicó debido a la

mayor agregación de las moléculas de proteína en la fase rica en ésta y a la migración parcial del plastificante a la fase lipídica de la película. Las mediciones de ángulo de contacto junto con los ensayos de absorción de agua confirmaron la menor hidrofiliidad de las muestras. La WVP no resultó afectada por el agregado de agente lipídico debido, parcialmente, a la presencia de pequeños poros en las películas.

Además, las películas de caseinato con 10 % de aceite de tung se entrecruzaron mediante calentamiento (95°C, 6 horas). Este tratamiento físico produjo grandes mejoras respecto a las películas sin tratamiento térmico, que consistieron, principalmente, en un marcado aumento de la integridad de las películas en agua, menor contenido de humedad de equilibrio y mejores propiedades mecánicas, manteniendo la extensibilidad en niveles aceptables.

Las diversas alternativas investigadas demostraron la aptitud del caseinato de sodio como formador de películas con posible aplicación en el envasado/recubrimiento de alimentos.

Abstract

In the last years, there has been an increasing interest in the use of proteins for the production of *green* materials due to their renewable and biodegradable character. Sodium caseinate is a low cost, easily available, non-toxic and very stable proteic product, which exhibits thermoplastic and film forming properties because of its random coil structure and ability for developing weak intermolecular interactions. However, protein based films have two main disadvantages when compared with synthetic polymers: poor mechanical properties and high affinity with water.

The aim of this work was to obtain and characterize biodegradable films based on sodium caseinate to be used as food coatings or packaging. Different alternatives were applied to correct the previously mentioned disadvantages.

Firstly, plasticization with glycerol was used as a method to obtain more flexible and extensible films. However, this improvement was accompanied with the deterioration of the mechanical resistance and the increase of humidity absorption and water vapor permeability. A glycerol concentration high enough to produce flexible but not excessively plasticized films was selected.

Then, plasticized sodium caseinate films were cross-linked by two methods: chemical and thermal modifications. Glutaraldehyde (GTA) was selected as chemical agent, demonstrating that the cross-linking level increases as GTA concentration increases. Although the comparison of the GTA cross-linked films showed that the tensile modulus and resistance increase with GTA content, a minimum concentration of at least 10 wt.% was needed to obtain better properties than those of the uncross-linked film. Additionally, the global hydrophilicity was not reduced by the use of this chemical agent. On the other hand, the optimal thermal cross-linking conditions were selected (less aggressive treatment) in order to obtain films with adequate deformation capability and reduced solubility in water. This treatment showed to be effective for improving thermal stability and hydrophilicity, the last one reflected in the water absorption and permeability measurements. The thermal cross-linking also led to the increased integrity the film in water environment, as compared with control sodium caseinate films. It was concluded that the cross-linking induced by the thermal treatment is a valid alternative to enhance the properties of films based on sodium

caseinate, without the inherent problems associated to the use of GTA, which is toxic at high concentrations.

On the other hand, films prepared from sodium caseinate and a carbohydrate were developed. Chitosan was selected due to its advantageous properties: biodegradable, biocompatible, antimicrobial and non-toxic, and because of its amine groups positively charged at $\text{pH} < 6.5$ that can interact and form three-dimensional networks with the anionic carboxylic groups of sodium caseinate. The caseinate-chitosan film exhibited improved mechanical properties (tensile and impact) and lower moisture content than chitosan or caseinate neat films. Control-caseinate, chitosan and hybrid films were applied, by immersion or wrapping, to different foods: cheddar cheese, carrots and salami. It was observed that both, chitosan and mixed coatings inhibited to a large extent the growth of mesophilic and psychrophilic bacterias, fungus and yeasts, because of the chitosan potential activity as antimicrobial agent, which does not decrease when combined with caseinate. Soil biodegradation of the complex film was also greatly reduced, as compared with that of the control caseinate film. Summarizing, the characterization of the complex film indicated that very strong interactions are developed between chitosan and caseinate chains, resulting, in general, in improved properties in comparison with those of the individual films.

Finally, and with the aim of reducing the hydrophilic character of caseinate films, hydrophobic components were added to the forming solution. Stable emulsions were obtained without the addition of emulsifying agents, because of the amphiphilic nature of caseinate. Tung oil was selected as the lipidic component and its effect on the absorption and water vapor permeability and optical and mechanical film properties was evaluated. Tung oil content affected the film mechanical response, increasing tensile strength and modulus while decreasing extensibility. This is explained considering the larger aggregation of the protein molecules in the protein rich phase and the partial migration of the plasticizer to the lipid rich phase of the film. Contact angle measurements and water absorption tests, confirmed the lower hydrophilic character of the modified samples. The WVP is unaffected by the addition of the lipids, in part due to the presence of small pores in the films.

Moreover, caseinate films containing 10 wt.% tung oil were cross-linked by thermal treatment (95°C , 6 h). This physical treatment led to large improvements with

respect to the non thermally treated films, that consist, mainly, in a marked increase of the films water integrity, lower equilibrium moisture content and better mechanical properties, keeping the deformation capacity in acceptable levels.

The different investigated alternatives confirmed the aptitude of the sodium caseinate as film forming material with potential applications in food packaging / coating.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción y Antecedentes

1.1 Películas poliméricas	1
1.2 Polímeros biodegradables	2
1.3 Películas biodegradables	4
1.4 Caseinato de sodio	6
1.5 Objetivos	13
1.6 Referencias	14

Capítulo 2. Materiales y Descripción de Técnicas Experimentales

2.1 Materiales	22
2.2 Descripción de técnicas experimentales y equipos	24
2.2.1 Obtención de las películas	24
2.2.2 Preparación de emulsiones	25
2.2.3 Medición del espesor	25
2.2.4 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	25
2.2.5 Espectrofotometría UV-visible	26
2.2.6 Colorimetría	26
2.2.7 Difracción de Rayos X (DRX)	26
2.2.8 Microscopías: Óptica de transmisión (TOM)	27
Electrónica de barrido (SEM)	27
De fuerza atómica (AFM)	28
2.2.9 Determinación del material soluble total (TSM)	28
2.2.10 Termogravimetría (TGA)	29
2.2.11 Propiedades termomecánicas	30
2.2.12 Absorción de humedad. Ecuación empírica de Peleg. Modelo de Fick	31
2.2.13 Ángulo de Contacto estático	33
2.2.14 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	35
2.2.15 Ensayos Mecánicos: de tracción e impacto	36
2.2.16 Análisis microbiológicos. Ensayos <i>in vitro- in vivo</i>	39
2.2.17 Ensayo de degradación en suelo	42
2.3 Referencias	43

Capítulo 3. Caracterización de la matriz. Películas de caseinato de sodio

3.1 Introducción	47
3.2 Preparación de las películas	51
3.3 Caracterización de las películas. Discusión y resultados.	51
3.4 Conclusiones	75
3.5 Referencias	76

Capítulo 4. Películas entrecruzadas de caseinato de sodio

4.1 Introducción	82
4.2 Preparación de las películas entrecruzadas con GTA	87
4.3 Caracterización de las películas entrecruzadas. Discusión y resultados	88
4.4 Conclusiones	107

4.5 Referencias	108
Capítulo 5. Películas de caseinato de sodio/quitosano	
5.1 Películas de quitosano	112
5.1.1 Introducción	112
5.1.2 Preparación de las películas	117
5.1.3 Caracterización de las películas. Discusión y resultados	118
5.2 Películas de quitosano/caseinato de sodio	133
5.2.1 Introducción	133
5.2.2 Preparación de las películas	134
5.2.3 Caracterización de las películas. Discusión y resultados	135
5.3 Conclusiones	168
5.4 Referencias	170
Capítulo 6. Películas de caseinato de sodio/aceite de tung	
6.1 Introducción	178
6.2 Preparación de las películas	180
6.3 Caracterización de las películas. Discusión y resultados	180
6.4 Conclusiones	189
6.5 Referencias	190
Capítulo 7. Conclusiones generales	206
Referencias integradas	208
Índice de Figuras	230
Índice de Tablas	235

Capítulo 1

Introducción y Antecedentes

1.1. Películas poliméricas

A partir de la segunda mitad del siglo pasado, la introducción y auge de los polímeros derivados del petróleo, tales como el polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno, poli (tereftalato de etileno), policloruro de vinilo (PVC), nylon y polivinilalcohol (PVA), entre otros (Tharanathan, 2003; Dutta y col., 2009), produjeron una revolución en varios campos de aplicación, entre ellos en el área de embalajes. Estos polímeros encontraron rápidamente amplia aceptación en embalajes de alimentos debido a sus atractivas propiedades tales como flexibilidad, buena resistencia a la tracción, bajo peso, buena procesabilidad y bajo precio. Sin embargo, tienen la desventaja de ser *no biodegradables*, la cual contribuye a la contaminación ambiental (Tharanathan, 2003). La durabilidad que hace a estos materiales tan útiles también asegura su persistencia en el medio ambiente y complica su disposición final, lo que se está convirtiendo en un problema cada vez mayor para muchos de los plásticos que se utilizan actualmente. Las tres principales estrategias disponibles para la gestión de los residuos plásticos son: la incineración, el reciclado y los vertederos (Huang, 1995).

Aunque un reemplazo total de los plásticos sintéticos por materiales biodegradables es, en la actualidad, prácticamente imposible, su sustitución parcial por materiales biodegradables nos permitiría preservar o ampliar los recursos petroleros. La investigación actual en el área abarca desde los biopolímeros modificados hasta las mezclas. Sin embargo, estos enfoques todavía requieren una mayor investigación y desarrollo antes de que sean competitivos frente a los polímeros sintéticos comúnmente utilizados (Huang, 1995).

Algunas de las condiciones esenciales de una buena película de envasado para alimentos (Kader, 1989, Tharanathan, 2003) son las siguientes:

1. permitir la respiración lenta pero controlada (reducción de la absorción de O₂), de vegetales y frutas envasados;
2. actuar como una barrera selectiva a los gases (CO₂) y al vapor de agua;
3. crear una atmósfera modificada con respecto a composición interna de gas, regulando así el proceso de maduración, lo que conlleva a un aumento de vida útil del producto hortícola.
4. disminuir la migración de lípidos (industria confitería).

5. mantener la integridad estructural y mejorar la manipulación mecánica.
6. servir como un vehículo para incorporar aditivos alimentarios (saborizantes, colorantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos);
7. prevenir (o reducir) la descomposición microbiana durante un almacenamiento extendido.

La disponibilidad limitada de los vertederos, la contaminación por la incineración con emisiones no controladas y el costo y las limitaciones del reciclaje impulsan a la industria del plástico a buscar otras soluciones. Los materiales de envasado para productos alimenticios, como cualquier otro material de almacenamiento a corto plazo, han estado bajo escrutinio durante los últimos años por ser considerados como contribuyentes pesados a los problemas de gestión de los residuos plásticos. El interés por mantener o mejorar la calidad de los alimentos, al mismo tiempo que reducir los desechos de los envases ha alentado la exploración de nuevos materiales para el envasado, tales como películas comestibles y biodegradables obtenidas a partir de recursos renovables (Barreto y col., 2003). El uso de estos últimos materiales, debido a su naturaleza biodegradable, puede, al menos en cierta medida, resolver el problema de los desechos. En este caso, tanto la biomasa renovable (los cultivos) y desechos agroindustriales emergen como las principales alternativas para producir nuevos materiales biodegradables. De hecho, los residuos agroindustriales ofrecen un gran potencial como materia prima debido no sólo a su bajo precio, sino también porque su conversión en productos útiles contribuye a resolver el problema de su eliminación (Demicheli, 1996).

1.2. Polímeros biodegradables

La Norma ASTM D 6400-2004 define a un *plástico biodegradable* como un plástico que se degrada por acción de microorganismos naturales tales como bacterias, hongos y algas. Algunos autores indican que un polímero es denominado biodegradable cuando después del proceso de degradación queda reducido totalmente a productos naturales (dióxido de carbono, agua, metano o biomasa) por la acción de microorganismos (bacterias u hongos) y / o enzimas (Karlsson y Albertsson, 1998; Tharanathan, 2003).

Los polímeros biodegradables se pueden dividir en tres categorías principales, de acuerdo a su origen y producción, como se encuentra esquematizado en la Figura 1.1 (Tharanathan, 2003; Olabarrieta, 2005). En dicho esquema se remarcaron los polímeros que serán utilizados en este trabajo de tesis.

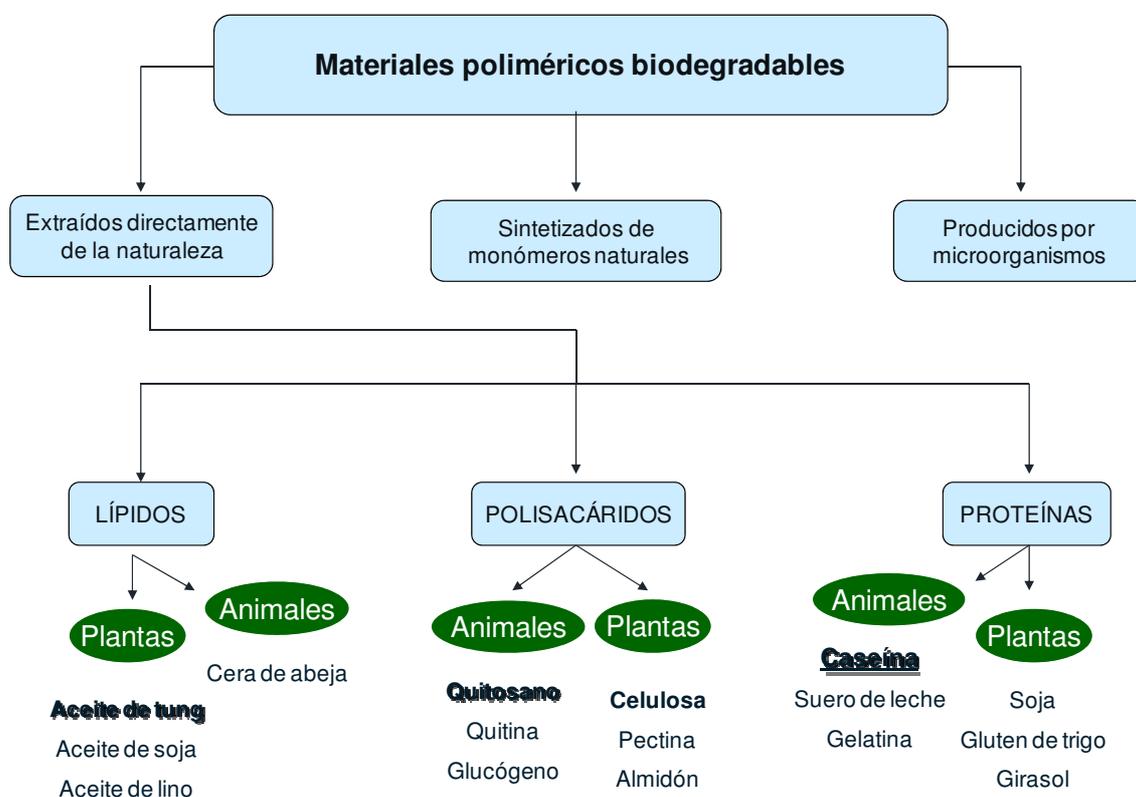


Figura 1.1. Clasificación de los polímeros biodegradables, en base a su origen y producción.

Entre los polímeros producidos por síntesis química clásica utilizando monómeros renovables de origen biológico se encuentra el ácido poliláctico, un biopoliéster polimerizado a partir de monómeros de ácido láctico. Los monómeros pueden producirse a partir de la fermentación de hidratos de carbono como materia prima, provenientes principalmente del maíz o la papa. El grupo de polímeros producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente consiste principalmente en poli-hidroxicanoatos (PHA's) (ej polihidroxibutirato y polihidroxivalerato), pero se están llevando a cabo desarrollos que permiten obtener celulosa bacteriana (aunque aún en cantidades reducidas).

Los materiales básicos de investigación que se utilizan para la producción de películas biodegradables y recubrimientos en envases para alimentos son aquellos que se extraen directamente de la biomasa. En general, los que se encuentran más

disponibles son extraídos de plantas agrícolas y animales marinos y se basan en: proteínas, polisacáridos y lípidos (Arvanitoyannis y col., 1998; Barreto y col., 2003; Olabarrieta 2005; Mucha y Pawlak, 2005; Pitkowski, 2009; Guyomarc'h, 2009; Fabra y col., 2009).

Los polisacáridos son polímeros naturales. Estos pueden ser tanto alimentos ricos en energía, almacenados en las plantas (almidón) y animales (glucógeno), o tener funciones estructurales en la pared celular de las plantas (celulosa, pectina) o en el esqueleto exterior duro de los insectos y especies similares (quitina) (Wong y col., 1992; Nelson y Cox, 2000; Dutta y col., 2009; Hirano, 1989). Hasta la fecha, los principales polisacáridos de interés para la producción de películas han sido la celulosa, el almidón (Bertuzzi y col., 2007; Chillo y col., 2008), los alginatos (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2008), las gomas naturales (goma xántica) y el quitosano (Butler y col., 1996; Wong y col., 1992; Shepherd y col., 1997; Coma y col., 2002; Srinivasa y col., 2007).

Las proteínas, al contrario de los homopolímeros o copolímeros en los que uno o dos monómeros se repiten, son heteropolímeros que se componen de más de 20 aminoácidos diferentes, cada uno con determinadas secuencias y estructuras. Debido a esta diversidad molecular, las proteínas tienen un potencial considerable para la formación de enlaces, que difieren con respecto a su posición, naturaleza, y / o energía. Existen numerosas publicaciones científicas acerca de películas comestibles o recubrimientos basados en proteínas. Entre las proteínas más utilizadas se encuentran las del gluten de trigo (Hernández-Muñoz y col., 2004; Mujica Paz y col., 2005), las de la soja (Denavi y col., 2009; Denavi, Tapia-Blácido y col., 2009), las del suero de la leche (Gounga y col., 2007; Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2009), las de la gelatina (Bigi y col., 2004; Bergo y Sobral, 2007), las del girasol (Orliac y col., 2003); las de la zeína (Ghanbarzadeh y col., 2007; Mastromatteo y col., 2009) y las de la caseína (Barreto y col., 2003; Barreto, Pires y Soldi, 2003; Cristo y col., 2008).

El interés en estos materiales y el desarrollo de sus aplicaciones en el envasado de los alimentos han aumentado debido a los grandes excedentes de materias primas que se producen en forma de subproductos de procesos agroindustriales.

1.3. Películas biodegradables

Las películas obtenidas a partir de productos naturales renovables, además de ser biodegradables o poseer la capacidad de desintegrarse o utilizarse en compostaje,

pueden actuar como fertilizantes y acondicionadores de suelo, facilitando un mejor rendimiento de los cultivos. También pueden extender la vida útil de alimentos, mejorando así su calidad (Audic y Chaufer, 2005; Schou y col., 2005). Aunque relativamente caros, los materiales biodegradables son el futuro de los envases, especialmente para productos alimenticios con alto valor agregado (Srinivasa y Tharanathan, 2007).

Las ventajas de las películas biodegradables, en comparación con las obtenidas a partir de materiales poliméricos sintéticos son (Olabarrieta, 2005) básicamente, que las primeras pueden:

- contribuir a la reducción de la contaminación ambiental, ya que se producen a partir de materias primas renovables y biodegradables.
- ser comestibles, por lo que las películas pueden ser consumidas junto con el producto. Esto podría ser importante, ya que representa un envase ideal para el medio ambiental (no se desecha).
- ser utilizadas en envases multicapa, por ejemplo, con alguna de las capas de material celulósico resultando en un envase totalmente biodegradable.
- mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos envasados, siempre que diversos componentes (aromatizantes, colorantes y endulzantes) se incorporen en ellas.
- complementar el valor nutritivo de los alimentos. Esto es particularmente cierto para películas basadas en proteínas.
- funcionar como soportes de agentes antimicrobianos y antioxidantes.
- regular la transferencia de la humedad, oxígeno, dióxido de carbono, lípidos, aroma y sabor en sistemas alimenticios compuestos, de manera de aumentar la vida útil del producto y mejorar la calidad.

En la mayoría de los casos, es deseable que la película sea eficiente como barrera al vapor de agua, de manera de retardar la deshidratación superficial de productos congelados o frescos (carne, frutas y vegetales) o la absorción de humedad del ambiente. Por ejemplo, se puede retrasar la absorción de agua que causa la formación de una costra en los polvos alimenticios, o mantener crocantes las galletas/tortas secas por más tiempo. El control de intercambios gaseosos, particularmente de oxígeno, permite regular la maduración de las frutas o reducir significativamente la oxidación de alimentos sensibles al oxígeno y la rancidez de grasas poliinsaturadas. La transferencia de vapores orgánicos debe ser minimizada de

manera de retener compuestos de aroma en los productos durante el almacenamiento o de prevenir la penetración de solvente en alimentos, lo cual induciría a toxicidad o pérdida de sabor. Mediante una película comestible se puede limitar la penetración de aceite durante el proceso de fritura, y la presencia de sacarosa o cloruro de sodio durante la deshidratación osmótica. Además, el efecto de la luz UV, que involucra reacciones por radicales libres en alimentos, puede reducirse significativamente. En este último caso, la eficiencia de la película para prevenir los efectos de la luz, puede mejorarse mediante la adición de pigmentos o absorbentes de luz (Dutta y col., 2009).

Las propiedades de las películas producidas a partir de biopolímeros y polímeros biodegradables dependen de la materia prima en la que se basan, de los aditivos utilizados y de las modificaciones químicas durante la producción. La determinación de las permeabilidades al vapor de agua y al oxígeno y la evaluación de las propiedades mecánicas son los métodos más frecuentemente utilizados para caracterizar una película de envasado para alimentos (Olabarrieta, 2005).

Las proteínas, polisacáridos y lípidos tienen buenas propiedades de formación de películas. Las películas formadas a partir de los polisacáridos son hidrofílicas y proporcionan barreras eficaces a los aceites, lípidos y gases como CO₂ y O₂, pero sus propiedades de barrera a la humedad son pobres. Las películas basadas en proteínas son muy interesantes ya que, potencialmente, sus grupos funcionales pueden ser utilizados para ajustar las propiedades del material, explotando, por ejemplo, su capacidad de formar redes, su plasticidad, y elasticidad (Rhim y Ng, 2007). Varios compuestos lipídicos, tales como grasas animales y vegetales también se han utilizado para producir películas y recubrimientos comestibles. Las películas basadas en lípidos tienen excelentes propiedades de barrera a la humedad pero pueden causar problemas organolépticos y de textura debidos a su oxidación y a su sabor ceroso (Guilbert y col., 1997).

1.4. Caseinato de sodio

El caseinato de sodio (**Cas**) es un polímero soluble en agua, comercialmente disponible, obtenido a partir de la precipitación ácida de la caseína, la principal proteína en la leche de vaca (24-29 g/l) (Audic y Chaufer, 2005). La caseína se encuentra presente en la leche, en la forma de complejos llamados micelas de caseína, con un

radio que varía entre 50 y 500 nm (Gennadios, 2002; Kobori y col., 2009; Pitowski y col., 2009).

La caseína bovina no es una proteína homogénea, sino que se compone principalmente de cuatro tipos diferentes de moléculas de caseína llamadas α_{S1} , α_{S2} , β y κ en una proporción en peso aproximada de 4:0.8:4:1 (Gennadios, 2002; Audic y Chaufer, 2005; Kobori y col., 2009; Guyomarc'h y col., 2009; Pitkowski y col., 2009) con pesos moleculares que van desde 19000 a 23900 g/mol (Audic y Chaufer, 2005). Estas fracciones de caseína difieren en sus pesos moleculares y en sus estructuras primarias, secundarias y terciarias (Barreto y col., 2003). Estas proteínas se mantienen unidas en complejos de micelas mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, y se requiere la presencia de calcio e iones fosfatos (llamado fosfato de calcio coloidal, CCP) para mantener su integridad. La estabilidad de la micela de caseína depende de la presencia de la κ -caseína en la superficie de la misma, la cual tiene como función ser una interfase entre las caseínas hidrofóbicas del interior de la micela y el medio acuoso. Es decir, cada micela está constituida por un núcleo o centro hidrofóbico, recubierto por una capa hidrofílica que no es otra cosa que la estructura de la κ -caseína. (Mao y col., 1992, Mercier y Vilotte, 1993).

El CCP puede removerse mediante precipitación de la caseína a pH ácido (4.6), después de lo cual la caseína precipitada puede resolubilizarse aumentando el pH (Pitkowski y col., 2009). Si esto se hace con NaOH se obtiene caseinato de sodio (Audic y Chaufer, 2005; Longares y col., 2005; Rhim y Ng, 2007; Kobori y col., 2009) y si se hace con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se obtiene caseinato de calcio. El caseinato de sodio tiene tendencia a formar pequeños agregados con un diámetro aproximado de 10 nm (Gennadios, 2002; Kobori y col., 2009), que son considerablemente más chicos que las micelas de caseína (50-500 nm) (Kobori y col., 2009), y contienen aproximadamente 15 moléculas.

La caseína es una proteína de bajo precio, fácilmente disponible, no-tóxica y altamente estable (Abu Diak y col., 2007). La caseína y los derivados de la caseína han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria (productos lácteos, carne, y confitería) como ingredientes y como emulsificantes debido a su importancia nutricional y funcional y han sido ampliamente estudiados para aplicaciones químicas, biológicas y nutricionales, así como para aplicaciones médicas y farmacéuticas (Arvanitoyannis, 1999; Abu Diak y col., 2007; Kobori y col., 2009). La caseína también se ha utilizado en pinturas, acabados de cuero y revestimientos de papel, como así también en la

preparación de recubrimientos biodegradables / comestibles (Rhim y Ng, 2007). La caseína es una proteína única porque es sintetizada en la glándula mamaria y no se encuentra en ningún otro lugar en la naturaleza (Gennadios, 2002).

Debido a su carácter renovable y biodegradable, el caseinato despierta creciente interés para la producción de materiales considerados *verdes*. El caseinato presenta propiedades termoplásticas y de formación de películas debido a su naturaleza de ovillo al azar y a su capacidad de formación de interacciones intermoleculares débiles, es decir, las cadenas de péptido parcialmente desnaturalizadas se unen principalmente a través de puentes hidrógeno resultando en la formación de la matriz proteica (Arvanitoyannis y Biliaderis, 1998; Audic y Chaufer, 2005; Longares y col., 2005; Rhim y Ng, 2007). A esto se le suman su transparencia, sus buenas propiedades de barrera a los gases (O₂) (Chick y Ustunol, 1998), su elevada calidad nutricional y sus excelentes propiedades sensoriales. Las películas comestibles basadas en caseinato son potencialmente capaces de reemplazar algunos materiales de envasado sintético convencionales utilizados para preservar y proteger alimentos (Chen, 1995; Audic y Chaufer, 2005; Schou y col., 2005).

Existen en la literatura varios trabajos detallados sobre películas basadas en proteína de leche. Barreto y col.(2003) prepararon películas de caseinato de sodio y observaron una disminución en la temperatura de transición vítrea y en la estabilidad térmica con el agregado de sorbitol (Barreto, Pires y Soldi, 2003). Kristo y col. (2008) observaron que el agregado de compuestos antimicrobianos a películas de caseinato-sorbitol mejora la actividad antimicrobiana pero alteran las propiedades termomecánicas y de barrera al vapor de agua, al actuar como plastificantes. Gounga y col. (2007) prepararon películas basadas en proteínas del suero con glicerol y evaluaron el efecto de la concentración de proteína y del glicerol sobre el espesor, la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua. Ghanbarzadeh y Oromiehi (2009) observaron que las películas laminadas proteína del suero-zeína muestran mejores propiedades en tracción que las películas individuales de cada proteína.

Las películas basadas en proteínas tienen dos grandes desventajas cuando se las compara con las películas basadas en polímeros sintéticos (Chen y Zhang, 1994; Chen y Wang, 1994; Grevellec y col., 2001; Mauer y col., 2000):

- Propiedades mecánicas pobres (baja resistencia a la tracción y elongación a la ruptura);

- Elevada sensibilidad al agua, es decir, alta solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua.

Existen diferentes métodos para lograr mejoras en estas propiedades. La mayor parte de los investigadores efectúan modificaciones en los *pretratamientos*, es decir, en la solución que forma película. Otros intentos se realizan aplicando *postratamientos* (aplicados sobre la película) (Micard y col., 2000). Las estrategias más comúnmente utilizadas son:

- **Plastificación**

Un plastificante es definido como un compuesto orgánico de bajo peso molecular, que causa una disminución en la temperatura de transición vítrea (Tg) de un polímero y un aumento de la flexibilidad y extensibilidad (Audic y Chaufer, 2005). Un material duro y quebradizo se vuelve suave y flexible cuando se lo plastifica. La eficiencia del plastificante está gobernada por su peso molecular y polaridad. Los plastificantes más eficientes son, generalmente, los más compatibles con el polímero.

El plastificante actúa disminuyendo las fuerzas intermoleculares entre cadenas poliméricas, lo cual lleva a un aumento del volumen libre (Audic y Chaufer, 2005) del polímero. Debido a esto, el plastificante también causa la disminución en las propiedades de barrera, que es un efecto no deseado.

- **Entrecruzamiento**

La presencia de grupos reactivos en proteínas hace posible entrecruzar las cadenas polipeptídicas a través de tratamientos químicos, enzimáticos o físicos, lo que puede conducir a una mejora en las propiedades de películas proteicas (Gerrard, 2002; Han y col., 2009). El entrecruzamiento en proteínas se puede lograr por diversos métodos:

Químico: En varios estudios las proteínas se han entrecruzado con aldehídos. Se han utilizado varios aldehídos para este tipo de reacción, en particular formaldehído (Audic y Chaufer, 2005; De Carvalho y Grosso, 2004; De Carvalho y Grosso, 2006), glutaraldehído (Bigi y col., 2001; Martucci y col., 2006) y glioxal (De Carvalho y Grosso, 2004; De Carvalho y Grosso, 2006). Audic y Chaufer (2005) y De Carvalho y Grosso (2006) observaron mayores valores de opacidad, una mejora en las propiedades

mecánicas, reducción de la permeabilidad al vapor de agua y un aumento de la resistencia estructural en agua con el agregado de formaldehído y glioxal en películas de caseinato de sodio y de gelatina. Sin embargo, el formaldehído resultó más eficiente que el glioxal en la mejora de las propiedades mecánicas de películas basadas en gelatina (De Carvalho y Grosso, 2004; De Carvalho y Grosso, 2006), mientras que no se registró variación en las curvas de absorción de humedad debido al entrecruzamiento (De Carvalho y Grosso, 2004).

Estos agentes químicos, aunque muy reactivos, tienen una gran desventaja: su toxicidad (Rhim y col., 1998), lo que puede resultar un inconveniente en la síntesis de materiales biopoliméricos diseñados para aplicaciones específicas (ej. películas comestibles).

Térmico: Las propiedades de distintas proteínas han sido sustancialmente modificadas por tratamientos térmicos controlados, entre ellas proteínas de soja (Gennadios y col., 1996; Rhim y col., 2000; Kim y col., 2002), de gluten de trigo (Ali y col., 1998; Kayserilioglu y col., 2003), de leche (Vachon y col., 2000), proteínas ricas en vicilina (Tang y col., acceso online); entre otras. Estos estudios han demostrado que al calentar películas proteicas a altas temperaturas se produce un aumento de la resistencia en tracción de la misma y una reducción de la permeabilidad al vapor de agua y de la absorción de humedad debido a la formación de puentes intermoleculares disulfuro (S-S) necesarios para la constitución de la película intacta (Ali y col., 1998; Gerrard, 2002; Orliac y col., 2002; Orliac y col., 2003; Pommet y col., 2004; Han y col., 2009).

Enzimático: Se han realizado entrecruzamientos enzimáticos con transglutaminasa sobre caseinato de sodio (Partanen y col., 2009; Dinnella y col., 2002), proteínas de la clara del huevo (Lim y col., 1998), gelatina (De Carvalho y Grosso, 2004), gelatina de pescado (Bae y col., 2009) y mezcla de gelatina y caseína (Chambi y Grosso, 2006), con posterior análisis de las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad, de las películas resultantes.

Chambi y Grosso (2006) encontraron que, en general, la permeabilidad al vapor de agua de películas basadas en caseína y en gelatina aumenta en función del tratamiento enzimático, al mismo tiempo que aumenta la elongación. Sin embargo, De Carvalho y Grosso (2004) informaron la tendencia opuesta en la permeabilidad para

películas basadas en gelatina entrecruzadas con transglutaminasa, aunque también observaron una mejora en las propiedades mecánicas. Por otra parte, Bae y col. (2009) encontraron que el tratamiento con transglutaminasa microbiana sobre películas de gelatinas de pescado reforzadas disminuye la resistencia a la tracción y la elongación a la ruptura. Estos investigadores no observaron cambios notables en la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua.

Radiación Gamma: El entrecruzamiento inducido por radiación gamma se considera un método eficaz para la mejora de propiedades mecánicas y de barrera de algunas películas y recubrimientos comestibles (Vachon y col., 2000; Lacroix y col., 2002; Ciesla y col., 2004). Lacroix y col. (2002) encontraron que la radiación gamma fue eficiente para inducir entrecruzamientos en películas proteicas, obteniendo estructuras más ordenadas y estables. Esto dio como resultado un aumento de la resistencia al impacto y mejores propiedades físico- químicas.

Otra forma más débil de radiación electromagnética es la radiación ultravioleta (UV) (Rhim y col., 1999), que también se ha utilizado para entrecruzar películas proteicas.

- **Mezclas**

Películas compuestas proteína- polisacárido: Esta es otra estrategia que se ha utilizado para mejorar las propiedades mecánicas de películas proteicas. Los polímeros derivados de monómeros naturales, como proteínas y polisacáridos, ofrecen grandes oportunidades dado que su biodegradabilidad y su compatibilidad ambiental están aseguradas. Las películas biopoliméricas que contienen tanto proteína como polisacárido pueden usar ventajosamente las características funcionales distintivas de cada ingrediente formador de la película. La incorporación de polisacáridos dentro de matrices globulares proteicas puede extender las propiedades funcionales de cada uno de ellos (Fabra y col., 2008). Existen varios trabajos que estudiaron las características de películas basadas en proteínas combinadas con carbohidratos, entre ellos: caseinato de sodio con alginatos (Fabra y col., 2008), donde se observó que los carbohidratos mejoraron las propiedades mecánicas de las películas, mientras que se produjo un aumento en la permeabilidad al vapor de agua, siendo este efecto dependiente de la concentración de alginato; caseinato con maltodextrina (Regan y col., 2009); caseinato

con goma xántica (Kobori y col., 2009) donde se estudió la dependencia de las interacciones proteína-carbohidrato con el pH; proteína del suero con almidón (Pogaku y col., 2007); gelatina con quitosano (Rivero y col., 2009; López-Caballero y col., 2005) donde se evaluó el efecto antimicrobiano del quitosano en los recubrimientos compuestos. Por otra parte, Rivero y col. (2009) encontraron que la presencia de quitosano en películas compuestas conduce a la obtención de películas más fuertes y con mejores propiedades de permeabilidad al vapor de agua. En la mayoría de los casos, las mejoras observadas en las propiedades de las películas se deben a la formación de complejos polielectrolíticos mediante la interacción iónica de macro-iones, por ejemplo entre caseinato de calcio y carboximetilcelulosa catiónica (Han y col., 2009), quitosano y alginato de sodio (Remuñán-López y Bodmeier, 1997; Remuñán-López y col., 1998) y caseinato de sodio y quitosano (Pereda y col., 2008 y 2009).

Películas proteína-lípido: La incorporación de compuestos lipídicos (ácidos grasos, ceras o aceites) en la solución formadora de la película ayuda a limitar la migración de humedad dado que los lípidos (hidrofóbicos) reducen la transmisión de vapor de agua y las proteínas le otorgan resistencia a las películas, ayudando así a mejorar la integridad estructural (Gontard y col., 1994; Fabra y col., 2008). Diversos investigadores han examinado y confirmado la efectividad de las películas compuestas de proteína de soja y/o caseinato de sodio y/o proteína de suero con ácidos grasos (principalmente ácido oleico), parafina o cera de abeja (Fabra y col., 2008; Fabra, Hambleton y col., 2009; Fabra, Talens y col., 2009; Monedero y col., 2009), de películas de proteína de suero con cera de abeja (Ozdemir y Floros, 2008) y de películas de gelatina de pescado con cera de abeja y aceite de colza (Sztuka y Kołodziejka, 2009).

1.5. Objetivos

El objetivo principal del trabajo de tesis es:

Obtener y caracterizar películas biodegradables basadas en caseinato de sodio para ser utilizadas como recubrimientos o envases para alimentos. Se buscan películas con propiedades mejoradas, que resulten aptas para reemplazar polímeros sintéticos como polietileno (Chen, 1995) o PVC plastificado (Audic y col., 2001), principales competidores en el mercado alimenticio. Se prestará especial atención a la mejora de las propiedades mecánicas así como a la reducción de la absorción de humedad y la permeabilidad al vapor de agua de estas películas.

Los objetivos particulares de esta tesis son:

- Preparar películas de caseinato de sodio plastificadas y analizar el efecto de la concentración de plastificante y humedad relativa sobre la morfología y propiedades de las mismas.
- Analizar el efecto del entrecruzamiento químico y térmico sobre la estabilidad y propiedades de las películas de caseinato de sodio. Explicar los cambios ocurridos en estos sistemas. Seleccionar las mejores condiciones de entrecruzamiento.
- Analizar el efecto de la incorporación de lípidos sobre la morfología y propiedades de las películas de caseinato. Evaluar las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y absorción de humedad de las películas resultantes, como función de la concentración de lípido. Analizar el efecto de entrecruzamiento sobre películas compuestas proteína-lípido.
- Preparar películas de quitosano y analizar el efecto del plastificante sobre la morfología y propiedades de las mismas. Evaluar el efecto de la incorporación de quitosano en las películas proteicas de caseinato de sodio. Investigar las interacciones desarrolladas entre el carbohidrato y la proteína y su influencia sobre las propiedades finales. Estudiar la biodegradación en suelo de las distintas películas obtenidas y el comportamiento microbiano frente a distintas microfloras naturales.

1.6. Referencias

- Abu Diak, O.; Bani-Jaber, A.; Amro, B.; Jones D.; and Andrews G. P. The Manufacture and characterization of casein films as novel tablet coatings *Trans IChemE, Part C, Food and Bioproducts Processing*, 85(C3): 284–290 (2007).
- Alemdar, A. Sain M. Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties *Composites Science and Technology* 68: 557–565 (2008).
- Ali, Y., V.M. Ghorpade, and M.A. Hanna, Properties of thermally-treated wheatgluten films. *Industrial Crops and Products*, 6: 177-184 (1997).
- Arvanitoyannis I, Biliaderis CG. Physical properties of polyol plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemical*; 62(3):333–42 (1998).
- Arvanitoyannis I.S., Nakayama A., Aiba S. Chitosan and gelatine based edible films; state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr. Polym.* 37: 371-382 (1998).
- Arvanitoyannis, I.S., *Totally and Partially Biodegradable Polymer Blends Based on Natural and Synthetic Macromolecules: Preparation, Physical Properties, and Potential as Food Packaging Materials*. *Polymer Reviews*, 39: 205-271 (1999).
- Audic JL, Poncin-Epaillard F, Reyx D, Brosse JC. Cold plasma surface modification of conventionally and nonconventionally plasticized PVC-based flexible films. Global and specific migration of additives into isooctane. *Journal Applied Polymer Science*; 79:1384–1393 (2001).
- Audic, J.; Chaufer, B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate *European Polymer Journal*, 41: 1934-1942 (2005).
- Bae H.J., Darby D.O., Kimmel R.M., Park H. J., Whiteside W.S. Effects of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin–nanoclay composite film. *Food Chemistry*; 114: 180–189 (2009).
- Barreto, J. Roeder, J.S. Crespo, G.R. Maciel, H. Terenzi, A.T.N. Pires, V. Soldi P.L.M., Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/ sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chemistry*; 82: 425–431 (2003).
- Barreto, P.L.M. Pires, A.T.N. Soldi V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability*; 79: 147–152 (2003).
- Beachley, V. Wen X. Fabrication of nanofiber reinforced protein structures for tissue engineering *Materials Science and Engineering C* 29: 2448–2453 (2009).

- Bendahou, A Kaddami, H. Dufresne A. Investigation on the effect of cellulosic nanoparticles' morphology on the properties of natural rubber based nanocomposites doi:10.1016/j.eurpolymj.2009.12.025 (2010).
- Bergo, P. Sobral P.J.A., Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*; 21: 1285–1289 (2007).
- Bertuzzi, M.A. Castro Vidaurre, E.F. Armada, M. Gottifredi J.C. Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*; 80: 972–978. (2007).
- Bigi, A. Cojazzi, G. Panzavolta, S. Rubini, K. Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*; 22: 763-768 (2001).
- Bigi, A. Panzavolta, S. Rubini K.; Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*; 25: 5675–5680 (2004).
- Butler, B.L., Vergano P.J, Testin, R.F, Bunn, J.M & Wiles, J.L., Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and Storage. *Journal of Food Science*, 61(5): 953-961 (1996).
- Chambi, H; Grosso C Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*; 39: 458–466 (2006).
- Chen H, Zhang S. Effects of protein-lipid and proteinplasticizer ratios on functional properties of sodium caseinate-acetylated monoglyceride films. *J Dairy Sci*; 77(suppl. 1):8 (1994).
- Chen H, Wang W. Physical properties of milk protein emulsion films as affected by different melting points lipids. *J Dairy Sci*; 77(suppl. 1):8–15 (1994).
- Chen H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*; 78:2563–2583 (1995).
- Chick J, Ustunol Z. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*; 63(6):1024–1027 (1998).
- Chillo, S. Flores, S. Mastromatteo, M. Conte, A. Gerschenson, L. Del Nobile M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*; 88: 159–168 (2008).
- Ciesla, K., Salmieri S., Lacroix M., Le Tien C., Gamma irradiation influence on physical properties of milk proteins. *Radiation Physics and Chemistry*, 71(1-2): 95-99 (2004).
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., & Deschamps, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3): 1162–1169. (2002).
- De Carvalho R.A., Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*; 18: 717–726 (2004).
- De Carvalho R. A. y Grosso R. F. Properties of chemically modified Gelatin films. *Brazilian journal of chemical Engineering*; 23: 45 – 53 (2006).

- Demicheli, M., Biodegradable plastics from renewable sources, in IPTS Report, Vol 10., <http://www.jrc.es>, (1996).
- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M.; Añón, M. C. Montero, P., Mauri, A. N., Gómez-Guillén M. C., Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, doi:10.1016/j.foodhyd.2009.03.007 in press (2009).
- Denavi, G.; Tapia-Blácido D.R.; Añón M.C., Sobral P.J.A., Mauri A.N., Menegalli F.C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*; 90: 341–349 (2009).
- Dinnella, C. Gargaro, M. T. Rossano, R. Monteleone E. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. *Food Chemistry*; 78: 363–368 (2002).
- Dutta, P.K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G.K.; Dutta, J. Review Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*; 114: 1173–1182 (2009).
- Fabra, M.J.; Talens, P., Chiralt A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*; 23: 676–683 (2009).
- Fabra, M.J.; Hambleton, A; Talens, P; Debeaufort, F; Chiralt, A y Voilley A Aroma Barrier Properties of Sodium Caseinate-Based Films. *Biomacromolecules*, 9: 1406–1410 (2008).
- Fabra, M.J.; Talens, P., Chiralt A Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*; 85: 393–400 (2008).
- Fabra, M.J. Talens, P Chiralt A Effect of alginate and k-carrageenan on tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate–lipid based films. *Carbohydrate Polymers*; 74(3): 419-426 (2008).
- Flieger, M., Kantorová, M.; Prell, A.; Řezanka T. and Votruba J. Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica*; 48(1): 27-44 (2003).
- Gennadios, A., Ghorpade, V. M., Weller, C. L. and Hanna, M. A. Heat curing of soy protein films. *Transactions of the ASAE*, 39: 575–579 (1996).
- Gennadios A., Formation and Properties of Casein Films and Coatings in *Protein-Based Films and Coatings*, Ed by Gennadios A., CRC Press, United States. capítulo 7: 181-211 (2002).
- Gerrard, J A. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology*; 13: 391–399 (2002).
- Ghanbarzadeha, B; Musavib, M; Oromiehiec, A.R.; Rezayib, K; Razmi Radb, E; Milanib J Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *LWT*; 40: 1191–1197 (2007).
- Ghanbarzadeh, B.; Oromiehi A.R Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *Journal of Food Engineering*; 90: 517–524 (2009).

- Gontard, N., Duchez, C; Cuq, J-L; Guilbert, S Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29(1):39-50 (1994).
- Gounga, M. E.; Xu, S-Y; Wang Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*; 83: 521–530 (2007).
- Grevellec J, Marquie´ C, Ferry L, Crespy A, Vialettes V. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomacromolecules*; 2:1104–9 (2001).
- Guilbert, S., Cuq, B. y Gontard, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 14(6): 741-751 (1997).
- Guyomarc’h, F.; Nono, M.; Nicolai, T.; Durand, D., Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of k-casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*; 23: 1103–1110 (2009).
- Han, J, Bourgeois S, Lacroix M Protein-based coatings on peanut to minimise oil migration. *Food Chemistry*, 115: 462–468 (2009).
- Helbert, W. Cavaillé, J. Y. Dufresne A. Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. Part I: Processing and mechanical behavior. *Polymer Composites*; 17(4): 604-611 (1996).
- Hernández-Muñoz, P. Villalobos, R. Chiralt, A. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions *Food Hydrocolloids* 18 647–654 (2004).
- Hirano, S., Production and application of chitin and chitosan in japan, in *Chitin and Chitosan*, A. Skjak-Braek, and Saford, Editor., Elsevier Science Publishing Co.: London. p. 37-43 (1989).
- Huang, S.J., Polymer Waste Management - biodegradation, incineration and recycling. *Journal Macromolecular Science - Pure Applied Chemistry*, 32(4): 593-597 (1995).
- Karlsson, S. y Albertsson, A.-C. Biodegradable Polymers and Environmental Interaction. *Polymer Engineering and Science*, 38(8): 1251-1253 (1998).
- Kaysirilioglu, B. S.; Bakir, U.; Yilmaz, L.; Akkas, N Drying Temperature and Relative Humidity Effects on Wheat Gluten Film Properties. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51: 964-968 (2003).
- Kim, K M Weller, C L. Hanna M A. and Gennadios A Heat Curing of Soy Protein Films at Selected Temperatures and Pressures. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 140–145 (2002).
- Kobori, T. Matsumoto, A. Sugiyama S. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*; 75: 719–723 (2009).
- Kristo, E. Koutsoumanis, K. P. Biliaderis C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*; 22: 373–386 (2008).

- Lacroix, M.; Lea, T.C.; Ouattara, B.; Yu, H.; Letendre, M.; Sabato, S.F.; Mateescu, M.A.; Patterson G. Use of g-irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functional characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*; 63: 827–832 (2002).
- Lim, L-T Mine, Y. y Tung, M. A. Transglutaminase Cross-Linked Egg White Protein Films: Tensile Properties and Oxygen Permeability. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4022-4029 (1998).
- Longares, A.; Monahan, F. J.; O’Riordan, E. D.; O’Sullivan, M. Physical properties of edible films made from mixtures of sodium caseinate and WPI. *International Dairy Journal*, 15(12): 1255-1260 (2005).
- López-Caballero, M.E. Gómez-Guillén, M.C. Pérez-Mateos, M. Montero P. A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*; 19: 303–311 (2005).
- Mao, I.L.; Buttazzoni, L.G. y Aleandri, R. Effects of polymorphic milk protein genes on milk yield and composition traits in Holstein cattle. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* 42:1-7 (1992).
- Martucci, J.F. Ruseckaite, R.A. Vázquez A. Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. *Materials Science and Engineering A* 435–436: 681–686 (2006).
- Mastromatteo, M.; Barbuzzi, G.; Conte, A.; Del Nobile M.A. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*; 10: 222–227 (2009).
- Mauer LJ, Smith DE, Labuza TP. Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible beta-casein films. *Int Dairy J*; 10:353–8 (2000).
- Mercier, J-C. y Vilotte, J-L. Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci.* 76:3079-3098 (1993).
- Micard, V., Balamri, R., Morel, M.-H. and Guilbert, S., Properties of Chemically and Physically Treated Wheat Gluten Films. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48: 2948-2953 (2000).
- Monedero, F.M.; Fabra, M.J.; Talens, P; Chiralt, A Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*; 91: 509–515 (2009).
- Mucha, M., Pawlak A., Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*; 427: 69–76 (2005).
- Mujica Paz, H. Guillard, V. Reynes, M. Gontard N. Ethylene permeability of wheat gluten film as a function of temperature and relative humidity. *Journal of Membrane Science*; 256: 108–115 (2005).
- Nelson, L.N. y Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed., New York: Worth Publishers (2000).
- Olabarrieta I. Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films. Tesis doctoral. Universidad de Estocolmo (2005).

- Olivas, G.I.; Barbosa-Cánovas G.V. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical mproperties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT*; 41: 359–366 (2008).
- Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L., Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate, *Polymer*; 43: 5417–5425 (2002).
- Orliac, O. Rouilly, A. Silvestre, F. Rigal L. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*; 18: 91-100 (2003).
- Ozdemir, M., Floros, J.D., Optimizaton of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *Journal of food engineering*, 86: 215-224 (2008).
- Partanen, R. Paananen, A.; Forssell, P.; Linder, M. B., Lille., M.; Buchert, J.; Lantto R. Effect of transglutaminase-induced cross-linking of sodium caseinate on the properties of equilibrated interfaces and foams. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, in press (2009).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E. Characterization of chitosan/ caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2):1080-1090 (2008).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E., Water vapor absorption and permeability of films based on chitosan and sodium caseinate. *Journal of Applied Polymer Science*, 111 (6): 2777-2784 (2009).
- Pitkowski, A., Nicolai, T., Durand, D. Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*; 23: 1164–1168 (2009).
- Pogaku, R.; Eng Seng, C; Boonbeng, L; y Kallu, U R Whey Protein Isolate-Starch System- A Critical Review. *International Journal of Food Engineering*; 3 (6), Available at: <http://www.bepress.com/cgi/siteview.cgi/ijfe/vol3/iss6/art1> (2007).
- Pommet, M.; Morel, M-H; Redl A Aggregation and degradation of plasticized wheat gluten during thermo-mechanical treatments, as monitored by rheological and biochemical changes. *Polymer*, 45: 6853-6860 (2004).
- Regan, J.O., Mulvihill, D.M., Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.045 (2009).
- Remuñán-López, C.; Bodmeier, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of controlled release*, 44: 215-225 (1997).

- Remuñán-López, C; Portero, A; Vila-Jato, J L; Alonso, M J. Design and evaluation of chitosan / ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 55: 143–152 (**1998**).
- Rhim J, Gennadios A, Weller CL, Cezeirat C, Hanna MA, Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Industrial Crops Products*; 8: 195– 203 (**1998**).
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C. L. Hanna M. A., Properties of ultraviolet irradiated protein films. *LWT- Food Science and Technology*, 32(3): 129-133 (**1999**).
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L. And Hanna, M. A. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 4937–4941 (**2000**).
- Rhim, J-W.; Ng, P. K. W. Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Critical Rev Food Sci Nutr*, 47(4): 411-433 (**2007**).
- Rivero, S.. García, M.A Pinotti A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*; 90: 531–539 (**2009**).
- Schou, M.; Longares, A.; Montesinos-Herrero, C.; Monahan, F. J.; O’Riordan, D.; O’Sullivan, M. Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT Food Science and Technology*, 38: 605 (**2005**).
- Shepherd, R., Reader, S. y Falshaw, A. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate journal*, 14: 535-542 (**1997**).
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar, K.R, Tharanathan, R.N. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*; 63: 79–85 (**2004**).
- Srinivasa, P. C.; Tharanathan, R. N. Chitin/Chitosan — Safe, Ecofriendly Packaging Materials with Multiple Potential Uses. *Food Reviews International*, 23: 53-72 (**2007**).
- Srinivasa, P.C. Ramesh, M.N. Tharanathan R.N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*; 21: 1113–1122 (**2007**).
- Svagan, A. J. Hedenqvist, M. S. Berglund L. Reduced water vapour sorption in cellulose nanocomposites with starch matrix. *Composites Science and Technology* 69: 500–506 (**2009**).
- Sztuka K. and Kołodziejska I., The influence of hydrophobic substances on water vapor permeability of fish gelatin films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). *Food Hydrocolloids* 23: 1062-1064 (**2009**).
- Tang, C. Liu H. Cellulose nanofiber reinforced poly(vinyl alcohol) composite film with high visible light transmittance *Composites: Part A* 39: 1638–1643 (**2008**).

Tang, Ch-H; Xiao, M-L; Chen, Z; Yang X-Q; Properties of Cast Films of Vicilin-rich Protein Isolates from Phaseolus Legumes: Influence of Heat Curing DOI: 10.1016/j.lwt.2009.05.020, acceso online.

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

Vachon, C.; Yu, H.-L.; Yefsah, R.; Alain, R.; St-Gelais, D.; and Lacroix, M. Mechanical and Structural Properties of Milk Protein Edible Films Cross-Linked by Heating and ζ -Irradiation. J. Agric. Food Chem., 48: 3202-3209 (2000).

Velde, A. Introduction to Clay Minerals, Chapman & Hall, London, , pp. 178 (1992).

Wong, D. W. S.; Gastineau, F. A.; Gregorski, K. S.; Tillin, S. J.; Pavlath, A. E. Chitosan-lipid films : microstructure and surface energy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 540-544 (1992).

Capítulo 2

Materiales y Descripción de Técnicas
Experimentales

En este capítulo se describen tanto el sistema seleccionado para el desarrollo experimental, como las técnicas utilizadas para elaborar y caracterizar los materiales presentados en esta Tesis.

2.1. Materiales

La proteína seleccionada para la realización de este trabajo es la caseína, obtenida de la leche. Se utilizó en la forma de **caseinato de sodio** y se adquirió de Lactoprot Deutschland GMBH (Alemania). El peso molecular promedio de proteína (M_w) es de 22600 g mol^{-1} (Audic y Chaufer, 2005). El producto comercial utilizado contiene 88.9 % en peso de proteína, siendo el resto lactosa, lípidos, humedad y cenizas.

Entrecruzante químico

Se utilizó Glutaraldehído (GTA), en solución acuosa (50% p/v). Se utilizó el producto comercial provisto por Q.B.S (Buenos Aires, Argentina), grado analítico. La solución acuosa consiste en una mezcla de aldehído libre, glutaraldehído monomérico mono y dihidratado, hemiacetales cíclicos mono y poliméricos y varios polímeros $\alpha \beta$ insaturados generados por auto-condensación aldólica durante el almacenamiento (Jayakrishnan y Jameela, 1996; Zeeman, 1998; Gennadios, 2002; Orliac y col., 2002). La estructura química del monómero se presenta en la figura inferior.

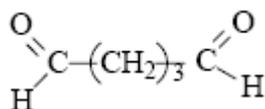


Figura 2.1.1: Estructura química del glutaraldehído.

Carbohidrato

Se utilizó quitosano, (grado de deacetilación (DD) 98%, $M_v = 1.61 \times 10^5 \text{ g/mol}$) suministrado por ACOFAR, Mar del Plata, Argentina. El grado de deacetilación se define como la fracción molar de unidades deacetiladas [-NH₂] en la cadena polimérica (Zhang y col., 2005). El peso molecular promedio viscoso (M_v) se determinó a partir de su viscosidad intrínseca $[\eta]$, obtenida a partir de una solución 0.25 M ácido acético/0.25 M acetato de sodio a 25°C, de acuerdo a la ecuación de Mark-Houwink- Sakurada (MHS) (Kasaai y col., 2000) establecida como $[\eta] = 1.49 \times 10^{-4} (M_v)^{0.79}$.

El quitosano es un heteropolisacárido lineal que consta principalmente de unidades de $\beta(1-4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glucosa y parcialmente de unidades de $\beta(1-4)$ -2-acetoamida-2-deoxi-D-glucosa, dependiendo del grado de deacetilación (Prodpran y col., 2007). Su estructura química se presenta en la figura inferior.

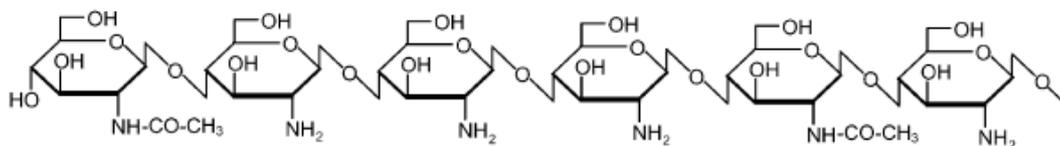


Figura 2.1.2. Estructura química del quitosano.

Plastificante

Se utilizó Glicerol (Gli) (92 g/mol) como plastificante (Química DEM, Mar del Plata, Argentina). Su estructura química se muestra en la figura inferior.

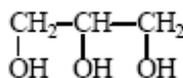


Figura 2.1.3. Estructura química del glicerol.

Lípido

Se utilizó aceite de tung, que fue provisto por Cooperativa Agrícola Limitada de Picada Libertad, Argentina. El aceite se caracterizó mediante técnicas analíticas (Urbanski, 1977), determinándose un valor de saponificación = 223 mg KOH/g y un número de ácido = 2.11 mg KOH/g.

El aceite de tung tiene la estructura química de un triglicérido, con un alto porcentaje (84%) de ácido α -elaeostearico (9-cis, 11-trans 13-trans-ácido octadecatrienoico), con tres insaturaciones conjugadas (Li y Larock, 2003; Mosiewicki y col., 2009). La estructura química de su mayor constituyente se representa en la siguiente figura.

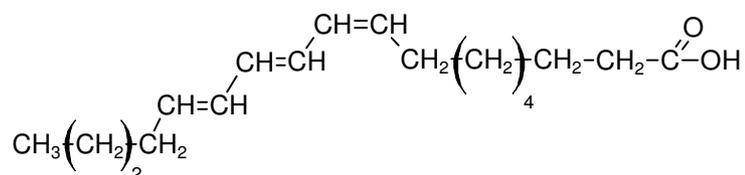


Figura 2.1.4. Estructura química del ácido α -elaeostearico.

2.2. Descripción de técnicas y equipos

2.2.1 Obtención de las películas: Técnica de disolución y evaporación solvente (casting)

La formación de películas generalmente involucra interacciones inter e intramoleculares o entrecruzamiento de cadenas poliméricas formando una red tridimensional semi-rígida. El grado de cohesión depende de la estructura polimérica, el solvente utilizado, la temperatura y la presencia de otras moléculas como plastificantes.

Todas las películas fueron obtenidas por la técnica de disolución y evaporación del solvente o *casting* de la solución. El procedimiento utilizado se esquematiza en la figura inferior (Fig. 2.2.1). El *casting* (Siew y col., 1999; Tanabe y col., 2002) es el método más frecuentemente utilizado para la preparación de este tipo de películas, de acuerdo a la bibliografía consultada (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2009; Mastromatteo y col., 2009; Barreto y col., 2003; Bigi y col., 2004; Kristo y col., 2008; Hernández-Muñoz y col., 2004; Bergo y Sobral, 2007; Gounga y col., 2007; Denavi, Tapia-Blácido y col., 2009; Denavi y col., 2009).

En primera instancia, mediante el mezclado del polímero en un buen solvente a la temperatura adecuada se obtiene una solución homogénea del polímero. Luego dicha solución se vierte en placas de Petri recubiertas con papel autoadhesivo-antiadherente (Teflón ®). Por último se fijan las condiciones de evaporación del solvente y secado (temperatura, tiempo) que favorecen la consecuente formación de la película.

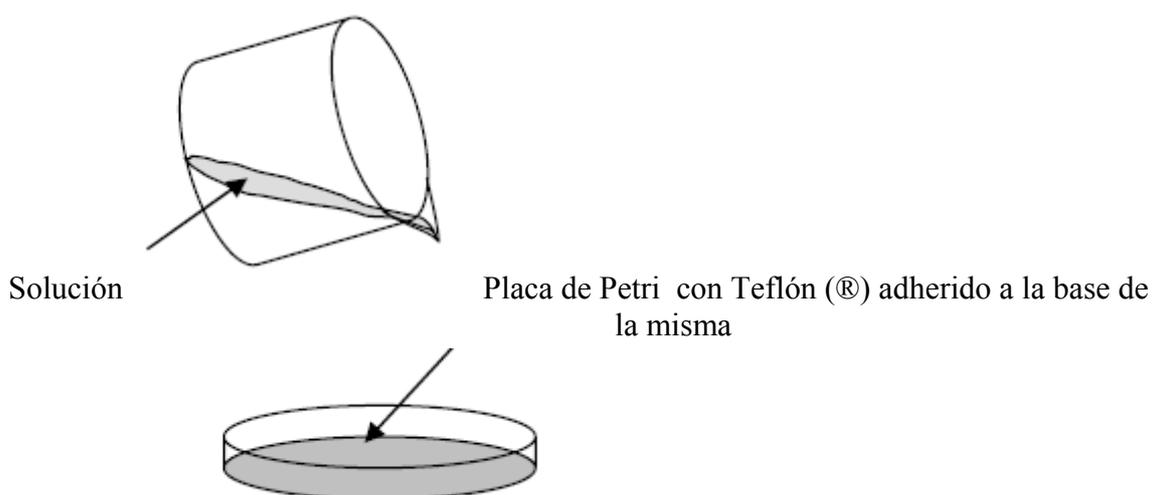


Figura 2.2.1. Esquema de la técnica de casting.

2.2.2 Preparación de emulsiones

Para preparar las emulsiones, se partió de la solución homogénea de caseinato de sodio preparada de acuerdo a la metodología descrita en el ítem anterior. La formación de la emulsión se logró mediante el mezclado intensivo de la solución con el componente lipídico, utilizando un agitador mecánico a varilla (Thorbell, HS-30-FC) por un tiempo de 10 min a 20,000 rpm. Debido a que este proceso incorpora aire al sistema, las emulsiones formadas se desgasificaron mediante filtrado con una tela para retener la espuma generada. Posteriormente, las emulsiones se volcaron sobre placas de Petri y se secaron en estufa con circulación forzada de aire hasta que se lograron las películas.

2.2.3 Medición del espesor

El espesor de las películas se midió usando un micrómetro manual (0-25 mm) con una exactitud de 0.01 mm. Los valores reportados son un promedio de seis lecturas tomadas en distintas posiciones de cada película.

2.2.4 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR de las películas se obtuvieron por el método de reflexión total atenuada (ATR) usando un espectrofotómetro Mattson Genesis II, a partir de muestras de 90 a 120 μm de espesor. En esta técnica la muestra se presiona contra un prisma o placa de material óptico denso que transmite la radiación IR, tal como se muestra en la Fig. 2.2.2. La penetración controlada de la onda evanescente en la muestra hace que la radiación IR pueda ser selectivamente absorbida en la superficie de la muestra en contacto con el prisma o placa. El espectro de la radiación reflejada internamente es similar al espectro IR de absorción convencional de la muestra.



Figura 2.2.2. Técnica de reflexión o reflectancia total atenuada (Attenuated Total Reflectance, ATR).

Por otra parte, las muestras en polvo se ensayaron en transmisión, para la cual se diluyó la muestra con KBr en polvo y previamente secado. Los polvos se mezclaron en mortero de ágata y se obtuvieron pastillas por compresión de los mismos.

En ambos casos, los espectros se registraron en un rango de 600-4000 cm^{-1} con una resolución de 2 de cm^{-1} , promediando, como mínimo, 32 barridos.

2.2.5 Espectrofotometría UV-visible

La espectrofotometría UV-visible es una técnica que permite evaluar el grado de transparencia u opacidad de un material. La opacidad de las películas se determinó según el método descrito por Irissin- Mangata y col. (2001), sobre tiras rectangulares colocadas directamente en la celda de cuarzo de un espectrofotómetro UV-visible. El espectro de absorción de la muestra se obtuvo entre 400 a 800 nm, usando aire como referencia, y se calculó la opacidad como el área bajo la curva, expresándola en unidades de Absorbancia x nanómetros (nm x UA) (Gontard y col., 1992; García y col., 2004; Vanin y col., 2005). Las mediciones fueron tomadas por sextuplicado para cada muestra y se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 (Estados Unidos).

2.2.6 Colorimetría

Se determinó el color de las películas mediante un colorímetro NoviBond RT 500 (Neu-Isenberg, Germany), con un área de medición de 8 mm de diámetro. Las mediciones se expresaron a través de los parámetros L^* , a^* , b^* (brillo “L”, rojo-verde “a” y amarillo-azul “b”). Los parámetros de color medidos fueron usados para calcular la diferencia de color total (ΔE) con respecto a la película de caseinato control, y el índice de blancura (WI), que están dados por las ecuaciones 2.2.1 y 2.2.2 (Monedero y col., 2009).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (2.2.1)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (2.2.2)$$

Para realizar las mediciones, las películas se colocaron sobre una placa estándar de calibración blanca. Se utilizaron seis muestras de cada película; los resultados presentados corresponden al promedio de las mediciones.

2.2.7 Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción de rayos X a altos ángulos (WAXS) permite obtener información sobre la estructura cristalina y la morfología de las muestras.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente en un analizador Phillips PW 1830/00, provisto de una fuente de Co ($\lambda=0.179$ nm). Los registros de intensidad (IRX) en función al ángulo de difracción (2θ) se obtuvieron en el intervalo de 5 a 70° , a una velocidad de $1^\circ/\text{min}$. El índice de cristalinidad (CrI %) se determinó mediante la relación de áreas a partir de la ecuación 2.2.3:

$$CrI = (A_{\text{crist}} / A_{\text{total}}) \times 100 \quad (2.2.3)$$

donde A_{crist} es el área correspondiente al/los picos cristalinos y A_{total} es el área total del difractograma (incluyendo la contribución amorfa).

2.2.8 Microscopías:

Óptica de transmisión (TOM)

Las superficies de las películas se analizaron mediante TOM, que fue llevada a cabo utilizando un microscopio Leica DMLB acoplado a una videocámara (Leica DC 100). Las películas se situaron entre porta- y cubre-objeto de vidrio y las fotografías se tomaron a distintas magnificaciones.

Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite obtener una imagen de una región microscópica de la superficie de una muestra. Un haz de electrones de 5 a 10 nm de diámetro barre la superficie y la interacción del haz con la muestra produce una serie de fenómenos: dispersión o absorción de electrones, emisión de rayos X o luz visible. Cualquiera de estas señales puede ser medida continuamente por métodos adecuados y permite reconstruir electrónicamente la imagen de la superficie de la muestra.

Las microscopías electrónicas se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL, modelo JSM-6460 LV (Tokio, Japón). Las muestras se colocaron sobre un soporte de bronce usando cinta doble faz, y luego se recubrieron con oro-paladio (metalización) antes de ser observadas en el microscopio.

Se observaron las superficies de las películas, la sección transversal de las mismas obtenidas mediante fractura frágil (películas fracturadas luego de su inmersión en aire líquido), así como la sección transversal de muestras rotas en ensayos de tracción.

De fuerza atómica (AFM)

La técnica de AFM puede ser usada en la investigación estructural de muestras biopoliméricas y superficies. Mediante esta técnica se crea una imagen de la superficie de la película mediante el barrido de una punta en un cantiléver flexible, montado sobre la muestra (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008). Esta técnica proporciona imágenes topográficas que permiten inferir la rugosidad superficial de las muestras escaneadas.

La morfología superficial de las películas se analizó mediante AFM, utilizando un microscopio Agilent Technologies 5500, Scanning Probe Microscope, con un tamaño de barrido de 125 μm x 125 μm y un rango vertical de 7 μm . Se tomaron cuatro mediciones de diferentes áreas de la superficie de la película (50 μm x 50 μm) utilizando el modo *tapping*. El principio básico del AFM es registrar la deflexión del cantiléver sobre las coordenadas x e y de la muestra, a medida que es escaneada bajo la sonda. Los datos registrados x e y se convierten luego en un mapa superficial 3D. La imagen resultante a partir del AFM es un mapa de fuerzas detectadas a lo largo de cada punto sobre la muestra (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008). Se estimaron mediante el software del equipo los siguientes parámetros estadísticos relacionados con la rugosidad de la muestra (Fabra y col., 2009): la rugosidad promedio (R_a), que es el promedio del valor absoluto de la desviación en altura tomada desde el plano medio de la superficie, y la raíz cuadrada media de la rugosidad (R_q), que es la raíz cuadrada del promedio de los cuadrados de las desviaciones de altura tomadas desde el plano medio de la superficie. Estos dos parámetros se escriben como:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Z_i - \bar{Z}| \quad (2.2.4)$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Z_i - \bar{Z})^2} \quad (2.2.5)$$

Siendo Z_i los valores de altura en el perfil (nm); \bar{Z} , el promedio aritmético de alturas (nm); y N , el número de puntos de datos en el perfil.

2.2.9 Determinación del material soluble total (TSM)

El material soluble total se expresó como el porcentaje de masa seca de película disuelta después de 24 horas de inmersión en agua destilada. Se utilizaron dos métodos

diferentes para esta determinación. El primero de ellos (SECO), ha sido utilizado en varios estudios acerca de películas basadas en diversas proteínas (Rhim y col., 1998). El método consistió en pesar un mínimo de tres muestras de 2 cm x 2 cm. de cada película (m_h) ($\pm 0,0001$ g) y luego secarlas en una estufa de convección a 105 °C durante 24 horas para determinar su masa seca inicial (m_0) mediante una nueva pesada. El contenido de humedad inicial (M_c) se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$M_c (\%) = \frac{m_h - m_0}{m_0} * 100 \quad (2.2.6)$$

Luego de esto, las piezas de película seca se colocaron en vasos de 50 ml conteniendo 30 ml de agua destilada y se almacenaron en una cámara ambientada a 25°C durante 24 hs con agitación suave ocasional. Con el objetivo de inhibir el crecimiento microbiano, se agregaron en los recipientes trazas de azida sódica (0.02 %). La masa no disuelta se determinó retirando cuidadosamente las películas de los recipientes, enjuagándolas suavemente con agua destilada y luego secándolas en la estufa de convección (105 °C) hasta peso constante (m_f). La masa soluble (TSM) se calculó de la siguiente manera:

$$TSM (\%) = \frac{m_0 - m_f}{m_0} * 100 \quad (2.2.7)$$

Para el segundo método (HÚMEDO), la masa seca inicial y la masa soluble no se determinaron sobre las mismas piezas de película, para evitar el calentamiento de las muestras antes de su inmersión en el agua. En lugar de ello, se pesaron tres muestras de cada película (m_h) y se sumergieron directamente en el agua (25 °C durante 24 hs), como se describió anteriormente. Posteriormente las muestras se secaron en estufa de convección (105 °C durante 24 h) para obtener la masa insoluble restante (m_f). El valor de masa seca inicial (m_0) que se necesita para calcular TSM se obtiene de la ecuación 2.2.6 mediante el M_c determinado para otras piezas obtenidas de la misma película.

2.2.10 Termogravimetría (TGA)

Esta técnica permite monitorear la evolución de la masa de una muestra pesada microanalíticamente, como función del tiempo (a temperatura constante) o de la

temperatura. Los ensayos se realizan bajo barrido con un medio gaseoso fijado de antemano (por ejemplo, aire o nitrógeno).

Se utilizó un analizador termogravimétrico Shimadzu TGA-50. Se realizaron corridas dinámicas variando la temperatura a velocidad constante. Se registró el peso de la muestra como función de la temperatura desde 25 hasta 500 °C. Sin embargo, los termogramas obtenidos se presentan a partir de 100 °C (y no desde temperatura ambiente), debido a que se ha comprobado que las pérdidas de masa hasta esa temperatura corresponden a la eliminación (evaporación) del agua absorbida por el material. La gran sensibilidad de las películas a la humedad introduce diferencias artificiales en los datos experimentales que no son asignables a su degradación térmica propiamente dicha. Entonces, para eliminar cualquier discrepancia que hubiera en el contenido de humedad inicial de las muestras, las pérdidas de peso debido a la degradación térmica del material se recalcularon en base seca, después de la evaporación de agua, tomándose como base el peso registrado a 105°C.

Las corridas se realizaron a velocidades de calentamiento de 5 °C/min o 10 °C /min, en atmósfera de nitrógeno (20 mL/min). La cantidad de muestra utilizada fue de 4 a 10 mg.

A partir de las curvas termogravimétricas se calcularon los siguientes parámetros: $T_{d,max}$, definida como la temperatura que corresponde a la velocidad de degradación máxima en cada región (temperatura del máximo de los picos de degradación de la curva derivada) y T_0 , definida como la temperatura inicial de degradación, que se tomó arbitrariamente como aquella correspondiente a una pérdida de masa del 3 %.

2.2.11 Propiedades termomecánicas

El reómetro es un instrumento que permite medir las historias de esfuerzo y deformación de un material para el cual no se conoce la ecuación constitutiva y se utiliza para determinar las funciones materiales que lo caracterizan. Los reómetros pueden clasificarse según midan en corte o en extensión. Además también pueden ser agrupados según el tipo de régimen en que puedan medir: bajas deformaciones, grandes deformaciones y ensayos a velocidad de deformación constante.

El flujo de corte típico es el que se obtiene cuando una de las superficies oscila en forma sinusoidal a frecuencia ω constante respecto de la otra (Bird y col, 1987). Si la amplitud de la oscilación es pequeña, el esfuerzo de corte resultante también oscila en

forma sinusoidal a la frecuencia ω . El carácter viscoelástico de los polímeros genera un desfase (δ) entre ambas ondas y la relación entre la tensión y la deformación permite definir un *módulo dinámico complejo*, $G^*(\omega)$. En este módulo participan el *módulo elástico*, $G'(\omega)$, y un *módulo viscoso*, $G''(\omega)$. El módulo elástico es una medida de la energía almacenada por el material mientras que el módulo viscoso corresponde a la energía perdida en cada onda de deformación. El cociente entre estos dos parámetros permite determinar el ángulo de desfase ya que $G'/G'' = \tan \delta$.

Se utilizó un reómetro para determinar el comportamiento dinámico-mecánico de las películas, en particular la temperatura de ablandamiento o de transición vítrea. Para ello, se utilizó un equipo Anton Paar (Physica MCR 301), que permite trabajar tanto con sólidos como con líquidos viscosos y en corte (cizalla) como utilizando flujos por arrastre (el flujo ocurre por arrastre de una superficie). Los ensayos realizados en este trabajo se hicieron utilizando la geometría de barras rectangulares (corte). Se realizaron barridos de temperatura, desde 20 a 150 °C, a una velocidad de calentamiento de 5°C/min. La deformación de las muestras se mantuvo en 0.1% para asegurar el comportamiento viscoelástico lineal del material. Se ensayaron tres muestras de cada película; los resultados presentados corresponden al promedio de las mediciones.

2.2.12 Absorción de humedad

Una medida de la hidrofiliidad de un material es su capacidad de absorber agua. Para determinar la cinética de absorción de humedad de los distintos materiales se utilizaron muestras de 2 cm x 1 cm. Las muestras se secaron en estufa de vacío a 40 °C durante tres días (se comprobó que en ese período alcanzaran peso constante), y se pesaron inmediatamente (W_0). Se comprobó que el secado a tan baja temperatura no ocasiona el entrecruzamiento de las cadenas de proteína, es decir, que no se modifica la estructura química de la película. A continuación, las muestras secas se colocaron sobre una malla metálica (para posibilitar la absorción de humedad por ambas superficies) en el interior de una cámara de humedad controlada mantenida a temperatura (23 ± 2 °C) y humedad relativa (HR) constantes. En la mayoría de los casos se utilizó una HR del 75 %, que se logró utilizando una solución acuosa de glicerol al 58 % en peso (ASTM D5032-97), aunque para mediciones puntuales se utilizaron también ambientes de 50 y 90 % HR. Las muestras fueron retiradas de la cámara a tiempos regulares y pesadas con una precisión de ± 0.0001 g., para obtener las isotermas de absorción de cada película.

Este experimento se realizó en cuatro muestras de cada película de manera de asegurar reproducibilidad en los resultados.

El contenido de humedad de las películas en función del tiempo se obtuvo del balance de masa total, tal como se indica en la ecuación 2.2.8:

$$M_t = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \times 100 \quad (2.2.8)$$

Donde:

M_t es el contenido de humedad de la muestra en función del tiempo expresado en base seca [%].

W_t es el peso de la muestra a un tiempo especificado [g].

W_0 es el peso seco inicial de la muestra [g].

Consideraciones teóricas

La aplicación de modelos teóricos existentes en el estudio de la absorción de moléculas pequeñas en una matriz polimérica, requiere del análisis de las suposiciones realizadas en su desarrollo. La mayoría de los modelos consideran la ausencia de reacción química entre el soluto y la matriz (Karbowski, 2008). Sin embargo, en sistemas sólidos, tales como productos alimenticios o polímeros, los procesos de transferencia de masa incluyen no sólo la difusión browniana, sino también otros fenómenos como la convección, fuerzas capilares o reacciones químicas (Mazaro y Zhu, 1999). La difusividad es altamente dependiente de las propiedades moleculares y de la reactividad de la sustancia que difunde con el medio. Las interacciones fisicoquímicas entre un sistema macromolecular y una pequeña molécula que difunde también afectan el proceso difusivo, como se ha observado en el caso de compuestos aromáticos en polímeros (Debeaufort y col., 1994). Por último, la difusión de agua dentro de los polímeros hidrófilos resulta en la relajación de las cadenas de polímero, con la consiguiente expansión de volumen. Así, el análisis simple de los datos experimentales puede sólo conducir a un coeficiente de difusión aparente.

Varios autores han propuesto modelos para la absorción de agua en películas hidrofílicas. Estos pueden dividirse en dos grandes categorías: empíricos y fundamentales. Los modelos empíricos, que no toman en cuenta los procesos físicos fundamentales que ocurren durante la absorción de agua, con frecuencia se prefieren

frente a los fundamentales, debido a su simplicidad y facilidad de cálculo. En esta categoría, la ecuación de Peleg (Peleg, 1988) es especialmente popular para la descripción empírica del proceso de absorción de agua en sistemas alimenticios tales como leche en polvo, arroz y almidón (Nashed y col., 2003) y películas poliméricas comestibles (Coupland y col., 2000). Esta expresión relaciona el contenido de humedad instantáneo (M_t) con el contenido de humedad inicial (M_0) y el tiempo de absorción (t), como se muestra en la ecuación 2.2.9:

$$M_t = M_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (2.2.9)$$

donde K_1 y K_2 son parámetros de ajuste. K_1 es la constante de velocidad de Peleg (h / (g agua/g sólido)) y se relaciona inversamente con la velocidad de absorción inicial; K_2 es la constante de capacidad de Peleg (g sólido/g agua) y se vincula con la capacidad de absorción final, (una disminución en K_2 resulta en una mayor capacidad de absorción) y t es el tiempo (min).

Los modelos fundamentales que describen la absorción de agua en las películas se basan generalmente en la segunda ley de Fick de la difusión que, en el caso específico de transporte de masa a través de una lámina plana con condiciones de frontera constantes, se reduce a la siguiente expresión (Crank, 1996):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left[-D \frac{(2n+1)^2 \pi^2 t}{l^2}\right] \quad (2.2.10)$$

donde M_∞ es la cantidad de agua absorbida en el equilibrio, D es el coeficiente de difusión efectivo o aparente y l es el espesor promedio de la película cuando ésta absorbe humedad por las dos caras.

La ecuación 2.2.10 es sólo válida cuando el vapor de agua penetra el polímero unidireccionalmente hacia la superficie plana. Dado que las muestras son películas muy finas (90-120 μm), la penetración de vapor de agua por los bordes puede despreciarse.

2.2.13 Ángulo de Contacto estático

La hidrofobicidad de la superficie de las películas se evaluó usando un goniómetro de ángulo de contacto. Este instrumento es usado para medir el ángulo de

contacto (θ) entre la interfase líquido-vapor y la superficie sólida, al alcanzar el equilibrio (ver Figura 2.2.3). El ángulo de contacto es indicativo de la capacidad de mojado (wettability) del líquido sobre la superficie. En el caso de un líquido que forma una película uniforme ($\theta=0^\circ$), se dice que el sólido ha sido mojado completamente por el líquido (Fig 2.2.4(a)). Si se forma un ángulo de contacto positivo ($\theta > 0$) (Fig 2.2.4(b) y c)) se describe al sistema como parcialmente mojado.

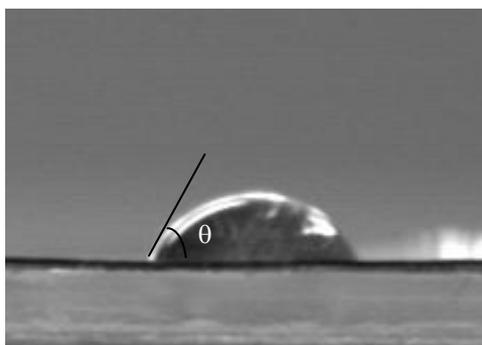


Figura 2.2.3. Ángulo de contacto de etilenglicol (θ) sobre la superficie de una película de quitosano.

La instalación experimental incluye una fuente de luz y una cámara fotográfica equipada con lentes de aumento, conectada a una computadora; las imágenes se capturan mediante el software PXC Draw.

Esta herramienta no sólo se usa para medir ángulo de contacto, lo que permite inferir la energía superficial de las muestras, sino que también es utilizada para medir absorción o permeabilidad de un líquido (Hambleton y col., 2009).



Figura 2.2.4. Un líquido en una superficie sólida puede tomar una de estas tres formas distintas: a) puede desparramarse formando una película uniforme ($\theta=0^\circ$), b) puede formar un lente convexo con una sección menor que el radio de curvatura ($30^\circ < \theta < 90^\circ$), o c) puede formar una sección mayor que el radio de curvatura ($\theta > 90^\circ$).

En este trabajo se determinó el ángulo de contacto de las películas utilizando como solvente etilenglicol (solvente polar).

El procedimiento consistió en depositar una gota de etilenglicol sobre la superficie de las películas utilizando una micropipeta ($5 \mu\text{L}$). Cuando el sistema alcanzó el equilibrio, se tomó una fotografía de la gota depositada sobre la muestra y usando un

analizador de imágenes se midió el ángulo entre la base de la película, que contenía la gota, y la tangente a la gota de líquido; con una precisión de $\pm 2^\circ$.

Todas las películas fueron acondicionadas en una cámara de humedad controlada (50 % HR) antes de cada ensayo. Se ensayaron siete muestras de cada película, a una temperatura de 24 °C, de manera de asegurar reproducibilidad en los resultados.

2.2.14 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

WVP es una medida de la facilidad que tiene la humedad para penetrar y atravesar un material.

La velocidad de transferencia de vapor de agua [g/s.m^2] a través de las películas se determinó gravimétricamente de acuerdo a la norma ASTM E96-95 (ASTM, 1993). Las películas se acondicionaron durante tres días en una cámara a 64.5% de humedad relativa, hasta alcanzar peso constante. Se utilizó un ventilador situado dentro de la cámara para remover el aire interno, de manera de garantizar condiciones uniformes en todos los puntos de la misma. Durante este período las muestras alcanzaron condiciones de equilibrio. Posteriormente, las muestras se fijaron sobre cápsulas de Dherling diseñadas especialmente de acuerdo a las especificaciones de la norma mencionada previamente (ver Figura 2.2.5). Las cápsulas contenían en su interior agua destilada (100% de humedad relativa) o CaCl_2 deshidratado (0% de humedad relativa). Ya sea el desecante o el agua, ambos debían cubrir toda la superficie dejando un espacio encima de ellos de 0.5 cm de altura. Las películas fueron selladas en sus uniones con las cápsulas usando grasa siliconada para evitar pérdidas de humedad. Una vez armado, todo el conjunto se colocó dentro de la cámara de humedad controlada, a 64.5 % HR y temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

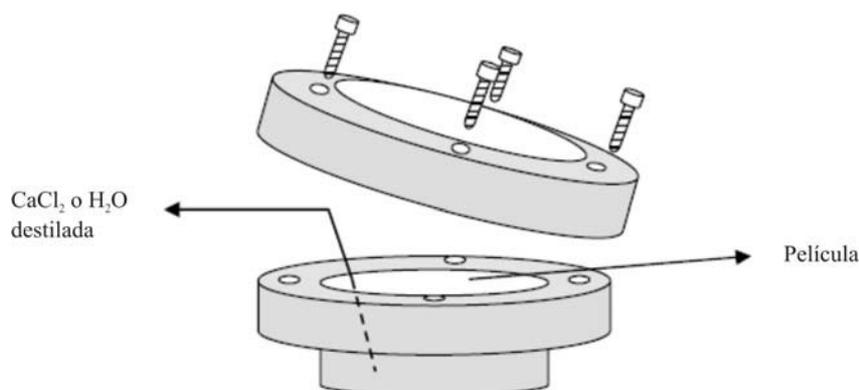


Figura 2.2.5. Esquema de las cápsulas utilizadas para el ensayo de WVP (Martucci, 2008).

El peso de las películas se registró cada hora, por un período de 7 horas.

Se utilizó una regresión lineal para ajustar los datos experimentales de masa (g) vs. tiempo (h), y para calcular la pendiente de la recta resultante en g s^{-1} . Se analizaron seis muestras por cada tipo de película. Los valores de permeabilidad se presentan como coeficientes de permeabilidad de agua, WVP, expresados en $[\text{g.m./ Pa.s.m}^2]$, como sigue:

$$\text{WVP} = \Delta W / [A \Delta t (p_2 - p_1)]^{-1} \quad (2.2.11)$$

donde ΔW es la masa de agua absorbida o perdida en la cápsula (g), y e es el espesor de la película (m), Δt es el tiempo transcurrido para un cambio de peso ΔW (por lo tanto, $\Delta W / \Delta t$ es la pendiente calculada a partir del gráfico masa de la cápsula vs. tiempo), A es el área expuesta de la película (m^2), y $p_2 - p_1$ es la diferencia de presión de vapor a través de la película (Pa), que se calculó en base a la temperatura de la cámara y a la humedad relativa dentro y fuera de la cápsula.

2.2.15 Ensayos Mecánicos

Tracción

El principio del ensayo normalizado consiste en solicitar el material en tracción uniaxial a una velocidad de desplazamiento uniforme, mientras se realiza la medición simultánea de la carga aplicada y de la deformación inducida. Las propiedades mecánicas de las probetas se calculan entonces, a partir de los registros de carga vs. desplazamiento.

Las muestras se cortaron en forma de hueso de acuerdo a lo especificado en la norma ASTM D1708-93 (ASTM, 1993). Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) usando una máquina universal de ensayos Instron 8501. La velocidad de la travesa fue de 10 mm/min. Se ensayaron un mínimo de seis muestras de cada película. Todas las muestras fueron acondicionadas a 50 % HR durante 4 días antes de ser ensayadas.

Los registros carga (P) vs. desplazamiento (L) se corrigieron a tensión verdadera vs deformación nominal según las siguientes expresiones:

$$\sigma = \frac{P}{A}, \text{ donde } A = \frac{A_0 \times L_0}{L} \text{ y } L = L_0 + \Delta L \quad (2.2.12)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} = \frac{L - L_0}{L_0} \quad (2.2.13)$$

A partir de las curvas resultantes se determinaron:

- el módulo elástico o de Young (E), tomado como la pendiente de la región elástica y lineal del registro tensión –deformación.
- la tensión y deformación últimas, σ_u y ε_u , respectivamente, tomadas en el momento de la rotura del material.

La tensión última representa la resistencia del material a la tracción, la deformación última es una medida de la capacidad de estiramiento de la película, y el módulo de Young es una medida de la rigidez del material (Gennadios, 2002).

Impacto

Se evaluó el comportamiento en impacto de las distintas películas utilizando una máquina de impacto instrumentado del tipo *falling weight* (Fractovis Gravity Drop CEAST 6789).

La técnica de impacto al dardo se utiliza ampliamente para obtener la respuesta en fractura *out of plane* (fuera del plano) de materiales poliméricos y materiales compuestos (Mouzakis y col., 2000; Acha, Marcovich y col., 2006; Acha, Reboredo y col, 2006). Este método ofrece una visión realista de la respuesta del material sometido a la aplicación de una carga súbita en dirección paralela a su espesor (Mouzakis y col., 2000).

Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, la energía de impacto del dardo de punta semiesférica utilizada fue de 7.5 Joule (velocidad de incidencia= 1 m/s, masa= 7.5 kg), para garantizar la rotura del material. Las curvas carga-tiempo se registraron durante 16 mseg. Se ensayaron un mínimo de 5 muestras de cada película (14 cm de diámetro), de aproximadamente 100 μm de espesor, las cuales se sujetaron mediante un soporte de 75 mm de diámetro.

De los fractogramas obtenidos se determinaron los siguientes parámetros:

- La resistencia máxima (σ_d), que está relacionada con la iniciación de la fisura. La fuerza en este punto puede convertirse a tensión, la cual representa la resistencia al impacto en flexión al inicio de la fisura.

$$\sigma_d = \frac{2.5 \times F_{\max}}{t^2} \quad (2.2.14)$$

donde F_{\max} es la carga máxima aplicada durante el ensayo y t es el espesor de la muestra.

- La energía consumida para iniciar la fisura (E_i), la cual se normaliza por el espesor (t) del material.

$$E_i = \frac{1}{t} \times \int_0^{X_{\max}} F dX \quad (2.2.15)$$

donde X es la deformación alcanzada durante el ensayo del material.

- La energía total (E_t) requerida para perforar completamente el disco, también normalizada por el espesor.

$$E_t = \frac{1}{t} \times \int_0^{X_{total}} F dX \quad (2.2.16)$$

- La energía de propagación (E_p), que es la energía requerida para perforar el disco una vez iniciada la fisura.

$$E_p = E_t - E_i \quad (2.2.17)$$

- El índice de ductilidad (DI)

$$DI = \frac{E_t - E_i}{E_t} = \frac{E_p}{E_t} \quad (2.2.18)$$

que varía entre 0, para un material que se comporta de manera totalmente frágil en impacto, a 1, para un material completamente dúctil en impacto.

2.2.16 Análisis microbiológicos

Ensayos in vitro:

- *Actividad antimicrobiana de las soluciones formadoras de películas: Método de difusión en agar*

El ensayo de difusión en agar es un método comúnmente utilizado para examinar la actividad antimicrobiana debida a la difusión del compuesto testeado a través de una placa de agar que contiene agua conjuntamente con un microorganismo o microflora indicadora. La difusión depende del tamaño, forma y polaridad del material que difunde.

Se utilizó el método de difusión en agar para determinar la sensibilidad de tres diferentes microfloras nativas de alimentos (zanahoria, queso cheddar y salame de Milano) a los componentes de las soluciones formadoras de películas. Este ensayo se realizó inoculando una placa de agar Cerebro Corazón (BH) (Britania, Buenos Aires, Argentina) con los microorganismos indicadores. Para esto, las microfloras naturales de zanahoria, queso cheddar y salame de Milano se prepararon a partir de 10 g de material crudo macerado en 90 ml de solución de búfer fosfato (0.1 mol/L, pH 7.2) utilizando un homogeneizador (Stomacher 400 Circulator Homogenizer) de acuerdo a la técnica descrita por Ponce y col. (2003). Las placas inoculadas fueron incubadas por 3 horas a 37°C.

Posteriormente, las diferentes soluciones formadoras de películas (70 µL) fueron colocadas en cada uno de los hoyos previamente realizados sobre la placa (5–6 mm diámetro) de acuerdo a la metodología descrita por Coma y col. (2002). Las placas se incubaron a 37 °C por 24-48 horas y posteriormente se midió la actividad inhibitoria, en base al diámetro de las zonas de inhibición. Se clasificó la sensibilidad de las diferentes soluciones antimicrobianas mediante el diámetro de los halos como: no sensibles (diámetros menores que 8 mm); sensibles (diámetros mayores que 9-14 mm); muy sensibles (diámetros 15-19 mm); y extremadamente sensibles (diámetros mayores que 20 mm) (Ponce y col., 2003).

Para asegurar la viabilidad de los microorganismos indicadores y para confirmar la carga celular inicial, se inocularon controles sin las soluciones formadoras de películas. Además, a fin de testear el posible nivel de contaminación inicial de las soluciones formadoras de películas, se llevaron a cabo controles sin microorganismos indicadores, sólo con las soluciones formadoras de películas. Finalmente, para confirmar las propiedades no-antimicrobianas del solvente utilizado en la solución

formadora de la película de quitosano y mezcla, se realizaron controles en placas inoculadas con 1% p/p de ácido acético (pH 5.0). Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado en dos corridas experimentales independientes.

- *Actividad antimicrobiana de las películas: Ensayo de difusión en agar modificado*

Se utilizó una modificación de la metodología descrita anteriormente para determinar las propiedades antimicrobianas de las películas. Las películas se cortaron asépticamente en cuadrados de 1.5 cm x 1.5 cm (2.25 cm² de área) usando un cúter estéril y fueron luego asépticamente transferidas a placas de agar (15 ml de agar Cerebro corazón (BH)) previamente inoculadas con los microorganismos indicadores (microfloras nativas de queso cheddar, zanahoria y salame de Milano). Luego de 24-48 horas de incubación a 37°C, se determinaron las áreas de la zona de inhibición alrededor de los trozos de película. Estas áreas fueron transferidas a papel y las siluetas resultantes se cortaron y pesaron. El peso correspondiente a las áreas de inhibición fue referido al peso del área conocida (2.5 cm²). Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado en dos corridas experimentales independientes.

El contacto de las películas con alimentos de distintas actividades acuosas o su almacenamiento a diferentes temperaturas o humedades relativas, pueden alterar las propiedades microbiológicas de los envases durante el tiempo de almacenamiento. Por este motivo, se estudió también el efecto de las variables ambientales sobre las propiedades antimicrobiológicas de las películas. Las películas fueron almacenadas a dos niveles distintos de humedad relativa (40 y a 65%) y temperatura (10 y 20 °C) por distintos tiempos. Posteriormente, y utilizando trozos de área conocida, se determinaron los efectos antimicrobianos de las películas sobre las tres microfloras nativas (queso cheddar, zanahoria y salame de Milano), de acuerdo a lo descrito en el inciso anterior.

Ensayos in vivo:

Las películas fueron aplicadas sobre los alimentos de dos maneras diferentes: mediante inmersión (recubrimiento) y mediante envoltura.

En primera instancia, los alimentos a ensayar (zanahoria, queso cheddar y salame de Milano) se cortaron en rodajas de 0.5 cm de espesor. En particular, las rodajas de zanahoria se lavaron por inmersión en agua con 200 ppm de hipoclorito de

sodio por 60 s, seguido de un enjuague con agua de red y drenaje. Posteriormente las rodajas se sumergieron dentro de las distintas soluciones formadoras de películas por 180 s a 20°C y luego se dejó que drenara el líquido residual. A continuación las rodajas se secaron mediante flujo de aire a temperatura y humedad relativa controlada (30°C y 40-50 % de humedad relativa) por 50 min. Las rodajas de queso cheddar y salame fueron directamente sumergidas en las soluciones formadoras de películas (sin lavado previo) y sujetas a secado posterior en las mismas condiciones descriptas para las rodajas de zanahoria.

Se utilizaron dos controles: (a) rodajas de alimento fresco sin tratamiento (muestras control frescas) y (b) rodajas de alimento fresco inmersas en agua destilada y sujetas a las mismas condiciones de secado (muestras control secas).

Para la aplicación de las películas por envoltura, las rodajas de los alimentos fueron envueltas en las diferentes películas de forma que la película entre en contacto con el alimento.

Las muestras finales obtenidas (alimentos con recubrimientos y envoltura) se almacenaron durante 5 días a 65% HR y 10°C.

Para los análisis microbiológicos, se prepararon homogenatos, colocando 10 g de cada uno de los alimentos tratados (con películas) y sin tratar (control) en 90 mL de una solución buffer de PO_4K_3 0.1M (pH=7.2) y agitando los sistemas con un homogeneizador (Stomacher 400 Circulator Homogenizer). Se realizaron diluciones seriadas que fueron posteriormente sembradas en superficie sobre Plate Count Agar (PCA) (Britania, Buenos Aires, Argentina), para la enumeración y diferenciación de bacterias mesófilas aerobias y psicrótrofas, incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ y a $6\pm 1^\circ\text{C}$, respectivamente, durante 24-48 horas. El recuento de hongos y levaduras se determinó en medio agar YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) (Britania, Buenos Aires, Argentina), a $20\pm 1^\circ\text{C}$, durante 4-5 días. (ICMSF, 1983; Mossel y Moreno García, 1985). Los recuentos microbianos se realizaron por duplicado en seis lotes independientes. Los resultados se expresan en *ciclos log*, definidos como:

$\text{Ciclos log} = \log \text{UFC} / \text{gr}$, (logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra analizada).

2.2.17 Ensayo de biodegradación en suelo

El experimento se llevó a cabo en una serie de macetas de plástico (80 cm x 15 cm x 10 cm) conteniendo resaca de pino (Pinocha) y usando la microflora natural

presente (Di Franco y col., 2004; Alvarez y col., 2006). Las muestras de las distintas películas se cortaron en forma rectangular (2 cm x 3 cm) y, luego se secaron en estufa de vacío a 40°C hasta peso constante para obtener el peso seco inicial (m_0). Las muestras se colocaron en el interior de bolsitas (5 cm x 4 cm) diseñadas con malla de acero inoxidable. Los agujeros de la malla permiten el acceso de los microorganismos y la humedad, y las muestras degradadas pueden ser fácilmente extraídas de las mismas. Las bolsitas se enterraron a una profundidad de 5 cm de la superficie, de manera de asegurar la degradación aeróbica. La pinocha se mantuvo en condiciones saturadas de humedad mediante la aspersión periódica de agua destilada y la temperatura fue de 20 ± 2 °C.

A intervalos específicos, las muestras fueron desenterradas, retiradas de las bolsitas (cuando su integridad lo permitió) y fotografiadas para realizar un análisis cualitativo del proceso de degradación. Cuando fue posible, algunas de las muestras se secaron en estufa de vacío hasta peso constante y luego se pesaron (m_f) para determinar la pérdida de peso (WL) mediante la ecuación 2.2.19. Estas últimas mediciones se utilizaron para realizar un análisis cuantitativo del proceso degradativo.

$$WL(\%) = \frac{m_f - m_0}{m_0} * 100 \quad (2.2.19)$$

Todos los resultados informados en el estudio de degradación en suelo son el promedio de dos mediciones.

2.3. Referencias

- Acha, B. A.; Marcovich, N. E.; Karger- Kocsis, J. Biodegradable jute cloth reinforced thermoplastic copolyester composites: fracture and failure behaviour. *Plastics Rubber Compos*, 35: 73-82 (2006).
- Acha, B. A.; Reboredo, M. M.; Marcovich, N. E. Effect of coupling agents on the thermal and mechanical properties of polypropylene–jute fabric composites. *Polym Int*, 55: 1104-1113 (2006).
- Alvarez, V.A.; Ruseckaite, R.A.; Vazquez A. Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. *Polym Degrad Stab*, 91: 3156-3162 (2006).
- Audic J-L, Chaufer B, Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, 41: 1934–1942 (2005).
- Barreto, P. L. M.; Roeder, J.; Crespo, J. S.; Maciel, G. R.; Terenzi, H.; Pires, A. T. N.; Soldi, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/ sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chemistry*, 82: 425-431 (2003).
- Bergo, P. Sobral P.J.A., Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21: 1285–1289 (2007).
- Bigi, A. Panzavolta, S. Rubini K.; Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25: 5675–5680 (2004).
- Bird, RB, Armstrong, RC y Hassager, O, *Dynamics of Polymer Liquids*, vol1, Fluid Mechanics, 2da ed., Wiley-Interscience, Nueva York (1987).
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., Deschamps, A., Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *J. Food Sci.* 67: 1162–1169 (2002).
- Coupland, J. N.; Shaw, N. B.; Monahan, F. J.; O’Riordan, E. D.; O’Sullivan, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *J Food Eng*, 43: 25-30 (2000).
- Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*, 1st ed.; Clarendon: Oxford, (1956).
- Deb, S.; Braden, M.; Bonfield, W. Water absorption characteristics of modified hydroxyapatite bone cements, *Biomaterials*, 16, 1095 (1995).
- Debeaufort, F.; Voilley, A.; Meares, P. Water vapor permeability and diffusivity through methylcellulose edible films. *J Membr Sci*, 91: 125 (1994).
- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M.; Añón, M. C. Montero, P., Mauri, A. N., Gómez-Guillén M. C., Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, doi:10.1016/j.foodhyd.2009.03.007 (2009).

- Denavi, G.; Tapia-Blácido D.R.; Añón M.C., Sobral P.J.A., Mauri A.N., Menegalli F.C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, 90: 341–349 (2009).
- Di Franco, C.R.; Cyras, V.P.; Busalmen, J.P.; Ruseckaite, R.A.; Vázquez A. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Polym Degrad Stab*, 86: 95–103 (2004).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures *Food Hydrocolloids* 23: 676–683 (2009).
- Focher, B., Beltrame, P. L., Naggi, A., & Torri, G. Alkaline Ndeacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structural modifications. *Carbohydrate Polymers*, 12: 405–408 (1990).
- García M.A., Pinotti A., Martino M.N., Zaritzky N.E. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohyd. Polym.* 56: 339-345 (2004).
- Gennadios, A., *Protein-based Films and Coatings*, ed. A. Gennadios.: CRC Press LLC, USA, (2002).
- Ghanbarzadeh, B.; Oromiehi, A.R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 209–215 (2008).
- Ghanbarzadeh, B.: Oromiehi A.R Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *Journal of Food Engineering*, 90: 517–524 (2009).
- Gontard N., Guilbert S., Cuq J-L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food. Sci.* 57: 190-199 (1992).
- Gounga, M. E.; Xu, S-Y; Wang Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, 83: 521–530 (2007).
- Hambleton A, Fabra, M-J; Debeaufort F; Dury-Brun C, Voilley A, Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion–based films used for encapsulation of active food compounds. *Journal of Food Engineering*, 93: 80–88 (2009).
- Hernández-Muñoz, P. Villalobos, R. Chiralt, A. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. *Food Hydrocolloids*, 18: 647–654 (2004).
- ICMSF, 1983. *Microorganismos de los alimentos*. Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 105–280.
- Irissin-Mangata, J.; Bauduin, G.; Boutevin, B.; Gontard, N. New plasticizers for wheat gluten films. *Eur Polym J*, 37: 1533 (2001).

- Jayakrishnan, A., Jameela, S.R., Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, 17 (5): 471-484, review (1996).
- Karbowiak, T.; Gougeon, R. D.; Rigole, S. Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. *Food Chem*, 106: 1340-1349 (2008).
- Kasaai, M. R., Arul, J., & Charlet, G.. Intrinsic viscosity –Molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38: 2591–2598 (2000).
- Kasaai MR. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent– emperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr Polym*, 68: 477–88 (2007).
- Kristo, E. Koutsoumanis, K. P. Biliaderis C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22: 373–386 (2008).
- Li, F. Hanson, M.V. Larock R.C. Soybean oil–divinylbenzene thermosetting polymers: synthesis, structure, properties and their relationship. *Polymer* 42: 1567–1579 (2001).
- Li F. and Larock R. C., Synthesis, Structure and Properties of New Tung Oil-Styrene-Divinylbenzene Copolymers Prepared by Thermal Polymerization. *Biomacromolecules*, 4: 1018-1025 (2003).
- Martucci, JF, Relación estructura propiedades en materiales basados en gelatina, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, INTEMA (2008).
- Masaro, L.; Zhu, X. X. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels, and solids. *Progress in Polymer Science*, 24: 731. (1999).
- Mastromatteo, M.; Barbuzzi, G.; Conte, A.; Del Nobile M.A. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 222–227 (2009).
- Monedero, F. M.; Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*, 91: 509–515 (2009).
- Mosiewicki, M. A. Casado, U. Marcovich, N. E. Aranguren, M. I. Polyurethanes from tung oil: polymer characterization and composites, *Polymer Engineering & Science*. ISSN 0032-3888, 49 (4): 685-692 (2009).
- Mossel, D., Moreno García, B., 1985. *Microbiología de alimentos*. Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 214–272.
- Mouzakis, D. E.; Harmia, T.; Karger-Kocsis, Fracture behavior of discontinuous long glass fiber reinforced injection molded polypropylene. *J. Polym Polym Comp*, 8: 167-175 (2000).
- Nashed, G.; Rutgers, R. P. G.; Sopade, P. A., The Plasticization effect of glycerol and water on the gelatinization of wheat starch. *Starch*, 55:31 (2003).
- Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L., Effects of additives on the mechanical

- properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*, 43: 5417–5425 (2002).
- Peleg M. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.*, 53: 1216-1219 (1988).
- Ponce, A., Fritz, R., Del Valle, C., Roura, S., Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT* 36: 679–684 (2003).
- Prodpran T., Benjakul, S.; Artharn A.; Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 605–614 (2007).
- Siew, D. C. W.; Heilmann, C.; Easteal, A. J.; Cooney, R. P. Solution and film properties of sodium caseinate/glycerol and sodium caseinate/poly(ethylene glycol) edible coating systems. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3432–3440 (1999).
- Tanabe, T.; Okitsu, N.; Tachibana A.; Yamauchi, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials*, 23: 817-825 (2002).
- Urbanski, J. *Handbook of Analysis of Synthetic Polymers and Plastics*, Editors J. Urbanski., W. Czerwinski, K. Janicka, F. Majewska, H. Zowall, John Wiley & Sons, Inc., Polonia. (1977).
- Vanin F.M., Sobral P.J.A., Menegalli F.C., Carvalho R.A. , Habitante A.M.Q.B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloid*, 19: 899-907 (2005).
- Zeeman R.; Cross-linking of Collagen-based Materials. Tesis doctoral, Universidad de Twente, (1998).
- Zhang, Y Xue, C Xue, Y Gao, R y Zhang X Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340: 1914–1917 (2005).

Capítulo 3

Caracterización de la matriz

Películas de caseinato de sodio

3.1. Introducción

Características físicas y químicas del caseinato

La leche bovina contiene 3.5% de proteína, incluyendo a las diferentes caseínas y a las proteínas del suero (β lactoglobulinas, α lactoglobulinas, albúmina bovina e inmunoglobulina) (Monogioudi y col., 2009). La caseína bovina no es una proteína homogénea, sino que se compone de cuatro tipos diferentes de moléculas de caseína llamadas α_{s1} (38%), α_{s2} (10%), β (36%) y κ (13%) (Gennadios, 2002; Audic y Chaufer, 2005; Kobori y col., 2009; Guyomarc'h y col., 2009; Pitkowski y col., 2009) y un constituyente minoritario, χ (3%) (Audic y Chaufer, 2005).

La caseína tiene propiedades físicas diferentes de las proteínas fibrosas (como miosina) o globulares típicas. En la Tabla 3.1 se muestra la composición de los principales aminoácidos y los pesos moleculares de las diferentes caseínas.

Tabla 3.1. Composición en aminoácidos (Nº) y masas molares de las distintas fracciones de caseína. (Gennadios, 2002).

Características	α_{s1} -caseína	α_{s2} -caseína	β -caseína	κ -caseína
Residuos de cisteína	0	2	0	2
Residuos de prolina	17	10	35	20
Residuos de fosfato serina	8	11	5	1
Residuos de fenilalanina	8	6	9	4
Residuos de tirosina	10	12	4	9
Residuos de glutamina	24	25	18	12
Residuos de lisina	14	24	11	9
Residuos de aminoácidos totales	199	207	209	169
Masa molar (kDa)	23.6	25.2	24.0	19.0

El caseinato de sodio, obtenido a partir de la precipitación ácida de la caseína, tiene tendencia a formar pequeños agregados con un radio de aproximadamente 11 nm, que contienen alrededor de 15 moléculas (Pitkowski y col., 2009), debido, probablemente, a la asociación de porciones hidrofóbicas de moléculas de caseína, similares a aquellas observadas para las micelas en soluciones jabonosas. Además de estas pequeñas partículas, las soluciones de caseinato de sodio contienen partículas

grandes, con un radio aproximado de 80 nm (Pitkowski y col., 2009). La fracción en peso de esas partículas es muy pequeña.

El caseinato de sodio es completamente soluble en agua a pesar de su alto contenido de aminoácidos no polares (35-45% del total de residuos de aminoácidos). Se pueden preparar soluciones acuosas con concentraciones de caseína de hasta un 20 % p/p a elevadas temperaturas. Esta elevada solubilidad se debe al alto contenido de grupos fosfatos, al bajo nivel de aminoácidos que contienen azufre (cisteína) y al alto contenido de carbohidratos en la fracción κ -caseína (Gennadios, 2002). La solubilidad del caseinato es mínima en el rango de pH de 3.8–4.0 (punto isoeléctrico), ya que en ese intervalo la proteína sufre un cambio conformacional (Barreto y col., 2003) que impide la formación de película, debido a la acción de fuerzas repulsivas intermoleculares (Olabarrieta y col., 2005).

La caseína tiene bajo contenido de azufre (0.8 %) en comparación con otras proteínas, por ej. la proteína del gluten (1.7 %), pero tiene alto contenido de grupos fosfatos, y por eso es que se la denomina “fosfoproteína” (Barreto y col., 2003). Las fracciones más grandes de caseína (α_{s1} y β) no contienen cistina ni cisteína. El bajo contenido de cisteína y, consecuentemente, de puentes disulfuro, resulta en una molécula con una conformación móvil, abierta y flexible, y de tipo *random coil* (ovillo estadístico) (Barreto y col., 2003). Este tipo de estructuras facilitan la formación de películas a través de enlaces intermoleculares de tipo puente de hidrógeno y electrostáticos. La estructura abierta también deja a la proteína más accesible a reacciones enzimáticas, como el entrecruzamiento catalizado por la transglutaminasa y tirosinasa (Monogioudi y col., 2009).

Las caseínas β y κ son proteínas anfipáticas que tienen extremos hidrofóbicos e hidrofílicos, lo cual las hace adecuadas para ser usadas como emulsificantes. Esta característica ayuda a la formación de emulsiones compuestas proteína-lípido estables para recubrimientos de superficies húmedas. Sin embargo, las caseínas son consideradas generalmente hidrofílicas debido a que sus valores de hidrofobicidad son menores que aquellos de la valina (Gennadios, 2002). Entre las distintas fracciones, la β -caseína es la más hidrofóbica y la α_{s2} -caseína es la más hidrofílica.

La caseína tiene poca estructura secundaria o terciaria probablemente debido a su alto contenido de prolina, que rompe las α hélices y las β lámina-plegadas.

Guo y col. (1996) informaron que la viscosidad, hidrofobicidad relativa y capacidad de emulsión del caseinato de sodio, se reducen al calentarlo a 132 °C. Al contrario, la solubilidad y estabilidad de espuma aumentan al calentarlo a la misma temperatura.

Efecto del plastificante sobre las propiedades de las películas

Las proteínas por sí mismas, incluidas la del suero de leche y gluten de trigo, forman películas frágiles debido a la fuerte interacción entre las cadenas de proteínas a través de puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y / o entrecruzamiento por puentes disulfuro (Gennadios, 2002; Kokoszka y col., 2010). Esta fragilidad hace que estas películas no resulten útiles para usarse en envasado. La técnica habitual para reducir la fragilidad de las películas es agregar un plastificante. Los plastificantes son líquidos hidrofílicos de bajo peso molecular que reducen la interacción entre las cadenas de proteínas adyacentes. La plastificación de las proteínas de la leche es un fenómeno complejo que puede explicarse principalmente por la capacidad de las moléculas hidrofílicas de plastificante de compartir puentes de hidrógeno con la red proteica (Mangavel, 2003). El resultado es un aumento del volumen libre y de la movilidad de las cadenas poliméricas, menores resistencia mecánica, temperatura de transición vítrea y propiedades de barrera y películas más flexibles y extensibles (Kokoszka y col., 2010).

Los plastificantes más comúnmente utilizados son los alcoholes poli-funcionales, como el polietilenglicol, glicerol y sorbitol (Kokoszka y col., 2010; Sothornvit y Krochta, 2000; Anker, 1998; McHugh y Krotcha, 1994b; Pommet, 2003; Pouplin y col., 1999; Irissin-Mangata, 2001). El glicerol y el sorbitol se han usado ampliamente y en general se los describe como buenos plastificantes (Audic y Chaufer, 2005; Cheuk-Hang y col., 2005; Siew y col., 1999) debido a su habilidad para reducir la cantidad de puentes de hidrógeno intermoleculares mientras aumenta el espaciado intermolecular y se reduce la resistencia mecánica de las películas.

Fabra y col. (2008) observaron que las películas de caseinato de sodio preparadas con glicerol son más flexibles y deformables que aquellas preparadas con sorbitol, resaltando así el mayor efecto plastificante del glicerol sobre estas películas. Otros autores observaron resultados similares en películas preparadas a partir de proteínas de clara de huevo (Gennadios y col., 1994), proteína de suero de leche (Mc Hugh y Krochta, 1994b), gelatina y almidón soluble (Arvanitoyannis y col., 1997),

proteína miofibrilar de pescado (Cuq y col., 1997), mezclas de caseinato de sodio y almidón soluble (Arvanitoyannis y Biliaderis, 1998), caseína (Chick y Ustunol, 1998) y proteína de soja (Audic y Chaufer, 2005). Este efecto puede deberse a la naturaleza hidrofílica mayor del glicerol cuando se la compara con el sorbitol (el glicerol absorbe más humedad, la cual actúa como plastificante adicional) y al hecho de que la molécula de glicerol sea mucho más chica que la de sorbitol, lo que hace que se inserte más fácilmente entre las cadenas de proteína e interaccione a través de puente de hidrógeno, reduciendo así las interacciones proteicas intermoleculares más eficientemente y aumentando, consecuentemente, el espaciado intermolecular.

Por todo lo anterior, se eligió glicerol como plastificante. El glicerol es un plastificante de alto punto de ebullición (290°C para el glicerol puro, pero disminuye sustancialmente en presencia de agua). Es soluble en agua, polar, no volátil, y miscible con proteínas. También es inocuo, lo cual es importante para las películas que estarán en contacto con alimentos (McHugh y Krochta, 1994b). Estas propiedades hacen del glicerol un plastificante ideal para ser usado con un polímero compatible soluble en agua (Mahmoud y Savello, 1992).

Por otro lado, el aumento en la flexibilidad de la película también es acompañada por un aumento en su permeabilidad al vapor de agua, que depende del tipo y del contenido de plastificante (Mc Hugh y Krochta, 1994b; Sothornvit y Krochta, 2000). Este aumento en la permeabilidad al vapor de agua no es deseable para mantener la calidad de los alimentos, por lo que resulta necesario optimizar el uso de plastificante para obtener un equilibrio correcto de propiedades mecánicas y de barrera, de acuerdo a los requerimientos de la aplicación para la cual se diseña la película (Gennadios, 2002; Ali y col., 1997; Sothornvit y Krochta, 2000; Maté y Krochta, 1996; Gontard, 1993; Irissin-Mangata, 2001; Hernández-Muñoz y Hernández, 2002).

El agua es el plastificante más ubicuo e incontrolable para películas obtenidas a partir de materiales biopoliméricos hidrofílicos, por lo tanto, la humedad relativa ambiental tiene un gran efecto en las propiedades de la película (Gontard y Ring, 1996) y puede explicar porque las películas basadas en proteína se vuelven más frágiles en bajas condiciones de humedad (Kokoszka y col., 2010). El efecto de plastificación y / o hinchamiento por absorción de agua sobre polímeros hidrofílicos (polares) también resulta en un aumento de los valores de permeabilidad al vapor de agua (Gontard, 1996; McHugh y Krochta, 1994b; McHugh y col., 1994).

3.2. Preparación de las películas de caseinato de sodio

Las películas se prepararon de acuerdo al procedimiento habitual de mezclado, colada y evaporación de solvente (técnica de casting) (Lazaridou y Biliaderis, 2002; Fernández Cervera y col., 2004; Zhai y col., 2004; Xu y col., 2005; Bourtoom y Chinnan, 2008; Ziani y col., 2008), de acuerdo a lo explicado en el capítulo 2.

Las películas de caseinato de sodio se prepararon a partir de una disolución del polvo de caseinato en una concentración de proteína del 2.5 % (p/v) en agua destilada, mediante agitación continua durante 3 horas a temperatura ambiente (pH= 6.65). El plastificante (glicerol) se agregó en relaciones en peso glicerol/ proteína (gli/pro) de 0.15, 0.28, 0.37 y 0.5, lo que equivale a relaciones en peso total (gli/(pro+gli)) de 0.13, 0.22, 0.27 y 0.33. Posteriormente se volcaron porciones (35 g) de las distintas soluciones en las placas de Petri (14 cm diámetro) esquematizadas en la figura 2.2.1 (capítulo 2). Finalmente se secaron en estufa de convección a 35 °C por un tiempo aproximado de 12 horas.

Una vez de que el exceso de agua fue evaporado, las películas se acondicionaron en ambientes de humedad relativa (HR) constante, 50 u 80%, dependiendo del ensayo a realizarse.

3.3. Caracterización de las películas de caseinato de sodio

Aspecto macroscópico de las películas de caseinato

La Figura 3.1 muestra el aspecto macroscópico de la película de caseinato de sodio. Se observa que la misma es transparente, homogénea, y sin fisuras o poros macroscópicos. No se observaron cambios en la apariencia de las películas al prepararlas con distintos contenidos de glicerol.

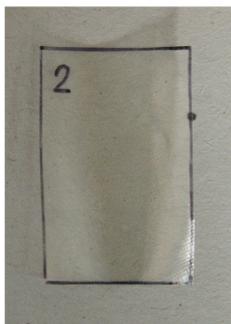


Figura 3.1. Aspecto macroscópico de la película de caseinato.

Para una concentración de proteína constante (2.5% p/p), las películas preparadas con diferente contenido de glicerol mostraron valores similares de espesor, variando entre 89 y 120 μm . Las diferencias en espesor no fueron significativas, por lo que se considera que la relación de glicerol no afecta el espesor de las películas. Gounga y col. (2007) y Schou y col. (2005) tampoco observaron efecto alguno del contenido de glicerol sobre el espesor de las películas proteicas.

Aspecto microscópico de las películas de caseinato

Se observaron la superficie de la cara superior (la que estuvo en contacto con aire durante la formación de la película) y la sección transversal obtenida por fractura criogénica (ruptura frágil, obtenida mediante la fractura del material en aire líquido), de manera de analizar la morfología de los materiales sin haber sido deformados. Las Figuras 3.2 y 3.3 muestran las superficies y las secciones transversales de las películas de caseinato obtenidas con y sin glicerol, respectivamente.

Analizando las Figuras 3.2(a y b) se observan superficies homogéneas, pero se distinguen grandes diferencias en la textura del material. En la película sin glicerol pueden distinguirse zonas caracterizadas por fisuras distribuidas al azar, probablemente debido a la formación de estrías durante el proceso de secado. Características similares han sido previamente observadas en películas de gelatina (Bigi y col., 2001; De Carvalho y Grosso, 2004). La adición de plastificante mejora las superficies volviéndolas mucho más lisas y sin la presencia de imperfecciones.

En las imágenes de la superficie de fractura (Figuras 3.3(a y b)), se observan algunos agujeros muy pequeños en el interior de las películas, que tienen un tamaño aproximado de 200 nm. Estos agujeros no se atribuyen al agregado de glicerol, debido a que también aparecen en las películas de caseinato no plastificadas, con igual tamaño y aspecto. Se presume que deben haber sido formados y atrapados durante la etapa de secado debido a la evaporación del solvente, es decir, agua. Además de estas características, las micrografías obtenidas a tan bajas temperaturas muestran una superficie característica de materiales homogéneos sin deformar.

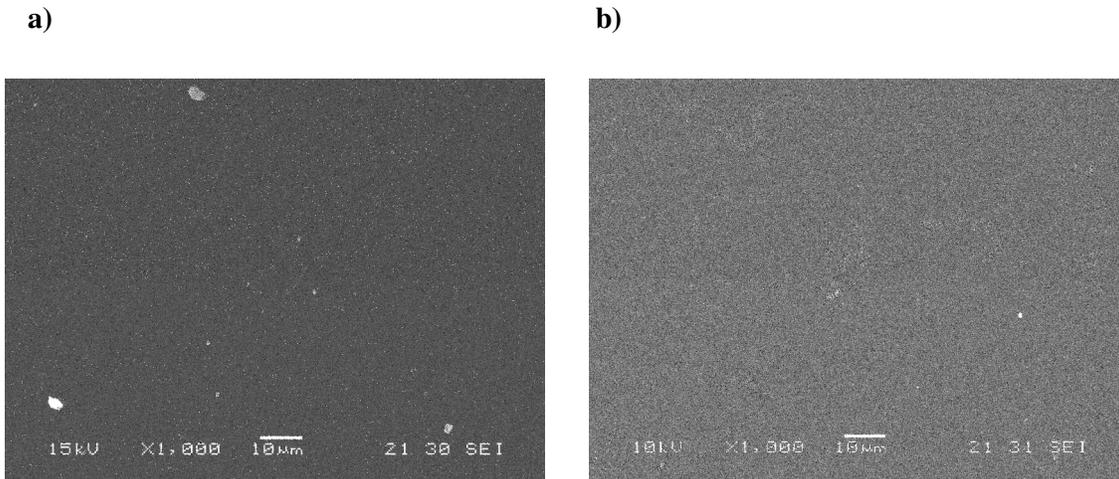


Figura 3.2. Micrografías SEM de la superficie. (a) Películas de caseinato con 50% de glicerol (gli/pro=0.5); (b) películas de caseinato sin glicerol.

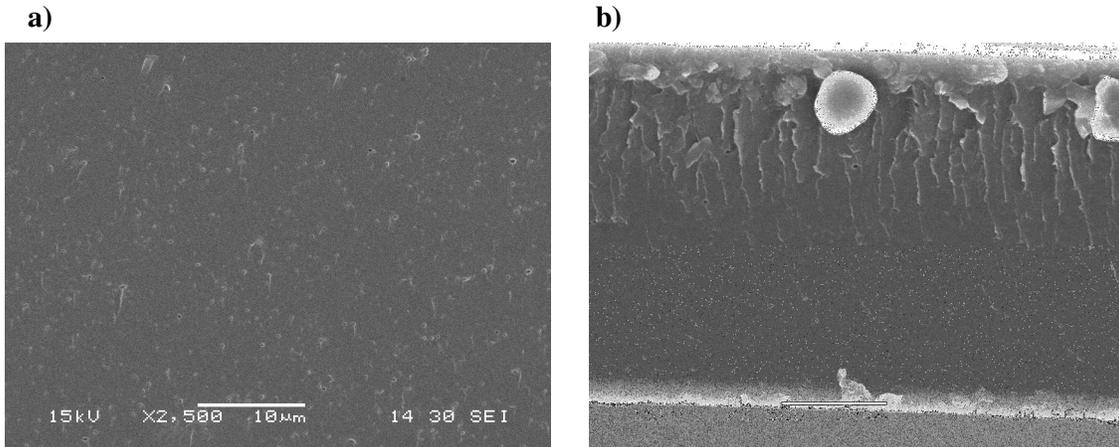


Figura 3.3. Micrografías SEM de la sección transversal obtenida por fractura criogénica. (a) Películas de caseinato con 50% de glicerol (gli/pro=0.5); (b) películas de caseinato sin glicerol.

Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron y analizaron los espectros FTIR del caseinato de sodio en polvo y de las películas preparadas a partir del mismo. La Figura 3.4 muestra los espectros correspondientes al polvo de caseinato y a la película de caseinato preparada sin el agregado de aditivos (plastificantes, biocidas).

La banda de absorción ancha observada en el rango de longitudes de onda de $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ se atribuye al estiramiento de los grupos NH y OH libres y ligados. La presencia de grupos OH y NH en el caseinato de sodio y OH correspondientes al agua adsorbida, son indicaciones claras de la capacidad del caseinato de formar puentes de hidrógeno inter e intramoleculares con los C=O de los aminoácidos (grupos peptídicos y carboxílicos) de la proteína (Barreto y col., 2003).

El espectro del polvo de caseinato de sodio muestra una región de NH ancha, la cual cubre el rango de longitudes de onda de 3400–3520 cm^{-1} , indicando la presencia de grupos NH_2 sin ligar y sugiriendo que no es posible para todos los grupos NH_2 terminales formar puentes de hidrógeno mientras el caseinato se encuentre en el estado de polvo. Esta banda ancha se superpone con las vibraciones de los grupos OH libres o no ligados. Estos hidroxilos pueden provenir, mayoritariamente, del agua retenida en el polvo (Lacroix y col., 2002). En realidad, la banda alrededor de 3450 cm^{-1} aparece en cadenas proteicas aisladas (Guo y col., 1989) y ha sido asignada a grupos NH sin ligar. La banda centrada alrededor de 3300 cm^{-1} ha sido asociada a puentes de hidrógeno intermoleculares aunque, más probablemente, sea originada por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares (Barreto y col., 2003). También se ve una pequeña banda a 3080 cm^{-1} , la cual se asigna a la estructura de NH, probablemente un sobretono de absorción de la banda amida II (Bellamy, 1975).

La región de estiramiento de CH (3000-2800 cm^{-1}) (Barreto y col., 2003) muestra picos correspondientes a CH_2 y CH_3 (2925 y 2965 cm^{-1} , respectivamente), con un pico muy pequeño proviniendo de CH (terciario) a 2876 cm^{-1} .

Los dos espectros muestran bandas en la región de 1600–1500 cm^{-1} , correspondiente a las bandas amida I (estiramiento C=O) y amida II (deformación N-H y estiramiento C-N), comunes a todas las proteínas (Barreto y col., 2003). Se evidencia un claro corrimiento de la banda de amida I desde 1660 cm^{-1} para el polvo de caseinato hasta 1640 cm^{-1} para la película del mismo material, lo que está relacionado con los cambios atribuidos a los puentes de hidrógeno $-\text{NH}----\text{O}=\text{C}$. Un ejemplo relacionado al corrimiento de esta banda debido a los cambios de conformación ha sido discutido en la literatura para poli-l éster benzil glutamato (de 1658 a 1630 cm^{-1})(Bellamy, 1975).

Se observa también la banda a 1450 cm^{-1} asociada a la deformación de CH (Barreto y col., 2003). La banda a 1080 cm^{-1} está formada, aparentemente, por la contribución de las señales de grupos diferentes tales como la flexión de CH fuera de plano (en estructuras aromáticas) y PO_2 o estiramiento de P-OH (en ésteres de fosfatos), el cual está presente en cantidad significativa en el caseinato de sodio, especialmente en los residuos de serina.

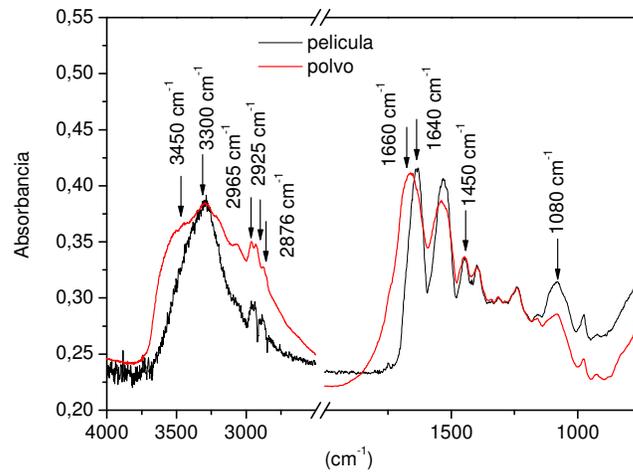


Figura 3.4. Espectros FTIR del polvo de caseinato y de la película preparada a partir de éste (sin glicerol).

Se analizaron también los espectros infrarrojos de las películas de caseinato que contienen un porcentaje gli/pro de 28, y se compararon con los que no tienen plastificante (Figura 3.5(a)). La presencia de glicerol en la formulación no da lugar a la aparición de nuevos picos de absorción; las bandas observadas son aquellas presentes en las películas de caseinato o las provenientes del mismo glicerol (ej. la banda 1111 y a 1045 cm⁻¹ en la Figura 3.5 (a)). Sin embargo, aunque las curvas de IR no sugieren la creación de nuevos tipos de enlaces (Ziani y col., 2008), se observan diferencias en las intensidades de los enlaces existentes. Por ejemplo, se evidencia un incremento en la intensidad de la banda a 3280 cm⁻¹ para las películas conteniendo glicerol, atribuido al aumento de grupos OH libres y ligados mediante puentes de hidrógeno (Barreto y col., 2003) que se produce al aumentar la cantidad de agua libre en el sistema (Bergo y Sobral, 2007). Lo mismo se observó en las películas acondicionadas a mayores humedades relativas (Figura 3.5(b)).

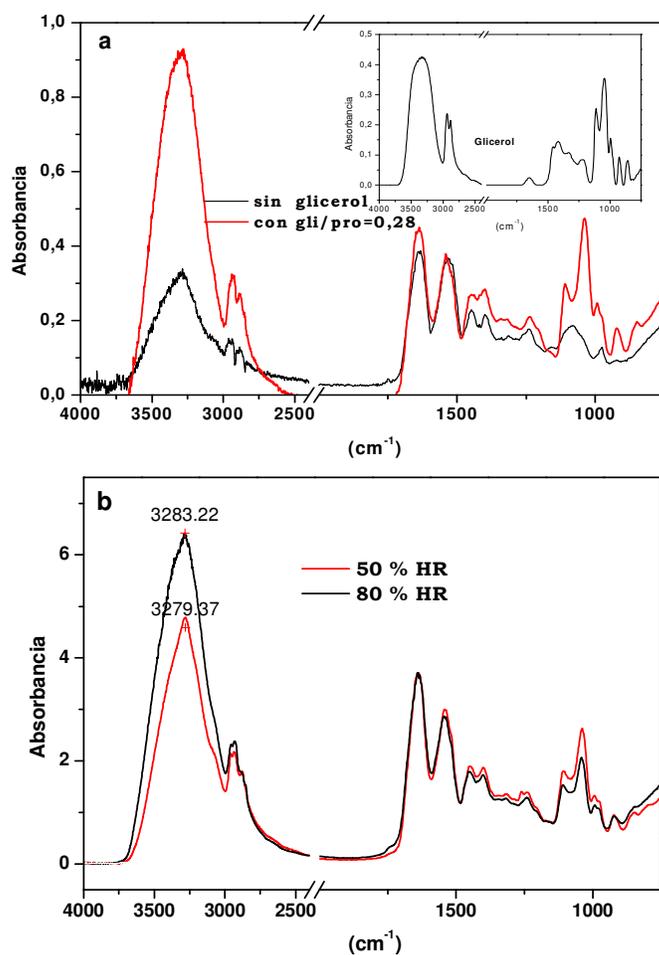


Figura 3.5. Espectros de FTIR de películas de caseinato. a) Con y sin glicerol, acondicionadas a 50 % HR; b) Acondicionadas a 50 y a 80 % HR, con gli/pro=0.28.

Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 3.6 se representan los difractogramas del caseinato de sodio en polvo y de la película. El difractograma de la película es el esperado para proteínas amorfas (Grellec y col., 2001). Por otro lado, tampoco se ve una contribución de fase cristalina en el polvo, lo cual está en concordancia con las características estructurales (ovillo estadístico) de esta proteína.

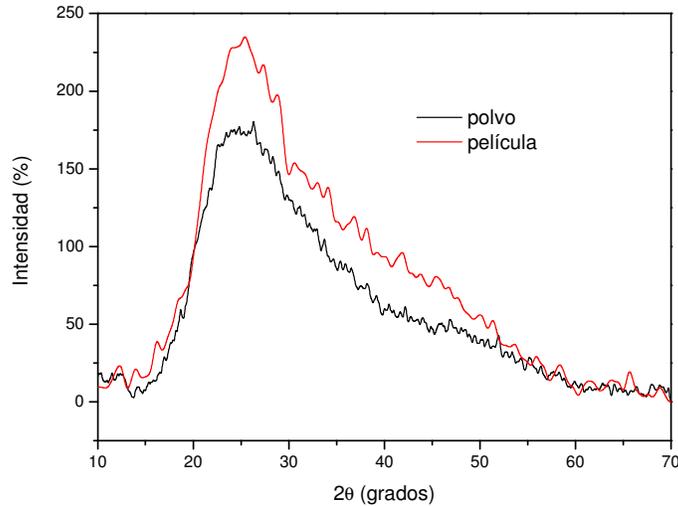


Figura 3.6. DRX del caseinato de sodio en polvo y de la película obtenida a partir de éste.

Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica del caseinato de sodio y de las películas obtenidas a partir del mismo se evaluó mediante análisis termogravimétrico en modo dinámico. En la Figura 3.7 se muestran las curvas de % de masa remanente (Fig 3.7(a)) y de sus respectivas derivadas (Fig. 3.7 (b)) en función de la temperatura, correspondientes al caseinato de sodio en polvo y a las películas obtenidas, sin y con el agregado de glicerol (gli/pro=0.28).

De acuerdo a la literatura (Barreto y col., 2003; Porter y col., 2009) la masa residual de las películas proteicas plastificadas no cambian mucho en el rango de 500 a 900°C, y es por eso que el TGA se finalizó en 500°C. Además, los patrones de degradación térmica de las proteínas resultaron diferentes de los correspondientes a polímeros sintéticos comparables, tales como poliamidas (Porter y col., 2009), con respecto a la cinética del proceso de degradación y la cantidad de residuo carbonoso final. La degradación de las proteínas muestran residuos carbonosos mucho mayores que el valor cero, que es el predicho para los componentes hidrocarbonados y para los grupos amida (Van Krevelen, 1990). El esqueleto amida y las cadenas laterales de hidrocarburos de muchas proteínas tienden a interactuar con su propio tipo debido a las grandes diferencias en sus polaridades, y se ha sugerido que la segregación fuerte de las interacciones por puente hidrógeno entre grupos amida en las proteínas promueve la formación del residuo (Gerrard, 2002).

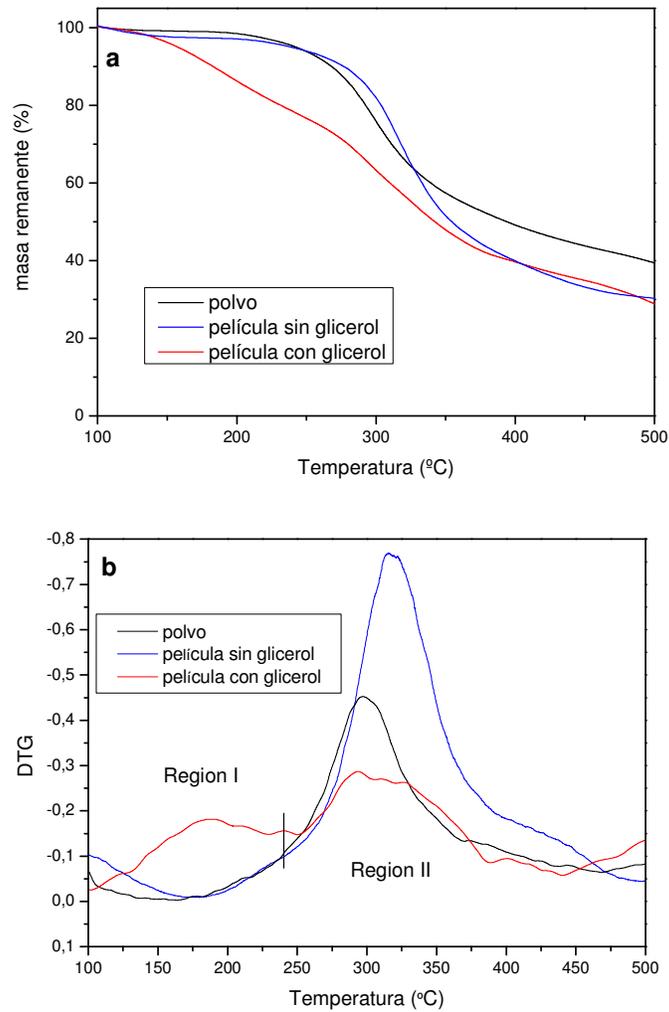


Figura 3.7. Termogramas del caseinato de sodio en polvo y de la película de caseinato con y sin glicerol. (a) Curvas TG; (b) curvas DTG.

La película de caseinato plastificada con glicerol muestra dos etapas principales de pérdida de masa, como fue observado por Barreto y col., (2003) en películas de caseinato de sodio y gelatina plastificadas con sorbitol. La primera región de degradación (Región I) se atribuye a la pérdida de glicerol, por eso es que esta etapa no se evidencia en el polvo de caseinato y la película sin glicerol (Figura 3.7 (b)).

En la Tabla 3.2 se muestran los parámetros termogravimétricos (definidos en el capítulo 2, sección 2.2.10) del polvo y de las películas de caseinato de sodio, determinados a partir de las curvas DTG (figura 3.7 (b)) y las curvas TG (figura 3.7 (a)).

Tabla 3.2. Parámetros termogravimétricos del caseinato en polvo y de la película del mismo material, con y sin el agregado de glicerol.

Parámetros termogravimétricos		Polvo	Película	
			sin glicerol	Gli/pro=0.28
T₀ (°C)		222.9	203.7	144
Región I	T_{d, max} (°C)	--	--	190
(105-240)	Pérdida de peso (%)	4.7	5.1	21.33
Región II	T_{d, max} (°C)	300	316.5	295-327
(240-500)	Pérdida de peso (%)	55.91	64.64	49.83
Residuo sólido (500 ° C)		39.39	30.26	28.84

La segunda etapa de degradación (Región II) está asociada a reacciones de pirólisis de la cadena polipeptídica y es el principal evento térmico (Fraga y Williams 1985; Barreto y col. 2003; Chiellini y col. 2001a). Durante el calentamiento, se destruye gradualmente la estructura inicialmente ordenada de películas comestibles. Esto sucede luego de la ruptura de los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares, los cuales son responsables de mantener orden en las cadenas poliméricas en películas proteicas (Barreto y col., 2003).

La película plastificada comienza a degradarse a una temperatura mucho menor que el polvo y la película sin plastificante (ver Tabla 3.2), lo cual está relacionado a la pérdida del glicerol. La pérdida de peso en la Región I para las película plastificadas corresponde al 21.33 %, cuyo valor está muy cercano al contenido real de glicerol que fue agregado (22% respecto al peso total) al preparar las películas, lo cual reafirma que en esta etapa está involucrada la pérdida del glicerol. Por otra parte, el polvo de caseinato comienza a degradar a mayor temperatura (223 °C) que la película sin glicerol (204°C), y pierde un 56 % de masa en la Región II, sufriendo una degradación similar a la informada para el polvo de gelatina (55 %) por Martucci (2008). La película con glicerol pareciera perder menos masa (49.83 %) que la película sin plastificante (64.64 %) en esta región, sin embargo, al descontar el glicerol en los cálculos, la pérdida de masa es de un 63.3 %, asemejándose a la de la película plastificada.

La película de caseinato plastificada tiene un pico ancho de degradación en comparación al polvo y a la película sin glicerol. Estas dos últimas muestras presentan una curva similar de degradación, mostrando un máximo bien definido a 300 y 316° C, respectivamente. Esto quiere decir que, aunque la película sin glicerol comienza a

degradar a menor temperatura que el polvo, muestra su máximo de degradación a una temperatura mayor.

En cuanto al residuo final a 500° C, la película con glicerol retiene un 28.84 % de su peso, que al ser corregido en base libre de glicerol permite obtener un residuo final cercano al 37 %. Este valor está claramente en el mismo intervalo de resultados obtenidos para la película sin glicerol y para el polvo original usado en la obtención de las películas.

Opacidad

La transparencia es, en gran medida, una propiedad de interés en el estudio de las películas debido a su gran impacto en la apariencia del producto cuando se las utiliza como recubrimientos o envases (Mali y col., 2004).

Con el objetivo de evaluar la transparencia de las películas se midió la opacidad de muestras de caseinato de sodio preparadas con diferentes contenidos de glicerol, y los resultados se muestran en la Tabla 3.3. Valores de opacidad relativamente bajos indican que las películas son transparentes. Además, la opacidad está influenciada por el espesor de las películas, siendo mayor su valor a medida que éste aumenta.

Tabla 3.3. Valores de opacidad de películas de caseinato de sodio con diferentes contenidos de glicerol.

% (gli/pro)	Opacidad (UA*nm)	Espesor (mm)	Opacidad/ espesor (UA*nm*mm⁻¹)
0	154.25± 19.63	0.096±0.028	1695.17± 410.99
28	142.56± 15.55	0.096±0.025	1505.04 ± 150.50
50	125.91± 22.91	0.127± 0.018	990.14± 42.47

Las opacidades experimentales de las películas de caseinato varían entre 103 y 173 Au nm (teniendo en cuenta la dispersión) y muestran una mejor performance que películas de gluten de trigo, medidas por el mismo método (250.4 UA nm, Gontard, 1991). Por otro lado, Mali y col., (2004) encontraron para películas de almidón valores experimentales de opacidad que van desde 85.0 a 111.2 UA nm, con un espesor promedio de 90 µm., resultando en películas ligeramente más transparentes que las de caseinato informadas aquí.

Como se esperaba, las películas de caseinato de sodio con 50 % glicerol son más transparentes (125.91UA nm) que las de menor contenido de glicerol (ver Tabla 3.3). Aunque con mayor espesor promedio, la muestra con mayor contenido de glicerol es la que posee el menor valor de opacidad. Para independizarnos de esta última variable, se compararon los valores de opacidad normalizados por el espesor (ver Tabla 3.3); aún así se observa una reducción del 34 % en los valores de opacidad con respecto a los de la película con 28 % glicerol y de un 42 % con respecto a la película que no contiene plastificante en su formulación.

Propiedades mecánicas en tracción

La Figura 3.8 muestra las curvas tensión nominal vs. deformación, medidas para películas de caseinato de sodio con diferentes relaciones glicerol/proteína (%). A contenidos de glicerol de 0 y 15 %, el comportamiento corresponde al de un material relativamente frágil, que se quiebra fácilmente y se fractura a deformaciones de alrededor de 4 y 13 %, respectivamente. Las películas preparadas con estas concentraciones tan bajas de glicerol no pueden doblarse sin quebrarse, por lo que no cumplirían los requisitos básicos para usarse en embalaje de alimentos.

El cambio más notable en el comportamiento de tracción ocurre al cambiar el contenido de glicerol de 15 a 28 %. Las películas preparadas con una relación gli/pro de 15 % muestran enblanqueamiento (whitening) a partir del punto de fluencia y en la región de concentración de tensiones, lo que se atribuye al desarrollo de microfisuras que dispersan la luz produciendo el efecto de blanqueo macroscópico de la película; al continuarse el ensayo, la muestra, finalmente se rompe. La curva tensión-deformación correspondiente a estas películas presenta una tensión máxima (fluencia); para deformaciones mayores a la de fluencia, la tensión disminuye continuamente hasta la ruptura. Para las películas preparadas con una relación gli/pro del 28 % todavía es posible identificar una tensión de fluencia, pero no ocurre lo mismo con las películas preparadas con 50 % de glicerol, las que tampoco presentan endurecimiento por deformación. Siew y col. (1999) informaron que los plastificantes son efectivos dentro de un intervalo de concentraciones, es decir, poca cantidad de plastificante resulta en películas quebradizas, y demasiado plastificante vuelve a las películas muy pegajosas como para que presenten propiedades mecánicas útiles y fiables.

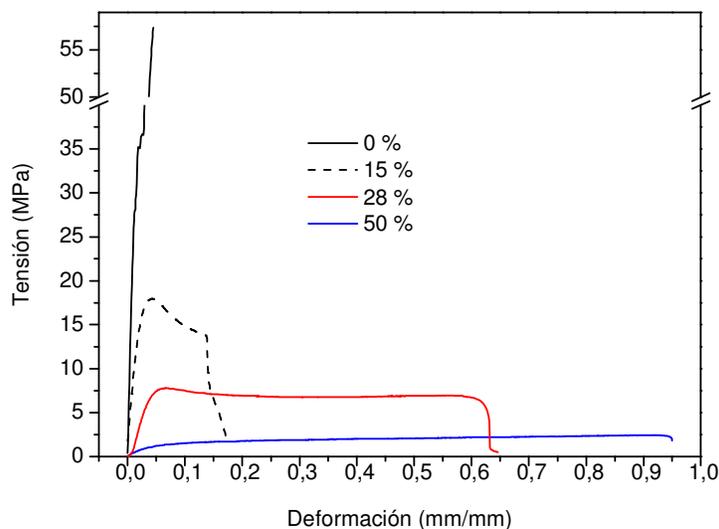


Figura 3.8. Curvas tensión-deformación de películas de caseinato de sodio formuladas con diferentes relaciones gli/pro, acondicionadas a 23 °C y 50% HR.

Claramente, la adición de plastificante reduce el módulo y la tensión máxima en los ensayos de tracción (Siew y col., 1999; Chick y Ustunol, 1998; Tomasula y col., 1998) mientras que mejora considerablemente la deformación última de las películas. Las muestras son menos rígidas y mucho más flexibles con el agregado de glicerol.

La Tabla 3.4 resume los resultados obtenidos en los ensayos de tracción. Cuando se comparan los resultados, se debe recordar que todas las muestras estaban acondicionadas a 50 % HR antes del ensayo, pero, debido a los diferentes contenidos de glicerol, el contenido de humedad en equilibrio de las películas es también distinto. El glicerol es altamente higroscópico y por este motivo, las muestras que contienen más glicerol, absorberán más agua. Es por esto que el efecto plastificante del aditivo se incrementa y el material se comporta de manera más flexible y deformable a contenidos de glicerol mayores.

Tabla 3.4. Propiedades mecánicas en tracción de películas de caseinato de sodio formuladas con diferentes relaciones gli/pro, acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

Gli/ Pro (%)	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
0	2908.0± 121.9	57.0± 0.3	4.0± 0.5
15	802.8± 63.2	13.6± 1.3	11.6± 5.6
28	250.9± 20.3	6.2± 0.2	63.2± 6.0
50	32.5± 4.6	2.4± 0.2	91.6± 15.2

Los valores de las propiedades medidos en este trabajo, son comparables a los informados por Kristo y col. (2008), quienes estudiaron películas de caseinato (4% p/p) con 25% de sorbitol, acondicionadas a 50 % HR, y las ensayaron a 60 mm/min, encontrando valores de módulo de 1100 MPa, tensión de rotura de 30 MPa y elongación última de 12 %. Otros autores han informado también el fuerte efecto de la higroscopicidad del glicerol, y prepararon películas de caseinato con relaciones en peso de glicerol/proteína tan bajo como 8 %. Ellos indican que estos materiales resultaron muy delicados y se rompían durante la manipulación (Schou y col., 2005). Sin embargo, estos problemas desaparecieron usando contenidos en peso de glicerol superiores al 15 %.

Comparando las propiedades con respecto a las de otras películas proteicas, Monedero y col (2010) encontraron que el módulo y la resistencia a la tracción resultaron mayores para películas de caseinato de calcio que para películas proteicas de caseinato de sodio y de soja, mientras que la elongación resultó menor; en otras palabras demostraron que la proteína de soja y el caseinato de sodio proveen estructuras más flexibles en contraste al caseinato de calcio que da origen a películas rígidas y menos flexibles. Este efecto ha sido relacionado con las diferentes interacciones electrostáticas y al entrecruzamiento de calcio entre las cadenas poliméricas, lo cual fortalece la estructura de la matriz.

El caseinato de sodio también tiene un alto potencial de captación de agua, lo que resulta en películas que son muy sensibles a la humedad ambiente (Gennadios, 2002). Como en el caso del glicerol, el agua compite para establecer interacciones por puentes de H y formar interacciones electrostáticas con las cadenas de caseinato, reduciendo las interacciones intermoleculares de la proteína (Schou y col., 2005).

Dado que el agua actúa como plastificante, se analizó su efecto acondicionando las muestras en diferentes condiciones de humedad relativa (HR). La Tabla 3.5 resume los resultados obtenidos en los ensayos de tracción para películas de caseinato de sodio con una relación gli/pro del 28 % y acondicionadas en ambientes con diferentes contenidos de humedad relativa.

Tabla 3.5. Propiedades mecánicas de películas de caseinato de sodio plastificadas con glicerol (gli/pro=0.28) y acondicionadas a diferentes % HR ambiente.

HR (%)	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
40	315.4± 30.8	7.4± 0.5	60.7± 9.8
50	250.9± 20.3	6.2± 0.2	63.2± 6.0
80	52.8± 17.3	4.4± 0.9	101.0± 19.4

La influencia de la humedad en el módulo de tracción y en la tensión a la ruptura es claramente notable, ambos disminuyen cuando la HR aumenta. Por otro lado, la elongación a la ruptura aumenta a medida que aumenta el contenido de humedad. De esta manera, las películas se vuelven más flexibles y extensibles. Este comportamiento es el resultado de la plastificación adicional introducida por el agua. Las moléculas de agua contienen grupos hidroxilo (OH) que interactúan con los grupos amino (NH₂) y carboxilo (COOH) de las proteínas a través de puentes de hidrógeno, afectando el comportamiento mecánico de las películas, dando lugar a materiales con mayor lubricidad molecular (Audic y Chaufer, 2005).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las Figuras 3.9 (a y b) muestran las superficies de fractura de películas de caseinato de sodio (con y sin el agregado de glicerol), acondicionadas a 50 % HR y ensayadas en tracción. Como se esperaba, la apariencia de las superficies de fractura está afectada por el contenido de glicerol de las muestras.

La figura 3.9(a), que tiene mayor contenido de glicerol, muestra los planos de fractura más suavizados, aunque con discontinuidades de fractura superficial más nítidas.

En estas imágenes se dificulta visualizar los pequeños microhuecos que aparecen claramente en las micrografías de fractura a baja temperatura. La deformación del material durante el ensayo de tracción (a temperatura ambiente) dificulta la visión de estas pequeñas imperfecciones en el seno de la película. Sin embargo, alguna de ellas pueden aún ser identificadas y éstas pueden aumentar la probabilidad de falla del material.

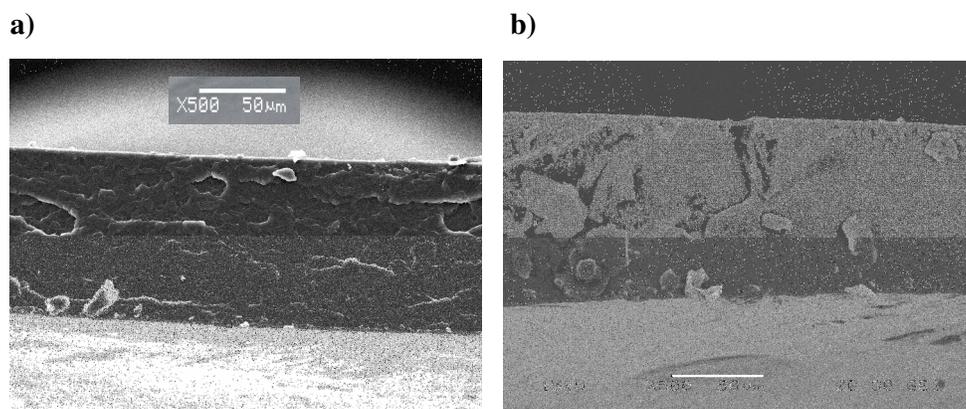


Figura 3.9. Micrográficas SEM de la superficie de fractura en tracción de películas de caseinato acondicionadas a 50 % HR. a) Con 50 % (gli/pro); b) sin glicerol.

Se analizaron también las superficies de fractura en tracción (a temperatura ambiente) de películas con una relación glicerol/proteína de 0.5, acondicionadas en ambientes a 50 y a 80 % de humedad relativa. Las micrográficas se muestran en la figura 3.10(a y b). También en este caso, la superficie de fractura está fuertemente afectada por el contenido de humedad de las películas, siendo el efecto causado por el agua aún mayor que el observado para muestras con distintos contenidos de glicerol.

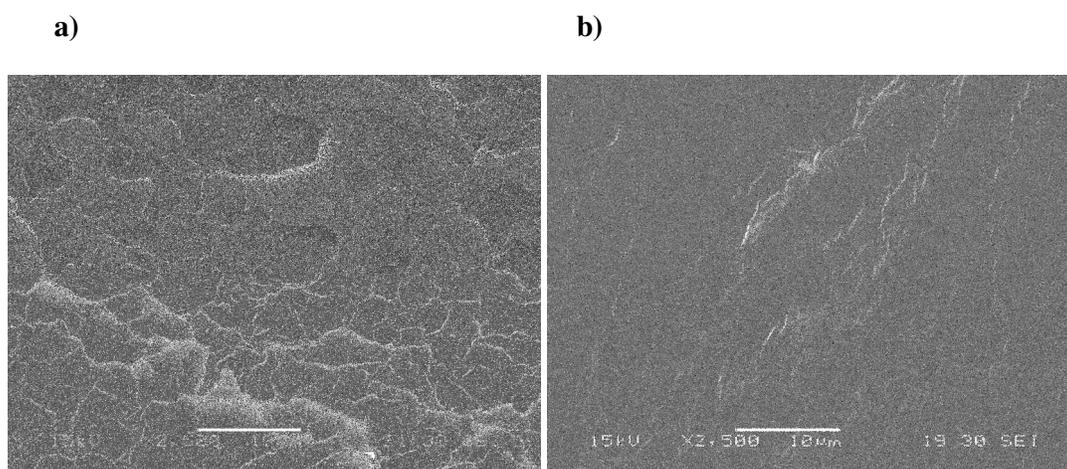


Figura 3.10. Micrográficas SEM de las superficies de fractura en tracción de películas de caseinato de sodio conteniendo glicerol (gli/prot=0.5). (a) Acondicionadas a 50% HR; (b) Acondicionadas a 80% HR.

La Figura 3.10(b) muestra planos de fractura suavizados con respecto a la muestra a 50 % HR. En las películas con menor contenido de humedad, las discontinuidades de fractura superficiales se ven mucho más nítidas, y éstas se vuelven más lisas bajo la acción plastificante de la humedad en el material almacenado a 80 % HR, debido a la relajación rápida del polímero.

Absorción de humedad

Se realizaron estudios de absorción de humedad sobre películas de caseinato de sodio para determinar los efectos de la exposición a ambientes con distintas humedades relativas y de la adición de glicerol.

La Figura 3.11 ilustra las isotermas de absorción de las películas preparadas con una relación constante de gli/pro de 28 % y acondicionadas en ambientes a 50, 75 y 90 % HR. Se observa un aumento en la masa de agua absorbida como función del tiempo de exposición al ambiente húmedo, que se vuelve mucho más notable a medida que aumenta la humedad relativa. El tiempo necesario para alcanzar la humedad de equilibrio resultó ser dependiente de la HR de almacenamiento; las películas acondicionadas a mayores HR necesitan más tiempo para alcanzar el equilibrio, como también fue informado por Mali y col (2005) para películas de almidón. Las muestras acondicionadas en ambientes de 50 y 75 % HR parecen tender hacia un valor de equilibrio para tiempos relativamente largos, mientras que las películas acondicionadas a 90 % RH muestran un aumento sostenido del peso hasta aproximadamente 3000 minutos (2 días) y luego comienzan a perder masa, probablemente por un mecanismo de degradación hidrolítica que se ve acelerado en ambientes muy húmedos. Cabe aclarar que esta última película fue adquiriendo una consistencia de gel a lo largo del ensayo, provocada por el gran hinchamiento debido al ingreso sostenido de agua en la misma y luego de dos semanas de ensayo se observó el crecimiento de hongos en la superficie, lo cual contribuyó a la disminución de masa en esta etapa.

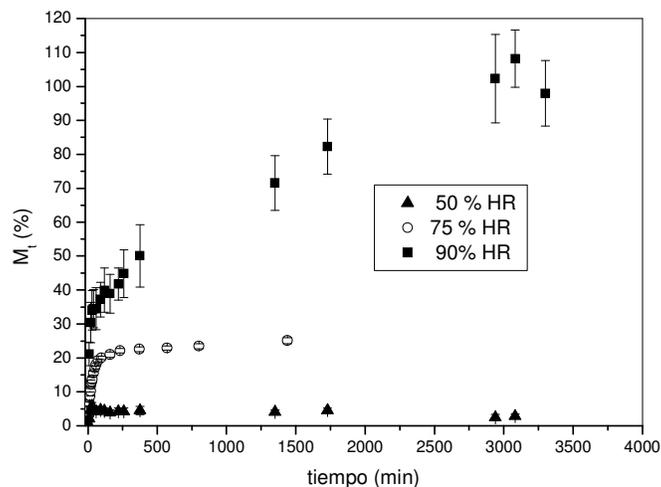


Figura 3.11. Isotermas de absorción de humedad de películas de caseinato de sodio con 28% de glicerol, a 23 °C y acondicionadas en ambientes con distinta HR.

Por otra parte, en el proceso de absorción de humedad en condiciones de alta humedad se pueden observar al menos dos estadios con velocidades de absorción diferentes. El primero de ellos, con una velocidad creciente logarítmica, corresponde al mecanismo de absorción, mientras que en el segundo (de saturación) la velocidad de absorción de agua disminuye gradualmente hasta que se alcanza el contenido máximo de ganancia de agua (equilibrio). See y col (2009) observaron experimentalmente diferentes etapas en la absorción de agua en películas de poliéster modificadas con arcillas (en ese caso particular: absorción, saturación, equilibrio y degradación) en películas de poliéster modificadas con arcillas. La cinética de absorción de humedad depende de la velocidad de difusión y del nivel y velocidad de relajación molecular (Watari y col, 2003). A medida que transcurre el tiempo de exposición en ambiente húmedo y aumenta el contenido de humedad de la muestra, la relajación molecular se vuelve más significativa. Consecuentemente, el máximo contenido de humedad que puede absorber la muestra aumenta gradualmente a medida que el ensayo progresa, debido en parte a la relajación del polímero, hasta que se alcanza el equilibrio final.

Se observa también que la velocidad de absorción inicial se incrementa a medida que lo hace la humedad relativa, lo cual contribuiría a indicar que en ambientes muy húmedos se producen cambios estructurales o conformacionales en la matriz que la vuelven más propensa al transporte de vapor de agua. En estas condiciones, las cadenas proteicas adquieren mayor movilidad debido a la plastificación por agua, lo que les permitiría adquirir una conformación de ovillo más abierta que facilitaría la entrada de vapor de agua al polímero. Aún sabiendo que el proceso es no-Fickeano, se calculó un coeficiente de difusión efectivo de las películas almacenadas en los distintos ambientes, tomando sólo los valores anteriores a 400 minutos. En la Tabla 3.6 se presentan los valores calculados, que, aún teniendo solamente validez comparativa, aumentan con el contenido de humedad del ambiente. Este aumento del coeficiente de difusión con la HR ambiente también se observó en películas de quitosano-PVA (Mucha y col., 2005) y en membranas de poliamida sulfonada, estudiadas por Watari y col. (2003). Por último, y como era de esperar, se observó que el contenido de humedad de equilibrio (EMC) es mayor a medida que la humedad ambiente se incrementa, como también fue informado, entre otros autores, por Mucha y col (2005) para películas de quitosano-PVA acondicionadas en ambientes con distintas HR.

Tabla 3.6. Coeficientes de difusión efectivos y EMC de películas de caseinato acondicionadas en ambientes con distinta HR.

HR (%)	Espesor (mm)	EMC (%)	Modelo Fickiano (ec. 2.2.10)
			$D_{ef} (m^2 s^{-1}) \times 10^{13}$
50	0.081±0.005	2.84± 0.61	2.67± 0.53
75	0.089± 0.016	25.08± 0.87	2.83± 0.73
90	0.096±0.010	102.58± 12.17	7.30± 1.14

Por otro lado, las Figuras 3.12 (a y b), presentan las curvas de absorción de humedad en función del tiempo de películas preparadas con distintas concentraciones de glicerol. Todas las mediciones fueron realizadas a 23 °C y 75 % HR.

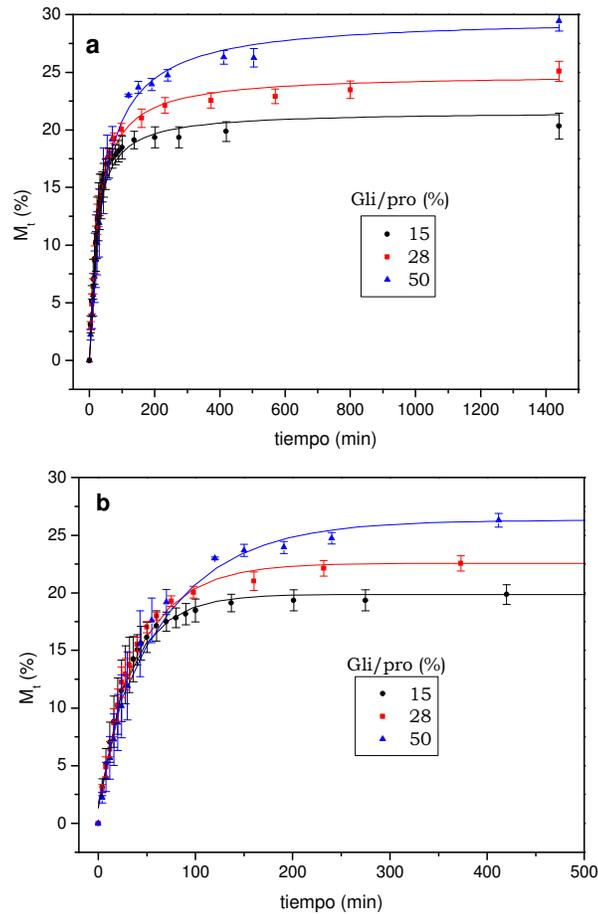


Figura 3.12. Isotermas de absorción de humedad de películas de caseinato de sodio con distinto contenido de glicerol, a 23 °C y 75 % HR. a) Las líneas sólidas representan el ajuste de la ecuación de Peleg (ec. 2.2.9), b) Las líneas sólidas representan el modelo de Fick (ec. 2.2.10).

Análogamente al caso ya discutido (variación de la humedad ambiente), los datos de absorción de humedad experimentales indican que todas las películas muestran una muy rápida velocidad de absorción al inicio del ensayo, seguida de una etapa de absorción de agua mucho más lenta, hasta que se alcanza un contenido de humedad en equilibrio que aumenta a medida que la concentración de plastificante es mayor, debido a la naturaleza hidrofílica del glicerol (ver Figura 3.12(a)). Este valor es una medida del número de sitios de absorción; el agregado de plastificante provee más sitios activos mediante la exposición de sus grupos OH hidrofílicos en los que las moléculas de agua pueden ser absorbidas mediante puentes de H (Mali y col., 2005). Este aumento de la hidrofiliidad con la concentración de plastificante ha sido también observado para diferentes películas proteicas plastificadas con glicerol: proteína del suero de la leche (Mahmoud y Savello, 1992; Coupland y col., 2000), gelatina (Lim y col., 1999) y proteína de soja (Cho y Rhee, 2002); esta última también con similar respuesta si se la plastifica con sorbitol.

El contenido de humedad de equilibrio alcanzado por las muestras se obtuvo por lectura directa a partir de las curvas experimentales (Figura 3.12(a)) y se presentan en la Tabla 3.7. Los valores hallados están en acuerdo con los informados para materiales similares en la literatura. Por ejemplo, Kristo y col (2008) midieron un contenido de humedad de equilibrio (EMC) de 18 % a 75 % HR, para películas de caseinato (4% p/p) con 25 % de sorbitol, cercano al valor de EMC de 25% para las películas de caseinato con gli/pro de 28%.

Los valores de masa de humedad vs. tiempo determinados experimentalmente se ajustaron mediante la ecuación empírica de Peleg (ec. (2.2.9)) sobre el período total de tiempo del ensayo, y los parámetros de ajuste se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión efectivos (D_{ef}) de películas de caseinato con diferentes contenidos de glicerol.

Gli/pro (%)	Espesor (mm)	EMC (%)	Ecuación de Peleg (ec. 2.2.9)			Modelo Fickiano (ec. 2.2.10)
			Parámetros de ajuste			$D_{ef} (m^2 s^{-1}) \times 10^{13}$
			K_1 (min/% peso)	K_2 (% ⁻¹)	R^2	
15	0.011±0.002	21.33±0.57	0.946±0.285	0.0462± 0.001	0.987	5.02± 0.62
28	0.089± 0.016	25.08± 0.87	1.055± 0.198	0.0404± 0.002	0.992	2.83± 0.73
50	0.012±0.003	28.94±1.44	1.495±0.459	0.0335±0.002	0.994	3.31± 0.77

K_1 es una constante relacionada con la transferencia de masa, cuanto menor es K_1 , mayor es la velocidad de absorción de agua inicial; K_2 es una constante relacionada con la capacidad máxima de absorción de agua, cuanto menor es K_2 mayor es la capacidad de absorción. Las películas plastificadas con el mayor contenido de glicerol presentan el menor valor de K_2 y el mayor de K_1 , indicando que poseen la menor velocidad de absorción inicial pero alcanzan el mayor contenido de agua en el equilibrio. Sin embargo Mali y col (2005) y Cho y Rhee (2002) encontraron los menores valores de K_1 y K_2 para películas de almidón y para películas proteicas de soja con el mayor contenido de glicerol, respectivamente. Debemos tener en cuenta que, mientras que la constante K_2 no es afectada por el espesor de las películas, sí lo es la constante K_1 ; y en este modelo la medida del espesor no es una variable que se tenga en cuenta. Debido a que en nuestro caso existe una diferencia en los espesores de las distintas películas (Tabla 3.7), este análisis puede llevar a conclusiones erróneas respecto del proceso de absorción. Por este motivo es que estos mismos datos también se ajustaron a la ecuación 2.2.10, que corresponde al modelo Fickiano, a fin de calcular los coeficientes de difusión efectivos.

La figura 3.12(b) muestra las curvas ajustadas correspondientes a la ecuación 2.2.10 con el contenido de glicerol como parámetro. La concordancia entre los puntos experimentales y las curvas teóricas es buena en las primeras etapas de absorción, pero la predicción del modelo se desvía ligeramente a tiempos largos (no se muestra en la figura). Además, la desviación aumenta a medida que el contenido de glicerol se incrementa. Los últimos datos del ensayo de absorción (que pueden observarse en la Figura 3.12(a)), muestran comportamiento no-Fickiano porque después de un período de tiempo en el cual las muestras parecen alcanzar el equilibrio (desde 300 a 500 minutos), la velocidad de absorción de agua se incrementa nuevamente, aunque proporcionalmente menos que en los primeros estadios de absorción. Debido a esto, el último valor de absorción de agua utilizado en el proceso de ajuste con la ecuación 2.2.10 fue tomado a los 400 minutos. Las difusividades efectivas obtenidas también se reportan en la Tabla 3.7. La película con 15 % de glicerol es la que presenta el mayor valor de D_{ef} , no existiendo una diferencia marcada para las películas con menor contenido de plastificante. Aunque este comportamiento (mayor D_{ef} con menor contenido de glicerol) se contradice con lo que esperábamos, el menor contenido de glicerol y, por consiguiente, la menor movilidad de las cadenas poliméricas, puede llevar a conformaciones de ovillo estadístico diferentes y por consiguiente, la

concentración de grupos polares expuestos será también diferente. Así, estos cambios conformacionales afectarán la probabilidad de establecer interacciones específicas entre el agua y los sitios hidrofílicos del polímero, como se explica más adelante en esta sección.

Como fue previamente mencionado, el modelo de Fick describe el transporte de masa por difusión pura, en el cual la única fuerza impulsora para la entrada del solvente en la matriz es el gradiente de concentración. Sin embargo, la difusión de componentes de bajo peso molecular en polímeros está generalmente gobernada por dos fenómenos que ocurren simultáneamente, el transporte de masa Fickiano y un fenómeno de relajación cuya fuerza impulsora es la desviación del sistema del equilibrio (Del Nobile y col., 1994). Este último comportamiento límite se produce cuando una capa muy fina del polímero se pone en contacto con un líquido que provoca hinchamiento. En este caso, el tiempo de difusión característico es mucho más chico que el tiempo de relajación polimérico; por lo tanto, la relajación polimérica se vuelve el fenómeno limitante controlando la cinética de absorción del soluto (Del Nobile y col., 1994; Watari y col., 2003). Como se mencionó previamente (estudio de absorción en ambientes con distinta HR), al alcanzarse altos contenidos de humedad y dado el suficiente tiempo, las cadenas poliméricas alcanzan un nivel de relajación que da lugar a una conformación más abierta y a la re-aceleración del proceso de absorción de humedad, alcanzándose finalmente un mayor contenido de humedad de equilibrio.

Además, la absorción de agua en polímeros moderadamente hidrofílicos es un fenómeno complejo debido a la presencia de interacciones específicas entre las moléculas de agua y los sitios hidrofílicos del esqueleto polimérico. De hecho, la absorción puede describirse como la combinación de dos mecanismos: las moléculas de agua absorbidas están en parte dispersas al azar dentro de la matriz polimérica y en parte físicamente ligadas a los sitios hidrofílicos (McHugh y Krochta, 1994; Pochat-Bohatier y col., 2006).

Al utilizar la ecuación 2.2.10 (Fick), se asume que el coeficiente de difusión depende sólo de la temperatura (difusión Fickiana ideal); sin embargo, en este caso, esta suposición puede no cumplirse estrictamente debido a las interacciones específicas entre el polímero y las moléculas de agua. Estas interacciones fueron también encontradas en un estudio previo del grupo sobre difusión de humedad en harina de madera y compuestos derivados (Marcovich y col., 1999). Además, a medida que el agua penetra en polímeros hidrofílicos, se va produciendo cierta plastificación. Este efecto es más

crítico a medida que el contenido de glicerol aumenta. En este sentido, Karbowski y col. (2008), que investigaron la difusión de una molécula de referencia (fluoresceína) introducida en una película biopolimérica de i-carragenina acondicionada a distintas humedades relativas, revelaron el mecanismo de difusión subyacente, encontrando que mientras que la concentración de agua en la película permanece por debajo de un valor crítico, el coeficiente de difusión de la fluoresceína es constante y que, superado ese valor, el mismo aumenta. También encontraron que una fracción de moléculas de fluoresceína es retenida en el seno de la película por interacciones específicas del tipo puente de hidrógeno, y que la misma adquiere movilidad completa cuando la concentración de agua sobrepasa el valor crítico.

En el caso de las películas de caseinato estudiadas, cuando se sobrepasa una concentración de aproximadamente 18-23 % en peso de agua absorbida, dependiendo del contenido de glicerol (de acuerdo a las figuras 3.12 (a y b)), se comienza a ver una aceleración del proceso de absorción de agua, en contraposición con el plateau que podría obtenerse de ser el proceso fickeano. Considerando válidos los razonamientos de Karbowski y col. (2008), este comportamiento podría explicarse considerando que los sitios específicos de interacción con las moléculas de agua que se absorben están ya completamente saturados, es decir, que para estos contenidos de humedad ya se ha superado el valor crítico. Por otro lado, el glicerol probablemente interactúa con grupos similares del polímero y también con el agua, con lo que el efecto se acentúa a medida que la película incorpora más glicerol. Sin embargo también resulta esperable que a medida que aumenta el contenido de plastificante (glicerol y vapor de agua, en este caso) aumente la movilidad de las cadenas proteicas, lo que podría resultar en cambios conformacionales del polímero, resultando en una estructura polimérica más relajada. En otras palabras, la conformación de ovillo estadístico podría ser diferente para distintos contenidos de plastificante y lo que se estaría estudiando sería un material al menos ligeramente diferente en cada punto de la curva.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas de caseinato de sodio con distinto contenido de glicerol, medidos a 23 °C, con un gradiente de humedad relativa de 0-64.5% se muestran en la Figura 3.13. Los valores informados son del mismo orden de magnitud que los datos disponibles en literatura para materiales similares, 8.3×10^{-10} g m/Pa s m² para películas de caseinato de sodio plastificadas con

glicerol (Schou y col., 2005), $10 \pm 0.7 \times 10^{-10}$ g m/Pa s m² para películas de caseinato de sodio plastificadas con sorbitol (Kristo y col., 2008), $10.5-12 \times 10^{-10}$ g m/Pa s m² (Kunte y col., 1997) y $8-8.5 \times 10^{-10}$ g m/Pa s m² (Cho y Rhee, 2004), para películas proteicas de soja; todas ensayadas bajo condiciones similares de temperatura y gradiente de humedad relativa.

Como regla general, la incorporación de plastificantes hidrofílicos en películas de proteínas aumenta la permeabilidad al vapor de agua (Kolodziejska y Piotrowska, 2007). La inclusión de moléculas de glicerol en la red polimérica incrementa el espaciado intermolecular mediante la reducción de interacciones proteína-proteína. El plastificante agregado impide la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas de proteínas, favorece la movilidad de cadenas poliméricas, aumentando el volumen libre y facilitando así la difusión de moléculas de agua a través de la película (Chen, 1995; Kokoszka y col., 2010). Además, debido a la naturaleza hidrofílica del glicerol, este compuesto actúa como humectante, mejorando la capacidad de retención de agua de la matriz polimérica y contribuyendo también a mayores valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas. Existen varias publicaciones que muestran un aumento de la WVP con la adición de polioles u otras moléculas pequeñas en biopolímeros (Biliaderis y col., 1999; Hernández-Muñoz y col., 2003; Kristo y col., 2007; Siew y col., 1999; Sobral y col., 2001).

Se utilizó una ecuación exponencial de dos parámetros para ajustar los datos experimentales (Hernández-Muñoz y col., 2004).

$$WVP = WVP_0 \exp(kx) \quad \text{ec. 3.1}$$

donde x es la concentración de glicerol [g (100 g)^{-1}], k es un parámetro relacionado con eficiencia del glicerol para plastificar la películas, y WVP_0 corresponde al WVP de las películas sin glicerol.

La Figura 3.13 también muestra que los valores de permeabilidad medidos presentan una funcionalidad exponencial con el contenido de glicerol. Este comportamiento también ha sido observado para los WVPs de varias proteínas y polisacáridos plastificados con agua y glicerol (Mc Hugh y col., 1994; Maté y Krochta, 1996; Gontard y col., 1993; Gounga y col., 2007). En el modelado de los resultados experimentales usando la ecuación 3.1, el WVP_0 se mantuvo como parámetro de ajuste debido a la dificultad de medir WVP para películas no plastificadas (materiales frágiles

que se rompen fácilmente y no pueden ser manipulados sin romperse) (Pereda y col., 2008).

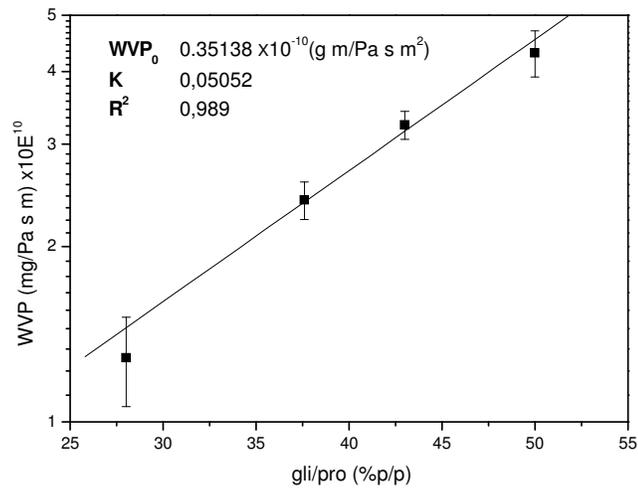


Figura 3.13. WVP en función del contenido de glicerol de películas de caseinato de sodio. (■) valores experimentales y (—) curva modelada.

El valor de k calculado está en el mismo intervalo de valores que los publicados en literatura para bio-películas; por ejemplo, se ha informado un valor de 0.042 para películas de gliadina equilibradas a 75 % HR (Hernández-Muñoz y col., 2004). Como se muestra en la figura 3.13, la simple ecuación 3.1 provee un ajuste al menos aceptable de los valores experimentales.

3.4. Conclusiones

Se prepararon películas de caseinato (con y sin el agregado de glicerol), caracterizadas mediante las técnicas de FTIR, SEM, Rayos X y TGA. También se midieron sus propiedades ópticas, y al tratarse de películas transparentes, presentaron valores de opacidad relativamente bajos y altamente dependientes del espesor.

Las propiedades mecánicas de las películas resultaron afectadas por el contenido de humedad y de glicerol; ambos actúan como plastificantes, reduciendo el módulo y la deformación de ruptura, pero aumentando la deformación última.

Las mediciones de absorción de agua para las películas de caseinato de sodio indicaron que a medida que la concentración de glicerol aumenta, los contenidos de humedad en equilibrio también se incrementan debido a la naturaleza hidrofílica del plastificante, mientras que las velocidades de absorción de humedad resultan similares. Los datos experimentales se ajustaron mediante la ecuación empírica de Peleg cubriendo todo el período del ensayo y con un muy buen ajuste. Por otra parte, se utilizó el modelo de difusión unidimensional de Fick en una lámina para estimar el coeficiente de difusión efectivo. En este caso, se obtuvo una buena concordancia entre las curvas modeladas y los puntos experimentales en las primeras etapas de absorción, pero no a tiempos mayores, lo que fue atribuido a los cambios en la estructura de la matriz debido a la plastificación.

En cuanto a los valores de permeabilidad al vapor de agua mostraron una relación exponencial creciente con el contenido de glicerol, por lo que se analizó este efecto usando una ecuación adecuada de dos parámetros para ajustar los datos experimentales.

En los capítulos siguientes se presentan los resultados obtenidos utilizando la matriz de caseinato plastificada con una relación en peso glicerol/proteína del 28 %. Se seleccionó esa concentración de plastificante debido a que este contenido es suficiente para obtener películas flexibles. A porcentajes menores (15%) las películas son relativamente frágiles y a contenidos mayores (37 y 50 %) las películas presentan excesiva plastificación con propiedades mecánicas, de permeabilidad y absorción de agua pobres en comparación con las que contienen 28 % de glicerol.

3.5. Referencias

- Ali, Y., V.M. Ghorpade, and M.A. Hanna, Properties of thermally-treated wheat gluten films. *Industrial Crops and Products*, 6: 177-184 (1997).
- Anker, M., M. Stading, and A.-M. Hermansson, Mechanical Properties, Water Vapor Permeability, and Moisture Contents of b-Lactoglobulin and Whey Protein Films Using Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5): 1820-1829 (1998).
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., & Yamamoto, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols. Part III. *Food Chemistry*, 60: 593–604 (1997).
- Arvanitoyannis, I., and Biliaderis, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemistry*, 62(3): 333–342 (1998).
- Audic, J. L., Chaufer, B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, 41: 1934–1942 (2005).
- Barreto P.L.M., Pires A.T.N., Soldi V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym. Degrad. Stabil.*, 79: 147–152 (2003).
- Barreto, P.L.M.; Roeder, J.; Crespo, J.S.; Maciel, G.R.; Terenzi, H.; Pires, A.T.N. ; Soldi, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/ sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chemistry*, 82: 425–431 (2003).
- Bellamy, L. J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*; Cambridge UK: Chapman and Hill, University Press, p 226 (1975).
- Bergo, P., & Sobral, P. J. A. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21: 1285–1289 (2007).
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Rubini K., Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatine films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22: 763-768 (2001).
- Biliaderis, C. G., Lazaridou, A., & Arvanitoyannis, I. Glass transition and physical properties of polyol-plasticized pullulan-starch blends at low moisture. *Carbohydrate Polymers*, 40: 29–47 (1999).
- Bourtoom, T.; Chinnan, M. S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (9): 1633-1641 (2008).
- Chen, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal Dairy Science*, 78: 2563-2583 (1995).

- Cheuk-Hang Wan, V., Kim, M.S., y Lee, S.Y. Water vapor permeability and mechanical properties of soy protein isolate edible films composed of different plasticizer combinations. *Journal of Food Science*, 70(6): 387–391 (2005).
- Chick, J., and Ustunol, Z. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*, 63: 1024–1027 (1998).
- Chiellini E., Cinelli P., Grillo Fernandes, Kenawy El Refaye S., Lazzeri A. Gelatin-based blends and composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. *Biomacromolecules*, 2: 806-811(2001a).
- Cho, S. Y.; Rhee, C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *LWT Food Science and Technology*, 35: 151-157 (2002).
- Cho, S. Y., Rhee, C. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *Lebensmitte Wissenschaft und-Technologie*, 37: 833–839 (2004).
- Coupland, J. N.; Shaw, N. B.; Monahan, F. J.; O’Riordan, E. D.; O’Sullivan, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43: 25-30 (2000).
- Cuq, B., Gontard, N., Aymard, C., & Guilbert, S. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. *Polymer Gel Networks*, 5(1): 1–15 (1997).
- De Carvalho R.A., Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloid*, 18: 717-726 (2004).
- Del Nobile, M. A.; Mensitieri, G.; Netti, P. A.; Nicolais, L. Anomalous diffusion in poly-ether-ether-ketone. *Chemical Engineering*, 49: 633–644 (1994).
- Del Nobile, M. A.; Fava, P.; Piergiovanni, L. Water transport properties of cellophane flexible films intended for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 53: 295–300 (2002).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt, A. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85: 393–400 (2008).
- Fernández Cervera, M.; Karjalainen, M.; Airaksinen, S.; Rantanen, J.; Krogars, K.; Heinämäki, J.; Colarte, A. I.; Yliruusi, Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58: 69-76 (2004).
- Fraga A.N., Willimas R.J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer*, 26: 113-118 (1985).
- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L., & Krochta, J. M. Edible coatings and films based on proteins. In J. M. Krochta, E. A. Baldwin, & M. O. Nisperos-Carriedo (Eds.), *Edible*

- coatings and films to improve food quality (pp. 201–277). Lancaster, PA: Technomic Publishing (1994).
- Gennadios, A., Protein-based Films and Coatings, ed. A. Gennadios: CRC Press LLC, USA. (2002).
- Gerrard JA, Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. Trends in Food Science Technology, 13: 391–399 (2002).
- Gontard, N Films et enrobages comestibles: Étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten. Montpellier. Tese (Doutorado)— Biochimie, Biologie Cellulaire et Moleculaire— Science des Aliments, Universite´ Montpellier II, França (1991).
- Gontard, N., S. Guilbert, and J.L. Cuq, 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(1993).
- Gontard, N. Thubault, R.; Cuq, B. & Guilbert, S., Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(4): 1064-9 (1996).
- Gontard, N. y Ring, S. Edible Wheat Gluten Film: Influence of Water Content on Glass Transition Temperature. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(11): 3474-3478 (1996).
- Gounga, M. E.; Xu, S.; Wang, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. Journal of Food Engineering, 83: 521–530 (2007).
- Grevellec J.I., Marquie C., Ferry L., Crespy A., Vialettes V. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. Biomacromolecules, 2: 1104-1109 (2001).
- Guo, M.; Fox, P. F.; Flynn, A.; Mahammad, K. S. Heat-induced changes in sodium caseinate. Journal Dairy Research, 56: 503-512 (1989).
- Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A., & Kindstedt, P. S.. Heat induced modifications of the functional properties of sodium caseinate. International Dairy Journal, 6: 473–483 (1996).
- Guyomarc’h, F.; Nono, M.; Nicolai, T.; Durand, D., Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of k-casein or sodium caseinate. Food Hydrocolloids, 23: 1103–1110 (2009).
- Hernández-Muñoz, P. y Hernández R.J. Effect of Storage and Hydrophilic Plasticizers on Functional Properties of Wheat Gluten Glutenin Fraction Films. In Worldpak2002, 13th Proc IAPRI Conf. (2002).
- Hernández-Muñoz, P., Kanavouras, A., Perry, K. W. N., & Gavara, R. Development and characterization of biodegradable films made from wheat gluten protein fractions. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51: 7647–7654 (2003).

- Hernández-Muñoz, P.; López-Rubio, A.; Lagarón, J. M.; Gavara, R. Formaldehyde Cross-Linking of Gliadin Films: Effects on Mechanical and Water Barrier Properties, *Biomacromolecules*, 5: 415-421 (2004).
- Irissin-Mangata, J.; Bauduin, G.; Boutevin, B.; Gontard, N. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, 37(8): 1533-1541 (2001).
- Karbowiak, T.; Gougeon, R. D.; Rigole, S.; Delmotte, L; Debeaufort, F; and Voilley, A Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. *Food Chemistry*, 106: 1340–1349 (2008).
- Kobori, T. Matsumoto, A. Sugiyama S. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75: 719–723 (2009).
- Kokoszka, S. Debeaufort, F. Lenart, A., Voilley, A. Water vapor permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films *International Dairy Journal* 20: 53–60 (2010).
- Kolodziejska, I.; Piotrowska, B. The water vapor permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, 103: 295-300 (2007).
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Zampraka, A.. Water vapor barrier and tensile properties of composite caseinate–pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101: 753–764 (2007).
- Kristo, E; Koutsoumanis, K P.; Biliaderis C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22: 373–386 (2008).
- Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppet, S. L., Hanna, M. A., & Weller, C. L. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74: 115–118 (1997).
- Lacroix, M. Lea, T.C Ouattaraa, B. Yua, H. Letendrea, M. Sabatoc, S.F. Mateescub, M.A. Patterson G. Use of g-irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functionals characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*, 63: 827–832 (2002).
- Lazaridou, A.; Biliaderis, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan- starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate polymers*, 48: 179-190 (2002).
- Lim, L. T.; Mine, Y.; Tung, M. A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature, and glycerol content. *Journal of Food Science*, 64: 616–622 (1999).
- Mahmoud, R.; Savello, P. A. Mechanical Properties of and Water Vapor Transferability through Whey Protein Films. *Journal of Dairy Science*, 75: 942-946 (1992).

- Mali, S.; Grossmann, M. V. E; García, M. A.; Martino M. N., Zaritzky, N. E., Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate polymers*, 56: 129–135 (2004).
- Mali S. Sakanaka, L.S.; Yamashita, F. Grossmann M.V.E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect *Carbohydrate Polymers* 60 283–289 (2005).
- Mangavel, C., Barbot, J. Guéguen, J. y Popineau Y. Molecular Determinants of the Influence of Hydrophilic Plasticizers on the Mechanical Properties of Cast Wheat Gluten Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5): 1447-1452 (2003).
- Marcovich, N E., Reboredo, M M., Aranguren, M I. Moisture diffusion in polyester - woodflour composites. *Polymer*, 40(26): 7313-7320 (1999).
- Martucci, JF, Relación estructura propiedades en materiales basados en gelatina, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, INTEMA (2008).
- Maté, J.I. and J.M. Krochta, Comparison of Oxygen and Water Vapor Permeabilities of Whey Protein Isolate and beta-Lactoglobulin Edible Films. *J. Agric. Food Chem.*, 44(10): 3001-3004 (1996).
- McHugh, T.H., J.-F. Aujard, and J.M. Krochta, Plasticized Whey Protein Edible Films: Water Vapor Permeability Properties. *Journal of Food Science*, 59(2): 416-419 (1994).
- Mc Hugh, T. H., & Krochta, J. M. Sorbitol vs. glycerol plasticized whey protein edible film: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4): 841–845 (1994b).
- McHugh, T. H.; Krochta, J. M. Milk protein-based edible films and coatings. *Food Technology*, 48: 97-103 (1994).
- Monedero, F. M.; Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of calcium and sodium caseinate on physical characteristics of soy protein isolate–lipid films *Journal of Food Engineering* 97: 228–234 (2010).
- Mucha M.; Ludwiczak, S., Kawinska M., Kinetics of water sorption by chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol) *Carbohydrate Polymers* 62: 42–49 (2005).
- Olabarrieta I. Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films. Tesis doctoral. Universidad de Estocolmo (2005).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. Characterization of chitosan/ caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107: 1080 (2008).
- Pitkowski, A.; Nicolai, T.; Durand, Dominique, Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*, 23: 1164–1168 (2009).
- Pochat-Bohatier C. , Sanchez J., Gontard N. Influence of relative humidity on carbon dioxide sorption in wheat gluten films *Journal of Food Engineering* 77 (2006) 983–991(2006).

- Porter, D.; Vollrath, F.; Tian, K.; Chen, X.; Shao, Z. A kinetic model for thermal degradation in polymers with specific application to proteins. *Polymer*, 50: 1814-1818 (2009).
- Pouplin, M., A. Redl, and N. Gontard, Glass Transition of Wheat Gluten Plasticized with Water, Glycerol, or Sorbitol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2): 538-543 (1999).
- Schou, M.; Longares, A.; Montesinos-Herrero, C.; Monahan, F. J.; O'Riordan, D.; O'Sullivan, M. Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT Food Science and Technology*, 38: 605- 610 (2005).
- See S.C.; Zhang, Z.Y. Richardson M.O.W. A study of water absorption characteristics of a novel nano-gelcoat for marine application *Progress in Organic Coatings* 65: 169-174 (2009).
- Siew, D. C. W., Heilmann, C., Easteal, A. J., y Cooney, R. P. Solution and Film Properties of Sodium Caseinate/Glycerol and Sodium Caseinate/Polyethylene Glycol Edible Coating Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3432-3440 (1999).
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15: 423-432 (2001).
- Sothornvit, R. y J.M. Krochta, Oxygen Permeability and Mechanical Properties of Films from Hydrolyzed Whey Protein. *J. Agric. Food Chem*, 48(9): 3913-3916 (2000).
- Sothornvit, R. y J.M. Krochta, Plasticizer Effect on Oxygen Permeability of b- Lactoglobulin Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12): 6298-6302 (2000).
- Tomasula, P.M., Parris, N., Yee, W. and Coffin, D.R., Properties of films made from CO₂-Precipitated casein. *J Agric. Food. Chem.*, 46: 4470-4474 (1998).
- Van Krevelen, D. W. *Properties of Polymers*, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam; Chapter 20-21 (1990).
- Watari T. Wang H., Kuwahara K., Tanaka, K. Kita, H.; Okamoto K.-i. Water vapor sorption and diffusion properties of sulfonated polyimide membranes. *Journal of Membrane Science* 219: 137-147 (2003).
- Xu, Y. X.; Kim, K. M.; Hanna, M. A.; Nag, D. Chitosan- starch composite film: preparation and characterization. *Industrial crops and products*, 21(2): 185-192 (2005).
- Zhai, M.; Zhao, L.; Kume, T. Study on antibacterial starch/ chitosan blend film formed under the action of irradiation. *Carbohydrate polymers*, 57: 83-88 (2004).
- Ziani, K; Oses, J; Coma, V; Mate J I. 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: 2159-2165 (2008).

Capítulo 4

Películas entrecruzadas de caseinato de sodio

4.1. Introducción

Las películas proteicas son generalmente efectivas como barrera a los lípidos, al oxígeno y a los aromas, en condiciones de baja a moderada humedad relativa (HR) (Rhim y col., 1998; Jayakrishnan y Jameela, 1996). Sin embargo, debido a la hidrofiliidad inherente de las proteínas y a las cantidades substanciales de plastificantes higroscópicos que deben ser agregados para permitir la manipulación del material, se obtienen películas proteicas con propiedades de barrera al vapor de agua muy pobres (Rhim y col., 1998; Vachon y col., 2000).

Entre las alternativas para lograr una estructura de matriz polimérica más fuerte, que se traduciría en una mejora en las propiedades funcionales de las películas (De Carvalho y Grosso, 2004), el entrecruzamiento de cadenas poliméricas es una de las más utilizadas. La introducción de entrecruzamientos dentro de una misma cadena proteica (enlaces intramoleculares) o entre distintas cadenas de proteínas (enlaces intermoleculares) puede lograrse, en principio, de tres maneras diferentes: utilizando tratamientos físicos (calor o radiación), químicos (agregando al sistema agentes de entrecruzamiento como el glutaraldehído) o enzimáticos (utilizando enzimas como la transglutaminasa) (Gerrard, 2002; Han y col., 2009). La mayoría de estas modificaciones se realizan como *pre-tratamientos*, es decir que los cambios en la formulación se introducen en la solución formadora de la película, aunque pero algunos se aplican como *pos-tratamientos*, es decir que se aplican sobre la película ya obtenida (Micard y col., 2000).

Se denomina termocondensación al entrecruzamiento mediante los grupos sulfidrilos de la cisteína por efecto del calor (Han y col., 2009). Las proteínas tienen la habilidad de formar puentes disulfuro intermoleculares durante el tratamiento térmico, siendo este uno de los enlaces covalentes más comunes y mejor caracterizados en proteínas (Maté y Krotcha, 1996; Gerrard, 2002). Estos puentes se forman a partir de reacciones de intercambio tiol-disulfuro y mediante el acoplamiento oxidativo de los grupos tiol de dos residuos de cisteína adyacentes dentro de una matriz proteica (Han y col., 2009). Un oxidante adecuado acepta los átomos de hidrógeno de los grupos tiol de los residuos de cisteína, produciendo entrecruzamientos disulfuro (Gerrard, 2002). El calentamiento de la proteína es esencial para la formación de puentes disulfuro intermoleculares que ayuden al establecimiento de una estructura de red polimérica

entrecruzada y, de acuerdo a Zinoviadou y col. (2009), es un proceso necesario para obtener películas flexibles que retengan su integridad estructural en ambientes de alta humedad. Varios autores han aplicado tratamientos térmicos sobre películas proteicas; por ejemplo Gennadios y col. (1996) mostraron mejoras en las propiedades de barrera a la humedad de películas proteicas de soja, Pérez Gago y col. (1999) informaron que películas proteicas de suero sometidas a calentamiento tenían mayores propiedades mecánicas que las correspondientes a las películas sin tratar, y otros estudios han mostrado que el tratamiento térmico mejora la dureza mecánica y la resistencia a la humedad de películas proteicas de gluten de trigo, proteína del suero y proteína de soja (Gennadios y col., 1996; Ali y col., 1997; Miller y col., 1997; Kim y col., 2002; Rhim y col., 2000). Estos resultados sugieren que el entrecruzamiento covalente, causado por tratamiento térmico, es una excelente alternativa para incrementar la insolubilidad en agua y la respuesta mecánica de películas basadas en proteínas, lo que brinda nuevas oportunidades para usos innovativos en la protección y preservación de alimentos (Kim y col., 2002).

Los aldehídos como formaldehído, glutaraldehído y glioxal también promueven entrecruzamientos inter e intra-moleculares en las proteínas (Rhim y col., 1998). Entre los agentes químicos que pueden utilizarse para entrecruzar una matriz proteica, el glutaraldehído (**GTA**) tiene la ventaja de reaccionar en forma relativamente rápida con un gran número de los grupos amino presentes en la molécula, uniendo covalentemente las cadenas de proteína. (Jayakrishnan y Jameela, 1996). Además, entre los agentes de entrecruzamiento químicos, el GTA es el más utilizado debido a su alta eficiencia en la estabilización de los materiales basados en proteína (especialmente colágeno) (Khor, 1997; Bigi y col., 2001; Han y col., 2009), su bajo precio, disponibilidad inmediata y su elevada solubilidad en soluciones acuosas (Jayakrishnan y Jameela, 1996).

El entrecruzamiento con glutaraldehído ha sido clínicamente aceptado y tiene ciertas ventajas a pesar de su citotoxicidad (Wisseemann y Jacobson, 1985; Jayakrishnan y Jameela, 1996) y de la coloración anaranjada característica de la formación de bases de Schiff, que otorga a las películas (Bigi y col., 1998; Zeeman, 1998; Bigi y col., 2002; De Carvalho y Grosso, 2004). Dado que la toxicidad del GTA parece estar relacionada con su liberación desde el material, Bigi y col (2001) realizaron estudios para su medición, a partir de los cuales determinaron que ésta no ocurre en las películas preparadas con concentraciones de entrecruzante inferiores al 1.5 % p/p. Sin embargo, Rhim y col., (1998) afirman que la toxicidad inherente de los aldehídos restringe su uso

a películas y recubrimientos proteicos que no se utilicen en aplicaciones comestibles. En forma contradictoria Han y col (2009) establecen que el glutaraldehído tiene la aprobación GRAS (generalmente reconocido como seguro) de la “U.S. Food and Drug Administration”, FDA (2006) para uso como aditivo alimentario en Estados Unidos de América. Independientemente del criterio adoptado, las películas proteicas entrecruzadas con GTA pueden ser usadas en embalajes y recubrimientos de productos no alimenticios, tales como envases para flores frescas y abono agrícola. En estas aplicaciones, la utilización de materiales de envase bioderivados puede aumentar el valor agregado del producto (Hernández-Muñoz y col., 2004). Por otro lado, y a pesar de la elevada cantidad de artículos científicos sobre películas proteína-glutaraldehído (Bigi y col., 1998; Bigi y col., 2001; Bigi y col., 2004; Martucci y col. 2006; Chatterji, 1989), no se dispone de información sobre el efecto del entrecruzamiento químico con glutaraldehído sobre películas de caseinato.

Por lo anterior, el objetivo de este capítulo es desarrollar y caracterizar películas de caseinato de sodio entrecruzadas mediante un tratamiento térmico y otro químico (usando glutaraldehído), y evaluar sus propiedades.

Solución de glutaraldehído

La solución acuosa de glutaraldehído consiste en una mezcla de aldehído libre, glutaraldehído monomérico mono y dihidratado, hemiacetales cíclicos mono y poliméricos y varios polímeros $\alpha\beta$ insaturados generados por auto-condensación aldólica durante el almacenamiento (Jayakrishnan y Jameela, 1996; Zeeman, 1998; Gennadios, 2002; Orliac y col., 2002), los cuales pueden incluir hasta ocho moléculas de glutaraldehído elementales (Korn y col., 1972; Marquié y Gilbert, 2002). El glutaraldehído libre (a), el hemiacetal cíclico monomérico (b) y los oligómeros del hemiacetal cíclico (c) están en equilibrio entre sí (Figura 4.1). El contenido de aldehído libre en la solución de glutaraldehído es, comúnmente, no mayor al 4%, debido a la facilidad de hidratación y ciclación (Olde Damink y col., 1995; Jayakrishnan y Jameela, 1996).

La velocidad de polimerización del glutaraldehído en solución acuosa es dependiente de la concentración, pH y temperatura. Algunos estudios han mostrado que el glutaraldehído libre puede polimerizar más rápidamente a pH alcalino para dar lugar a productos insaturados (Figura 4.2), pero cierto grado de polimerización puede observarse aún a pH 5 (Jayakrishnan y Jameela, 1996; Marquié y Guilbert, 2002).

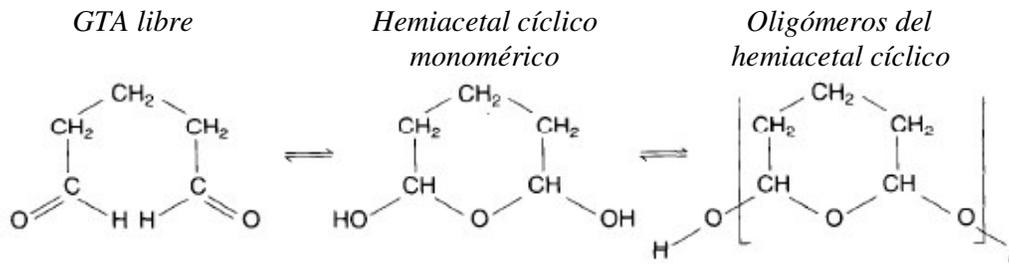


Figura 4.1. Equilibrio del glutaraldehído en solución acuosa.

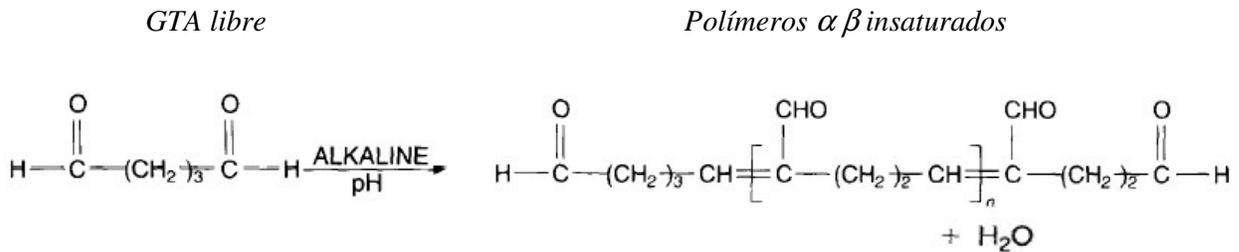


Figura 4.2. Polimerización del glutaraldehído acuoso en pH alcalino.

Reacción de entrecruzamiento de proteínas con GTA

La reacción de entrecruzamiento de proteínas con GTA ha sido ampliamente estudiada (Jayakrishnan y Jameela, 1996; Marquí y col., 1997; Zeeman, 1998; Marquí y Gilbert, 2002); aún así, el mecanismo de reacción es muy complejo y no está completamente dilucidado.

El glutaraldehído polimerizado reacciona principalmente con los grupos amino libres que provienen de los aminoácidos básicos (lisina en el caseinato) y de los aminoácidos terminales de la proteína, de acuerdo al esquema en la Figura 4.3, pero también reacciona con otros grupos nucleofílicos en proteínas, como los grupos carboxilos, amido, el grupo sulfidrilo de la cisteína, el anillo imidazol de la histidina y el grupo hidroxilo fenólico de la tirosina (Jayakrishnan y Jameela, 1996; Han y col., 2009). Se cree que el glutaraldehído entrecruza las cadenas poliméricas de manera inter e intramolecular mediante la formación de enlaces covalentes. Esto puede ocurrir de dos maneras: formación de un enlace aldimina (-C=N-) (base de Schiff) mediante la reacción de un grupo aldehído del GTA con un grupo amino de la lisina (Jayakrishnan y Jameela, 1996; Hernández-Muñoz y col., 2004) (ver Figura 4.3), o una condensación aldólica entre dos aldehídos adyacentes. La unión que da lugar a la base de Schiff no es un enlace estable, mientras que sí lo es el producto de condensación aldólica.

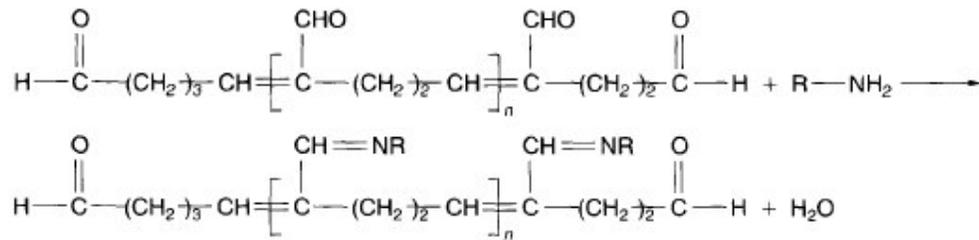


Figura 4.3. Reacción de glutaraldehído polimerizado con aminas primarias.

Las fracciones de aldehídos conjugados en el polímero (pero no en el monómero) dan origen a productos de reacción estables, mientras que los derivados de monoglutaraldehído (sin grupos insaturados) dan lugar a productos hidrolizables lábiles. Debido a que aún a pH 5 las soluciones acuosas de glutaraldehído contienen fracciones poliméricas, el glutaraldehído acuoso reacciona con los grupos amino como un polímero insaturado para dar lugar a enlaces imino estabilizados (base de Schiff) (Jayakrishnan y Jameela, 1996).

Los polímeros $\alpha \beta$ insaturados, los cuales poseen numerosos grupos funcionales aldehídicos, producen ciertos entrecruzamientos largos y flexibles entre las cadenas proteicas, que aumentan la movilidad molecular y mejoran la accesibilidad de los grupos remanentes en los fragmentos de lisina. La estructura molecular de estos enlaces largos formados entre las cadenas de proteínas entrecruzadas con GTA, separan las moléculas de proteína, disminuyendo las fuerzas intermoleculares (enlaces covalentes y físicos: puentes disulfuro y puentes de H, entre las cadenas de proteínas) a lo largo de la red proteica. Cuando se agregan altas concentraciones molares de GTA a la solución formadora de la película puede aparecer un efecto plastificante debido a un exceso de moléculas de GTA en la red proteica (Gennadios, 2002).

Así, el entrecruzamiento con GTA puede tener dos efectos opuestos: por un lado, el entrecruzamiento de las cadenas proteicas puede llevar a la formación de una red, y por el otro, las uniones formadas por GTA homopolimerizado pueden causar un aumento en el interespaciado entre las cadenas proteicas. Este último efecto puede evitar la formación de los enlaces entre las cadenas proteicas que estabilizan las películas control.

4.2. Preparación de las películas entrecruzadas con GTA

Inicialmente se preparó la solución de caseinato de sodio en una concentración de proteína al 2.5 % (p/v) en agua destilada, mediante agitación continua durante 3 horas a temperatura ambiente y a pH= 6.6, de manera de evitar la autocondensación de GTA que se ve favorecida en condiciones alcalinas (Martucci y col., 2006). A continuación se agregó la solución de GTA (50 % p/v en agua), en cantidades adecuadas para que las películas resultantes contengan relaciones en peso GTA/Cas de 0.03, 0.05 y 0.10, que corresponden a relaciones molares GTA/lisina de 0.61, 1.01 y 2.03, respectivamente. Estas últimas relaciones molares se calcularon considerando que el peso molecular del GTA corresponde a la forma monomérica (PM = 100 g/mol), que la lisina (PM = 144.15 g/mol) es el sitio reactivo primario entre proteínas y aldehídos (Rhim y col., 1998) y que su contenido en el caseinato de sodio es del 8% p/p (Dinnella y col., 2002), lo que corresponde a 12.4 moles de lisina por cada mol de caseinato de sodio. Las soluciones resultantes se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó el plastificante, en una relación en peso de glicerol/ (proteína+ GTA) de 0.28. Las soluciones obtenidas en esta última etapa se volcaron en placas de Petri y se secaron a 35 °C en una estufa con convección forzada de aire durante 10 hs aproximadamente, obteniéndose las distintas películas.

La contracción de las películas y un cambio de color visible acompañan a la reacción entre el GTA y el caseinato, debido a la formación del enlace aldimina (Schiff) (-C=N-). Ambas características se consideraron como indicaciones cualitativas del aumento en el número de puntos de entrecruzamiento en las películas a medida que aumenta la concentración de GTA (Rhim y col., 1998). La Figura 4.4 muestra los cambios en la coloración de las películas: ésta se vuelve más intensa (amarillenta) a medida que el contenido de GTA aumenta, como también observaron otros investigadores (Martucci y col., 2006; Chatterji, 1989; Bigi y col., 2001).

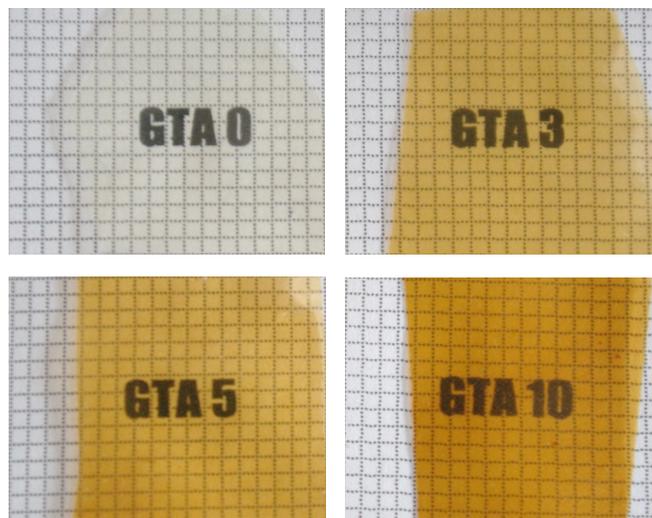


Figura 4.4. Fotografías ópticas de películas de caseinato entrecruzadas con diferente contenido de GTA.

4.3. Caracterización de las películas entrecruzadas

Material soluble total (TSM)

Las películas o envases útiles deben ser capaces de mantener los niveles de humedad adecuados del producto envasado. Además, es importante que si pasa la humedad a la película o envase, no lo disuelva. Por lo tanto, la determinación de la TSM de una película es importante para aplicaciones en envasado de alimentos (Kim y col., 2002).

Se determinó la masa total solubilizada en agua de las películas de caseinato de sodio entrecruzadas con GTA para cuantificar la integridad del material en ambiente acuoso y su grado de entrecruzamiento. Las mediciones de la masa soluble mediante el método SECO (pág. 28, cap. 2) permitieron, además, estudiar el efecto del calentamiento sobre las muestras (secado llevado a cabo a 105°C). Dado que las proteínas son susceptibles al entrecruzamiento inducido por tratamiento térmico (Gennadios y Weller, 1990; Gerrard, 2002; Ali y col., 1997; Pommet y col., 2004), el secado a altas temperaturas que se realiza para determinar el peso seco inicial induce el entrecruzamiento y da como resultado una baja estimación de la TSM real de las películas (Rhim y col., 1998).

La Tabla 4.1 muestra las determinaciones de material soluble total usando, tanto el método SECO como el HÚMEDO (ver Capítulo 2). La reducción de la masa soluble indica un aumento en el porcentaje de entrecruzamiento. Los valores de TSM obtenidos

por el método SECO son menores que los obtenidos por el otro método, para todas las películas analizadas, como fue observado también por otros autores para diferentes películas proteicas (Martucci y Ruseckaite, 2009). Esta diferencia es debida al entrecruzamiento adicional proteína-proteína generado durante el proceso de secado a 105 °C (Micard y col., 2000). Este proceso de calentamiento también fue acompañado por un aumento de la coloración de las películas (más amarillentas), tal como fue indicado por otros autores para películas proteicas de soja (Kim y col., 2002) y de gluten (Micard y col., 2000). Además, la cohesión de la red proteica mejoró luego del proceso de secado a 105°C, probablemente debido a la creación de un gran número de enlaces débiles y fuertes (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y puentes disulfuro) durante el tratamiento térmico, como fue reportado previamente en literatura (Ali y col., 1997; Orliac y col., 2002 y 2003). La diferencia entre los valores obtenidos por los dos métodos disminuye a medida que el porcentaje de GTA aumenta. Esto podría atribuirse a que con el incremento del grado de entrecruzamiento disminuye la movilidad de las cadenas proteicas y, por ende, la disponibilidad/accesibilidad de los grupos reactivos (principalmente los grupos sulfuros).

Tabla 4.1. Material soluble total (TSM) de películas de caseinato entrecruzadas con GTA.

GTA/Cas (%)	Método SECO (%)	Método HUMEDO (%)
0	25.0± 0.8	100.0± 0.0
3	18.5± 1.1	29.9± 5.3
5	15.4± 1.4	25.4± 12.7
10	13.1± 0.8	16.7± 0.4

La fracción soluble en películas de caseinato de sodio entrecruzadas con GTA puede atribuirse principalmente a la pérdida de compuestos de bajo peso molecular, tales como cadenas polipeptídicas de baja masa molar que pueden no haber sido entrecruzadas con el aldehído GTA y también debido a la exudación de glicerol fuera de la película (Micard y col., 2000; Martucci y Ruseckaite, 2009). Orliac y col.(2002, 2003) confirmaron esta última hipótesis reportando que casi todo el glicerol presente en las películas obtenidas por moldeo térmico de la proteína aislada de girasol, fue extraído

mediante la inmersión de las mismas en agua durante 24 horas (Orliac y col., 2002; Orliac y col., 2003).

Las películas de caseinato que no contienen GTA y que fueron sometidas al tratamiento térmico a 105 °C muestran una solubilidad en agua reducida, en comparación con las muestras control (TSM=25 y 100, respectivamente), a pesar de haber sido obtenidas sin la adición del entrecruzante químico. Esta característica fue también observada para otras películas proteicas tratadas térmicamente, como las de proteína de suero, de caseinato de calcio y de suero- caseinato (Vachon y col., 2000), de proteínas de soja (Kim y col., 2002) y de proteínas de gluten (Micard y col., 2000). Al considerar este comportamiento, es conveniente recalcar que la caseína no es susceptible a la desnaturalización térmica a esta temperatura (105°C) debido a la marcada estabilidad que le brindan sus bajos contenidos de cistina y cisteína, que dan como resultado una restringida formación de puentes disulfuro (Kirchmeier, 1962). La estabilidad térmica de caseinato se explica también por las restricciones impuestas por sus altos contenidos de prolina e hidroxiprolina a la formación de una estructura terciaria plegada (DeMan, 1999). La estabilidad térmica excepcional de la caseína hace posible hervir, esterilizar y concentrar la leche sin que ocurra la coagulación (DeMan, 1999; Fox, 1998).

De la Tabla 4.1 puede notarse que el nivel de solubilidad de las películas sin GTA, sometidas a calentamiento, es prácticamente igual al de la muestra que contiene una relación en peso GTA/Cas de 5% (TSM=25) y que no ha sido calentada, lo cual indica que ambas películas alcanzaron un grado similar de entrecruzamiento. Debido a estas ventajas, las propiedades de las películas entrecruzadas por tratamiento térmico (**CasH**) también se investigaron, y los resultados se informan y discuten en la siguiente sección, junto con los resultados de las películas entrecruzadas con GTA, a modo comparativo.

Películas entrecruzadas térmicamente: estudios preliminares

Inicialmente, y con la finalidad de seleccionar el tratamiento térmico a aplicar para alcanzar un grado de entrecruzamiento adecuado, se decidió determinar el efecto de distintas variables (tiempo y temperatura) sobre la solubilidad en agua y las propiedades mecánicas de las películas de caseinato. Las mediciones de solubilidad muestran (Tabla 4.2) que luego de 24 hs a 85°C la película sigue siendo 100% soluble en agua. Recién a temperaturas iguales o mayores que 95°C tiene lugar el

entrecruzamiento inducido por calor, y así, la fracción soluble disminuye a medida que el tiempo o la temperatura aumentan.

Tabla 4.2. Material soluble total (TSM) de películas de caseinato entrecruzadas mediante tratamiento térmico.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)		
	6	12	24
85	100.0± 0.0	100.0± 0.0	100.0± 0.0
95	62.3± 2.3	48.0± 3.1	32.5± 0.8
105	45.7± 2.9	33.9± 1.8	25.0± 0.8

Por otra parte, se midieron las propiedades mecánicas en tracción de las películas de caseinato de sodio sometidas a los distintos tratamientos térmicos, y los resultados se muestran en la Tabla 4.3. Se observa que a medida que el tratamiento térmico se hace más severo (mayor tiempo y/o temperatura) el módulo y la tensión a la ruptura aumentan, al mismo tiempo que la elongación se reduce. Este último efecto no es deseable, si consideramos que las películas pueden ser usadas para envasado de alimentos. Por este motivo, se seleccionó el tratamiento térmico a 95°C durante 6 horas, ya que resulta suficiente para alcanzar un grado de entrecruzamiento elevado (TSM 62.3%) y produce un aumento en la resistencia del 100% con respecto al de la película sin entrecruzar, sin sacrificar en demasía su capacidad de deformación.

Tabla 4.3. Propiedades mecánicas en tracción de películas de caseinato entrecruzadas mediante tratamiento térmico.

Películas Cas	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
sin calentamiento	251.0± 20.3	6.3± 0.2	63.0± 6.0
95°C 6 horas	525.8± 63.8	10.6± 1.1	53.1± 11.5
95°C 24 horas	634.6± 80.1	13.1± 0.4	23.2± 4.3
105°C 6 horas	530.5± 11.8	10.4± 0.3	40.4± 10.7
105°C 24 horas	649.9± 81.3	15.0± 0.9	14.4± 3.5

Propiedades termomecánicas

Los ensayos preliminares indican que la temperatura de transición vítrea, considerada arbitrariamente como la temperatura a la cual se produce el cambio abrupto

en la curva de $\tan \delta$ vs temperatura, aumenta con el nivel de tratamiento. En ese instante, el material alcanza un ablandamiento tal que se hace imposible continuar el ensayo. Como esta temperatura depende fuertemente del nivel de plastificación del polímero y las muestras ensayadas tienen niveles de humedad diferentes (asociadas directamente a la HR en el momento del ensayo), se observó cierta variabilidad en las determinaciones, por lo que se considera más adecuado hablar de intervalos de variación de la temperatura de transición vítrea.

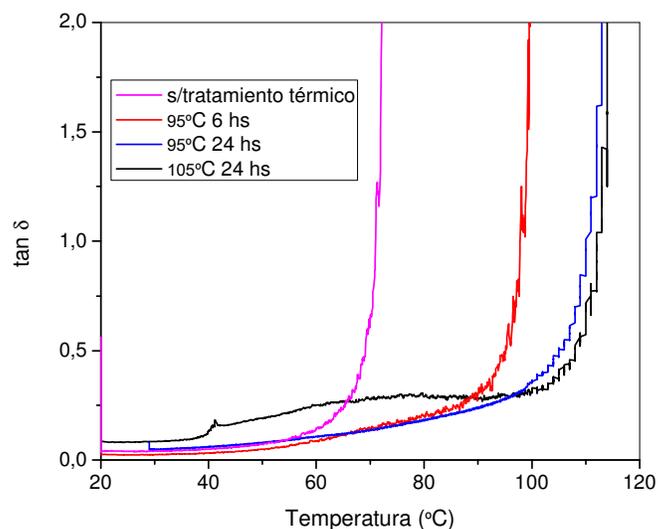


Figura 4.5. Curvas $\tan \delta$ vs temperatura de películas de caseinato de sodio plastificadas ($g_{li}/pro=0.28$) y tratadas térmicamente.

De la Figura 4.5 se deduce que la T_g de la película plastificada y sin tratamiento térmico está entre 55 y 65°C, mientras que las películas tratadas a 95°C por 24 hs o a temperaturas superiores presentan temperaturas de transición vítrea que se ubican en el rango de 100 a 110°C. Para el menor nivel de tratamiento térmico (95°C, 6 hs), estos valores se encuentran entre 90 y 100°C. Estos resultados están en acuerdo con las diferencias en el nivel de entrecruzamiento de las películas y las correspondientes propiedades informadas (Tablas 4.2 y 4.3): a menor TSM, mayor T_g y mayor módulo de Young.

Aspecto microscópico de las películas entrecruzadas

En la Figura 4.6 (a y b) se muestran las micrografías obtenidas por SEM de la cara superior (en contacto con aire, durante el secado) de las películas entrecruzadas con relaciones de GTA /Cas de 3 y 5 % en peso.

En ambas micrografías se observan superficies homogéneas, lo cual indica que no ocurrió separación de fases durante el proceso de secado; se observa además la presencia de microporos, siendo su número mayor para las películas que contienen más GTA. Estos microporos eran prácticamente inexistentes en las películas de caseinato control (ver Figura 3.2, capítulo 3); en estas películas aparecen probablemente por atrapamiento del solvente durante la etapa de secado, debido a que el entrecruzamiento se produce a una mayor velocidad que la evaporación del mismo. En la película que contiene mayor proporción de GTA también alcanzan a distinguirse zonas caracterizadas por fisuras distribuidas al azar, ocasionadas por la formación de estrías durante el proceso de secado (al ser mayor la contracción generada por la reacción de entrecruzamiento).

En la Figura 4.7 se presentan las micrografías del espesor de las películas entrecruzadas química o térmicamente, obtenidas por fractura criogénica. Estas imágenes sirven para confirmar que la morfología superficial es representativa de lo que ocurre en todo el material, evidenciando la existencia de microporos en todas las películas, pero siendo los de mayor tamaño y concentración, los que se encuentran en las películas preparadas con GTA. Por otro lado las fisuras y/o grietas debidas a la contracción durante el secado sólo se observan en las películas entrecruzadas químicamente.

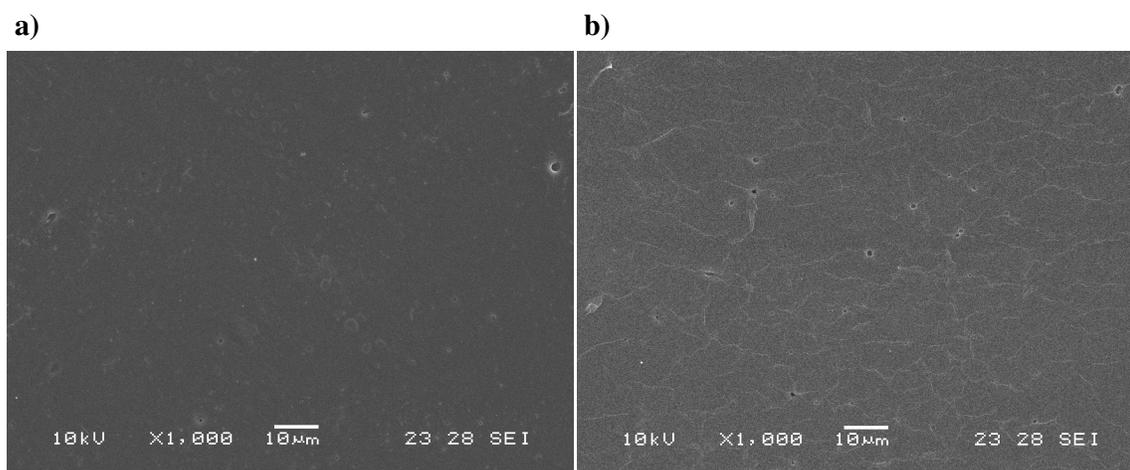


Figura 4.6. Aspecto microscópico de la superficie de las películas de caseinato entrecruzadas con relaciones GTA/Cas de 0.03 (a) y 0.05 (b). Glicerol/proteína=0.28.

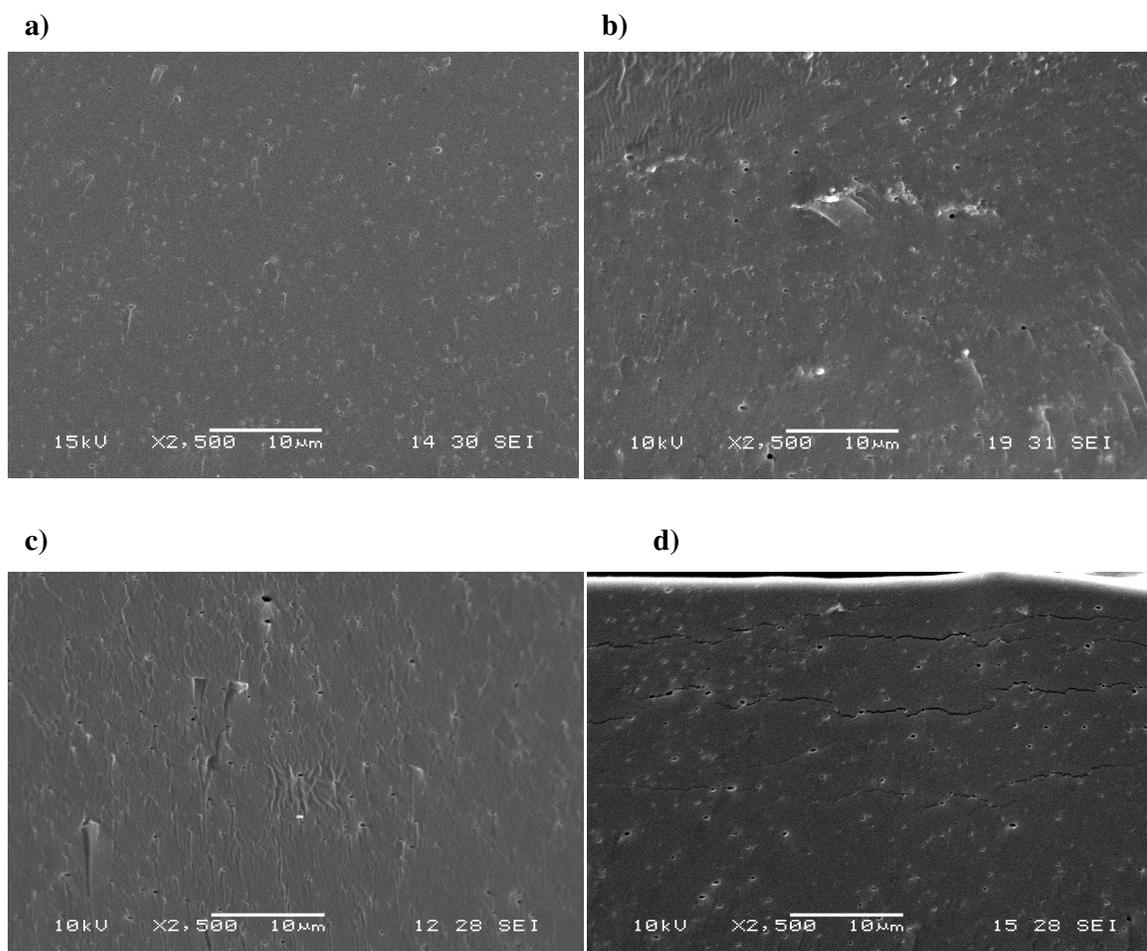


Figura 4.7. Micrografías SEM del espesor de las películas entrecruzadas de caseinato. Superficies de fractura criogénica. a) Cas, b) CasH, c) 3% GTA, d) 5 % GTA.

Angulo de contacto estático

La hidrofobicidad superficial de las películas se evaluó mediante mediciones de ángulo de contacto. En general, a mayor ángulo de contacto más hidrofóbica es la superficie. La Tabla 4.4 muestra los valores de ángulo de contacto con etilenglicol, de las películas de caseinato entrecruzadas usando GTA y mediante tratamiento térmico.

Tabla 4.4. Ángulo de contacto con etilenglicol, de películas de caseinato de sodio entrecruzadas.

Película	$\theta_{\text{etilenglicol}} (^{\circ})$
Cas	26.31± 1.59
CasH	43.55± 3.62
GTA 3	44.44± 2.45
GTA 5	50.20± 1.56
GTA 10	46.86± 3.56

Todas las películas tratadas con GTA tienen valores similares de ángulo de contacto (42-52°), y éstos son notablemente mayores a los encontrados para la película de caseinato control (26.3°), lo cual significa que su hidrofobicidad superficial es mayor. Esto se atribuye a la reducción relativa de los grupos polares libres de la proteína al estar comprometidos en enlaces aldimina con el GTA, y a la orientación preferencial de grupos no polares hacia la superficie en contacto con el aire durante la formación de la película.

La película tratada térmicamente presenta una polaridad superficial menor que la película control, y apenas mayor que la alcanzada mediante entrecruzamiento químico. Este aumento en la medida de ángulo de contacto, cuando se la compara con la película proteica no entrecruzada, puede sugerir el desarrollo de entrecruzamientos entre sitios hidrofílicos a lo largo de las cadenas poliméricas, como fue observado por Kim y col. (2002). Por otra parte, el valor de ángulo de contacto ligeramente menor, en relación a las películas de GTA, se debe a un mayor número de grupos amino libres, responsables de gran parte de su polaridad. Tang y col (2009) observaron que el calentamiento disminuía la hidrofobicidad superficial de películas proteicas ricas en vicilina, y lo atribuyeron al desplegado (inducido por el calor) de las proteínas y a la subsecuente exposición de los grupos funcionales (especialmente los clusters cargados) que se encontraban inicialmente ocultos en el interior de las moléculas proteicas. No es el caso observado para las películas basadas en caseinato de sodio, ya que esta proteína es una molécula con una conformación abierta de tipo *random coil*, con poca estructura secundaria y terciaria debido a su alto contenido de prolina, que rompe las α hélices y las β lámina-plegadas (Barreto y col., 2003).

Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 4.8 muestra los espectros FTIR de las películas de caseinato preparadas con y sin el agregado de GTA (3%). Las dos muestras exhiben características similares, tales como los picos en la región de estiramiento de los CH (3000-2800 cm^{-1}). Se observa un corrimiento en la banda de absorción de CH_2 de 2882 a 2860 cm^{-1} y de 2936 a 2920 cm^{-1} para la banda que corresponde a la absorción de CH_3 , con respecto al espectro de la película sin GTA (ver Figura 4.8). Las bandas en la región 1600–1500 cm^{-1} , correspondientes a las señales amida I y amida II, comunes a las proteínas, también se observan en los espectros de las películas entrecruzadas (Barreto y col., 2003).

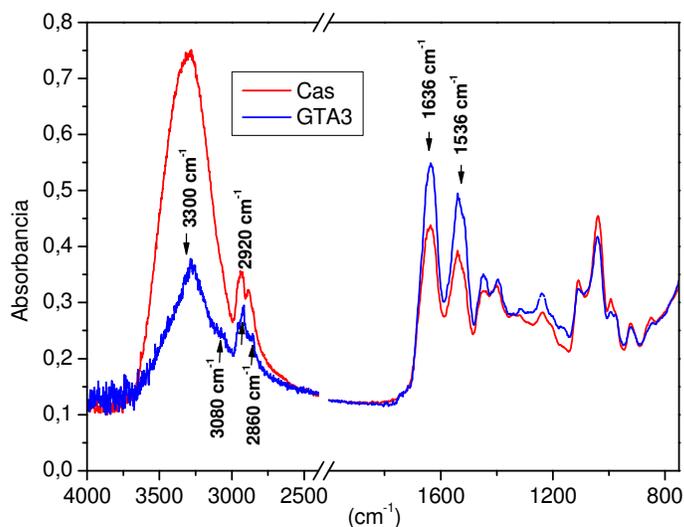


Figura 4.8. Espectros FTIR de películas de caseinato de sodio preparadas sin y con GTA (3 %).

Las asignaciones correspondientes al espectro de la película no entrecruzada se comentaron en el Capítulo 3. En el caso de las películas entrecruzadas, los cambios en los espectros se observan en:

- * La señal a 3080 cm^{-1} (marcada en el espectro) y encontrada también en el espectro del polvo de caseinato, se asigna a la estructura de NH, probablemente un sobretono de absorción de la banda amida II (Bellamy, 1975).

- * La zona ancha entre $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, que incluye la señal de los grupos NH y OH libres y ligados, es menos intensa para las películas entrecruzadas. En particular, la zona entre $3400\text{ y }3520\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a los grupos NH sin ligar, se ve reducida en el espectro de la muestra entrecruzada con GTA debido a que estos grupos fueron consumidos durante la reacción (Lacroix y col., 2002).

- * La banda centrada alrededor de 3300 cm^{-1} , que ha sido asociada a enlaces intermoleculares de H, aunque más probablemente sea originada por enlaces de H intra e intermoleculares (Barreto y col., 2003), se reduce notablemente luego del entrecruzamiento, debido a la reacción de GTA con las cadenas proteicas. Además, la longitud de onda del pico de la señal amida I se corrió de 1636 cm^{-1} para 3 y 5 % de GTA a 1632 cm^{-1} para las películas con 10 % GTA, mientras que la amplitud de los picos también crece (no se muestra), confirmando el entrecruzamiento químico de la proteína (Nuthong y col., 2009).

Por otra parte, se analizaron los espectros FTIR de las películas de caseinato de sodio tratadas térmicamente. En la Figura 4.9 se presenta el espectro infrarrojo de la película tratada a 95°C durante 6 horas, en comparación con la película no entrecruzada.

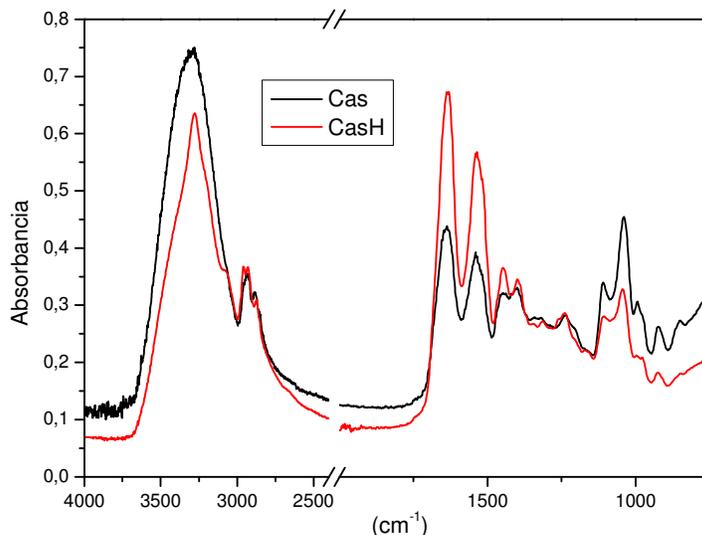


Figura 4.9. Espectros FTIR de películas de caseinato de sodio plastificadas, sin y con tratamiento térmico.

Se observa que la banda a 3000-3600 cm^{-1} de la película tratada térmicamente se reduce con respecto a la de la película control de caseinato, lo cual implica menor cantidad de grupos NH y OH libres, debido a que ahora se encuentran involucrados en enlaces o interacciones físicas diferentes. Por otra parte, los picos correspondientes a las bandas amida I y amida II, a 1638 cm^{-1} y a 1535 cm^{-1} , respectivamente, tienen mayor intensidad en el espectro de la película entrecruzada. Estos cambios en las bandas amida podrían indicar un aumento en la formación de uniones peptídicas entre los grupos amino y los grupos carboxilo del caseinato, los cuales podrían originarse entre los aminoácidos terminales, resultando, en consecuencia, en entrecruzamientos intermoleculares, tal como lo indican Lauber y col (2000). El entrecruzamiento térmico del caseinato sólo ocurre a temperaturas relativamente altas ($\geq 95^\circ\text{C}$), como se indica en la bibliografía relacionada (Abu Diak y col., 2007) y como también se demostró en este trabajo.

Color y opacidad

Los valores de opacidad, para las películas entrecruzadas con GTA y para la película CasH, se muestran en la Tabla 4.5. Como se mencionó anteriormente, valores de opacidad relativamente bajos indican películas transparentes, mientras que un aumento en los mismos implica matrices proteicas con mayor opacidad. Además, la opacidad es directamente proporcional al espesor de la muestra, por lo que esta dimensión debe ser considerada en el análisis.

Tabla 4.5. Opacidad de películas de caseinato de sodio entrecruzadas.

Película	Opacidad (Au*nm)	Espesor (mm)	Opacidad/ Espesor (Au*nm/mm)
Cas	142.56± 15.55	0.096± 0.025	1505.04± 150.50
CasH	151.23± 9.65	0.093± 0.019	1673.55± 301.19
GTA3	315.15± 54.22	0.123± 0.022	2949.26± 389.16
GTA5	340.06± 55.84	0.139± 0.035	3359.80± 494.56
GTA10	348.17± 27.92	0.135± 0.015	3574.30± 362.43

Los valores experimentales de opacidades de películas de caseinato sin la adición de GTA varían entre 127 y 158 Au nm, mostrando una mejor performance que las películas de gluten de trigo investigadas por Gontard (1991) (250.4 Au nm), las cuales fueron caracterizadas por el mismo método. Las películas de caseinato sometidas a tratamiento térmico (CasH) muestran valores de opacidad ligeramente mayores (142 a 160 Au nm) que los de la película control, pero marcadamente menores que aquellos de las películas entrecruzadas con GTA.

Analizando las películas de Cas-GTA, los valores de opacidad varían relativamente poco con el contenido de entrecruzante cuando se consideran tanto el espesor de las películas como la desviación estándar de la medición, como se observa en la última columna de la Tabla 4.5.

En la Tabla 4.6 se presentan los parámetros de color de las distintas películas de caseinato entrecruzadas. Los resultados indican que los tratamientos con GTA y con calor causan alteraciones significantes en dichos parámetros.

Tal como se había observado en la Figura 4.4, un cambio de color acompaña la reacción entre el GTA y el caseinato, siendo esta coloración más intensa a medida que

se incrementa el contenido del entrecruzante. Esta característica se refleja claramente en los valores de L^* , a^* , b^* , ΔE y WI.

Tabla 4.6. Parámetros de color de películas de caseinato entrecruzadas.

Película	L^*	a^*	b^*	ΔE^1	WI
Cas	87.95± 1.29	0.58± 0.08	-2.11± 1.09		88.49± 0.49
CasH	86.94± 0.64	0.25± 0.07	7.55± 0.89	9.75± 0.92	84.76± 0.82
GTA3	80.01± 1.79	5.54± 0.96	24.30± 2.02	30.02± 2.29	68.71± 2.15
GTA5	76.22± 1.35	11.55± 0.90	44.19± 1.74	48.13± 2.15	48.87± 2.09
GTA10	67.42± 1.76	18.17± 0.99	53.48± 1.75	61.68± 1.52	34.81± 1.51

¹Los valores de ΔE están calculados con respecto a la película de caseinato sin entrecruzar.

La adición de GTA ocasiona una reducción en el parámetro luminosidad (L^*) (de 87.95± 1.29 a 67.42± 1.76 para las películas sin y con 10% GTA, respectivamente) dando lugar a películas visualmente más oscuras. De acuerdo a lo indicado por Rhim y col. (1998), sus películas basadas en proteína de soja también se volvieron más oscuras al ser entrecruzadas con almidón dialdehído.

Los valores de las coordenadas cromáticas a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul) resultaron mayores que los de las películas sin modificar, lo cual corresponde a un aumento en la coloración anaranjada-amarillenta. Este aumento en la intensidad del color amarillo fue también informado para películas de gelatina tratadas con glioxal y formaldehído (De Carvalho y Grosso, 2006), para películas proteicas de soja con almidón dialdehído (Rhim y col., 1998) y para microcápsulas de gelatina entrecruzadas con glutaraldehído (Akin y Hasirci, 1995). Estos resultados, relacionados con la formación de enlaces CH=N entre los grupos amino libres de la proteína y el glutaraldehído se deben, en general, a los productos intermedios o finales de la reacción de Maillard (Rhim y col., 1998; De Carvalho y Grosso, 2006). Las variaciones en los parámetros de color fueron confirmadas por el aumento en los valores de ΔE y por la reducción del índice de blancura WI.

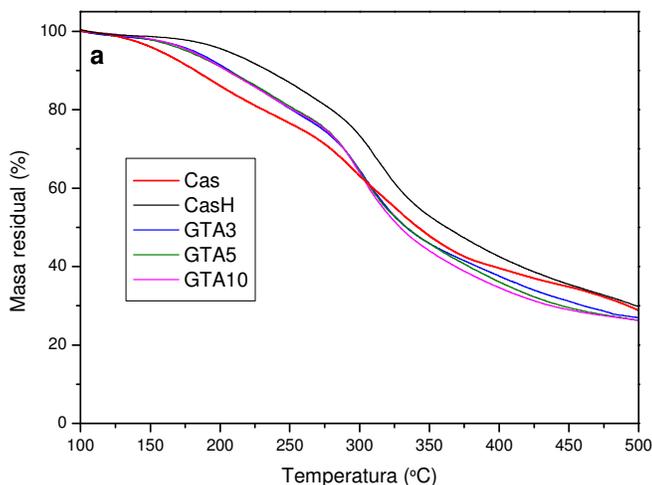
En cuanto a la película tratada térmicamente, se observan las mismas tendencias que con el GTA, pero los cambios son mucho más leves, y el aumento de ΔE sólo está dado por un incremento del valor b^* , y no del valor a^* , lo cual quiere decir que la coloración obtenida por las películas durante el entrecruzamiento térmico es netamente amarillenta. Otros autores evaluaron el efecto de distintos tratamientos térmicos sobre

los parámetros de color y observaron que las películas proteicas de soja se vuelven más amarillentas (mayor valor de b positivo) a medida que la temperatura o el tiempo de calentamiento aumenta (Kim y col., 2002). El aumento del color amarillento con el tratamiento térmico también fue informado para películas proteicas de soja y de gluten de trigo (Gennadios y col., 1996; Rhim y col., 2000).

Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de las películas entrecruzadas se evaluó mediante análisis termogravimétrico en modo dinámico. En la Figura 4.10 se muestran las curvas de % masa residual (Fig 4.10(a)) y de sus respectivas derivadas (Fig. 4.10(b)) en función de la temperatura, para las películas plastificadas CasH y GTA/Cas. En la Figura 4.10(b) se muestra sólo la curva que corresponde a una concentración de la película GTA/Cas de 5 %, dada la gran similitud observada entre las curvas obtenidas para películas con distintos contenidos de glutaraldehído.

Las curvas de TGA correspondientes a las películas entrecruzadas con GTA muestran un corrimiento en la temperatura inicial de degradación de aproximadamente 20 °C con respecto a la película de caseinato control y un residuo carbonoso (char) a 500°C levemente menor (26.24 y 28.8 %, para las películas GTA/ Cas y Cas, respectivamente), aunque estos valores resultaron prácticamente independientes de la concentración de aldehído. El aumento en la temperatura inicial de degradación en este tipo de materiales ha sido atribuida al reemplazo de los puentes de hidrógeno entre las cadenas proteicas por enlaces covalentes más estables (Bigi y col., 2001 y 2004).



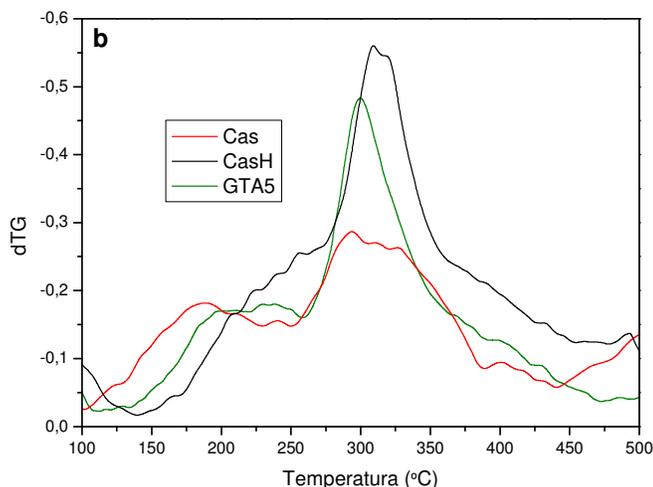


Figura 4.10. Curvas de degradación térmica de películas entrecruzadas térmicamente y con diferentes contenidos de GTA a) Curvas TG, b) curvas DTG.

Por otro lado, la película de CasH muestra la mayor temperatura inicial de degradación (38 °C más alta que la correspondiente a la película de caseinato control) y la menor velocidad de degradación hasta los 200°C. El residuo de la película CasH a 500°C es aproximadamente el mismo que el de la película Cas (29.9 y 28.8%, respectivamente) y es levemente mayor que los valores correspondientes a las películas entrecruzadas con GTA (26.24 %). Así, aunque tanto el entrecruzamiento químico como el térmico aumentan la temperatura inicial de degradación de las películas, la tratada térmicamente es la que presenta la mayor resistencia térmica global.

Propiedades mecánicas

Ensayos de tracción

Las propiedades mecánicas de las películas se informan en la Tabla 4.7. A medida que el contenido de GTA aumenta de 3 a 10 % (p/p) se observa un aumento en el módulo elástico y en la resistencia última. Al mismo tiempo, se produce una disminución en la elongación a la ruptura. Estos resultados se relacionan con el aumento de enlaces covalentes formados entre las cadenas polipeptídicas a medida que el contenido de GTA aumenta.

Por otro lado, los resultados obtenidos para las películas control de caseinato están fuera de esta tendencia. Estos presentan valores de módulo y resistencia última mayores que los obtenidos con las películas de GTA/Cas preparadas con concentraciones de glutaraldehído de hasta un 5%. Esto puede explicarse considerando que la disminución en la cantidad de interacciones fuertes (puentes de hidrógeno) presentes en las películas

de Cas (Gennadios, 2002) no son compensadas por la formación de enlaces covalentes con el GTA, cuando el grado de entrecruzamiento es bajo. La muestra conteniendo 10% de GTA presenta una mejora en el módulo de tracción y en la resistencia con respecto a la muestra sin entrecruzar, pero la elongación a la ruptura se reduce excesivamente.

Tabla 4.7. Propiedades mecánicas de películas de caseinato con diferente contenido de GTA.

Película	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
Cas	251.0 ± 20.3	6.3 ± 0.2	63.2 ± 6.0
CasH	525.8 ± 63.8	10.6 ± 1.1	53.1 ± 11.5
GTA3	132.1 ± 20.0	3.3 ± 0.4	58.5 ± 3.5
GTA5	249.8 ± 19.7	5.8 ± 0.2	37.0 ± 7.1
GTA10	444.7 ± 44.6	9.1 ± 0.9	11.3 ± 3.0

La película CasH muestra propiedades mecánicas mejoradas (módulo y resistencia a la tracción) incluso respecto de las muestras entrecruzadas con hasta un 10% de GTA. Otros autores encontraron también un aumento en la resistencia a la tracción de películas de proteína de soja (Gennadios y col., 1996; Rhim y col., 2000; Kim y col., 2002) y de proteína de gluten (Micard y col., 2000) sometidas a tratamiento térmico, y en la resistencia (σ_b) y elongación a ruptura (ϵ_b) de películas proteicas ricas en vicilina (Tang y col., 2009) tratadas de la misma manera. Además, estas películas exhiben una elongación a la ruptura del 53.1 %, o sea una reducción comparativamente baja con respecto al valor medido para las películas control de Cas ($\epsilon_b = 63.2$ %). Claramente, estas mejoras en las propiedades mecánicas pueden atribuirse a las nuevas interacciones (electrostáticas, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro) desarrolladas entre los componentes de la proteína en la red de la película luego del tratamiento térmico. Podemos concluir que el tratamiento térmico resultó más efectivo que el entrecruzamiento con GTA en lo que respecta a la mejora de las propiedades en tracción de las películas.

Absorción de humedad

Para investigar el efecto del tratamiento térmico y de agregado de GTA sobre la hidrofiliidad de las películas proteicas de caseinato, se llevó a cabo un estudio de absorción de humedad a 75% HR y 25°C. Las isotermas de absorción de las distintas películas se presentan en la Figura 4.11.

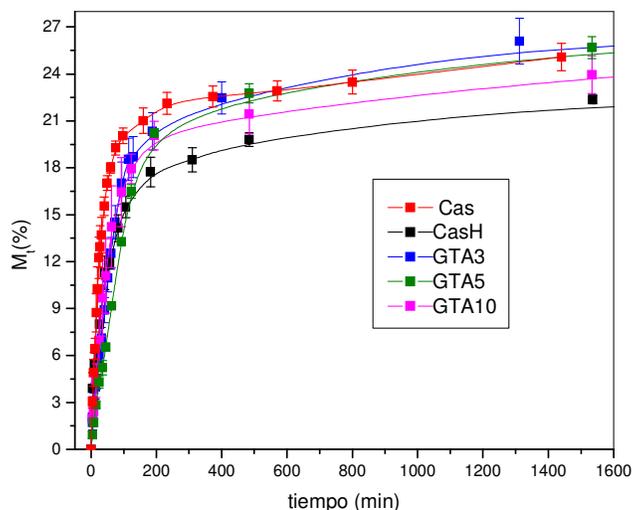


Figura 4.11. Isotermas de absorción de humedad para películas de caseinato de sodio entrecruzadas térmicamente y con diferentes contenidos de GTA, a 23 °C y 75 % HR en función del tiempo.

Los datos de absorción de humedad experimental se ajustaron mediante la ecuación empírica de Peleg (ec. 2.2.9) en el período total de tiempo y también con la ecuación 2.2.10, correspondiente al modelo de Fick, hasta los 400 min, de manera de calcular los coeficientes de difusión efectivos. Los parámetros de ajuste se reportan en la Tabla 4.8.

Como puede observarse de los parámetros R^2 , las curvas resultantes del proceso de ajuste de la ecuación de Peleg muestran una muy buena correlación con los datos experimentales. El parámetro K_1 , asociado con la inversa de la velocidad de absorción inicial, revela que la velocidad de absorción mayor corresponde a la película de Cas ($K_1 = 1.05$), como también se observa en la Figura 4.11. La magnitud del coeficiente de difusión efectivo ($2.831 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$), corrobora esta afirmación. La película de caseinato poscurada, a pesar de presentar un valor de K_1 mayor que el correspondiente a la película control (recordar que el modelo de Peleg no tiene en cuenta el espesor), presenta un valor de coeficiente ligeramente mayor que el de la película de Cas, lo que indicaría que la velocidad de absorción de vapor de agua no es, prácticamente, afectada por el tratamiento térmico aplicado en esas condiciones de tiempo y temperatura (95°C 6 horas). Por otra parte, las películas entrecruzadas con GTA presentan los mayores valores de K_1 y menores de D_{ef} . Como se discutió previamente, el entrecruzamiento de las películas con GTA produce un mayor distanciamiento de las cadenas de caseinato, lo que resulta en una mayor accesibilidad de las moléculas de agua hacia los sitios hidrofílicos remanentes. Estos sitios actúan anclando las moléculas y reduciendo su

difusión a través de las películas. No hay una tendencia clara para estos dos parámetros a medida que el contenido de GTA aumenta, con K_1 variando entre 2.6 y 3.9 y D_{ef} entre 2 y $2.316 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$.

Tabla 4.8. Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión efectivos (D_{ef}) de películas de caseinato tratadas térmicamente o con diferentes contenidos de GTA. HR: 75%, temperatura: 25°C.

Película	Espesor (mm)	EMC (%)	Ecuación de Peleg (ec. 2.2.9)			Modelo de Fick (ec. 2.2.10)
			K_1 (min/% peso)	K_2 (% ⁻¹)	R^2	D_{ef} (m ² s ⁻¹) x 10 ¹³
Cas	0.089± 0.016	25.08± 0.87	1.055± 0.198	0.0404± 0.002	0.992	2.83± 0.73
CasH	0.084± 0.015	21.96± 1.40	2.022± 0.384	0.0460± 0.002	0.992	2.94± 1.11
GTA3	0.122± 0.025	26.37± 1.18	2.646± 0.324	0.0362± 0.002	0.982	2.04± 0.20
GTA5	0.126± 0.040	26.68± 0.48	3.939± 0.116	0.0350± 0.001	0.987	2.00± 0.50
GTA10	0.104± 0.004	25.57± 1.05	2.675± 0.488	0.0400± 0.003	0.985	2.32± 0.72

Los contenidos de humedad en equilibrio a 75 % HR para todas las películas, se muestran también en la Tabla 4.8. Estos valores, inversamente proporcionales al parámetro K_2 , claramente indican que la película de CasH corresponde a la muestra menos hidrofílica, con la menor capacidad de absorción final (21.9%). El entrecruzamiento y los enlaces fuertes generados entre los sitios hidrofílicos de las cadenas proteicas durante el tratamiento térmico hacen que la película presente una reducida afinidad por el agua y, en consecuencia, alcanzan menores contenidos de agua en el equilibrio, así como mayores difusividades efectivas (menor cantidad de grupos polares en la película CasH que en la película Cas con capacidad de interactuar y retener moléculas de agua). Este comportamiento fue observado también por Kim y col (2002) para películas proteicas de soja tratadas térmicamente.

Con respecto a las películas GTA/Cas, sus valores de EMC resultaron ser ligeramente mayores que aquellos de la película de referencia. Una explicación razonable para este comportamiento inesperado se encuentra nuevamente en la reducción de la cantidad de puentes de hidrógeno resultantes a partir de la introducción de GTA en las cadenas proteicas. El entrecruzante interfiere con la formación de estas interacciones proteicas relativamente fuertes, haciendo que queden más grupos polares

expuestos al vapor de agua (comparado con las muestras sin entrecruzar) aumentando, en consecuencia, la afinidad por el agua de las películas. Es necesario recordar que las interacciones entre las cadenas polipeptídicas son tan fuertes que se requiere del agregado de un plastificante hidrofílico para evitar la fragilidad e impartir flexibilidad a las películas resultantes (Hernández-Muñoz y col., 2004).

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Se midió la permeabilidad al vapor de agua a 25 °C de las películas entrecruzadas térmica y químicamente, utilizando un gradiente de humedad relativa de 100- 64.5%. Los resultados se presentan en la Tabla 4.9.

Es notable observar que la WVP aumenta a medida que se incrementa la densidad de entrecruzamiento, cuando originalmente se esperaba el efecto contrario.

Tabla 4.9. Permeabilidad al vapor de agua de películas de caseinato de sodio entrecruzadas térmicamente y con diferentes contenidos de GTA (100:64.5 % HR; 25°C).

Película	Espesor (mm)	WVP (m g / Pa s m²)*10¹⁰
Cas	0.12± 0.02	11.07± 0.89
CasH	0.10± 0.03	7.79± 1.25
GTA3	0.11± 0.02	11.35± 2.53
GTA5	0.12± 0.01	12.92± 1.19
GTA10	0.15± 0.05	16.78± 3.52

La permeabilidad al vapor de agua depende no sólo de la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica del material, sino que también resulta afectada por la presencia de agujeros o fisuras en el material, así como por el impedimento estérico y la tortuosidad en la estructura (Wang y Padua, 2005). En este trabajo, se atribuye el aumento de la WVP con el contenido de GTA a la estructura molecular de los enlaces largos formados entre las cadenas de proteínas entrecruzadas con el aldehído, que separan a través de distancias relativamente largas a las moléculas de proteína, disminuyendo las fuerzas intermoleculares (enlaces covalentes y físicos: puentes disulfuro y puentes de H, entre las cadenas de proteínas) que pueden desarrollarse a lo largo de la red polimérica. Esto lleva a un aumento del volumen libre del material, lo que facilita la difusión de las moléculas de agua a través de las películas, explicando el aumento de la permeabilidad observada. Sin embargo, la razón más probable para este comportamiento es,

desafortunadamente, el gran número de agujeros, fisuras y estrías en las películas entrecruzadas, que se observó en las microscopías SEM (superficie, Figura 4.6; sección transversal, Figura 4.7), y se atribuyeron a la evaporación del solvente y a la contracción experimentada por las muestras durante el proceso de secado. Estos defectos facilitan significativamente el transporte de vapor de agua a través de las películas. Ghanbarzadeh y col (2007) también encontraron un efecto inesperado en los valores de WVP de películas de zeína sin plastificar, resultando mayores que los correspondientes a películas de zeína plastificadas, atribuyéndoselo a una mala asociación de cadenas y a la formación de numerosos espacios huecos y cavidades en las películas.

Por otro lado, la película de CasH muestra valores de permeabilidad al vapor de agua ($7.79 \text{ m.g} / \text{Pa.s.m}^2$) menores que los correspondiente a la película control ($11.07 \text{ m.g} / \text{Pa.s.m}^2$), en acuerdo con las observaciones de Kim y col (2002) para películas proteicas de soja. Este cambio se atribuye a la formación de un gran número de enlaces fuertes durante el tratamiento térmico, lo que convierte a estas películas en las menos hidrofílicas de este estudio, como se indicó en la sección previa.

Resumiendo el comportamiento de las películas de caseinato almacenadas en ambientes húmedos, se concluye que la película CasH es una opción válida como envoltura de alimentos, porque exhibe las menores hidrofílicidad, solubilidad en agua y WVP en comparación con las otras muestras estudiadas, y no posee además, los problemas de toxicidad asociados con el uso de GTA.

4.4. Conclusiones

Se estudió el entrecruzamiento químico del caseinato de sodio usando diferentes concentraciones de glutaraldehído. La evidencia física (TSM, cambios de coloración debido a la formación de la base de Schiff) indica que el nivel de entrecruzamiento aumenta a medida que el contenido de GTA se incrementa, mientras que la estabilidad térmica mejora por el entrecruzamiento químico, pero es poco sensible a la concentración de GTA.

El módulo de tracción y la resistencia de las películas de caseinato aumentan con la concentración de entrecruzante, aunque sólo las muestras preparadas con más de 5% GTA presentan comportamiento mejorado con respecto a la película de caseinato control (no entrecruzada). Sin embargo, y a pesar de que las mediciones de ángulo de contacto estático parecían indicar que la hidrofiliidad superficial de las películas se había reducido con el entrecruzamiento químico, la hidrofiliidad global (volumétrica), evaluada con mediciones de WVP y absorción de humedad, que es uno de los principales problemas de las películas basadas en proteínas, no resultó mejorada mediante el entrecruzamiento químico. Estos resultados fueron consistentes con la formación de una red entrecruzada pero flexible, lo cual aumenta la movilidad de los segmentos de cadena y contribuye positivamente a la difusión de moléculas de agua. Además, los agujeros y grietas inducidos por la contracción de la película durante el proceso de secado aumentan su capacidad de permeación al vapor de agua.

Por otro lado, también se estudió el comportamiento de películas de caseinato entrecruzadas térmicamente (CasH). Se seleccionó el tratamiento térmico menos agresivo (6 hs a 95°C) que dio lugar a un red parcialmente entrecruzada que conservó su buena capacidad de deformación. Las películas así tratadas mostraron mejores propiedades físicas (WVP y absorción de humedad relativamente bajos), mecánicas, y hasta mejor estabilidad térmica comparadas con la películas control de caseinato de sodio y con las películas entrecruzadas químicamente con GTA; y sin las complicaciones inherentes asociadas con el uso de GTA (tóxico a altas concentraciones). Por lo tanto, se concluye que el entrecruzamiento inducido por tratamiento térmico es una alternativa válida y atractiva para mejorar las propiedades de las películas basadas en caseinato de sodio.

4.5. Referencias

- Abu Diak, O.; Bani-Jaber, A.; Amro, B.; Jones D.; and Andrews G.P. The Manufacture and Characterization of Casein Films as Novel Tablet Coatings Food and Bioproducts Processing 85(3): 284-290 (2007).
- Akin, H. and Hasirci, N., Preparation and Characterization of Crosslinked Gelatin Microspheres, Journal of Applied Polymer Science, 58 (1): 95-100 (1995).
- Ali Y, Ghorpade VM and Hanna MA, Properties of thermally-treated wheat gluten films. Industrial Crops and Products, 6: 177-184 (1997).
- Barreto P.L.M., Pires A.T.N., Soldi V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. Polym. Degrad. Stabil, 79: 147-152 (2003).
- Barreto, P.L.M.; Roeder, J.; Crespo, J.S.; Maciel, G.R.; Terenzi, H.; Pires, A.T.N. ; Soldi, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/ sorbitol solutions and glass transition of their films. Food Chemistry, 82: 425-431 (2003).
- Bellamy, L. J. The Infrared Spectra of Complex Molecules; Cambridge UK: Chapman and Hill, University Press, p 226 (1975).
- Bigi A., Bracci B., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. Biomaterials, 19: 2335-2340 (1998).
- Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials, 22: 763-768 (2001).
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K. Stabilization of gelatine films by crosslinking with genipin. Biomaterials, 23: 4827-4832 (2002).
- Bigi, A.; Panzavolta, S.; Rubini, K., Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. Biomaterials, 25: 5675-5680 (2004).
- Chatterji, Prabha R., Gelatin with Hydrophilic/Hydrophobic grafts and Glutaraldehyde crosslinks. Journal of Applied Polymer Science, 37: 2203- 2212 (1989).
- De Carvalho, R.A.; Grosso, C.R.F., Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. Food Hydrocolloids, 18: 717-726 (2004).
- De Carvalho, R.A.; Grosso, C.R.F Properties Of Chemically Modified Gelatin Films Brazilian Journal of Chemical Engineering 23: 45- 53 (2006).
- DeMan, J. M. Principles of Food Chemistry, 3rd ed.; Aspen: Gaithersburg, MD; p 118. (1999).
- Dinnella, C Gargaro, M T Rossano, R Monteleone, E Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. Food Chemistry, 78: 363-368 (2002).

- Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. In *Dairy Chemistry and Biochemistry*; Blackie Academic & Professional: Dublin, Ireland; p 368 (1998).
- Gennadios A and Weller CL, Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44(10): 63-69 (1990).
- Gennadios, A., Ghorpade, V. M., Weller, C. L. and Hanna, M. A. Heat curing of soy protein films. *Transactions of the ASAE*, 39: 575–579 (1996).
- Gennadios A, Protein-Based films and coatings, ed by Gennadios A. USA: CRC Press, (2002).
- Gerrard JA, Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science Technology*, 13: 391–399 (2002).
- Ghanbarzadeh, B; Musavib, M; Oromiehie, A.R.; Rezayib, K; Razmi Radb, E; Milani J Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films .*LWT*, 40: 1191–1197 (2007).
- Gontard N, Films et enrobages comestibles: Étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten. Montpellier. Tese (Doutorado)— Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire— Science des Aliments, Université Montpellier II, França. (1991).
- Han, J, Bourgeois S, Lacroix M Protein-based coatings on peanut to minimise oil migration. *Food Chemistry*, 115: 462–468 (2009).
- Hernández-Muñoz, P., López-Rubio, A., Lagarón, J. M., and Gavara, R., Formaldehyde Cross-Linking of Gliadin Films: Effects on Mechanical and Water Barrier Properties. *Biomacromolecules*, 5 (2): 415-421 (2004).
- Jayakrishnan, A., Jameela, S.R., Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, 17(5): 471-484 review (1996).
- Khor, E.; Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*, 18: 95-103 (1997).
- Kim, K M Weller, C L Hanna M A and Gennadios A Heat Curing of Soy Protein Films at Selected Temperatures and Pressures. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 140–145 (2002).
- Kirchmeier, O. *Milchwissenschaft (German)*, 17: 408 (1962).
- Korn, AH, Fearheller, SH and Filachione, EM, Glutaraldehyde, Nature of the Reagent. *J Mol Biol*, 65: 525-529 (1972).
- Lacroix, M. Lea, T.C Ouattaraa, B. Yua, H. Letendrea, M. Sabatoc, S.F. Mateescub, M.A. Patterson G. Use of g-irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functionals characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*, 63: 827–832 (2002).
- Lauber, S; Klostermeyer, H. Y Henle, T., Influence of irreversible casein crosslinking on the gel strength of yoghurt, *Czech Journal of Food Sciences* 18:69-71(2000).

- Mali, S.; Grossmann, M. V. E; García, M. A.; Martino M. N., Zaritzky, N. E., Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56: 129–135 (2004).
- Martucci JF, Ruseckaite RA, Tensile Properties, Barrier Properties and Biodegradation in Soil of Compression – Molded Gelatin-Starch Dialdehyde Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 112: 2166–2178 (2009).
- Marquié C., Tessier A.M., Aymard C., Guilbert S. HPLC Determination of the reactive Lysine content of cottonseed protein films to monitor the extent of cross-linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde and Glyoxal. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 922-926 (1997).
- Marquié C., Guilbert S., Formation and properties of cottonseed protein films and coatings en Protein-based films and coatings. 1era. Edición. Editado por A. Gennadios, Ed. CRC press; 275-304 (2002).
- Martucci, J.F.; Ruseckaite, R.A., Vázquez, A., Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. *Materials Science and Engineering A*, 435–436: 681–686 (2006).
- Maté, J.I. and Krochta, J.M. Comparison of Oxygen and Water Vapor Permeabilities of Whey Protein Isolate and beta-Lactoglobulin Edible Films. *J. Agric. Food Chem.*, 44(10): 3001-3004 (1996).
- Micard, V.; Belamri, R.; Morel, M.-H. and Guilbert S. Properties of Chemically and Physically Treated Wheat Gluten Films. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2948-2953 (2000).
- Miller, K. S.; Chiang, M. T.; Krochta, J. M. Heat curing of edible whey protein films. *J Food Sci*, 62: 1189-1193 (1997).
- Nuthong, P.; Benjakul, S.; Prodpran, T.; *Int J Bioll Macromols*, 44: 143-148 (2009).
- Olde Damink L.H.H., Dijkstra P.J., van Luyn M.J.A., van Wachem P.B., Nieuwenhuis P., Feijen J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 6: 460-472 (1995).
- Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L., Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*, 43: 5417–5425 (2002).
- Orliac O, Rouilly A, Silvestre F, Rigal L Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*, 18: 91-100 (2003).
- Pérez-Gago, M. B.; Nadaud, P.; Krochta, J. M. Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat- denatured versus native whey protein films *J Food Sci*, 64: 1034-1037 (1999).
- Pommet M, Morel M-H; Redl A, Guilbert S, Aggregation and degradation of plasticized wheat gluten during thermo-mechanical treatments, as monitored by rheological and biochemical changes. *Polymer*, 45(20): 6853-6860 (2004).

- Rhim, J.; Gennadios A., Weller, C. L., Cezeirat, C., Hanna, M. A., Soy protein isolate–dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products*, 8: 195– 203 (**1998**).
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L. And Hanna, M. A. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 4937–4941 (**2000**).
- Tang, Ch-H; Xiao, M-L; Chen, Z; Yang X-Q; Properties of Cast Films of Vicilin-rich Protein Isolates from Phaseolus Legumes: Influence of Heat Curing *LWT-Food Sci Technol*, 42: 1659 (**2009**).
- Vachon, C.; Yu, H.-L.; Yefsah, R.; Alain, R.; St-Gelais, D.; and Lacroix, M. Mechanical and Structural Properties of Milk Protein Edible Films Cross-Linked by Heating and γ -Irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3202-3209 (**2000**).
- Wang, Q., & Padua, G. W. Properties of zein films coated with drying oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3444–3448 (**2005**).
- Wissemann K.W., Jacobson B.S. Pure gelatin microcarriers: synthesis and use in cell attachment and growth of fibroblast and endothelial cells. *In vitro. Cell. Dev. Biol.* 21: 391-401 (**1985**).
- Zeeman R.; Cross-linking of Collagen-based Materials. Tesis doctoral, Universidad de Twente, **1998**.
- Zinoviadou, K. G.; Koutsoumanis, K. P.; Biliaderis, C. G.; Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef *Meat Science*, 82(3):338-345 (**2009**).

Capítulo 5

Películas de caseinato de sodio/quitosano

5.1. Películas de quitosano

5.1.1 Introducción

En los últimos tiempos ha habido un interés creciente en el desarrollo de materiales con capacidad formadora de películas y que además tengan propiedades antimicrobianas, lo cual contribuye a prolongar la vida útil del alimento en contacto con el envase.

Los envases antimicrobianos son uno de los sistemas de envases activos más prometedores, ya que son altamente efectivos para inhibir, reducir o retrasar el crecimiento de los microorganismos patogénicos que contaminan los alimentos (Dutta y col., 2009) manteniendo de esta manera la calidad del producto por más tiempo. En este contexto, el quitosano ha sido ampliamente utilizado en la preparación de películas y recubrimientos antimicrobianos debido a su propiedad de inhibir o retrasar el crecimiento de hongos y de numerosas bacterias patógenas en la superficie del producto, extendiendo así su vida útil.

El quitosano (Quit) es un derivado deacetilado de la quitina, que es el segundo polímero más abundante en la tierra después de celulosa (Kurita, 1997; Ziani y col., 2008; Dutta y col., 2009). La quitina es un polisacárido de origen natural que se encuentra en el mayor componente estructural del exoesqueleto de los invertebrados (cangrejos, camarones, krill, calamar, etc) (ver Figura 5.1) y de las paredes celulares de los hongos y algunas algas (Zhang y col., 2005; Ziani y col., 2008), pero la única fuente considerable y práctica es el exoesqueleto de mariscos recolectados comercialmente (Wong y col., 1992). La biodegradación de la quitina en los residuos de crustáceos es muy lenta. La acumulación de grandes cantidades de desechos provenientes del procesamiento de crustáceos se ha convertido en una preocupación importante en la industria de procesamiento de alimentos (Hirano, 1989). La industria de mariscos produce grandes cantidades de quitina y la mayor parte se desperdicia. Japón y EE.UU. son los principales y más tradicionales productores de quitina, mientras que India, China, Pakistán, Noruega e Islandia, entre otros, se han sumado más recientemente a la producción de quitina como un subproducto de sus nuevas industrias de mariscos (Wong y col., 1992). Los volúmenes de producción de quitina son comparativamente mucho más bajos que los de celulosa (Shahidi y col., 1999). Las razones principales son

los altos costos para la extracción de quitina y las importantes diferencias entre los distintos lotes en función de la fuente (distintos organismos marinos), lo que dificulta la preparación de lotes reproducibles y uniformes en cantidades a granel (Peter, 1995).



Figura 5.1. Exoesqueleto de los camarones.

Varios productores ofrecen quitosano comercial en diversos grados de pureza, peso molecular y grado de deacetilación (Khan y col., 2002). El grado de deacetilación es una de las características químicas más importantes (Li y col., 1992) que condicionan el desempeño del quitosano en muchas de sus aplicaciones (Lower, 1984; Knorr, 1991; Khan y col., 2000). Específicamente, el grado de deacetilación determina el contenido de grupos amino libres en estos polisacáridos (Khan y col., 2002), por lo que se lo puede emplear para distinguir entre la quitina y quitosano. Por ejemplo, la quitina con un grado de deacetilación del 75% o más es generalmente conocida como quitosano (Li y col., 1997). El proceso de deacetilación implica la eliminación de grupos acetilo de la cadena molecular de la quitina mediante la acción de álcali concentrado y tratamiento de alta temperatura (Zhang y col., 2005), dejando un grupo amino ($-NH_2$) en la cadena. La versatilidad del quitosano depende principalmente de la alta concentración de estos grupos amino reactivos.

Las estructuras moleculares de la quitina y el quitosano se muestran en la Figura 5.2. Sus estructuras químicas son muy similares a la de la celulosa. La quitina se compone de unidades repetitivas de β -(1-4)-2-deoxi-2-acetoamida-D-glucosa (N-acetil-D-glucosamina) (Zhang y col., 2005; Srinivasa y col., 2004) y el quitosano es un polisacárido lineal que consta de unidades repetitivas de β (1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa), cuando está completamente deacetilado (Srinivasa y col., 2007; Ziani y col., 2008). El predominio de grupos parcialmente deacetilados hace a este polímero soluble en ácidos orgánicos diluidos, originando soluciones o geles claros, homogéneos, y viscosos con una estructura consistente, que resultan ideales como recubrimientos de

alimentos (Peter, 1995; Darder, 2003). Al igual que la celulosa, la quitina y el quitosano son semicristalinos debido a sus enlaces lineales. Los grupos activos químicamente en la estructura de quitosano son los grupos hidroxilo y amino libres, siendo ambos susceptibles a modificaciones químicas (Darder, 2003).

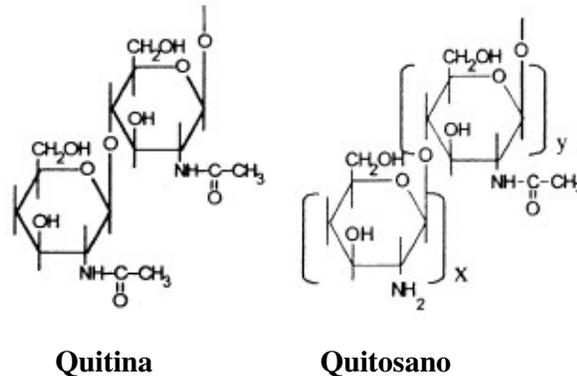


Figura 5.2. Estructuras moleculares de la quitina y el quitosano, x e y varían de acuerdo al grado de acetilación (Pawlak y Mucha, 2003).

La quitina y el quitosano, comparados con otros polisacáridos, poseen algunas propiedades específicas que les confieren un alto potencial en una amplia variedad de aplicaciones, tales como biomédicas, farmacéuticas, biotecnológicas, cosmetológicas, alimentarias, agrícolas, e incluso para tratamiento de agua (como coagulantes) y usos en la industria de la fibra (Knorr, 1991; Kurita, 1997; Zhang y col., 2005; Luyen y Rossbach, 1992; Remuñán-López y col., 1997; Shahidi y col., 1999; Srinivasa y col., 2007; Ziani y col., 2008; Dutta y col., 2009). En cuanto a sus propiedades ambos polímeros son:

- **Anti-microbianos**, lo que hace a la quitina y el quitosano potenciales inhibidores del crecimiento de una amplia variedad de hongos, bacterias y virus (Fernandez-Saiz y col., 2009).
- **Polímeros con alta concentración de cargas positivas**, debida a los grupos amino que poseen cargas positivas a pH inferiores a 6.5, lo cual permite que puedan interactuar y formar redes tridimensionales con materiales cargados de manera negativa, tales como enzimas, células, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, etc (Argin-Soysala y col., 2009).
- **Biodegradables**, lo que hace a la quitina y el quitosano ideales para disminuir el impacto medioambiental de los envases y otros productos finales producidos a partir de ellos.

• **Biocompatibles**, son polímeros naturalmente no tóxicos y biodegradables en medios fisiológicos comunes.

El quitosano es, además de todo esto, bioadhesivo y bifuncional (Remuñán-López, 1997). Su importancia reside en sus propiedades antimicrobianas en conjunción con su carácter catiónico y su propiedad de formación de películas (Arvanitoyannis y col., 1998). Esta propiedad catiónica junto con su biocompatibilidad son las razones que lo hacen adecuado para usos biomédicos tales como: agente bacteriostático, agente floculante, vehículo de transporte de drogas, regenerador de tejidos de la piel, inhibidor del crecimiento de tejido conectivo indeseable y agente de inmovilización y encapsulación de metales pesados tóxicos (Sugama y Cook, 2000; Silva y col., 2004).

Debido a la estructura lineal de este polisacárido se pueden obtener películas resistentes, flexibles y transparentes (Kittur y col., 1998; Hoagland y Parris, 1996; Dutta y col., 2009). Las películas puras de quitosano generalmente tienen carácter cohesivo y compacto, y la superficie de la película posee un contorno liso sin poros o fisuras (Coma y col., 2002). Tienden a exhibir resistencia a las grasas y aceites y una permeabilidad selectiva a los gases, pero carecen de resistencia a la transmisión de agua (Kittur y col., 1998; Hoagland y Parris, 1996; Bordenave y col., 2007) debido a su alto carácter hidrofílico.

Se han escrito varios trabajos sobre las propiedades de películas de quitosano, y la mayoría de éstos se realizan en Japón (Makino y Hirata, 1997; Kurita, 1997; Peter, 1995). Las propiedades del quitosano, en particular su alta actividad antimicrobiana, lo hacen adecuado para ser usado como material de envasado y para recubrimientos comestibles (Butler y col., 1996; Wong y col., 1992; Shepherd y col., 1997; Krasavtsev y col., 2002). Los recubrimientos de quitosano han demostrado su capacidad de extender el tiempo de almacenamiento de frutas y hortalizas frescas, como mangos, bananas, ananás, melones, etc. (Dong y col., 2004; Srinivasa y col., 2002; Kittur y col., 2001; Sangsuwan y col., 2008) debido a que inhiben el crecimiento fúngico (Krochta y Mulder-Johnston, 1997; Srinivasa y col., 2007), reducen la producción de etileno, aumentan la concentración de CO₂ interno y disminuyen los niveles de O₂.

Makino y Hirata (1997) han demostrado que un laminado biodegradable compuesto de quitosano- celulosa y policaprolactona puede ser usado en envases de atmósfera modificada para productos frescos. Sin embargo, deben aún resolverse muchos problemas antes de que el quitosano pueda ser considerado de interés comercial, por ejemplo, reemplazando al poli (etileno-co-vinil alcohol). El desarrollo de

materiales útiles basados en quitosano es un campo relativamente inexplorado, en comparación con el estudio de los materiales más convencionales, y la mayoría de las aplicaciones están todavía en fase de desarrollo (Gällstedt, 2004).

5.1.2 Preparación de películas de quitosano

El quitosano (**Quit**) (grado de deacetilación (DD)= 98%) es insoluble en agua debido a su estructura semicristalina, pero se disuelve en ácidos orgánicos acuosos y se obtiene una solución viscosa a pH inferior a 6. Esto es debido a que el quitosano tiene grupos amino primarios con un valor de pKa de 6.3. A pH bajos, los grupos amino se protonan ($-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$) y se cargan positivamente, lo que convierte al quitosano en un polielectrolito catiónico soluble en agua. Por otro lado, a medida que el pH aumenta por encima de 6, estos grupos amino del quitosano se deprotonan, el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble. La transición soluble-insoluble ocurre a un valor de pKa entre 6 y 6.5 (Pillai y col., 2009).

En este trabajo y en concordancia con lo informado en la mayoría de las publicaciones (Coma y col., 2002; Srinivasa y col., 2004; Mucha y Pawlak, 2005; Sarasam y Madihally, 2005; Durango y col., 2006; Bordenave y col., 2007), también se utilizó ácido acético para protonizar el quitosano, de manera de hacerlo soluble en agua y poder obtener películas homogéneas y transparentes.

Se prepararon soluciones de quitosano al 2 % (p/v) en ácido acético al 1% vol. (pH= 4.4), mediante agitación continua (magnética) a temperatura ambiente. Se agregó el plastificante en relaciones de peso glicerol/Quitosano (gli/Quit) de 0.15, 0.28, 0.37, y 0.5. Posteriormente, a fin de eliminar insolubles, se realizó una filtración usando papel de filtro.

La solución (50 g) se volcó en placas de Petri y se evaporó el solvente a 80 °C en estufa con convección forzada de aire, de acuerdo a lo sugerido en bibliografía (Mayachiew y Devahastin, 2008; Srinivasa y col., 2004) durante aproximadamente 10 horas. Estudios preliminares de estos autores también indicaron que, secando a temperaturas superiores a 100°C, las películas adquieren un color amarronado, lo que resulta desventajoso desde el punto de vista estético (Srinivasa y col., 2004).

5.1.3 Caracterización de las películas de quitosano

Aspecto macroscópico de la película de quitosano

La Figura 5.3 muestra el aspecto macroscópico de la película de quitosano. Las películas obtenidas son transparentes, con una coloración ligeramente amarilla. No se observan imperfecciones aparentes.

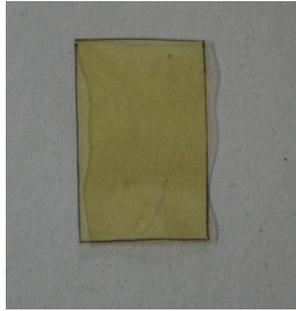


Figura 5.3. Aspecto macroscópico de la película de quitosano.

Aspecto microscópico de las películas de quitosano

Se utilizó SEM para visualizar la superficie y la sección transversal (obtenida mediante fractura criogénica con aire líquido) de la película de quitosano plastificada con glicerol. Las Figuras 5.4(a y b) muestran, respectivamente, la sección transversal y la superficie de la cara inferior (en contacto con el molde) de la película de quitosano con una relación gli/Quit= 0.28.

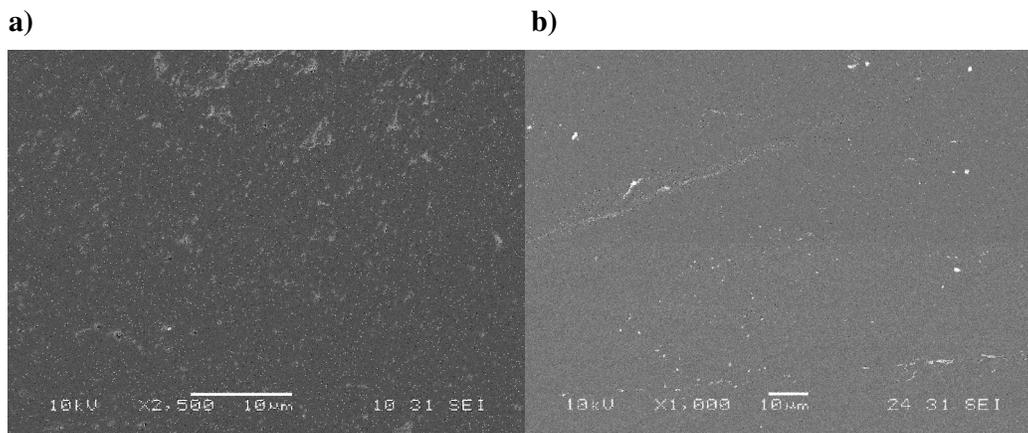


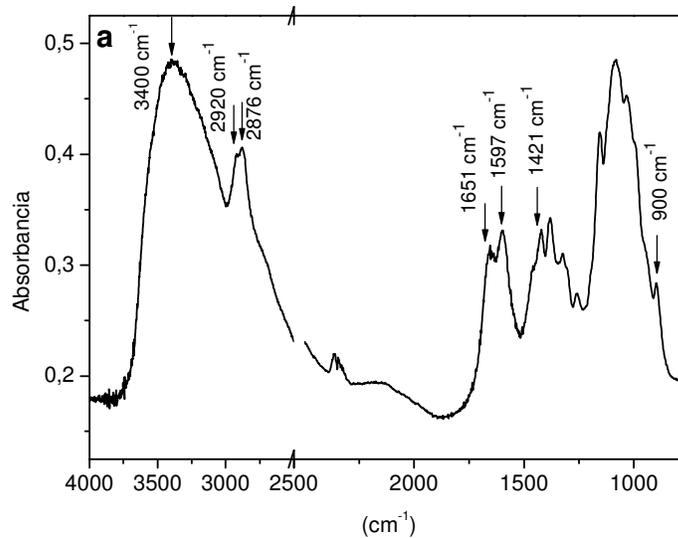
Figura 5.4. Micrografías SEM de las películas de quitosano plastificadas (gli/Quit= 0.28). (a) Sección transversal (obtenida mediante fractura criogénica); (b) Superficie inferior.

El análisis de la cara permite apreciar una morfología superficial lisa y uniforme, con la presencia de ciertas líneas provenientes de la copia del molde antiadherente.

La vista microscópica del espesor de la película presenta también la morfología típica de materiales homogéneos sin deformar, sin la presencia de fisuras o grietas, pero revelan la existencia de poros muy pequeños en el interior del material. Ziani y col. (2008) observaron lo mismo para películas de quitosano. Se entiende que estos agujeros, al igual que en las películas de caseinato, deben haber sido formados durante la etapa de secado, debido a la evaporación del solvente (agua).

Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 5.5(a) muestra el espectro de FTIR correspondiente al polvo de quitosano. El espectro muestra una banda ancha centrada en 3400 cm^{-1} asignada al estiramiento de los enlaces O-H unidos a la estructura principal de los componentes de la cadena, con contribución de la absorción por el estiramiento de los enlaces N-H (Pranoto y col., 2005; Sionkowska, 2006). En este espectro no hay evidencia de estiramiento de enlaces de O-H libres (3600 cm^{-1}). Los picos de absorción a 2920 y 2876 cm^{-1} corresponden a la vibración de estiramiento de grupos alifáticos CH_2 y CH (terciario), respectivamente (Pawlak y Mucha, 2003; Sionkowska, 2006).



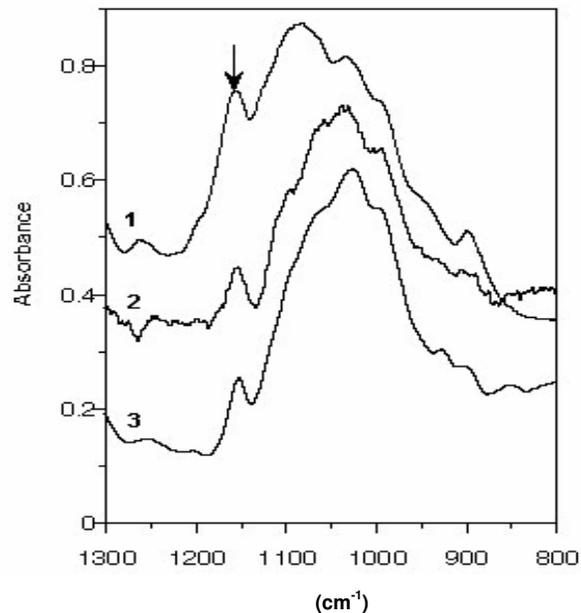


Figura 5.5. Espectro FTIR de (a) polvo de quitosano; (b) quitosano (región 1300–800 cm^{-1}): (1) Polvo, (2) Película preparada sin glicerol; (3) Película preparada con glicerol (gli/Quit=0.28).

La banda entre 1550 y 1690 cm^{-1} es indicativa de la presencia de grupos amida I y II (vibraciones de flexión del enlace N-H de los grupos amino secundarios), los cuales permanecen debido a la deacetilación incompleta (en particular el pico a 1651 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo (C=O) de la banda amida I, típico de la quitina, que se ve como un hombro debido al alto grado de deacetilación) (Arvanitoyannis y col., 1997; Pawlak y Mucha, 2003). Ziani y col. (2008) encontraron que la intensidad de absorción de la banda amida I disminuye a medida que aumenta el grado de deacetilación. La banda amida II a 1597 cm^{-1} también se superpone a la absorción correspondiente a la flexión del enlace N-H en los grupos amino primarios (NH_2) (Pawlak y Mucha, 2003).

La banda de absorción alrededor de 1400 cm^{-1} es resultado de la absorción de varios grupos: carboxilos ($-\text{COO}^-$) (Pranoto y col., 2005), OH de los alcoholes primarios (Sionkowska, 2006) y $-\text{NH}$ (Ziani y col., 2008). La banda entre 1155 y 1025 cm^{-1} es el resultado de las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O-C y de deformación de los C-O y de los OH de los grupos alcoholes primarios y secundarios en las moléculas de quitosano (Ostrowska-Czubenko y Gierszewska-Druzynska, 2009). El pico pequeño a 900 cm^{-1} también está asignado a los enlaces β glucosídicos (C-O-C) (Cheng y col., 2003).

La Figura 5.5(b) muestra la región 1300-800 cm^{-1} para el polvo de quitosano y para las películas formuladas con y sin el agregado de glicerol. La banda debida al

glicerol contribuye a la absorción en la región. Se observa que la banda de absorción localizada a 1150 cm^{-1} no se modifica durante el proceso de formación de la película.

Difracción de Rayos X (DRX)

La Figura 5.6 muestra los patrones de difracción de rayos X del quitosano en polvo (DD, grado de deacetilación 98 %) y de las películas obtenidas con y sin el agregado de glicerol. Los difractogramas demuestran el carácter semi-cristalino del quitosano puro y de las películas preparadas sin aditivos.

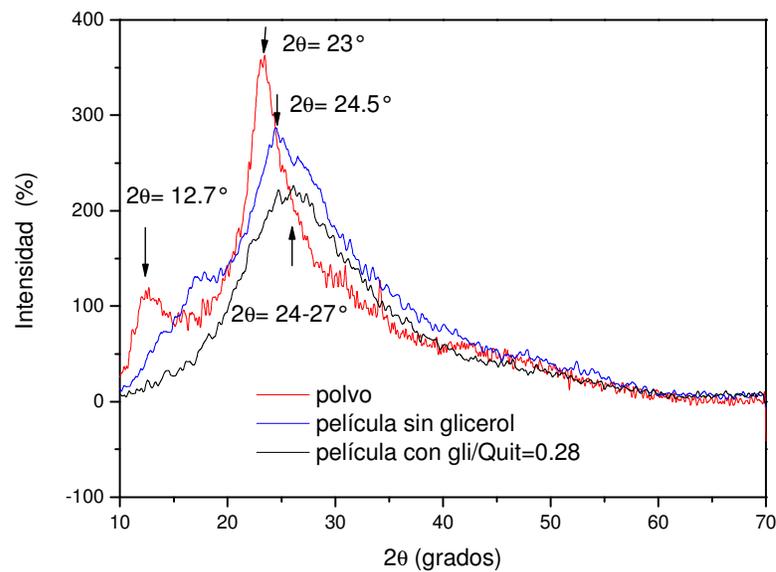


Figura 5.6. Patrones de DRX del quitosano en polvo y de la película de quitosano con y sin agregado de glicerol.

Para el polvo de quitosano, se observan dos reflexiones cristalinas en el rango de 2θ de 5 a 70° . Dichas reflexiones se ven aproximadamente en 13° y en 23° , respectivamente. Esto está en concordancia con lo informado por otros autores que encontraron dos reflexiones a 2θ alrededor de $10\text{--}12^\circ$ y de $20\text{--}22^\circ$, para quitosano con grado de deacetilación del 80 % (Srinivasa y col., 2004), con DD= 90 % (Zhang y col., 2005) y con DD=85 % (Bourtoom y Chinnan, 2008). El pico alrededor de 13° (plano de difracción 020) se atribuye a los cristales de quitosano anhidro (Ziani y col., 2008) y no se evidencia en los difractogramas de las películas, debido a la técnica de obtención de las mismas (disolución y evaporación). En otras palabras, el pico a 13° desaparece en las muestras que contienen agua. El pico de difracción alrededor de $2\theta = 20^\circ$, corresponde

al plano de difracción 110, como fue informado por otros autores para películas de quitosano (Srinivasa y col., 2004; Zhang y col.2005; Ziani y col., 2008).

Se calculó el índice de cristalinidad (CrI) para los dos planos (020 y 110) que corresponden a distintas estructuras cristalinas (Bourtoom y Chinnan, 2008), de acuerdo a la ecuación 2.2.3 (Capítulo 2), donde A_{crist} es el área del pico cristalino del plano 020 o 110, según corresponda. Las áreas relativas se calculan a partir de la deconvolución de los picos existentes en el difractograma, utilizando una distribución Gausiana para su ajuste. Por otro lado, se consideró que la película con glicerol es esencialmente amorfa. Los índices de cristalinidad obtenidos para cada material se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Índices de cristalinidad del quitosano y de la película sin plastificante.

	CrI (%)		
	plano 020	plano 110	total
Polvo	12.3	11.3	23.6
Película sin glicerol	9.0	4.3	13.3

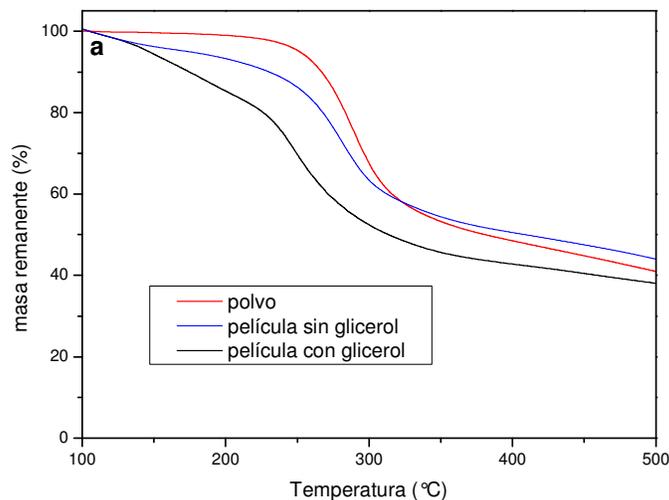
Para la película de quitosano sin glicerol, se observa un corrimiento de los dos picos hacia mayores ángulos, lo cual puede deberse a un aumento de interacciones intermoleculares del quitosano al formarse las películas. El pico correspondiente al plano de difracción 020 se desplaza a 17° y se lo atribuye al quitosano hidratado (Sionkowska y col., 2004). Zhang y col (2005) observaron un aumento del espaciado d a medida que disminuía el DD de quitosano, sobre todo para el plano 020, y lo atribuyeron a un cambio en las fuerzas intermoleculares, así como a la historia previa de la muestra, incluyendo temperatura de preparación y condiciones de almacenamiento y manipuleo. En el difractograma de la película sin glicerol (Figura 5.6) se observa que las dos estructuras cristalinas siguen presentes, pero se ve una disminución considerable del índice de cristalinidad con respecto al polvo. Ziani y col. (2008) informaron índices de cristalinidad (calculados a partir de las intensidades relativas de cada pico) para el plano 110, de 22 y 14 %, para películas de quitosano con 96 y 60.9 % de grado de deacetilación, respectivamente. Los autores explicaron esta diferencia en cristalinidad por el hecho de que las cadenas de quitosano con mayor DD son más compactas, facilitando la formación de puentes de hidrógeno y, así, la formación de cristales en las películas. Además, el quitosano con mayor DD contiene mayor cantidad de grupos glucosaminos, lo cual también facilita la formación de enlaces por puentes de

hidrógeno. El quitosano utilizado en esta tesis tiene un alto grado de deacetilación (98%), por lo que comparativamente los valores medidos son más bajos que los informados por Ziani y col. (2008). De todas formas, si se consideran las variaciones posibles debidas a las diferentes fuentes de los quitosanos, se puede concluir que la cristalinidad medida está dentro de un intervalo razonable.

En la película que contiene glicerol, el pico alrededor de $2\theta=13^\circ$ desaparece por completo, como lo observaron también Ziani y col (2008), resultando en una estructura amorfa. Esto sucede en presencia de glicerol debido a que el plastificante aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas, disminuyendo la cohesión interna de la matriz de quitosano. El glicerol provoca la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de quitosano, para formar enlaces de hidrógeno con sus grupos amino. (Cheng y col., 2003).

Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica del quitosano y de las películas obtenidas a partir del mismo se evaluó mediante análisis termogravimétrico en modo dinámico. En la Figura 5.7 se muestran las curvas de % masa remanente (Fig 5.7(a)) y de sus respectivas derivadas (Fig. 5.7 (b)) en función de la temperatura, para el quitosano en polvo y para las películas sin y con glicerol (gli/Quit=0.28).



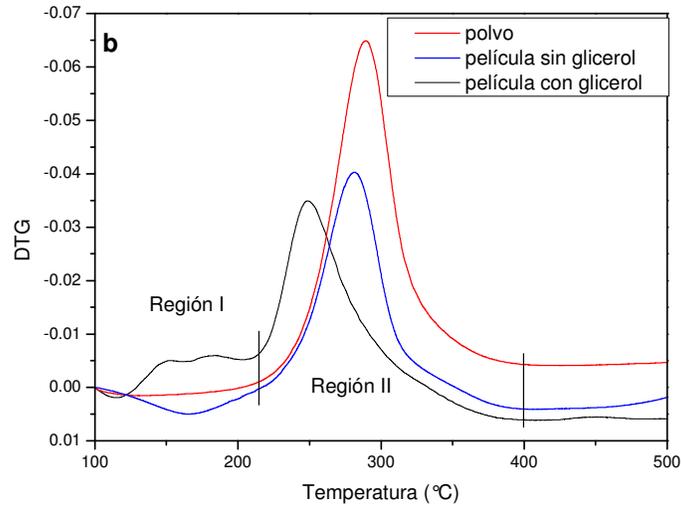


Figura 5.7. Termogramas del quitosano en polvo y de la película de quitosano sin y con plastificante (gli/Quit=0.28), (a) curvas TG; (b) curvas DTG.

La película de quitosano con glicerol muestra dos etapas principales de pérdida de masa, mientras que el polvo y la película sin plastificante presentan sólo una (ver Figura 5.7(b)). La primera región de degradación se atribuye a la pérdida de glicerol, como fue observado también en las películas de caseinato.

En la Tabla 5.2 se muestran los parámetros termogravimétricos del polvo y de las películas de quitosano correspondientes a las Regiones I y II (ver Figura 5.7 (b)), los cuales se determinaron a partir de las curvas TG (Figura 5.7 (a)) y las curvas DTG (Figura 5.7 (b)).

La temperatura inicial de degradación de las películas con glicerol (T_0), la cual se calculó considerando una pérdida de masa del 3 %, es de 133.5 °C. Esta temperatura es apenas inferior a la del inicio de degradación de la película sin glicerol (138°C), pero mucho menor a la correspondiente al polvo. Por otro lado, la película sin glicerol pierde un 8% de su peso total en la Región I, mientras que el polvo de quitosano pierde tan sólo un 1.4%. Estas pérdidas de peso son debidas principalmente a la remoción del agua absorbida que no pudo eliminarse hasta los 105°C y que estaba ligada a través puentes de hidrógeno (Sugama y Cook, 2000; Ostrowska-Czubenko y Gierszewska-Druzynska, 2009). Para la película con glicerol este porcentaje de pérdida de masa es mucho mayor (17.4%) debido a que también incluye la eliminación de plastificante. El valor medido es más bajo que el contenido de glicerol nominal (22% con respecto al peso total), sugiriendo que el quitosano retiene fuertemente el plastificante, debido al alto contenido de grupos OH en el polisacárido.

Tabla 5.2. Parámetros termogravimétricos del quitosano en polvo y de la película con y sin glicerol.

Parámetros termogravimétricos		Polvo	Película	
			sin glicerol	gli/Quit=0.28
T₀ (°C)		238.7	138.1	133.5
Región I	T_{d,max} (°C)			152-182.5
(105-215)°C	Pérdida de peso (%)	1.4	8.1	17.4
Región II	T_{d,max} (°C)	289.4	281.0	249.0
(215-500)°C	Pérdida de peso (%)	57.63	47.93	44.55
Residuo sólido (500 ° C)		40.97	43.97	38.05

La segunda etapa de degradación (Región II en Figura 5.7(b)) está asociada a la descomposición del quitosano (Pawlak y Mucha, 2003). Se analizaron las $T_{d,max}$ de los distintos materiales, y se observó que éstas toman menores valores pasando del polvo de quitosano a las películas sin y con glicerol. Lo anterior indica una mayor estabilidad térmica para la película sin glicerol ($T_{d,max}= 281.0^{\circ}\text{C}$) con respecto a la película plastificada ($T_{d,max}= 249.0^{\circ}\text{C}$), asemejándose su respuesta en degradación a la del polvo de quitosano ($T_{d,max}= 289.4^{\circ}\text{C}$). Además, al analizar las pérdidas de masa correspondientes a la Región II, se encontró que éstas se reducen significativamente al formar la película (de 57% para el polvo a 47% para las películas). Por otro lado hay que tener en cuenta que la película de quitosano tiene cristales hidratados y el agua proveniente de ellos (absorbida) se sigue perdiendo por encima de los 105°C ; entonces los valores reales de pérdida de peso en esta región, recalculados en base seca son 58.5 y 52.2°C , respectivamente, resultando más parecidos entre sí. Pawlak y Mucha (2003) encontraron una $T_{d,max}$ de 288°C y un residuo sólido del 42 % a 450°C para películas de quitosano sin glicerol, lo que se corresponde satisfactoriamente con lo informado en esta tesis.

En resumen, las películas comienzan a degradarse a menores temperaturas que el polvo y tienen, también, su máximo de degradación a temperaturas inferiores. En cuanto a los valores de residuo final a 500°C , se observa que la película sin glicerol es la que más retiene su peso, siguiéndole el polvo y por último la película con glicerol (38%). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, al corregir este valor eliminando al glicerol en

los cálculos, se obtiene un residuo final cercano al 46 %, un valor muy similar al medido para la película obtenida sin el plastificante.

Efecto del contenido de plastificante sobre propiedades ópticas, mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua

Los agentes de plastificación son esenciales para corregir los problemas de fragilidad de las películas biopoliméricas. La fragilidad es una característica inherente atribuida a la estructura primaria compleja y a las fuerzas intermoleculares débiles desarrolladas por los polímeros naturales. Los plastificantes actúan reduciendo las fuerzas intermoleculares del polímero, disminuyendo así la rigidez de la estructura de la película y aumentan la movilidad de las cadenas poliméricas, mejorando, de esta forma, su capacidad de formación (Srinivasa, Ramesh y Tharanathan, 2007).

Al igual que para la película de caseinato, se utilizó glicerol como plastificante. Suyatma y col. (2005) encontraron que glicerol y polietilenglicol eran los más adecuados como plastificantes del quitosano, tomando en cuenta su eficiencia de plastificación.

Opacidad

Se midió la opacidad de películas de quitosano preparadas con diferentes contenidos de glicerol con el objetivo de cuantificar la transparencia de las mismas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.3. Comparado con los valores de opacidad de las películas de caseinato, se observa que las películas de quitosano presentan una transparencia menor (200-280 UA*nm, aproximadamente).

Tabla 5.3. Valores de opacidad para películas de quitosano y caseinato con diferente contenido de glicerol.

Película	Relación en peso Gli/Quit (%)	Opacidad (UA*nm)	Espesor (mm)	Opacidad/ espesor (UA*nm*mm⁻¹)
Cas	0	154.25± 19.63	0.096± 0.028	1606.77± 511.38
	28	142.56± 15.55	0.096± 0.025	1485.00± 419.26
	50	125.91± 22.91	0.127± 0.018	991.42± 228.59
Quit	15	240.55± 37.23	0.086± 0.016	2797.09± 677.23
	28	254.30± 28.65	0.08± 0.007	3178.80± 453.55
	50	231.72± 15.36	0.095± 0.014	2439.16± 394.23

No se observa una tendencia clara con el agregado de glicerol como se vio para las películas de caseinato de sodio. Sólo se encuentra un aumento en la transparencia cuando incrementamos el contenido de glicerol de 28 a 50 % en peso.

Propiedades mecánicas

Se investigó el efecto del contenido de glicerol sobre las propiedades mecánicas en tracción de las películas de quitosano. Las curvas se muestran en la Figura 5.8(a), y los resultados de las propiedades se resumen en la Tabla 5.4.

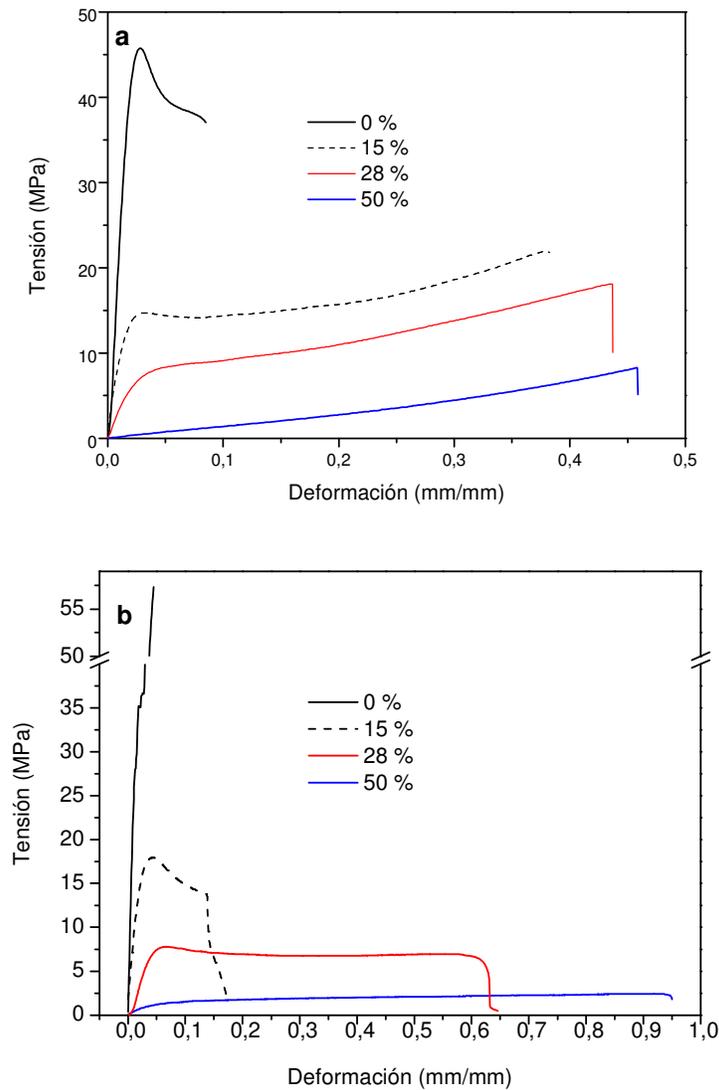


Figura 5.8. Curvas tensión-deformación de películas formuladas con diferente contenido de glicerol (% gli/Quit), acondicionadas a 23 °C y a 50% HR. a) Películas de quitosano; b) películas de caseinato.

Los valores medidos de propiedades mecánicas dependen no sólo del grado de deacetilación del quitosano, sino también del peso molecular y de las condiciones de ensayo (velocidad de deformación de la muestra en el ensayo de tracción, humedad relativa). A pesar de estas variables, los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con los informado por otros autores para películas de quitosano con distinto grado de deacetilación y ensayadas en diferentes condiciones. En la Tabla 5.5 se muestra un detalle de los resultados presentados por algunos de ellos.

La Figura 5.8(a) muestra que el efecto de la adición de plastificante sobre el comportamiento mecánico de películas de quitosano es muy similar a aquel obtenido para películas de caseinato (Figura 5.8(b), se incluye para facilitar la comparación). La rigidez de las películas (módulo elástico) y la tensión de fluencia disminuyen, mientras que la deformación última aumenta con la relación en peso glicerol/quitosano en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla 5.4. Propiedades mecánicas en tracción de películas de quitosano formuladas con diferentes contenidos de glicerol, acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

Relación en peso Gli/ Quit (%)	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
0	2386.7± 53.8	43.2± 1.5	2.7± 0.1
15	819.2± 53.6	23.4± 2.1	39.5± 2.1
28	229.8± 56.1	17.3± 2.8	44.2± 7.9
50	13.8± 0.3	8.3± 0.9	45.0± 2.6

Tabla 5.5. Propiedades mecánicas en tracción de películas de quitosano reportadas por otros autores.

Observaciones	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)	Referencias
DD= 80 %; 50 mm/min		52.71± 4.27	7.67± 2.16	Srinivasa y col., 2004
DD=95 %; 25 mm/min		37.037± 1.29	3.457± 0.34	Pranoto y col., 2005
50 mm/min	858.33	31.3	29.84	Srinivasa y col., 2007
20 % glicerol, DD= 96 %; 75% HR, 48 mm/min.		47.1± 9.6	67.3± 2.9	Ziani y col., 2008
DD= 78%, 50 mm/min	1875	39.10	10.84	Srinivasa, Ramesh y
25 % glicerol, DD= 78%, 50 mm/min	19.35	14.14	34.00	Tharanathan, 2007

Las curvas también muestran un punto de fluencia definido hasta una relación en peso de glicerol del 15 %. Se evidencia en la Figura 5.8 que las películas de quitosano son más sensibles a la adición de plastificante que las películas de caseinato. Las películas de quitosano preparadas con una relación en peso del 15 % de glicerol, alcanzan una deformación máxima (bajo cargas de tracción) a un valor aproximado de 40 %, mientras que las de caseinato rompen a una deformación de alrededor del 13 %. Además, las películas de quitosano preparadas con glicerol, presentan endurecimiento por deformación hasta el punto de ruptura (excepto a altos contenidos de glicerol), una característica que no fue observada para películas de caseinato.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Se midió la permeabilidad al vapor de agua de películas de quitosano con distinto contenido de glicerol. Los ensayos se realizaron a 23 °C usando un gradiente de humedad relativa de 0- 64.5%.

En la Figura 5.9 se muestran los valores de permeabilidad obtenidos.

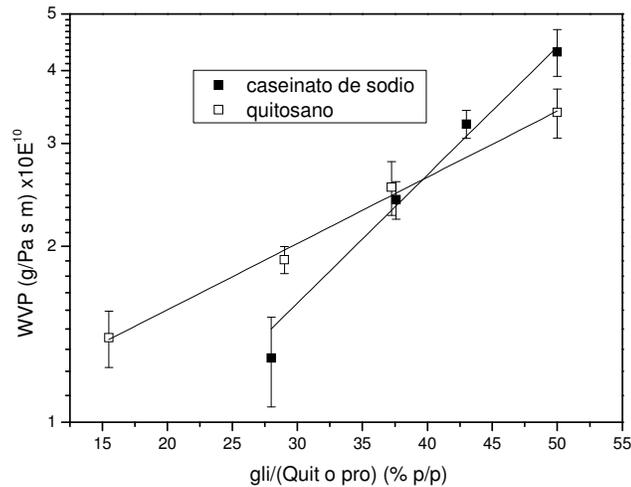


Figura 5.9. WVP en función del contenido de glicerol de películas de caseinato de sodio (■) y de quitosano (□) valores experimentales y (—) curva modelada.

En literatura se encontraron valores de la misma magnitud para películas de quitosano con diferentes grados de deacetilación: $2.6 \cdot 10^{-10}$ a $4 \cdot 10^{-10}$ g.m/Pa.s.m² para películas de quitosano (DD=95 %) modificadas con aceite de ajo y 2.672×10^{-10} g.m/Pa.s.m² $\pm 2.52 \times 10^{-11}$ g.m/Pa.s.m² para las películas de quitosano sin modificaciones (Pranoto y col., 2005); 1.53×10^{-10} g.m/Pa.s.m² para películas de quitosano con menor grado de deacetilación (DD=78 %) (Srinivasa, Ramesh y

Tharanathan, 2007). Ziani y col. (2008) informaron valores de permeabilidad de 1.285×10^{-11} g.m/Pa.s.m² y 1.03×10^{-11} g.m/Pa.s.m² para películas de quitosano con 20 % glicerol y sin glicerol, respectivamente (DD=96 %), ensayados bajo condiciones similares de temperatura y humedad relativa. Estos últimos valores informados son de un orden de magnitud menor a los observados por otros autores, incluyendo los determinados en este trabajo. Esto podría atribuirse a diferencias en el grado de deacetilación del quitosano o en la viscosidad de la solución de casting. Sin embargo, Wiles y col. (2000) aseguran que estas variables no tienen efecto sobre las propiedades de velocidad de transmisión de vapor de agua de películas de quitosano.

Como se esperaba, la permeabilidad al vapor de agua aumenta a medida que se incrementa el contenido de glicerol, lo cual también fue observado por otros autores (Arvanitoyannis y col., 1997; Kolodziejska y Piotrowska, 2006). El glicerol es una molécula hidrofílica relativamente pequeña, que puede insertarse entre cadenas poliméricas adyacentes, disminuyendo atracciones intermoleculares y facilitando así la migración de las moléculas de vapor de agua al aumentar el volumen libre del polímero. Como se vio en el capítulo 3, el contenido de humedad final fue significativamente mayor para las películas de caseinato a medida que se incrementó el porcentaje de glicerol, por lo que éste es otro factor que afecta el resultado, debido al efecto plastificante de las moléculas de agua. Además, la disminución en la cristalinidad de la matriz puede también explicar este comportamiento. Como se mostró en la Figura 5.6, la difracción de rayos X indicó que las películas perdieron cristalinidad, debido a la incorporación del glicerol en la matriz. Esta disminución en la cristalinidad está en relación directa con la reducción de la cohesión de la matriz y por consiguiente conduce a un aumento de la difusión de vapor de agua (Ziani y col., 2008).

A bajos contenidos de glicerol, las películas de quitosano muestran valores de permeabilidad mayores que las películas de caseinato. Sin embargo, se observó un comportamiento opuesto en muestras preparadas con una relación de glicerol en peso mayor al 40 %. También se evidencia (Figura 5.9) una mayor sensibilidad de la matriz proteica a cambios en la concentración de plastificante.

Tal como fue explicado en el capítulo 3 (página 74), los resultados se ajustaron a una ecuación exponencial de dos parámetros (Hernández-Muñoz y col., 2004) (ecuación 3.1). Los valores de WVP_0 , k y los coeficientes de regresión para las películas de caseinato y quitosano se presentan en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Parámetros de ajuste de las curvas WVP vs. contenido de glicerol de las películas de caseinato y quitosano.

Película	WVP₀ x 10¹⁰ (g m/Pa s m²)	k x 10²	R²
Quit	0.924	2.61	0.994
Cas	0.351	5.05	0.989

Como se observa a partir de los coeficientes de regresión, la ecuación 3.1 da un muy buen ajuste de los resultados experimentales. Además, un valor de k mayor para la película de caseinato significa que el glicerol es más eficiente en plastificar películas de proteína que de quitosano, al menos en lo que respecta a la permeación al vapor de agua. Los valores de k calculados se encuentran en el orden de aquellos informados por otros autores, por ej. k=0.042 para películas de gliadina equilibradas a 75 % HR. (Hernández-Muñoz y col., 2004).

Por otra parte, también se investigó el efecto de los gradientes de humedad relativa sobre la permeabilidad de películas de quitosano preparadas con contenido de glicerol constante (15 %). Los resultados experimentales se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. WVP de películas de quitosano (espesor inicial= 0.085 mm) plastificadas (gli/Quit=0.15), expuestas a diferentes gradientes de humedad relativa.

Condición de ensayo (% RH)	WVP x 10¹⁰ (g.m/Pa.s.m²)
0/ 78	2.02± 0.11
0/ 71	1.55± 0.13
0/ 64.5	1.39± 0.15

Como se anticipó, las condiciones de ensayo tienen un gran efecto sobre las mediciones de permeabilidad al vapor de agua. Un aumento en el gradiente de HR (aumentando la humedad dentro de la cámara) tiene un impacto substancial sobre esta propiedad. Los valores de permeabilidad al vapor de agua aumentan a medida que el gradiente de humedad lo hace. Lo mismo fue observado por Lai y Padua (1998) al aumentar la humedad relativa del ambiente de 53 a 98 %. Esto se debe al aumento de la difusividad causada por el efecto adicional de plastificación del agua (Coma y col.,

2003). El agua es un plastificante fuerte para biopolímeros ya que aumenta significativamente el volumen libre de los mismos, permitiendo aumentar la movilidad de los segmentos de las cadenas poliméricas (Ghanbarzadeh y col., 2007).

El mecanismo involucrado en el transporte de masa a través de películas hidrofílicas como las de quitosano es muy complejo. Esta complejidad lleva a isotermas de absorción de agua no lineales. Por lo tanto, el transporte de vapor de agua varía de manera no lineal con la presión de vapor de agua, lo que lleva a la obtención de difusividades dependientes del contenido de agua (Fernández Cervera y col., 2004).

5.2. Películas de Quitosano/Caseinato de sodio

5.2.1 Introducción

Los polímeros derivados de monómeros naturales, como las proteínas y los polisacáridos, ofrecen grandes oportunidades debido a que su biodegradabilidad y su compatibilidad ambiental están aseguradas. Las películas biopoliméricas que contienen ingredientes tanto de proteína como de polisacárido, pueden usar ventajosamente las características funcionales distintivas de cada material formador de la película. Algunos trabajos indican que la incorporación de polisacáridos en matrices proteicas globulares puede extender las propiedades funcionales de cada uno de estos materiales (Fabra y col., 2008).

Las proteínas y los polisacáridos generalmente forman películas con buenas propiedades mecánicas pero con propiedades de barrera pobres, debido a su naturaleza hidrofílica. Sin embargo, existe poca información en literatura acerca de la habilidad de formación de películas cuando se utilizan combinaciones de proteínas y polisacáridos.

Se han reportado trabajos de caseinato de sodio combinado con alginatos y k-carrageninas (Fabra y col., 2008), con maltodextrina (Regan y col., 2009) y con goma xántica (Kobori y col., 2009). En cuanto a las películas de quitosano, existen una gran cantidad de trabajos en los que se lo estudió combinado con gelatina (Arvanitoyannis y col., 1998; Cheng y col., 2003; López-Caballero y col., 2005; Kolodziejska y col., 2006; Kolodziejska y Piotrowska, 2007; Rivero y col., 2009). Pero, de acuerdo a nuestro conocimiento, no es común encontrar trabajos acerca de películas de quitosano-caseinato o quitosano-caseína (Kim y col., 2005). En la producción de estas películas, pueden presentarse ventajas debido a que el quitosano actúa como polímero catiónico y es capaz de establecer interacciones electrostáticas a través de sus grupos NH_3^+ con los grupos aniónicos, como COO^- , presentes en la proteína a pH superiores al punto isoeléctrico. Estas interacciones son responsables de la formación de complejos poliméricos (Li y col., 1992; Dumitriu y col., 1994; Remuñán-López y col., 1998).

El objetivo de esta sección del capítulo es analizar la producción y caracterización de películas comestibles basadas en caseinato de sodio y quitosano, que combinen las principales ventajas de ambos componentes: la alta disponibilidad de la caseína y las propiedades antimicrobiológicas del quitosano. El glicerol se agrega como

plastificante, de manera de obtener películas flexibles que puedan doblarse y manipularse sin romperse. Se presentarán los resultados de la caracterización y del estudio de las propiedades de las películas combinadas quitosano-caseinato, mostrando también la comparación con las películas puras de quitosano y caseinato.

5.2.2 Preparación de películas de quitosano/caseinato de sodio

La preparación de un complejo polielectrolítico a partir de caseinato de sodio y quitosano requiere un control cuidadoso del pH de las soluciones. El caseinato de sodio es estable a pH 6.5 (Guo y col., 1989) y es altamente insoluble en su punto isoeléctrico (pI), que corresponde a un pH entre 3.8 y 4 (Lieske y Konrad, 1994). El quitosano muestra una mayor solubilidad en una solución al 1% vol. de ácido acético (pH 4.4), pero permanece soluble a pH menor a 6.

Dado que el quitosano es un biopolímero catiónico, mientras que el caseinato actúa como macroanión en las condiciones de mezclado (pH>pI), se espera una complejación entre ambos polímeros como resultado de su mezcla íntima (Srinivasa y Tharanathan, 2007). Han y col.(2009) también establecieron que la interacción iónica entre caseinato de calcio y carboximetilcelulosa catiónica puede estabilizar la red proteica. Otros autores obtuvieron complejos polielectrolíticos entre el quitosano catiónico y polímeros aniónicos, entre ellos alginato de sodio (Remuñán-López y Bodmeier, 1997; Remuñán-López y col., 1998), trifolifosfato (TPP) (Shu y Zhu, 2000), xantán (Dumitriu y col., 1994), colágeno (Sionkowska y col., 2004) y proteína de músculo de pescado (Prodpran y col., 2007).

Las soluciones de caseinato de sodio y de quitosano, cuya preparación se explicó en secciones previas, se mezclaron en volúmenes iguales, mediante un agitador magnético (350 rpm), obteniendo una relación en peso Quit-Cas de 0.8. La solución mezcla posee un pH de 5.0 y no se observó separación de fases. Luego se procedió al agregado del plastificante en una relación única glicerol/(quitosano+ proteína) de 0.28, lo cual representa el 22 % respecto del peso del sólido total. Se hicieron pruebas para la preparación de películas con relaciones en peso Quit-Cas de 0.4 y 0.2, pero resultaron incompatibles, probablemente debido a la baja solubilidad del quitosano a pH mayores (el pH de la solución mezcla varía de acuerdo a las proporciones de las soluciones individuales usadas que tienen distintos pH) y a la baja disponibilidad de grupos NH_3^+ para reaccionar con los grupos COO^- del caseinato.

La solución mezcla (40 g) se volcó en placas de Petri y el solvente se evaporó en estufa de convección a 35 °C, durante un tiempo aproximado de 10 horas (dependiente de la humedad ambiente).

5.2.3 Caracterización de las películas

Aspecto macroscópico de la película Quit-Cas

La Figura 5.10 muestra el aspecto macroscópico de la película de quitosano-caseinato. Estas películas son transparentes, con apariencia ligeramente amarillenta, (coloración intermedia entre la de caseinato y la de quitosano) y sin imperfecciones macroscópicas aparentes.



Figura 5.10. Aspecto macroscópico de la película Quit-Cas.

Aspecto microscópico de las películas de quitosano-caseinato

Se analizaron la superficie y la sección transversal obtenida mediante fractura criogénica de la película de quitosano-caseinato plastificada con glicerol (Figura 5.11(a y b)). Como se esperaba de una película obtenida a partir de la complejación de dos polímeros, no se observó separación de fases. Como en el caso de las películas de caseinato, se pudieron visualizar pequeños agujeros en el interior de las mismas (Figura 5.11(b)).

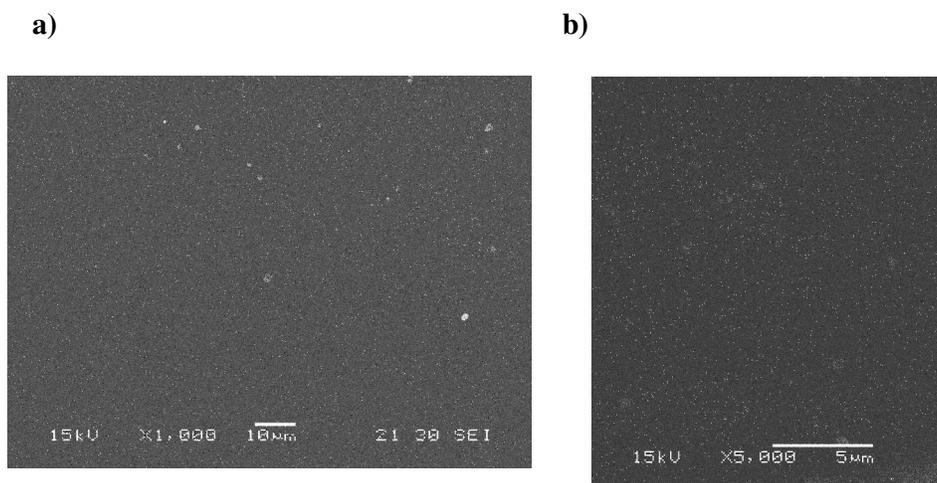


Figura 5.11. Micrografías SEM de películas quitosano-caseinato con glicerol en diferentes secciones de la muestra a) superficie y b) sección transversal obtenida por fractura criogénica.

Material Soluble Total (TSM)

Se determinó el material soluble total en agua a partir de la ecuación 2.2.7 (capítulo 2) de las distintas películas, de manera de evaluar su integridad en ambiente acuoso y también como una indicación cuantitativa del grado de entrecruzamiento o complejación. La Tabla 5.8 muestra las determinaciones del material soluble total.

A diferencia de lo realizado con las películas entrecruzadas con GTA, en este caso la solubilidad se determinó sólo mediante el método HÚMEDO para evitar el entrecruzamiento proteína-proteína generado por efecto del calentamiento de las películas.

Tabla 5.8. Material soluble total (TSM) de películas plastificadas (22% glicerol) de Quit, Cas y Quitosano-Caseinato.

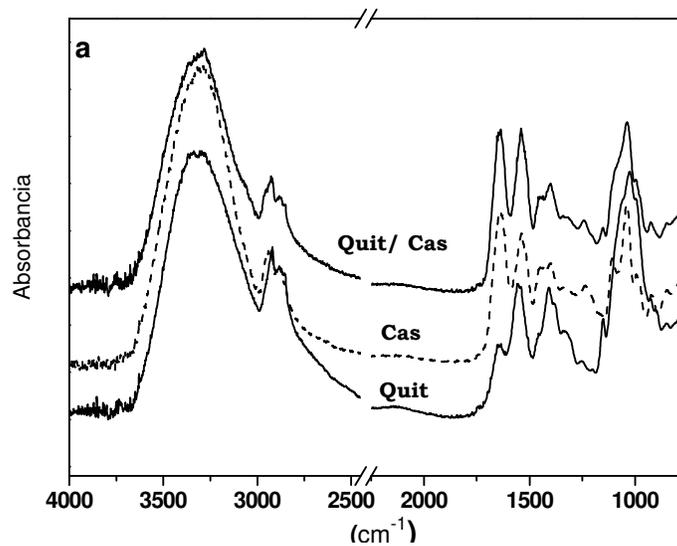
Película	TSM (%)
Cas	100.0± 0.0
Quit	16.2± 0.5
Quit-Cas	14.7± 1.9

La película de quitosano es ligeramente soluble en agua destilada (16.2%), mientras que la película de caseinato se disuelve en su totalidad. Sin embargo, se evidencian bajos valores de TSM para la película compleja (14.7%), cercanos a los de la película de quitosano, lo cual confirma al menos, el desarrollo de interacciones electrostáticas fuertes entre el quitosano y el caseinato. Esto también fue evidenciado

por Prodpran y col (2007) en películas de quitosano con proteínas de músculo de pescado, quienes lo atribuyeron a la formación de entrecruzamientos debidos principalmente a interacciones entre la proteína y el quitosano. Las interacciones que se desarrollan entre quitosano y caseinato pueden ser interacciones físicas (electrostáticas) o químicas resultantes de la reacción entre los grupos aminos del quitosano y los grupos carboxilos de caseinato vía reacción de Maillard, dando lugar a entrecruzamientos covalentes. Esta reacción ocurriría con mayor probabilidad durante el secado de la película, de acuerdo a lo indicado por Prodpran y col (2007).

Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 5.12(a) muestra los espectros infrarrojos de las películas de caseinato, quitosano y de la mezcla quitosano-caseinato (todas formuladas con una relación en peso de glicerol del 28%). Para ilustrar mejor el desarrollo de interacciones resultantes de la complejación de los dos biopolímeros en la mezcla quitosano-caseinato, se obtuvo un espectro de FTIR calculado teóricamente, a partir de la suma de los espectros experimentales de las películas individuales. Los espectros de FTIR de la película quitosano- caseinato, experimental, calculado y diferencia (experimental- calculado), se muestran en la Figura 5.12(b).



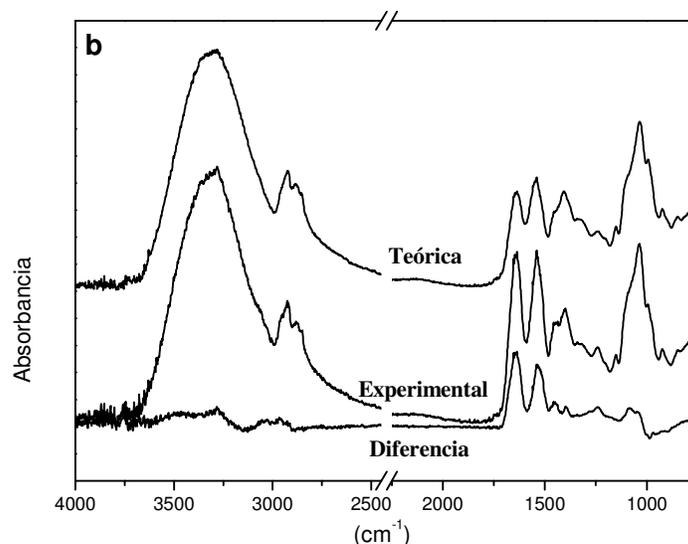


Figura 5.12. Espectros FTIR de a) Películas de caseinato, quitosano y quitosano-caseinato, todas plastificadas con una relación en peso de 28 % glicerol; b) Películas de quitosano- caseinato: teórica, experimental y diferencia (experimental- teórica).

Los espectros FTIR de las películas individuales ya han sido discutidos en secciones previas, por lo que aquí sólo se presenta el análisis de la mezcla compleja.

El espectro calculado se superpone bastante bien con el experimental (ver el buen ajuste en la región de 3000 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de CH), en casi todo el rango de números de onda con excepción de la región amida.

En el espectro experimental se observa una mayor intensidad en las bandas de 1640 y 1550 cm^{-1} , asignadas a los grupos amida I y II. Este incremento puede deberse a la contribución de las vibraciones de estiramiento de los grupos C=O que se producen debido a las interacciones electrostáticas entre los grupos aniónicos del caseinato (COO^-) y los grupos amino catiónicos del quitosano (NH_3^+) (Dumitriu y col., 1994; Sugama y Cook, 2000). Según Bergera y col. (2004), la atracción electrostática es la principal interacción que lleva a la formación del polielectrolito complejo. Esta interacción sería más fuerte que interacciones, tales como los enlaces amida o puentes de hidrógeno, que pueden ocurrir entre estos dos polímeros. En particular, los grupos NH_2 , OH y COOH del caseinato pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos OH del quitosano (Sionkowska y col., 2004; Kolodziejaska y Piotrowska, 2007).

Difracción de rayos X (DRX)

En la Figura 5.13 se representa el difractograma de la película quitosano-caseinato plastificada con glicerol, así como los difractogramas de las películas

individuales de quitosano y caseinato. En el difractograma no se evidencia un pico cristalino definido, lo que indica que se trata de un material amorfo. El espectro resultante es similar a los de las películas individuales de quitosano y caseinato de sodio.

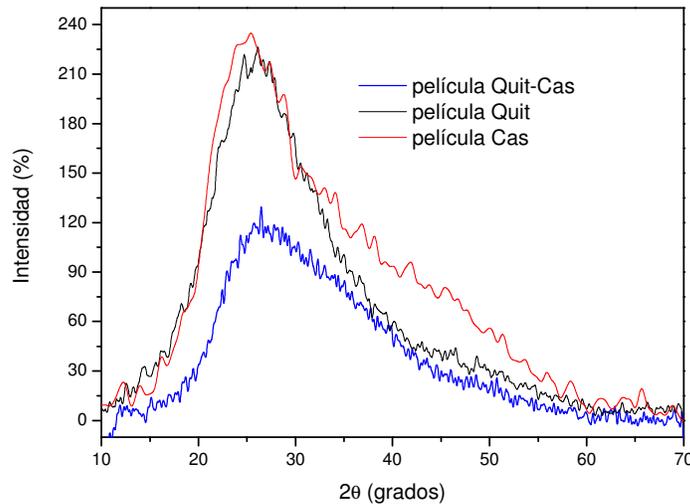


Figura 5.13. DRX de las películas de Quit, Cas y quitosano-caseinato con glicerol.

En bibliografía se encontraron resultados similares, por ejemplo, en películas preparadas a partir de mezclas quitosano-gelatina se observó una disminución de la cristalinidad respecto a la de la película de quitosano puro que fue atribuida a la disrupción de los puentes de hidrógeno de las moléculas de quitosano. Al formar el polielectrolito complejo quitosano-gelatina, los grupos amino en el quitosano forman enlaces de hidrógeno con los grupos carboxilo de la gelatina, resultando en una estructura amorfa (Cheng y col., 2003).

Mediciones de color y opacidad

Se midió la opacidad de películas de Quit, Cas y Quit/Cas, preparadas con una relación en peso de glicerol del 28 %. Los resultados se muestran en la Tabla 5.9. Se observa claramente una reducción de la transparencia de la película híbrida con respecto a la película de caseinato y un aumento con respecto a la de quitosano, es decir, la película mezcla presenta un opacidad intermedia entre la de los dos componentes, lo cual era de esperar al observar la Figura 5.10.

Tabla 5.9. Valores de opacidad de películas de quitosano, caseinato y Quit-Cas, con una relación en peso del 28% de glicerol.

Película	Opacidad (UA*nm)	Espesor (mm)	Opacidad/ espesor (UA*nm*mm⁻¹)
Cas	142.56± 15.55	0.096± 0.025	1505.04± 150.50
Quit	254.30± 28.65	0.080± 0.007	3398.31± 274.09
Quit-Cas	180.34± 24.16	0.071± 0.016	2550.80± 195.03

Para complementar estos resultados, se midieron también los parámetros de color, y éstos se presentan en la Tabla 5.10. El parámetro L^* (luminosidad) es alto para todas las películas, pero especialmente para las películas de caseinato y la mezcla. Sin embargo, los cambios más notorios se observan en el parámetro b^* (azul-amarillo), siendo mayor para las película de quitosano, lo cual era previsible luego de observar su coloración amarillenta en la fotografía de la Figura 5.3. Pranoto y col (2005) también observaron, a través de mediciones de color, que las películas de quitosano eran ligeramente amarillentas. La película compleja presenta un valor de b^* intermedio, indicando que la película proteica se vuelve más amarillenta a medida que el quitosano se incorpora a la película. El color amarillento del quitosano se atribuye a los grupos amino libres, que son susceptibles al pardeamiento mediante la reacción de Maillard, como establecieron Prodpran y col. (2007).

Tabla 5.10. Parámetros de color de películas de quitosano, caseinato y quitosano/caseinato plastificadas.

Película	L^*	a^*	b^*	WI
Cas	87.95± 1.29	0.58± 0.08	-2.11± 1.09	88.49± 0.49
Quit	80.59± 1.39	0.008± 1.19	44.67± 2.39	51.14± 2.55
Quit-Cas	85.85± 0.76	-3.32± 0.26	23.28± 2.84	73.94± 3.04

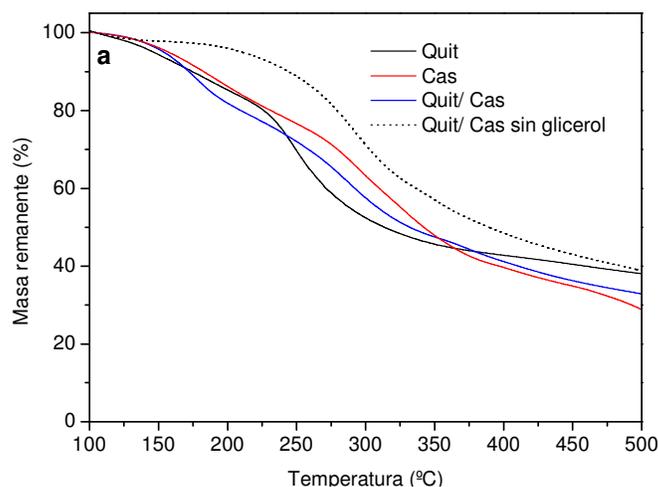
El índice de blancura (WI) es una medida complementaria de la transparencia, ya que las mediciones se hicieron a partir de un plato blanco estándar. De los valores en la Tabla 5.10 podemos observar la menor transparencia para la película de quitosano, mientras que la película compleja presenta valores intermedios, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en la Tabla 5.9. Podemos deducir también que el valor b^* referido al color amarillo está relacionado de manera inversa con la transparencia, es decir, a medida que el color amarillo aumenta, la transparencia

se reduce. Esto también fue observado por Prodpran y col (2007) en películas proteicas de músculo de pescado con quitosano.

Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de las películas se evaluó mediante ensayos termogravimétricos. La Figura 5.14 muestra las curvas de pérdida de masa (Figura 5.14(a)) y sus derivadas (Figura 5.14(b)), como función de la temperatura, obtenidas para películas de caseinato, quitosano y de la mezcla quitosano- caseinato, con y sin el agregado de glicerol. Las curvas se muestran desde 100°C ya que, como en las secciones previas, las pérdidas de peso experimentales se recalcularon en base seca (considerando que hasta 105°C sólo se produce la evaporación del agua absorbida por las muestras).

Los tres sistemas plastificados muestran un comportamiento similar, con dos etapas principales de pérdida de masa. La primera región en la Figura 5.14 (por encima de 105°C y hasta 200-240°C, dependiendo de la muestra considerada) se atribuye a la pérdida de glicerol. Esto está claramente ilustrado si comparamos los termogramas (señal derivada y pérdida de masa) de las películas complejas sin plastificar con los de las plastificadas. La película sin plastificar presenta sólo una región de degradación por encima de 200°C.



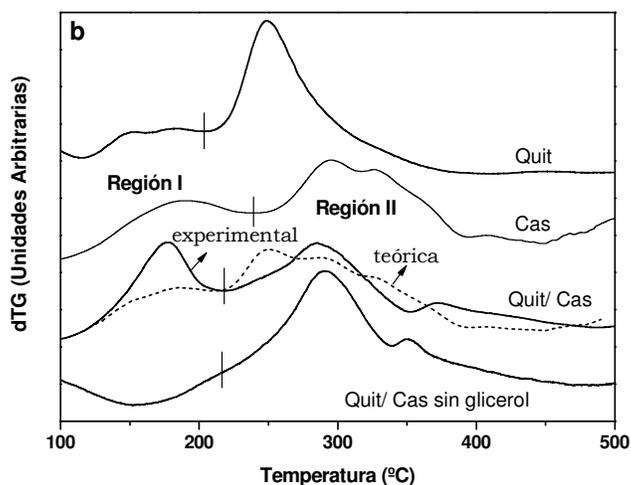


Figura 5.14. Termogramas de películas de Quit, Cas y de Quit-Cas, sin y con el agregado de glicerol (gli/quit+cas, 28 %). a) Curvas TG; b) Curvas DTG, corridas verticalmente para su mejor visualización.

La segunda región de degradación (en cada termograma) está asociada directamente a la degradación térmica del caseinato de sodio y/o del quitosano.

La Tabla 5.11 muestra el intervalo de temperaturas y las pérdidas de peso correspondientes a cada región, como se indica en la Figura 5.14(b). Los resultados observados de la Región I indican que los valores medidos están en buena concordancia con el contenido de glicerol de las muestras (el glicerol está siendo eliminado en esta región), al menos en las películas de caseinato y quitosano- caseinato. La Tabla 5.11 también resume la temperatura inicial de degradación (T_0), la temperatura ($T_{d,max}$) correspondiente al máximo de los picos de degradación en ambas regiones, y el residuo sólido a 500°C, para las películas investigadas. De la comparación de las curvas surge claramente que la degradación del quitosano (Región II) aparece corrida hacia mayores temperaturas cuando se lo compleja con caseinato, como resultado de las fuertes interacciones desarrolladas entre los dos componentes (ya discutido en la sección de FTIR) que, aparentemente mejoran la resistencia térmica del quitosano.

Tabla 5.11. Parámetros termogravimétricos para películas plastificadas de Quit, Cas y Quit-Cas (con y sin glicerol).

Parámetros termogravimétricos		Cas	Quit	Quit-Cas	
		Gli/Cas=0.28	Gli/Quit=0.28	Sin glicerol	Gli/Quit-Cas=0.28
T₀ (°C)		144.0	133.5	183.8	142.9
Región I	Intervalo de T (°C)	(105-240)	(105-215)	(105-218)	(105-218)
	T_{d,max} (°C)	190.0	152.0-182.5	-----	177.0
	Pérdida de peso (%)	21.33	17.40	5.84	21.51
Región II	Intervalo de T (°C)	(240-500)	(215-500)	(218-500)	(218-500)
	T_{d,max} (°C)	295.0/326.0	249.0	290.5 y 350.1	285.0
	Pérdida de peso (%)	49.83	44.55	55.36	45.64
Residuo sólido (500 °C)		28.84	38.05	38.80	32.85

El residuo sólido de la película híbrida plastificada resultó intermedio entre los valores de las películas de caseinato y quitosano.

La Figura 5.14(b) también muestra la curva teórica DTG para la degradación de la película compleja, calculada a partir del peso de las curvas DTG de los componentes individuales (quitosano y caseinato). Como puede observarse, las dos curvas difieren significativamente como resultado de las interacciones específicas que tienen lugar entre los dos principales componentes de las películas. Los resultados experimentales muestran que el glicerol es fácilmente eliminado en la Región I (Tabla 5.11), probablemente debido a los enlaces formados entre el caseinato y el quitosano, lo cual reduce el número de uniones disponibles para enlazarse con glicerol. Al analizar en mayor detalle, se observa que la degradación en la Región II aparece a mayores temperaturas en la curva experimental que en la teórica, indicando que el material es más resistente a la degradación térmica que lo esperado teóricamente.

Propiedades termomecánicas

Se realizaron ensayos termomecánicos sobre películas de caseinato de sodio, quitosano e híbridas, todas plastificadas con 28% de glicerol, con la finalidad de establecer los intervalos de temperaturas de transición vítrea o, más precisamente, de ablandamiento del material. En la Figura 5.15 se muestran las curvas de $\tan \delta$ vs

temperatura de las distintas películas. Las curvas representan resultados promedio de las mediciones.

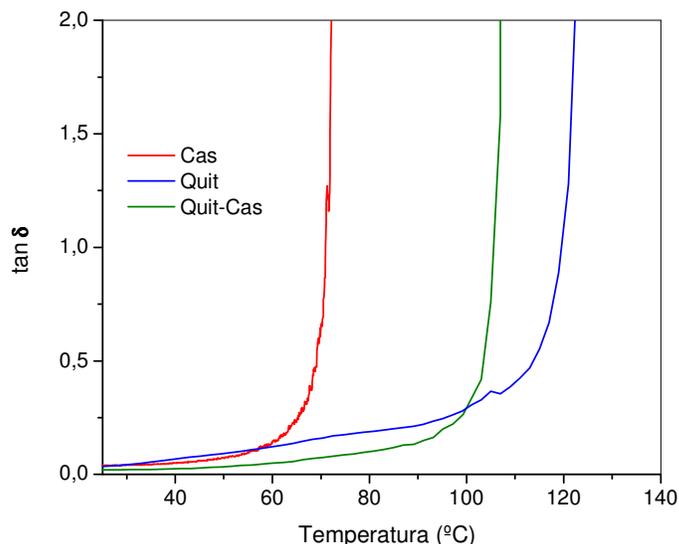


Figura 5.15 Curvas $\tan \delta$ vs temperatura de películas plastificadas de caseinato, quitosano y quitosano-caseinato.

Se observa que la película de quitosano puro se ablanda a la mayor temperatura, a partir 105°C. Por otro lado, las películas híbridas presentan en este punto un comportamiento intermedio, aunque su Tg está mucho más cerca de la muestra de quitosano que de las películas de caseinato de sodio. Nuevamente, este comportamiento se asocia a las fuertes interacciones desarrolladas durante la complejación del híbrido.

Propiedades mecánicas

Ensayos de Tracción

La Figura 5.16 muestra el comportamiento en tracción comparativo de las películas plastificadas de Cas, Quit y de Quit-Cas. El material combinado muestra resistencia mejorada con respecto a las películas simples. Es interesante notar que sus propiedades no correspondieron al promedio ponderado de las propiedades de los constituyentes individuales, sino que la complejación favorece el desarrollo de efectos sinérgicos que mejoran el comportamiento con respecto al de los componentes puros. Este es el resultado de las interacciones catiónico- aniónicas que pueden establecerse entre las dos macromoléculas, lo que se traduce en un aumento en la resistencia del material. La película Quit-Cas muestra endurecimiento por deformación al igual que la película de quitosano, con un incremento débil en la extensibilidad, 8% con respecto a

las películas de quitosano, pero disminuye un 24 % con respecto a las películas de caseinato. Sin embargo, las películas complejas aún alcanzan una deformación última del 50 %, lo cual permite una fácil manipulación sin riesgos de quebrarlas. Prodpran y col (2007) también encontraron que la incorporación de quitosano a películas proteicas reducía su capacidad de estiramiento, y Srinivasa y col (2007) informaron que la elongación de películas de polivinilalcohol se reducía cuando se incorporaba quitosano a las mismas.

La Tabla 5.12 resume los resultados de las propiedades mecánicas. Los valores del módulo elástico son muy similares para las películas de caseinato y quitosano, y como resultado, la película compleja muestra un valor casi idéntico (considerando los errores experimentales).

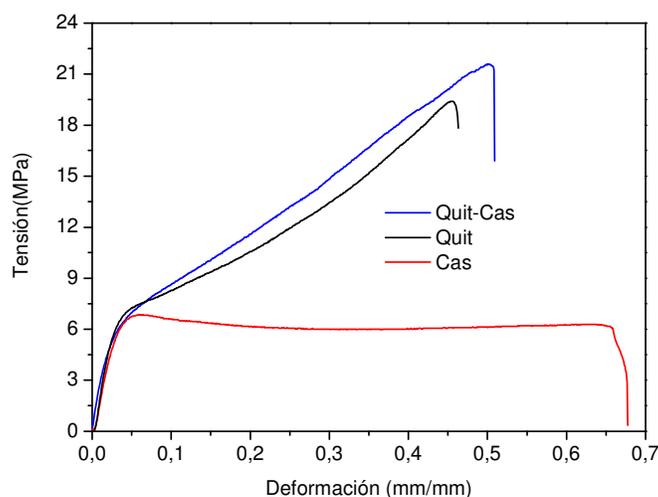


Figura 5.16. Comportamiento mecánico en tracción de películas de Quit, Cas y Quit-Cas, todas preparadas con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

Estudios en otras películas complejas como gelatina-quitosano, han indicado que estas películas presentan propiedades intermedias respecto de las propiedades de las películas puras (Arvanitoyannis y col., 1998). Lo interesante de los resultados obtenidos en esta sección es que la resistencia y el módulo en tracción de las películas complejas son comparables o levemente mejores que los correspondientes a las películas de quitosano.

Tabla 5.12. Propiedades de tracción de películas de Cas, Quit y Quit-Cas, con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

Película	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
Cas	250.9± 20.3	6.2± 0.2	63.2± 6.0
Quit	229.8± 56.1	17.3± 2.8	44.2± 7.8
Quit/Cas	223.6± 63.8	19.6± 2.8	47.9± 5.7

Ensayos de fractura mediante impacto

Las propiedades deseadas en un material para envasado de alimentos dependen de su aplicación. En general, un envase para alimentos debe ser un material no excesivamente deformable, para proveer integridad estructural o reforzar la estructura alimenticia o, al contrario, una película altamente deformable para aplicaciones tales como envoltura de alimentos (Mali y col., 2004).

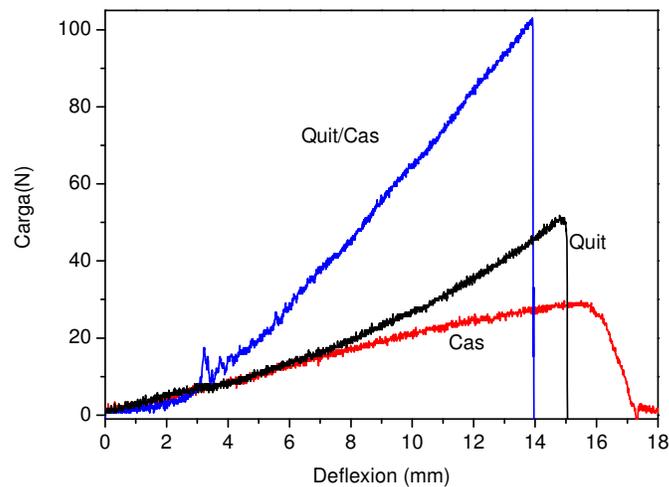


Figura 5.17. Comportamiento mecánico en impacto de películas de Quit, Cas y Quit-Cas, con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

La Figura 5.17 muestra los fractogramas IFWI para las películas de Cas, Quit y Quit-Cas, preparadas con una relación en peso de glicerol del 28 %, acondicionadas a 50 % HR. En la Figura se aprecia claramente la gran mejora obtenida al mezclar los dos componentes naturales: las películas híbridas resultan mucho más tenaces que las preparadas a partir de los constituyentes individuales, como lo indica el importante aumento en el área bajo la curva carga vs deflexión.

Tabla 5.13. Propiedades de impacto de películas de Cas, Quit y Quit-Cas, todas preparadas con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

Película	σ_d (GPa)	$E_i \times 10^3$ (J/mm)	$E_p \times 10^3$ (J/mm)	$E_t \times 10^3$ (J/mm)	DI
Quit	26.6± 3.5	4.6± 0.7	0.0± 0.0	4.6± 0.7	0.0± 0.0
Quit/Cas	35.6± 5.3	6.7± 0.6	0.0± 0.0	6.7± 0.6	0.0± 0.0
Cas	13.4± 2.4	3.1± 0.2	1.0± 0.1	4.1± 0.5	0.2± 0.04

La Tabla 5.13 resume los valores calculados obtenidos a partir de estos fractogramas. Las películas de Quit-Cas muestran una resistencia al impacto (σ_d) y una energía consumida para iniciar la fisura (E_i) mayores que las correspondientes a las películas de Cas y Quit. Por otra parte, la película compleja sigue el mismo comportamiento de fractura frágil (sin energía de propagación) que la película de quitosano. Estos resultados están en concordancia con la mejora de las propiedades en tracción observadas para la película compleja, y constituyen un incentivo importante para la utilización de este material como alternativa a las películas preparadas con cualquiera de los componentes de películas individuales.

Ángulo de contacto estático

Las proteínas y los carbohidratos poseen carácter hidrofílico y las medidas de ángulo de contacto son un buen indicador de esta propiedad en la superficie de las películas (Ghanbarzadeh y col., 2007). Esta técnica utilizada para determinar la polaridad de la superficie de las películas, permite complementar los resultados obtenidos mediante otras técnicas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que éstas mediciones corresponden a una propiedad superficial y no volumétrica. La Tabla 5.14 resume los valores de ángulo de contacto determinados por goniometría.

Como es bien sabido, el ángulo de contacto con un solvente polar (etilenglicol o agua) aumenta con la hidrofobicidad superficial creciente de las películas (Kokoszka y col., 2010). En la Tabla 5.14 se observan ángulos menores a 90° en todos los casos, siendo el menor de ellos el correspondiente a películas de caseinato (26.3°), por lo que éstas resultaron ser las películas con mayor polaridad superficial. Se observó una rápida disminución de los ángulos de contacto con el tiempo de exposición, sugiriendo un cambio rápido de las propiedades superficiales, debido a que las superficies de las películas permiten la infiltración o absorción del solvente polar. Por ello, las mediciones

se hicieron a tiempos relativamente cortos (15 segundos), antes de que comience a variar el ángulo por la penetración del solvente (Sugama y Cook, 2000). Esta disminución de los valores de ángulo fue también observada por Extrand y Kumagai (1997) para películas de gliadina, y por Kokoszka y col. (2010) para películas de proteína del suero de leche hasta los 30 segundos de medición; este período fue considerado como el tiempo de absorción y, a partir de ese instante, el volumen de la gota comenzó a crecer nuevamente, lo que se atribuyó al hinchamiento de las películas.

Se informaron resultados similares en bibliografía para películas proteicas de arveja (14-40°) (Gueguen y col., 1998), de girasol con diferente contenido de plastificante (12–30°) (Ayhllon-Meixueiro y col., 2000) y de quitosano (62°) (Cheng y col., 2003), todas las mediciones utilizando agua como solvente. Sin embargo, películas de gliadina exhibieron ángulos de contacto con agua entre 85 y 105°, sugiriendo una mayor hidrofobicidad superficial, lo cual pudo atribuirse a la insolubilidad en agua de las proteínas de gluten (Sanches y col., 1998). Las películas de zeína sin plastificante mostraron ángulos relativamente altos con etilenglicol (40°) en comparación con las películas de caseinato. Esto se debe a la alta relación de aminoácidos hidrofóbicos en su composición (Ghanbarzadeh y col., 2007), en oposición al caseinato que se caracteriza por su alto contenido de aminoácidos hidrofílicos.

Tabla 5.14. Medida del ángulo de contacto con etilenglicol correspondiente a la superficie de las películas obtenidas.

Película	$\theta_{\text{etilenglicol}}$ (°)
Cas	26.31± 1.59
Quit	65.71± 3.01
Quit-Cas	67.10± 1.22

Las películas complejas Quit-Cas presentan un valor de ángulo de contacto mayor (67.1°) en relación con las películas puras de caseinato y quitosano, y no un valor intermedio como habría de esperarse. Nuevamente, las películas híbridas presentan un valor similar e incluso mayor a las muestras de quitosano, lo cual se traduce en una mayor hidrofobicidad superficial, al menos para tiempos cortos de contacto. Esta es una característica deseable en películas que estarán en contacto con alimentos y constituye una mejora importante respecto de las películas basadas en caseinato, cuya principal desventaja es su alta higroscopicidad.

Absorción de humedad

Se evaluó el comportamiento de absorción de agua de películas de quitosano, caseinato y Quit-Cas, preparadas con una relación en peso de glicerol (%) de 28. La Figura 5.18 muestra las curvas de absorción de humedad de películas de Quit y Quit-Cas (las isotermas de absorción de humedad de películas de Cas se presentaron en el capítulo 3, Figuras 3.11 y 3.12) a 23 °C y 75 % HR, en función del tiempo.

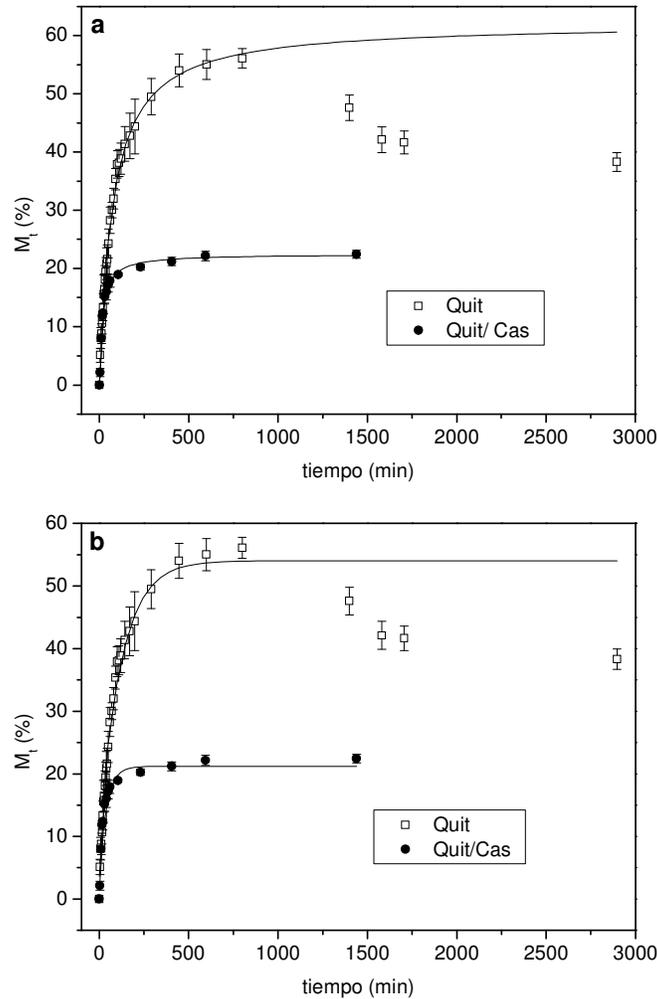


Figura 5.18 Isotermas de absorción de humedad de películas de Quit y Quit-Cas a 23 °C y 75 % HR. a) Las líneas sólidas representan el ajuste de la ecuación de Peleg (ec. 2.2.9), b) Las líneas sólidas representan el modelo de Fick (ec. 2.2.10).

Los contenidos de humedad de equilibrio (EMC) alcanzados por las distintas muestras se obtuvieron por lectura directa a partir de las curvas experimentales (Figura 5.18(a)) y se presentan en la Tabla 5.15. Los datos de absorción de humedad experimental se ajustaron mediante la ecuación empírica de Peleg (ec. 2.2.9) hasta los 1000 min., y los parámetros de ajuste se reportan también en la Tabla 5.15. Por otra

parte, con el fin de calcular los coeficientes efectivos de difusión, los resultados se ajustaron también al modelo de Fick (ec. 2.2.10).

Las Figuras 5.18(a y b) muestran las curvas correspondientes a la ecuación de Peleg y al modelo de Fick, respectivamente. El valor último de absorción de humedad usado en el proceso de ajuste de la ecuación de Fick se tomó a 400 min. Estos valores fueron aproximadamente 20 % para películas Quit-Cas y 54% para películas de quitosano, siendo este último valor comparable a datos reportados por Vargas y col. (2009).

Tabla 5.15. Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión efectivos (D_{ef}) para películas de Cas, Quit y Quit- Cas, con una relación en peso de glicerol (%) del 28.

Película	Espesor (mm)	EMC (%)	Ecuación de Peleg (ec. 2.2.9)			Modelo de Fick (ec. 2.2.10)
			Parámetros de ajuste			$D_{ef} (m^2 s^{-1})$ $\times 10^{13}$
			K_1 (min/% peso)	K_2 (% ⁻¹)	R^2	
Cas	0.089± 0.016	25.08± 0.87	1.055± 0.198	0.0404± 0.002	0.992	2.83± 0.73
Quit	0.100± 0.017	54.06± 2.79	1.149± 0.246	0.0167± 0.002	0.997	1.08± 0.31
Quit-Cas	0.095± 0.007	22.19± 0.74	0.799± 0.144	0.0445± 0.001	0.988	3.58± 0.69

Las curvas sólidas en la Figura 5.18(a) muestran una buena concordancia con los datos experimentales, como se puede ver de los parámetros R^2 (Tabla 5.15). El menor de los parámetros K_1 corresponde a las películas complejas Quit-Cas y el mayor a las películas de quitosano, en comparación con el correspondiente valor de la muestra de caseinato, lo que indica que la velocidad de absorción inicial es mayor para las películas complejas y menor para las de quitosano. La misma conclusión se obtiene del análisis de los coeficientes efectivos de difusión. Además, el valor bajo de K_2 de las películas de quitosano claramente indica que esta muestra tiene la mayor capacidad de absorción final, es decir, es la película más hidrofílica a tiempos relativamente largos. De la Figura 5.18(b) se observa claramente que tanto las películas de quitosano como las de Quit-Cas se desvían del comportamiento Fickiano a tiempos mayores que 600 min. De hecho, después de ese tiempo, el peso de las películas de quitosano disminuyó en vez de aumentar o permanecer constante, indicando probablemente una competencia entre el proceso de degradación y el de absorción de agua.

Las interacciones fuertes desarrolladas entre el caseinato y el quitosano al formar la película compleja dejan disponibles comparativamente pocos sitios en la matriz

polimérica (con respecto a las películas individuales) en los que puede retenerse el agua, y por lo tanto se observa un contenido final de agua reducido (en comparación con quitosano y caseinato). Por la misma razón (menos interacción con el agua), la velocidad de difusión de vapor de agua en la película compleja es mayor que en las películas de quitosano y caseinato puros, debido a que las pequeñas moléculas de agua no son retenidas por el polímero. Se pueden extraer conclusiones similares a partir del análisis del ajuste de Peleg y del modelo de Fick, aunque en el último caso, el alto grado de efectos no-Fickianos introduce incertidumbres en los valores absolutos de las difusividades calculadas.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Se midió la permeabilidad al vapor de agua de las películas de Cas, Quit y Quit-Cas formuladas con conteniendo una relación en peso de glicerol del 28 %. Las mediciones de permeabilidad se llevaron a cabo a dos gradientes de HR (%): 0-64.5 y 100- 64.5 (Tabla 5.16) de manera de evaluar además el efecto del nivel de humedad, que es un parámetro importante en el cálculo de la WVP (Kokoszka y col., 2010).

A partir de las determinaciones realizadas, se observa claramente, que el mayor valor de permeabilidad al vapor de agua corresponde a la película de quitosano, debido a la naturaleza hidrofílica, incluso mayor que la del caseinato, de este carbohidrato (Butler y col., 1996). Las películas basadas en polisacáridos generalmente poseen propiedades de barrera a la humedad débiles (Sebastian y col., 2006). Si las películas son catiónicas y fuertemente hidrofílicas, el agua interactúa con la matriz polimérica y la permeación al vapor de agua aumenta (Gocho y col., 2000). El valor de permeabilidad de la película compleja a un gradiente 0-64.5 % es menor que el de la película de quitosano, pero mayor que el correspondiente a la película de caseinato. Películas compuestas proteína- quitosano también mostraron mayores valores de permeabilidad que los de la película proteica, debido a un incremento en la hidrofiliidad de la película en presencia de quitosano (Prodpran y col, 2007). Vásconez y col (2009) también observaron esta tendencia en películas quitosano-almidón.

Por otra parte, la permeabilidad al vapor de agua de las películas aumenta al aumentar la humedad promedio (a uno y otro lado de la película). Esto debe asociarse con el gran efecto de plastificación del agua que resulta al aumentar la humedad, independientemente del gradiente. Bajo condiciones de alta humedad, el agua, que actúa como plastificante, favorece la relajación de las cadenas poliméricas, posibilitando el

aumento del flujo de solvente, lo que resulta en un aumento en la WVP. Este efecto fue también observado por Kokoszka y col (2010) en películas proteicas del suero de leche ensayadas a distintos gradientes de humedad relativa.

Tabla 5.16. WVP para películas de Quit, Cas y Quit-Cas, a diferentes gradientes de humedad relativa. Todas las muestras con glicerol en una relación en peso del 28 %.

Película	Temperatura (°C)	Espesor inicial (mm)	WVP (g.m/Pa.s.m ²) x 10 ¹⁰	
			% RH ¹	
			0/ 64.5	100/ 64.5
Cas	23	0.088	1.288± 0.226	7.075± 1.186
Quit	25	0.086	1.898± 0.102	9.630± 1.783
Quit/ Cas	24	0.092	1.655± 0.075	10.133± 1.108

¹ Las humedades relativas (% HR) son listadas como adentro y afuera de las cápsulas de ensayo (i-o).

Tanto las películas de caseinato como las de quitosano presentan un aumento similar en la permeabilidad a un gradiente de 100-64.5 con respecto a las películas analizadas a 0-64.5. Pero, mientras que la permeabilidad de las película híbrida Quit-Cas presenta un valor intermedio entre las permeabilidades de las películas de caseinato y de quitosano a 0:64.5, ésta muestra el valor máximo a 100:64.5. Todavía se está tratando de entender este comportamiento, aunque posiblemente pueda relacionarse con el efecto que causa una alta humedad relativa sobre las interacciones desarrolladas entre el polímero catiónico (quitosano) y los grupos carboxilos del caseinato, las cuales condujeron a la formación del complejo polielectrolítico. Una hipótesis posible es que el agua compita con los grupos polares de las proteínas y polisacáridos comprometidos en las interacciones tipo puente de hidrógeno, conduciendo a un aumento del volumen libre de la red. Otra explicación razonable es que bajo condiciones de alta humedad, las películas se hinchen de manera considerable, facilitando las relajaciones de las cadenas poliméricas. El hinchamiento podría facilitar un cambio conformacional en la microestructura de la película compleja que conduzca a una estructura polimérica más abierta, lo que posibilitaría el aumento del flujo de soluto (agua), resultando finalmente en valores de permeabilidad mayores a los esperados.

Como resultado del hinchamiento, podrían también ocurrir cambios en la estructura polimérica como respuesta a las tensiones generadas dentro de la película durante el proceso de absorción (Rogers, 1985). Estas hipótesis están también

respaldadas por observaciones hechas por otros autores: Arvanitoyannis y col. (1998) indican que la cohesión de mezclas gelatina-quitosano aumenta en la presencia de algunas moléculas autoasociadas, como agua o polioles, siempre y cuando la concentración de las mismas no exceda el 20 %. Ellos reportan valores de WVP entre 0.07×10^{-11} a 5×10^{-11} g m/Pa s m² para películas de quitosano/ gelatina plastificadas con agua y glicerol (Arvanitoyannis y col., 1998). En nuestro caso, hay una concentración relativamente alta de glicerol en la película compleja (22% con respecto a la masa total), lo cual, sumado a la masa de humedad absorbida debido al ambiente de alta HR, podría exceder el porcentaje para la asociación de moléculas que asegura una alta cohesión en la película.

Análisis microbiológicos

Ensayos in vitro

Considerando que las soluciones y películas desarrolladas en este trabajo tienen potencial para ser utilizadas en contacto con alimentos, se consideró interesante realizar una evaluación, aunque sea preliminar, de su comportamiento en ese ámbito. Para ello, se seleccionaron alimentos con distintas características físicas y actividades acuosas: zanahoria, queso cheddar y salame de Milano. En particular, la zanahoria es uno de los vegetales más populares, pero su comercialización se encuentra limitada por su rápido deterioro durante el almacenamiento debido a los cambios fisiológicos que le ocurren (Peiyin y Barth, 1998): el producto pierde su firmeza y desarrolla olores característicos de catabolismo anaeróbico, debido a sus altas velocidades de respiración y deterioración microbiológica (Barry- Ryan y col., 2000).

La Tabla 5.17 presenta los resultados del método de difusión en agar (capítulo 2, sección 2.2.16), que se realizó para determinar la sensibilidad de las microfloras nativas de zanahoria, queso y salame a las soluciones formadoras de películas y a las películas resultantes (Cas, Quit y Quit/Cas).

En primer lugar, se verificó la contaminación inicial de los controles realizados (ver cap 2, sección 2.2.16). Ninguna de las soluciones formadoras de películas resultó contaminada, como así tampoco se observó halo de inhibición en el ensayo con ácido acético acuoso (solvente), preparado con el mismo valor de pH que la solución de quitosano. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Fernandez-Saiz y col (2009) para soluciones control de ácido acético, y por Coma y col (2002) en películas basadas en quitosano.

Tabla 5.17. Actividades antimicrobianas de películas y soluciones formadoras de películas de Cas, Quit y Quit/Cas contra la microflora de zanahoria, queso cheddar y salame de Milano.

Microflora alimenticia	Diámetro de zona de inhibición (mm)			Área de inhibición (cm ²)		
	Diámetro inicial= 5 mm			Área inicial= 2.25 cm ²		
	Soluciones formadoras de película			Películas		
	Cas	Quit	Quit/Cas	Cas	Quit	Quit/Cas
Zanahoria	<8.00	9.00± 1.00	<8.00	<2.25	3.00± 0.10	3.30± 0.20
Queso	<8.00	10.00± 1.00	12.00± 2.00	<2.25	3.30± 0.30	4.20± 0.50
Salame	<8.00	8.00± 1.00	10.00± 1.00	<2.25	3.30± 0.40	4.20± 0.60

Dentro de las soluciones formadoras de películas, se observó que la actividad antimicrobiana más significativa fue la ejercida por la solución mezcla quitosano-caseinato sobre las microfloras nativas de queso cheddar y de salame, aunque la microflora de zanahoria no resultó ser sensible a ésta solución. En trabajos similares, Ponce y col. (2008) informaron también acción antimicrobiana limitada de la solución formadora de película de quitosano sobre la microflora nativa de calabaza y lo atribuyeron a que el tamaño del inóculo (aproximadamente 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colonias, UFC, por placa de Petri) era capaz de exceder la actividad de inhibición del quitosano. La anterior explicación podría utilizarse también en el presente caso, ya que no debe perderse de vista que las microfloras de los tres alimentos son diferentes y no tienen porque comportarse de igual manera. En particular, la zanahoria posee la mayor actividad de agua de los tres alimentos, y, como se discutió en secciones previas, la formación del híbrido quitosano-caseinato reduce la cantidad de grupos hidrofílicos, lo que resulta en una disminución de los grupos que pueden ligar agua y podría conducir a una reducción del poder antimicrobiano para este caso en particular. Sin embargo como los discutidos en este punto son estudios *in Vitro* y solo con la microflora, la primera hipótesis, que considera las sensibilidades diferenciales, pareciera ser la más probable.

Por otro lado, la microflora nativa de los tres alimentos resultó ser sensible a la solución de quitosano. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Bautista Baños y col (2005), quienes informaron que en zanahoria, fresa y papaya el quitosano superó el desempeño de compuestos químicos tales como ipridione y tiabendazol, fungicidas comúnmente utilizados para reducir la pudrición acuosa, moho gris y antracnosis, respectivamente. Una de las causas del comportamiento antimicrobiano del

quitosano es el carácter positivo de su grupo amino, que puede interactuar y formar polielectrolitos complejos con los polímeros ácidos producidos en las superficies de las células bacterianas (lipopolisacáridos, ácidos teicoicos y teicurónicos o polisacáridos capsulares), conduciendo a la pérdida de componentes proteínicos y otros constituyentes intracelulares de los microorganismos (Coma y col., 2002; Pranoto y col., 2005). Se ha informado también que el quitosano inhibe el deterioro ocasionado por diferentes bacterias, a través de sus habilidades, tanto para ligar agua como para inactivar distintas enzimas, y para absorber nutrientes normalmente usados por las bacterias (Ouattara y col., 2000). Diversos estudios han mostrado que el efecto de quitosano sobre algunos hongos es debido principalmente a las alteraciones en las funciones de la membrana celular, al interactuar con su superficie fuertemente electronegativa, lo que produce cambios en la permeabilidad, alteraciones metabólicas y en algunas ocasiones, la muerte del microorganismo (Fang y col., 1994).

Finalmente, la solución de Cas no ejerció acción antimicrobiana sobre la microflora de los tres alimentos estudiados.

Con respecto al análisis de las películas, los efectos antimicrobianos más significativos se observaron en muestras de quitosano y Quit-Cas sobre la microflora de queso y salame (Tabla 5.17). Al igual que la solución, la película de caseinato no mostró efectos antimicrobianos en ninguno de los alimentos ensayados. Sin embargo, utilizando la misma técnica para evaluar los efectos antimicrobianos de las películas, Cagri y col (2001) informaron que las películas proteicas de suero son adecuadas para alimentos con valores de pH cercano a 5.2, como las carnes y los quesos.

Las películas de Cas, Quit y Quit/Cas se almacenaron durante 5 días a 40 y 65% HR y a dos temperaturas diferentes (10 y 20°C) con el objetivo de evaluar los efectos de la temperatura y humedad relativa sobre la retención bacteriostática y bactericida. Las Figuras 5.19 y 5.20 muestran las áreas de inhibición de las películas de Quit y Quit-Cas frente a las microfloras de zanahoria, queso cheddar y salame de Milano. El área inicial de inhibición fue misma que se utilizó en el estudio previo (2.25 cm²).

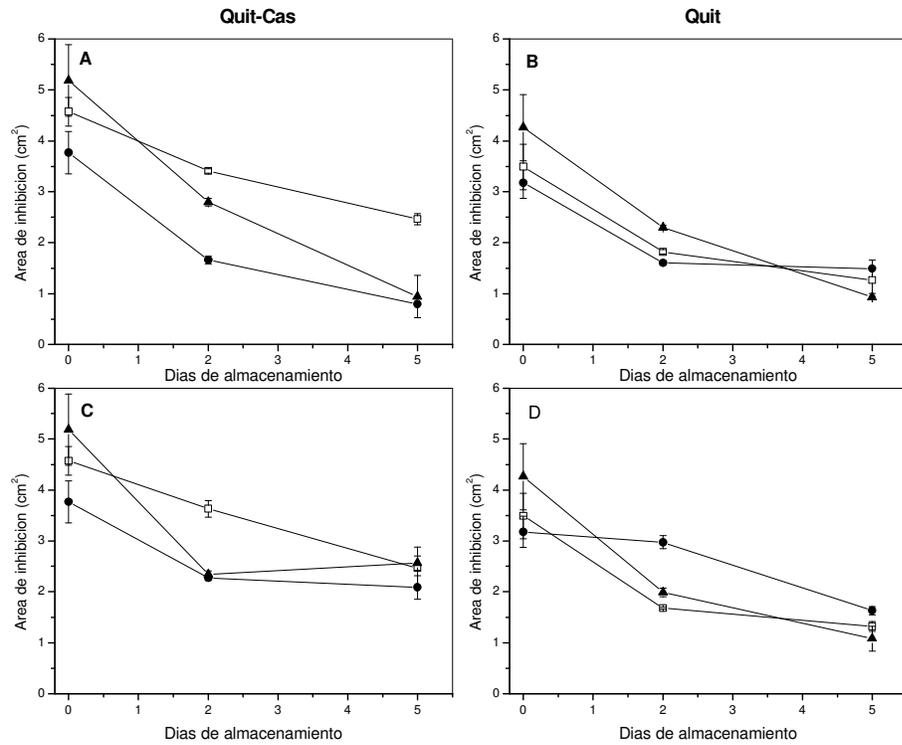


Figura 5.19. Películas de Quit y Quit-Cas almacenadas a 40% HR y temperatura constante (A y B) a 10° C; (C y D) a 20° C; (●) microflora vegetal; (□) microflora de queso y (▲) microflora de carne.

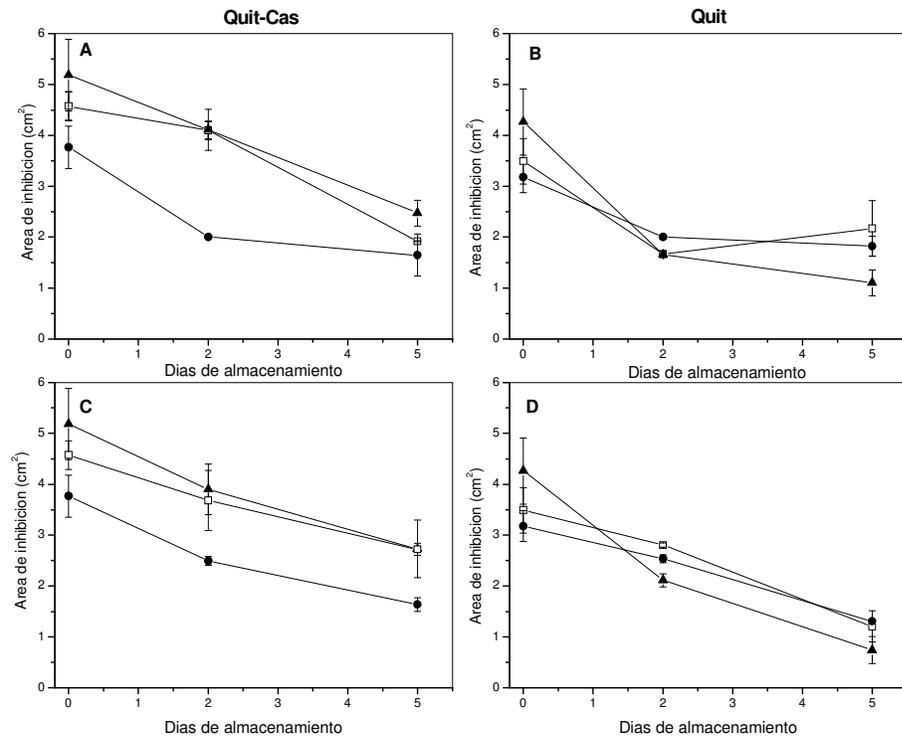


Figura 5.20. Películas de Quit y Quit-Cas almacenadas a 65% HR y temperatura constante (A y B) a 10° C; (C y D) a 20° C; (●) microflora vegetal; (□) microflora de queso y (▲) microflora de carne.

Los efectos antimicrobianos se reducen constantemente a medida que progresa el ensayo en todos los casos (Figuras 5.19 y 5.20), muy probablemente debido a que los grupos amino disponibles del quitosano se saturan rápidamente al unirse a componentes superficiales de las bacterias (Coma y col., 2002). Sin embargo, a los 5 días, la mayor retención antibacteriana se observó a 65% HR, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Como en la sección previa, los efectos más importantes se observaron en la película compleja frente a la microfloras nativas de queso y carne. Mientras que la película de caseinato aisladamente no muestra ninguna propiedad antimicrobiana (dato no mostrado), su combinación con el quitosano mejora su resistencia como biopreservante.

Hay varios factores que afectan la acción antimicrobiana del quitosano, tales como el grado de deacetilación y peso molecular del quitosano, el pH del medio, la composición en nutrientes y /o química del sustrato y, por supuesto, las condiciones ambientales (i.e. actividad del agua del sustrato o la humedad y la temperatura) (Devlieghere y col., 2004; Dutta y col., 2009). El quitosano altamente deacetilado tiene mayor carácter antimicrobiano que aquellos con una mayor proporción de grupos amino acetilados, debido a sus mayores solubilidad y densidad de carga (Dutta y col., 2009). Además, el quitosano tiene una compatibilidad excelente con otras sustancias por presentar alta densidad de grupos amino e hidroxilo en su estructura (Park y col., 2004). Los resultados presentados en esta sección indican que las interacciones fuertes (principalmente fuerzas electrostáticas) desarrolladas entre el quitosano y el caseinato no alteran la capacidad antibacteriana del primero. Por el contrario, otros autores observaron una reducción de la actividad antimicrobiana del quitosano cuando se incorporaron almidón o sorbato de potasio a la película, lo cual se atribuyó a la menor disponibilidad de grupos NH_3^+ para interactuar con la membrana celular (Vásconez y col., 2009). Esto quiere decir que en la estructura quitosano-caseinato sigue habiendo gran proporción de grupos amino disponibles (DD=98%) para interactuar con la superficie cargada negativamente de las bacterias, alterando la permeabilidad de la pared bacterial e induciendo la pérdida de electrolitos intracelulares y proteínas, tal como mencionaron Dutta y col (2009).

Ensayos in vivo

Las muestras alimenticias de zanahoria, queso cheddar y salame de Milano fueron recubiertas con las películas (Cas, Quit y Quit/Cas) de dos maneras diferentes:

mediante su inmersión en las distintas soluciones y mediante envoltura a partir de las películas ya formadas. La Figura 5.21 muestra cada una de las soluciones a ser aplicadas sobre los alimentos, mientras que la Figura 5.22 muestra los distintos alimentos luego de ser recubiertos por envoltura con las diferentes películas.

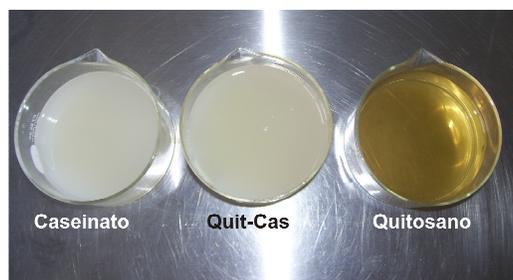


Figura 5.21. Soluciones formadoras de películas de caseinato, quitosano y quitosano/caseinato.

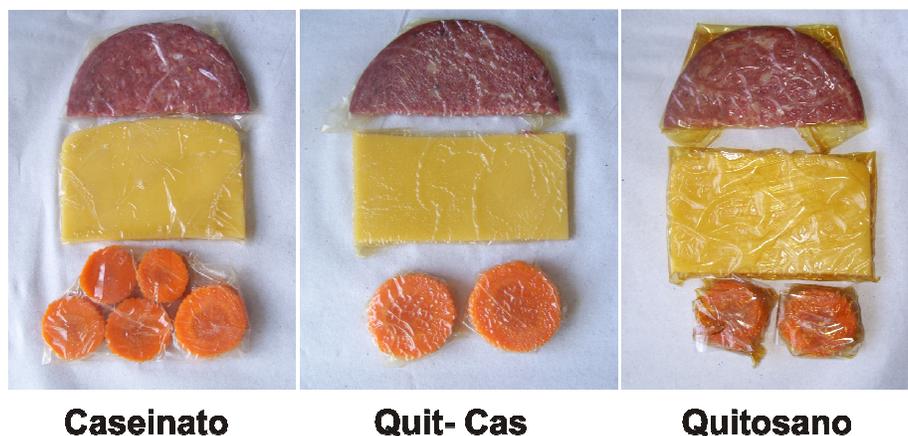


Figura 5.22. Alimentos de distinta naturaleza recubiertos con películas de caseinato, quitosano y quitosano/caseinato.

Las muestras alimenticias, luego de ser recubiertas, se acondicionaron durante 5 días a 65% HR y 10°C. Esta condición de almacenamiento se consideró como la óptima para la retención antimicrobiana, de acuerdo a los resultados presentados en la sección previa (Figuras 5.19 y 5.20). Si bien esta condición no es, de acuerdo a la bibliografía especializada (ASHRAE, 1994) la ideal para el almacenaje de alimentos, el desafío consiste en aplicar una tecnología de preservación sanitaria útil cuando los alimentos están sujetos a situaciones de almacenamiento abusivo o extremo. A lo largo de ese período de almacenamiento, se realizó sobre las muestras tratadas un análisis microbiano detallado de bacterias mesófilas, psicrótrofas, hongos y levaduras de acuerdo a lo descrito en el Cap. 2 (pag 42). Los efectos antimicrobianos resultantes se muestran en las Tablas 5.18, 5.19 y 5.20.

Tabla 5.18. Recuentos microbianos (log UFC/g) de bacterias, hongos y levaduras sobre distintos alimentos recubiertos con películas de caseinato de sodio aplicadas por inmersión y como envoltura, durante el almacenamiento a 10°C y 65% HR.

	Tiempo (días)	Hongos y levaduras			Bacterias mesófilas			Bacterias Psicrótrofas		
		Control	Inmersión	Envoltura	Control	Inmersión	Envoltura	Control	Inmersión	Envoltura
Zanahoria	0	2.8	2.8	2.8	4.6	4.6	4.6	4.5	4.5	4.5
	3	5.5	4.9	6.3	6.6	7.1	7.3	6.5	6.9	7.3
	5	7.5	5.8	8.3	9.0	8.8	9.1	7.4	6.3	8.7
Carne	0	3.5	3.5	3.5	5.4	5.4	5.4	4.5	4.5	4.5
	3	6.0	4.8	4.6	5.9	5.3	5.4	6.2	5.0	4.5
	5	5.4	5.4	4.2	6.5	5.5	5.3	5.0	4.4	4.2
Queso	0	4.8	4.8	4.8	6.1	6.1	6.1	5.0	5.0	5.0
	3	6.8	5.2	6.5	7.0	6.3	6.3	6.8	6.4	6.9
	5	9.1	5.9	9.1	9.0	6.4	6.3	9.0	6.9	6.3

Tabla 5.19. Recuentos microbianos (log UFC/g) de bacterias, hongos y levaduras sobre distintos alimentos recubiertos con películas de quitosano aplicadas por inmersión y como envoltura, durante el almacenamiento a 10°C y 65% HR.

	Tiempo (días)	Hongos y levaduras			Bacterias mesófilas			Bacterias Psicrótrofas		
		Control	Inmersión	Envoltura	Control	Inmersión	Envoltura	Control	Inmersión	Envoltura
Zanahoria	0	2.8	2.8	2.8	4.6	4.6	4.6	4.5	4.5	4.5
	3	5.5	3.0	3.0	6.6	3.4	3.1	6.5	3.7	3.7
	5	7.5	4.5	4.7	9.0	5.0	4.5	7.4	4.3	4.3
Carne	0	3.5	3.5	3.5	5.4	5.4	5.4	4.5	4.5	4.5
	3	6.0	2.7	3.9	5.9	4.9	4.7	6.2	3.6	3.0
	5	5.4	4.7	4.1	6.5	5.4	4.8	5.0	4.2	4.6
Queso	0	4.8	4.8	4.8	6.1	6.1	6.1	5.0	5.0	5.0
	3	6.8	4.3	4.2	7.0	4.4	4.1	6.8	5.6	4.4
	5	9.1	4.6	5	9.0	5.3	4.3	9.0	4.4	4.8

Tabla 5.20. Recuentos microbianos (log UFC/g) de bacterias, hongos y levaduras sobre distintos alimentos recubiertos con películas de quitosano-caseinato aplicadas por inmersión y como envoltura, durante el almacenamiento a 10°C y 65% HR.

	Tiempo (días)	Hongos y levaduras			Bacterias mesófilas			Bacterias Psicrótrofas		
		Control	Inmersión	Envoltura	Control	Inmersión	Envoltura	Control	Inmersión	Envoltura
Zanahoria	0	2.8	2.8	2.8	4.6	4.6	4.6	4.5	4.5	4.5
	3	5.5	3.9	2.0	6.6	4.7	2.5	6.5	4.1	2.4
	5	7.5	5.5	4.1	9.0	5.8	4.3	7.4	5.6	4.2
Carne	0	3.5	3.5	3.5	5.4	5.4	5.4	4.5	4.5	4.5
	3	6.0	2.5	2.4	5.9	4.3	3.6	6.2	3.1	2.7
	5	5.4	4.9	3.4	6.5	4.6	5.2	5.0	3.2	3.5
Queso	0	4.8	4.8	4.8	6.1	6.1	6.1	5.0	5.0	5.0
	3	6.8	3.0	4.7	7.0	3.0	4.7	6.8	4.9	4.8
	5	9.1	5.4	5	9.0	5.4	5.0	9.0	5.7	5.2

En la Tabla 5.18 se muestra el efecto antimicrobiano ejercido por los recubrimientos y las películas de caseinato de sodio sobre los distintos alimentos. En muestras de carne recubiertas, tanto por inmersión como por envoltura, sólo se observó un efecto antimicrobiano leve con reducción de aproximadamente 1-1.2 ciclos log, en comparación con las muestras control. En las muestras de zanahoria sólo se observó que el caseinato ejerce efecto antimicrobiano contra hongos y levaduras solamente cuando la película se aplica mediante inmersión; asimismo, se observa un aumento en el recuento de bacterias mesófilas y psicrótrofas, por lo que se considera que el caseinato de sodio no es adecuado como envoltorio de este tipo de alimentos frescos. Por último, al utilizar queso como sustrato alimenticio, a los 5 días de almacenamiento se registró una acción bactericida con reducciones de aproximadamente 3 ciclos log, tanto para hongos y levaduras como para bacterias mesófilas y psicrótrofas. El efecto antimicrobiano mayor se obtuvo contra hongos y levaduras a partir de muestras inmersas en la solución de caseinato, obteniendo reducciones de hasta 3.2 ciclos log. Es necesario destacar que en esta sección, los resultados se discuten de manera general y no cada valor puntualmente. Al trabajar con datos microbiológicos es necesario remarcar que siempre presentan mucha dispersión, son porciones diferentes las que se almacenan y una pequeña contaminación durante las etapas de preparación, corte o almacenamiento conduce a resultados muy diferentes.

Por otro lado, las películas de Quit y Quit/Cas aplicadas mediante inmersión o envoltura ejercen una acción bactericida significativa en las tres poblaciones bacterianas analizadas, con reducciones aproximadas de 2 a 4.5 órdenes log (Tablas 5.19 y 5.20). Las mayores reducciones que se observan a partir del recuento microbiano se registraron para el queso, tanto con películas o recubrimientos de quitosano como de quitosano-caseinato (reducciones de 3.3 a 4.8 ciclos log, respecto a las muestras control).

Al comparar ambas películas, se observa que la película compleja logró una mayor reducción microbiana que la de quitosano, cuando se utilizó carne como sustrato, siendo la diferencia más notable hasta los 3 días de almacenamiento. En cambio, con zanahoria, la película compleja tiene mayor capacidad para reducir levemente (diferencia menor a 0.5 ciclos log) la carga microbiana cuando la película es aplicada como envoltura, mientras que la película de quitosano ejerce un efecto antimicrobiano mucho más significativo (diferencia de 1 ciclo log.) cuando es aplicada mediante inmersión. Al evaluar el efecto sobre el queso, la película de quitosano ejerce un efecto

antimicrobiano similar e incluso mayor, en algunos casos, que la película compleja, la cual logra un mayor efecto que el quitosano hasta los 3 días de almacenamiento y sólo cuando la solución de quitosano-caseinato es aplicada por inmersión.

Al comparar los dos tratamientos aplicados sobre las películas, se observa que no existe una diferencia marcada en cuanto al grado de inhibición microbiana, estableciendo que las dos formas de aplicación de las películas son aptas para reducir el crecimiento de hongos y levaduras y de bacterias mesófilas y psicrótrofas.

La reducción del crecimiento microbiano brindado por las películas o recubrimientos de quitosano y Quit-Cas es considerable si se la compara con otros métodos que se aplican para reducir la carga microbiana en los alimentos, por ejemplo, la aplicación de atmósferas modificadas en rodajas de zanahoria, donde se obtuvo una reducción en el número de bacterias mesófilas aerobias de sólo 0.4 ciclo log (Amanatidou y col, 2000). Una gran cantidad de estudios indican las ventajas de usar recubrimientos de quitosano para extender la vida útil de los alimentos, entre ellos los realizados por González-Aguilar y col. (2008), quienes analizaron el efecto de éstos sobre la prevención del deterioro de papaya fresca cortada, encontrando que inhiben el crecimiento de bacterias mesófilas, hongos y levaduras. Durango y col. (2006) mencionaron el uso de recubrimientos antimicrobianos de almidón y quitosano como una alternativa viable para controlar el crecimiento microbiológico en zanahoria mínimamente procesada. Park y col. (2005) informaron que las propiedades antifúngicas de los recubrimientos de quitosano aplicados sobre frutillas frescas permitieron extender la vida útil de esa fruta. Jiang y col. (2005) informaron efectos similares sobre la vida útil del *litchi* (fruta tropical) almacenado en frío.

En este trabajo, se encontró que las propiedades bactericidas de la mezcla Quit/Cas no sólo son muy superiores a las de las películas de caseinato, sino que son también superiores, en algunos casos, a las de los recubrimientos de quitosano puro. La actividad antibacteriana significativa de la película compleja sugiere que la interacción iónica entre las dos macromoléculas no limita la actividad antimicrobiana del quitosano, sino que, al contrario, la potencia. Esto resulta sumamente atractivo, ya que en las secciones previas también se evidenció un efecto sinérgico en las propiedades mecánicas (tracción e impacto) y de absorción (ángulo de contacto, absorción de humedad) debido a la formación del complejo polimérico.

Ensayo de biodegradación en suelo

Se llevó a cabo un ensayo de evaluación, a escala laboratorio, del proceso de degradación de las distintas películas en la microflora natural del suelo. El uso de suelo nativo como medio de degradación se considera un enfoque realista para el estudio de este proceso en ambientes naturales. Por esta razón se espera que este ensayo brinde una buena estimación de los tiempos de degradación reales de los distintos materiales estudiados en este capítulo.

De esta manera, durante los experimentos de entierro en suelo, las películas fueron expuestas a una población microbiana mixta (incluyendo bacterias, hongos y actinomicetos, entre otros) que pueden actuar sinérgicamente durante la degradación y reproducirse en forma natural. El experimento se llevó a cabo durante 240 días.

El mecanismo de descomposición de un material polimérico es, en general, poco conocido. Como cabría esperar, la degradación comienza en la superficie de la muestra. A medida que la degradación progresa, se remueven las porciones degradadas del material, lo que resulta en la reducción de la cohesividad de la muestra y aumenta su relación área superficial/volumen. De esta manera el material se vuelve más abierto a la permeación de agua. Los microorganismos que contiene el agua contribuyen con su ataque a facilitar el acceso a las capas de material más profundas, aunque lo que realmente degrada el material son las enzimas producidas por los microorganismos (Ratajska y Boryniec, 1998). En esta etapa, el crecimiento de microorganismos puede causar además tensión mecánica en el material.

En la Figura 5.23 se muestra el aspecto macroscópico de las películas de caseinato en función del tiempo de entierro. La rápida deterioración macroscópica, fácilmente observable en las fotografías, impidió que se llevara a cabo un análisis cuantitativo de pérdida de masa y absorción de humedad debido a la dificultad de retirar las muestras de la malla metálica sin que sufrieran daño. Se nota claramente que el proceso de degradación es sumamente rápido y que concluye prácticamente al cuarto día de entierro de las películas, a diferencia de otras películas proteicas como las de gluten de trigo, que desaparecen luego de los 50 días (Domenek y col., 2004), de gluten-proteína de soja y glicerol que duran en suelo aproximadamente 30 días (Park y col., 2000) y de gelatina sola y entrecruzada con almidón dialdehído, que se deterioran dentro de los 15 días (Martucci y Ruseckaite, 2009). Por lo tanto, las películas de caseinato pueden clasificarse como materiales rápidamente degradables (Patil y col., 2000).

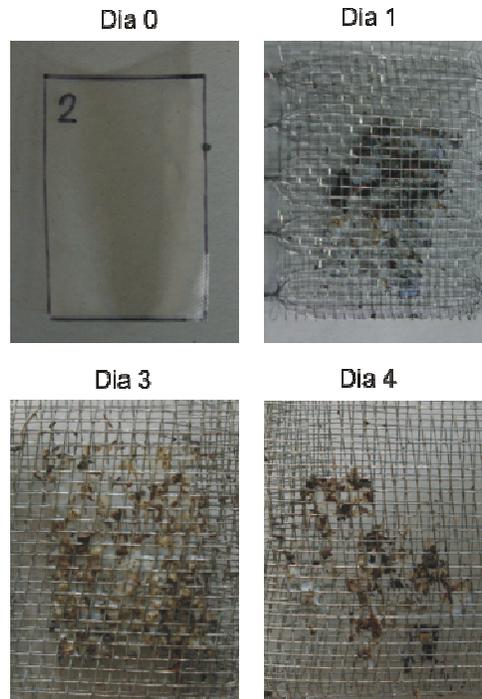


Figura 5.23. Deterioración macroscópica de películas de caseinato plastificadas (gli/pro=0.28) luego de diferentes tiempos de exposición en el medio de biodegradación.

La razón principal de este comportamiento es la gran susceptibilidad de los materiales basados en proteínas a la acción de enzimas (proteasas) que están presentes en una amplia variedad de microorganismos (Martucci y Ruseckaite, 2009); además el caseinato de sodio es una proteína totalmente amorfa y prácticamente no posee estructura secundaria, lo que contribuye a que su biodegradación sea más rápida que la de otras proteínas. La humedad absorbida por la película acelera el ingreso de los microorganismos presentes en la tierra, debido a la mayor disponibilidad de agua en el material, y a partir de ahí comienza la biodegradación.

También se enterraron en suelo las películas de Quit y de la mezcla Quit/Cas y se tomaron fotografías a distintos tiempos de entierro en suelo (Figura 5.24), con la finalidad de analizar cualitativamente el proceso de degradación.

Mientras que el caseinato se degrada por acción principal de las proteasas, el quitosano lo hace a través de diversas enzimas, tales como quitosanasa, lisozima y papaína. La quitosanasa es producida por un gran número de microorganismos, incluyendo tanto bacterias como hongos, que catalizan una escisión de tipo endo del quitosano y sus derivados, resultando en la formación de di y tetra-sacáridos, que luego, debido posiblemente a la actividad de la glucosaminidasa, conduce a la producción de

monosacárido (Harish Prashantha y col., 2005). La lisozima actúa a través de la hidrólisis de los residuos acetilados (Nair y Laucerin, 2007). La diferencia entre las proteínas y el quitosano es que las proteínas no tienen unidades repetitivas equivalentes a lo largo de las cadenas poliméricas. Esta irregularidad y desorden, entre otras cosas, contribuyen a su rápida biodegradación. El quitosano, por otro lado, posee unidades repetitivas, y esta regularidad hace que los grupos hidrolizables estén más inaccesibles a las enzimas (Jo y col., 2005). Además de ello, otra de las razones por las cuales el quitosano presenta un comportamiento biodegradativo más lento, es su carácter antimicrobiano debido a sus grupos amino cargados de manera positiva, pudiendo interactuar y formar polielectrolitos complejos con los polímeros ácidos producidos en las superficies de las células bacterianas.

En la Tabla 5.21 se presentan los valores de pérdida de peso (WL) de las películas enterradas de quitosano y de la mezcla, que se calcularon a partir de la ecuación 2.2.19 (Capítulo 2), teniendo en cuenta los pesos registrados durante los primeros días del proceso de degradación.

Tabla 5.21. Pérdida de peso en función del tiempo de degradación durante el entierro en suelo.

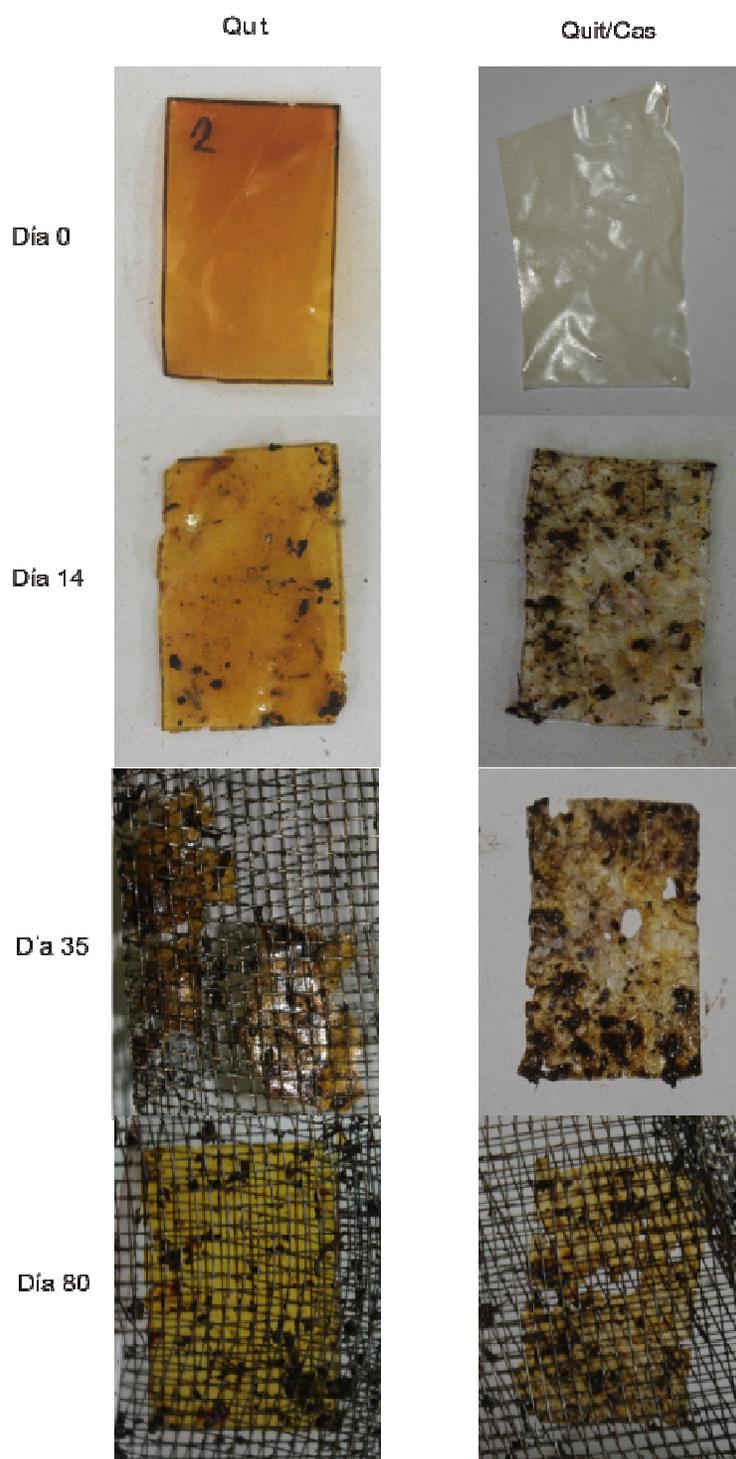
Película	Tiempo (días)	WL(%)
Quit	0	0.00± 0.00
	1	20.41± 0.39
	2	21.71± 0.99
	3	21.46± 1.76
	4	20.03± 2.29
	7	18.97± 2.23
	Quit-Cas	0
1		17.86± 1.51
2		15.86± 0.08
3		19.36± 1.47
4		29.62± 1.86
7		38.90± 4.50

Se observa claramente que en esta etapa inicial, la pérdida de peso de las películas de quitosano es prácticamente constante, es decir que aproximadamente el 20% del material se biodegrada rápidamente durante el primer día de entierro y no

ocurren cambios ulteriores durante el resto de la primera semana. Por otro lado, ese período pseudo-estacionario en las muestras de la película híbrida se observa sólo hasta el tercer día de entierro; a partir de ese momento la velocidad de pérdida de masa aumenta significativamente.

Por otro lado, en la Figura 5.24 se observa que la película de quitosano pareciera comenzar a deteriorarse visiblemente recién a los 130 días, mientras que la película mezcla comienza a degradarse notablemente mucho antes, cerca de los 35 días. En conclusión, la película de quitosano demostró ser la más resistente al proceso de biodegradación en suelo, en comparación con las otras dos películas ensayadas. En general, tanto la velocidad como el grado de biodegradación del quitosano dependen del grado de deacetilación (Kean y Thanou, 2009): a mayor grado de deacetilación mayores son la velocidad y susceptibilidad de las películas al proceso de degradación (Coma y col., 2002; Rajatzka y Boryniec, 1998).

La biodegradación de la película compleja Quit-Cas se vio altamente retardada, en comparación con la de la película proteica, con el agregado de quitosano. Sin embargo, aquí no se observó un efecto sinérgico que pueda atribuirse a la formación del complejo polielectrolítico, como podría esperarse del aumento del impedimento estérico resultante del desarrollo de interacciones electrostáticas entre ambos constituyentes, que volvería a los grupos hidrolizables más inaccesibles a las enzimas. Este efecto podría explicarse utilizando los resultados encontrados por Li y col (2009) durante sus ensayos de biodegradación con lisozima en películas de quitosano-alginato, quienes siguieron el proceso mediante la medición de azúcares reductores. De acuerdo a sus observaciones, la enzima degrada el quitosano atacando las uniones glucosídicas β -1,4 entre glucosamina y N-acetilglucosamina, sitios que en el complejo resultan inaccesibles. Concluyen que la biodegradación del complejo se debe más a la hidrólisis de la macromolécula que a la acción enzimática. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos de WVP, donde se observó que en condiciones de alta humedad la película compleja mostraba un valor de permeabilidad mayor que el de la película de quitosano, sugiriendo una estructura más abierta que facilitaría la entrada de microorganismos y los procesos de degradación hidrolítica, con respecto a la película de quitosano puro. También coincide con lo observado en los ensayos *in vitro* realizados con la microflora nativa de zanahoria, que es el alimento con mayor actividad de agua de los utilizados en este estudio y donde no se observó efecto inhibitorio del crecimiento al utilizar la solución mezcla quitosano-caseinato de sodio.



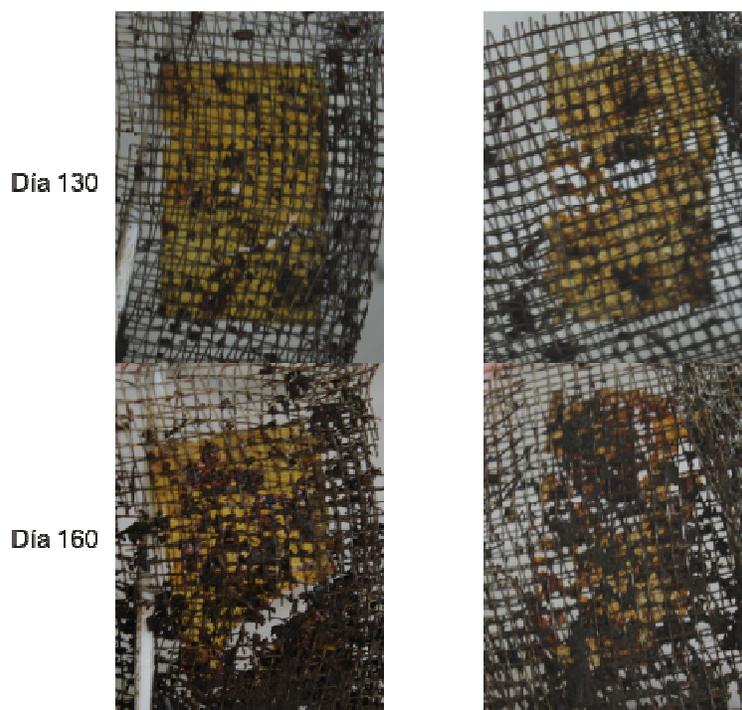


Figura 5.24. Deterioración macroscópica de películas de Quit y Quit/Cas plastificadas, luego de diferentes tiempos de exposición en el medio de biodegradación.

5.3. Conclusiones

Se prepararon y caracterizaron películas de quitosano y quitosano-caseinato plastificadas con glicerol. Mediante SEM se evidenció la ausencia de separación de fases en la película compleja Quit-Cas.

El espectro de las películas complejas muestra intensidades mayores que las esperadas a 1640 y 1550 cm^{-1} , en las bandas asociadas a los grupos amida, como resultado de la formación de un polielectrolito complejo entre el quitosano catiónico (grupos NH_3^+) y el caseinato aniónico (grupos carboxílicos).

Del análisis termogravimétrico se observa, para las películas Quit-Cas, un corrimiento de la temperatura de degradación hacia mayores temperaturas, con respecto a lo calculado teóricamente, como resultado de interacciones fuertes desarrolladas entre los dos componentes y que aparentemente mejoran la resistencia térmica del híbrido, respecto a la de los constituyentes individuales.

Las propiedades mecánicas de las películas de quitosano son altamente dependientes del contenido de glicerol, mostrando una respuesta similar que la encontrada para la plastificación de películas de caseinato. Se observa una reducción del módulo y de la resistencia a la tracción, al mismo tiempo que un aumento de la deformabilidad de las películas. Además, las películas Quit-Cas presentan una mejora moderada de la resistencia a la tracción (19.6 MPa) y un importante aumento de la resistencia al impacto (35.6 GPa) con respecto a las propiedades correspondientes a las películas puras de quitosano (17 MPa y 26.6 GPa , respectivamente). Por otro lado, las propiedades del híbrido resultaron marcadamente mejoradas con respecto a aquellas del caseinato (6.2 MPa y 13.4 GPa , respectivamente). La formación del complejo polielectrolítico desarrollado entre estas dos macromoléculas es considerada la razón de esta mejora.

Los valores de WVP de las películas de quitosano muestran una relación exponencial creciente con el contenido de glicerol, por lo que se usó la misma ecuación exponencial de dos parámetros utilizada en el capítulo 3 para ajustar los datos experimentales. Aunque las muestras de quitosano parecen ser mucho más permeables que las de caseinato a contenidos de glicerol menores al 40% , el glicerol es más eficiente en plastificar películas de caseinato que las de quitosano. Analizando los valores de permeabilidad obtenidos a dos gradientes de HR, se encuentra que éstos

aumentan con humedades crecientes, y que el incremento de WVP a 100: 64.5 (con respecto a aquellos obtenidos a 0:64.5) fue similar para las películas de quitosano y caseinato, pero éste fue mayor para las películas híbridas Quit-Cas.

Las películas de quitosano con glicerol presentan la menor velocidad de absorción de humedad, al compararlas con las películas de caseinato y con las híbridas, pero alcanzan un contenido de humedad de equilibrio mayor (aunque este valor no es estable) mientras que las películas complejas Quit-Cas exhiben el comportamiento opuesto. Nuevamente, esta última característica está relacionada a las interacciones fuertes que se desarrollan en el polielectrolito complejo, y está en concordancia con los valores medidos de ángulo de contacto que mostraron la mayor hidrofobicidad superficial para la película compleja, al menos a tiempos cortos de contacto.

La caracterización química (FTIR), mecánica (ensayos de tracción y fractura de impacto), termogravimétrica (TGA) y de permeabilidad (WVP) así como de absorción de humedad de las películas complejas Quit-Cas fueron todas coincidentes en indicar que se desarrollan interacciones muy fuertes entre las cadenas de quitosano y caseinato, lo cual resulta, en general, en mejores propiedades finales que las presentadas por los constituyentes individuales.

El uso de un recubrimiento antimicrobiano consistente en quitosano y caseinato aplicado por inmersión o mediante envoltura es una buena alternativa para controlar la microbiota presente principalmente en alimentos como el queso y el salame. Tanto el quitosano como la mezcla inhiben sustancialmente el crecimiento de bacterias mesófilas, psicrotrofas, hongos y levaduras, debido al potencial del quitosano como material de envase antimicrobiológico, cuya actividad no se ve reducida al combinarse con el caseinato. Basados en el concepto de tecnologías de barrera, el uso de recubrimientos en combinación con otras barreras tales como condiciones de procesamiento higiénico y temperaturas de almacenamiento adecuado, pueden contribuir a mejorar la seguridad de los alimentos mínimamente procesados.

La película de caseinato pierde su integridad después de 4 días de exposición en un medio degradativo, clasificándose como material rápidamente degradable. Por otro lado, la película compleja Quit-Cas se biodegrada a una velocidad mucho más lenta que la anterior, debido a la actividad biocida del quitosano y a la presencia de interacciones fuertes entre estos dos polímeros, que retrasan en gran medida el ataque microbiano.

5.4. Referencias

- Amanatidou, A., Slump, R. A., Gorris, L. G. M., & Smid, D. High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots. *Journal of Food Science*, 65(1): 61–66 (2000).
- Argin-Soysala, S. Kofinasb, P.; Lo Y.M. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels *Food Hydrocolloids* 23: 202–209 (2009).
- Arvanitoyannis, I.; Kolokuris, I.; Nakayama, A.; Yamamoto, N.; Aiba, S. Physico-chemical studies of chitosan–poly (vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 34: 9-19 (1997).
- Arvanitoyannis, S.; Nakayama, A.; Aiba, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, 37: 371- 382 (1998).
- ASHRAE, American Society of Heating Refrigerating and Air Conditioning Engineers, Inc. Commodity storage requirements (pp. 25.1-25.3). Atlanta. USA: ASHRAE (1994).
- Ayhlion-Meixueiro, F., Vaca-Garcia, C., & Silvestre, F. Biodegradable films from isolate of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3032–3036 (2000).
- Barry-Ryan, C., Pacussi, J. M., & O_Beirne, D. Quality of shredded carrots as affected by packaging film and storage temperature. *Journal of Food Science*, 65(4): 726–730 (2000).
- Bautista Baños, S; Hernández-Lauzardo, A.N; Velázquez del Valle, M.G; Bosquez-Molina, B; Sánchez-Domínguez, D. Quitosano: una alternativa natura para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Rev Iber Tecnología Postcosecha*, 7(1):1-6 (2005).
- Bergera, J. Reista, M. Mayera, J.M. Feltb, O. Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57: 35–52 (2004).
- Bordenave, N., Grelier, S., & Coma, V. Water and moisture susceptibility of chitosan and paper-based materials: Structure-property relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23): 9479–9488 (2007).
- Bourtoom, T; Chinnan M S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 1633-1641(2008).
- Butler, B.L., Vergaro, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. M., and Wiles, J. L., Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and Storage. *Journal of Food Science*, 61(5): 953-961. (1996).

- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-Amminobenzoic or sorbic acid. *Journal of Food Science*, 66(6): 865–870 (2001).
- Cheng, M.; Deng, J.; Yang, F.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24: 2871-80 (2003).
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., & Deschamps, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3): 1162–1169 (2002).
- Coma, V.; Sebti, I.; Pardon, P.; Pichavant, F. H.; Deschamps, A. Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 51: 265-271 (2003).
- Darder, M., Biopolymer-Clay Nanocomposites Based on Chitosan Intercalated in Montmorillonite. *Chem. Mater*, 15: 3774-3780 (2003).
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21: 703–714 (2004).
- Domenek, S. Feuilleley, P. Gratraud, J. Morel, M.-H. Guilbert S. Biodegradability of wheat gluten based bioplastics *Chemosphere* 54: 551–559 (2004).
- Dong, H.; Cheng, L.; Tan, J.; Zheng, K.; Jiang, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit *J Food Eng*, 64: 355-358 (2004).
- Dumitriu, S.; Magny, P.; Montane', D.; Vidal, P. F.; Chornet, E. Polyionic Hydrogels Obtained by Complexation between Xanthan and Chitosan: Their Properties as Supports for Enzyme Immobilization. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 9: 184-209 (1994).
- Durango A.M., Soares N.F.F, Andrade N.J. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17: 336-341, (2006).
- Dutta, P.K.; Tripathi, S; Mehrotra, G.K.; Dutta J, Review: Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114: 1173–1182 (2009).
- Extrand, C. W., Kumagai, Y. An experimental study of contact angle hysteresis. *Journal of Colloids and Interface Science*, 191: 378–383 (1997).
- Fabra, M.J. Talens, P Chiralt A Effect of alginate and k-carrageenan on tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate–lipid based films. *Carbohydrate Polymers*, 74(3):419-426 (2008).
- Fang, S. W., Li, C. F., & Shih, D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumwuat. *Journal of Food Protection*, 56: 136–140 (1994).
- Fernandez-Saiz, P.; Lagaron, J.M.; Ocio, M.J. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area *Food Hydrocolloids* 23: 913–921 (2009).

- Fernández Cervera, M.; Karjalainen, M.; Airaksinen, S.; Rantanen, J.; Krogars, K.; Heinämäki, J.; Colarte, A. I.; Yliruusi, J. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58: 69-76 (2004).
- Gällstedt, M., Films and Composites Based on Chitosan, Wheat Gluten or Whey Proteins-Their packaging related mechanical and barrier properties, in *Fibre and Polymer Technology.*, Technical Royal School, KTH: Stockholm. (2004).
- Ghanbarzadeh, B Musavi, M Oromiehie, A.R. Rezayi, K Razmi Rad, E Milani J Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *LWT*, 40: 1191–1197 (2007).
- Gocho, H. Shimizu, H. Tanioka, A. Chou, J.J. Nakajima, T. Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan, *Carbohydr. Polym.* 41: 87–90 (2000).
- González-Aguilar, G.A.; Valenzuela-Soto, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Goycoolea, F.; Martínez-Téllez, M.A.; Villegas-Ochoa, M.A.; Monroy-García, I.N.; Ayala-Zavala, J.F. DOI: 10.1002/jsfa.3405 (2008).
- Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P., & Subirade, M. Influence of plasticizers on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products*, 7: 149–157 (1998).
- Guo, M.; Fox, P. F.; Flynn, A.; Mahammad, K. S. Heat-induced changes in sodium caseinate. *J Dairy Res*, 56:503–512 (1989).
- Han, J, Bourgeois S, Lacroix M Protein-based coatings on peanut to minimise oil migration. *Food Chemistry*, 115: 462–468 (2009).
- Harish Prashantha, K.V.; Lakshmanb, K. Shamalab, T.R. Tharanathan R.N. Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films K.V. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56: 115–120 (2005).
- Hernández-Muñoz, P.; López-Rubio, A.; Lagarón, J. M.; Gavara, R. Formaldehyde Cross-Linking of Gliadin Films: Effects on Mechanical and Water Barrier Properties. *Biomacromolecules*, 5:415-421 (2004).
- Hirano, S., Production and application of chitin and chitosan in japan, in *Chitin and Chitosan*, A. Skjak-Braek, and Sanford, Editor., Elsevier Science Publishing Co.: London. p. 37-43 (1989).
- Hoagland, P.D. y Parris, N. Chitosan/Pectin Laminated Films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44(7): 1915-1919 (1996).
- Jiang, Y., Li, Y., Jiang, W., Effects of chitosan on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. *LWT* 38: 757–761 (2005).
- Jo, C.; Kang, H.; Lee, N. Y.; Kwon, J. H.; Byun M. W. Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation *Radiation Physics and Chemistry* 72: 745–750 (2005).

- Kean, T. Thanou, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, doi:10.1016/j.addr.2009.09.004 (2009).
- Khan, T.A., Peh, K.K. and Ch'ng, H.S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3(3): 303-311 (2000).
- Khan, T.A., Peh, K.K. and Ch'ng, H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 205-212 (2002).
- Kim, C. T.; Kim, C. J.; Cho; Y. J.; Chun, B. Y. *AIChE Ann Meeting Conf AQ2 Proc*, 8877 (2005).
- Kittur, F.S., Kumar, K.R. y Tharanathan, R.N. Functional packaging properties of chitosan films. *Z. Lebensm Unters Forsch A*, 206: 44-47 (1998).
- Kittur, F. S.; Saroja, N.; Habibunnisa; Tharanathan, R. N. Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. *Eur Food Res Technol*, 213: 306-311 (2001).
- Knorr, D., Recovery and Utilization of Chitin and Chitosan in Food Processing Waste Management. *Food Technology*: 114-122 (1991).
- Kobori, T. Matsumoto, A. Sugiyama S. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75: 719–723 (2009).
- Kokoszka, S. Debeaufort, F. Lenart, A., Voilley, A. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films *International Dairy Journal* 20: 53–60 (2010).
- Kolodziejka, I.; Piotrowska, B.; Bulge, M.; Tylingo, R. Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatin–chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 65: 404-409 (2006).
- Kolodziejka, I.; Piotrowska, B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, 103: 295-300 (2007).
- Krasavtsev, V., Maslova, G., Degtyareva, E., Bykova, V. and Noudga, L., Study and selection of chitosan characteristics for packaging materials and preservation of fish products. *Advances in Chitin Science*, 5: 543-546 (2002).
- Krochta, M. y Mulder-Johnston, C.D. *Edible & Biodegradable Polymer Films.*, Department of Food Science and Technology, University of California- Davis. (1997).
- Kurita, K., Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59: 117-120 (1997).

- Lai, H. M., Padua, G. W. Water barrier properties of zein films plasticized with oleic acid. *Cereal Chemistry*, 75(2): 194–198 (1998).
- Li, Q.; Duna, E. T.; Grandmaison, E. W.; Goosen, M. F. A. Applications and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4): 370-97 (1992).
- Li, J., Revol, J.F. y Marchessault, R.H. Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites. *Journal of Applied Polymer Science*, 65(2): 373-380 (1997).
- Li, X. Xie, H. Lin, J. Xie, W. Ma X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes *Polymer Degradation and Stability* 94: 1–6 (2009).
- Lieske, B.; Konrad, G. Thermal modification of sodium-caseinate. 2. Influence of temperature and pH on nutritive properties. *Milchwissenschaft*, 49: 71–74 (1994).
- López-Caballero, M.E. Gómez-Guillén, M.C. Pérez-Mateos, M. Montero P. A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19: 303–311 (2005).
- Lower, E.S., *Polymer from the Sea: Chitin & Chitosan*. Manufacturing Chemist., p. 47. (1984).
- Luyen, D.v. y Rossbach, V. Chitin and chitosan; potential fiber raw materials. *Technical textiles*, 35: 19-20. (1992).
- Makino, Y. y Hirata, T. Modified atmosphere packaging of fresh produce with a biodegradable laminate of chitosan-cellulose and polycaprolactone. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 247-254. (1997).
- Mali, S.; Grossmann, M. V. E.; Garcia, M. A.; Martino, M. N.; Zaritzky, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56: 129-135 (2004).
- Martucci, J.F. Ruseckaite R.A. Tensile Properties, Barrier Properties and Biodegradation in Soil of Compression – Molded Gelatin-Starch Dialdehyde Films, *Journal of Applied Polymer Science*, 112(4):2166-2178 (2009).
- Mayachiew, P; Devahastin S; Comparative Evaluation of Physical Properties of Edible Chitosan Films Prepared by Different Drying Methods. *Drying Technology*, 26(2): 176– 185 (2008).
- Mucha M.; Ludwiczak, S., Kawinska M., Kinetics of water sorption by chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol) *Carbohydrate Polymers* 62: 42–49 (2005).
- Mucha M. Pawlak, A. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochemica Acta*, 427: 69–76 (2005).
- Nair, L.S.; Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials *Prog. Polym. Sci.* 32:762–798 (2007).
- Ostrowska-Czubenko, J; Gierszewska-Druzynska, M. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes *Carbohydrate Polymers*, 77: 590–598 (2009).
- Ouattara, B., Simard, R., Piette, G., Be´gin, A., & Holley, R. A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 139–148 (2000).

- Park, S., Hettiarachchy, N., Were, L., Degradation behavior of soy protein–wheat gluten films in simulated soil conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3027–3031 (2000).
- Park, S., Daeschel, M., Zhao, Y., Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *J. Food Sci.* 69 (8), M215–M221 (2004).
- Park, S.; Stan, S.D; Daeschel, M.A.; Zhao, Y. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science*, 74(4): 202-207 (2005).
- Patil, R.D.; Dalev, P.G; Mark, J.E.; Vassileva, E.; Fakirov, S. Biodegradation of chemically modified gelatin films in lake and river waters *J. Appl Polym Sci*, 76, 29 (2000).
- Pawlak, A. Mucha M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochemica Acta*, 396: 153–166 (2003).
- Peter, M.G., Applications and Environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of macromolecular Science- Pure Applied Chemistry*, 32(4): 629-640 (1995).
- Peiyin, L., Barth, M. M. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. *Postharvest Biology and Technology*, 14: 51–60 (1998).
- Pillai, C.K.S. Paul, W; Sharma C P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34: 641–678 (2009).
- Ponce A., Roura S., Del Valle C., And Moreira M. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. *postharvest biology and technology* (49): 294-300 (2008).
- Pranoto, Y. Rakshit, S.K. Salokhe, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT*, 38: 859–865 (2005).
- Prodpran T., Benjakul, S.; Artharn A.; Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 605–614 (2007).
- Ratajska, M. Boryniec S. Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers *Reactive & Functional Polymers* 38: 35–49 (1998).
- Regan, J.O., Mulvihill, D.M., Preparation, characterization and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.045 (2009).
- Remuñán-López, C.; Bodmeier, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of controlled release*, 44: 215-225 (1997).
- Remuñán-López, C; Portero, A; Vila-Jato, J L; Alonso, M J. Design and evaluation of chitosan / ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 55: 143–152 (1998).

- Rivero, S. García, M.A Pinotti A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90: 531–539 (2009).
- Rogers, C. E. In *Polymer Permeability*; Comyn, J., Ed.; Elsevier: New York, p 11. (1985).
- Sanches, A. C., Popineau, Y., Mangavel, C., Larre, C., & Gueguen, J. Effect of different plasticizers on the mechanical and surface properties of wheat gliadin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4539–4544 (1998).
- Sangsuwan, J. Rattanapanone, N. Rachtanapun P. Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cantaloupe and pineapple. *Postharvest Biology and Technology* 49: 403–410 (2008).
- Sarasam, A. Madihally S. V. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26: 5500–5508 (2005).
- Sebastian, F. Stephane, G. Copinet, A. Coma, V. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains *Carbohydr. Polym.* 65: 185–193 (2006).
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. y Jeon, Y.-J. Food Applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 37-51 (1999).
- Shepherd, R., Reader, S. y Falshaw, A. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate journal*, 14: 535-542 (1997).
- Shu, X.Z. Zhu K.J. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 201: 51–58(2000).
- Silva, RM; Silva, GA; Coutinho OP; Mano, JF; Reis, RL, Preparation and characterization in simulated conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 15:1105-1112 (2004).
- Sionkowska A, Wisniewski, M; Skopinska, J.; Jenedy, CJ; Wess, TJ, Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, 25:795-801 (2004).
- Sionkowska A Effects of solar radiation on collagen and chitosan films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 82: 9–15 (2006).
- Srinivasa, P. C.; Baskaran, R.; Armes, M. N.; Harish Prashanth, K. V.; Tharanathan, R. N. Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *Eur Food Res Technol*, 215: 504-508 (2002).
- Srinivasa P.C., Ramesh, M.N. Kumar K.R., Tharanathan R.N., Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*, 63: 79–85 (2004).
- Srinivasa, P.C. Ramesh, M.N. Tharanathan R.N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21: 1113–1122 (2007).

- Srinivasa, P.C., Ravi R., Tharanathan R.N. Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80: 184–189 (2007).
- Srinivasa, P. C.; Tharanathan, R. N. Chitin/chitosan-safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Rev Int*, 23: 53 (2007).
- Sugama, T. Cook M. Poly(itaconic acid)-modified chitosan coatings for mitigating corrosion of aluminum substrates, *Progress in Organic Coatings*, 38: 79–87(2000).
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A., & Coma, V. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3950-3957 (2005).
- Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2): 536-547 (2009).
- Vásconez, M. B. Flores, S. K. Campos, C. A. Alvarado, J. Gerschenson L. N. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings *Food Research International* 42: 762–769 (2009).
- Wiles, L., Vergano, P. J., Barron, F. H., Bunn, J. M., & Testin, R. F. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *Journal of Food Science*, 65(7): 1175-1179 (2000).
- Wong, D. W. S.; Gastineau, F. A.; Gregorski, K. S.; Tillin, S. J.; Pavlath, A. E. Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4): 540-544 (1992).
- Zhang, Y Xue, C Xue, Y Gao, R y Zhang X Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340: 1914–1917 (2005).
- Ziani, K; Oses, J; Coma, V; Mate J I. 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: 2159-2165 (2008).

Capítulo 6

Películas de caseinato de sodio/aceite de tung

6.1. Introducción

El uso de películas o recubrimientos hechos a partir de bio- materiales, como una alternativa a la utilización de polímeros no biodegradables, es un tema de interés tanto para los investigadores como para los fabricantes (Fabra y col., 2009). Entre las películas basadas en biomasa renovable, las que se obtienen a partir de proteínas y polisacáridos tienen, generalmente, buenas propiedades organolépticas y mecánicas, y actúan como buenas barreras a los gases no condensables (O_2 , CO_2 , N_2) y aromas (Fabra y col., 2008²). Sin embargo, las películas basadas en proteínas muestran altos valores de absorción y permeabilidad al vapor de agua, debido a la hidrofiliidad de los aminoácidos que conforman sus moléculas (Anker y col., 2002; Prodpran y col., 2007; Quezada Gallo y col., 2000) y a la presencia de grupos -OH libres en la matriz, los cuales interactúan fuertemente con las moléculas de agua que migran (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008).

En muchas aplicaciones, se requiere de una buena barrera al vapor de agua dado que se deben mantener bajos niveles de actividad de agua (a_w) en alimentos con bajo contenido de humedad (ej. frutas secas, pasas, etc.), de manera de prevenir la degradación de textura (por ej. los cereales secos y crujientes pueden volverse esponjosos y perder lo crujiente al absorber agua, algunos alimentos de textura suave pueden volverse duros en caso de pérdida de agua, etc.; Yang y Paulson, 2000) y para minimizar reacciones deteriorativas químicas y enzimáticas (oxidación lipídica, pardeamiento de Maillard y enzimático, etc.; Anker y col., 2002) así como el crecimiento microbiano, que procede a velocidades fuertemente asociadas con el contenido de agua de los alimentos (a_w) (Yang y Paulson, 2000).

Debido a que las películas hechas a partir de un único polímero muestran buenas propiedades en algunos aspectos pero pobres en otros, comúnmente se utilizan mezclas de dos o más polímeros formadores de películas para preparar recubrimientos comestibles compuestos (Jia y col., 2009). Los envases compuestos se definen como películas o recubrimientos cuya estructura es heterogénea, es decir, que están formados por una matriz continua con, por ejemplo, inclusiones globulares cuando el material formador de la película/recubrimiento es una emulsión, o partículas sólidas en el caso de sustancias no solubles (fibras, proteínas no hidrofóbicas) cuando el material formador de película es una suspensión, o compuesto en capas (varias capas/ láminas

superpuestas). En general, las películas multicapa tienen mejores propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua que las películas formadas a partir de emulsiones, pero su producción requiere de un paso adicional de vertido o laminación y posterior secado para cada capa. Su uso, por lo tanto, no resulta muy práctico para su implementación a nivel industrial. Por el contrario, las películas compuestas formadas a partir de emulsiones pueden alcanzar propiedades similares a las anteriores y sólo requieren de una operación para su preparación (Dutta y col., 2009).

Para mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas proteicas, y tal como se mencionó arriba, suelen incorporarse sustancias hidrofóbicas tales como los lípidos. A su vez, las películas lipídicas son buenas como barrera a la humedad, pero son generalmente opacas (Quezada Gallo y col., 2000). Se han incorporado exitosamente grasas y lípidos (ceras, aceites hidrogenados, aceites naturales, ácidos grasos) (Quezada Gallo y col., 2000) de diferentes tipos en películas basadas en proteínas y carbohidratos mediante laminación y dispersión o emulsión (Anker y col., 2002; Yang y Paulson, 2000; Prodpran y col., 2007; Quezada Gallo y col., 2000, Fabra y col., 2008 y 2009). Se ha informado que las propiedades de barrera de películas a partir de emulsiones son dependientes de las técnicas de preparación, de la compatibilidad de los componentes, del tipo y cantidad de los lípidos utilizados, de la heterogeneidad microestructural y de la energía superficial de las películas formadas (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008; Fabra y col., 2008). El desarrollo de películas mejoradas se obtiene con un sistema multicomponente donde los hidrocoloides (proteínas o polisacáridos) forman una red continua y cohesiva, y las sustancias hidrofóbicas (lípidos) proporcionan las propiedades de barrera a la humedad (Quezada Gallo y col., 2000).

Aunque se han publicado numerosos trabajos acerca de películas proteína-lípido (Anker y col., 2002; Yang y Paulson, 2000; Prodpran y col., 2007; Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2008; Fabra y col., 2008, 2008², 2009, Sosa-Herrera y col., 2008; Shaw y col., 2002; Fabra y col., 2008; Monedero y col., 2009; Zinoviadou y col., 2009), no hay información disponible sobre películas de caseinato modificadas con aceite de tung (AT). El aceite de tung es un aceite vegetal extraído de las semillas del árbol de tung. El principal componente del triglicérido es el ácido α -elaeostearico, que contiene tres insaturaciones conjugadas (Sharma y Kundu, 2006). Además, el aceite de tung está aprobado por la FDA (Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos) para su uso en polímeros en contacto con alimentos.

El objetivo de este capítulo es el desarrollo y caracterización de películas compuestas caseinato de sodio-aceite de tung obtenidas por disolución / emulsión de los constituyentes en agua. Se evalúa el efecto del contenido lipídico sobre la absorción y permeabilidad al vapor de agua, propiedades ópticas y mecánicas de las películas. Además se analiza el efecto del entrecruzamiento por tratamiento térmico sobre películas híbridas seleccionadas.

6.2. Preparación de películas de caseinato de sodio/aceite de tung

Las películas preparadas a partir de caseinato de sodio y aceite de tung se obtuvieron a partir de emulsiones acuosas, tal como se describe en el capítulo 2 bajo el título “Preparación de emulsiones”, a partir de una solución acuosa de proteína al 2.5 % p/p, y utilizando dos relaciones en peso glicerol/ proteína (gli/pro): 0.15 y 0.28. La fracción lipídica fue incorporada a la solución de caseinato en relaciones en peso AT/ proteína de 0.05, 0.1 y 0.15.

No fue necesario el agregado de un agente emulsificante externo debido a que el caseinato de por sí cumple esa función al tener características anfifílicas (Fabra y col., 2008, 2008¹ y 2009, Sosa-Herrera y col., 2008), lo cual le permite formar una monocapa de proteína adsorbida sobre la interface aceite - agua (Dalgleish y col., 2002), al contrario de lo que ocurre con la gelatina, entre otras proteínas, donde se necesita de un emulsionante como la lecitina para evitar la exudación del compuesto hidrofóbico sobre la superficie de la película durante el proceso de secado (Andreuccetti y col., 2009). El secado de las mismas se realizó con la técnica tradicional (aproximadamente 10 horas en estufa con convección de aire a 35°C), también de acuerdo a lo indicado en el capítulo 2.

6.3. Caracterización de las películas caseinato de sodio-aceite de tung

Formación de la emulsión y de la película

La apariencia de las emulsiones fue *lechosa*, y no se observó visualmente separación macroscópica de fases (separación de capas líquidas) para ninguna de las concentraciones de aceite de tung utilizadas en este trabajo, después de 48 horas a temperatura ambiente (Rodríguez, Albertengo y Agullo, 2002), indicando la eficiencia

del caseinato en la estabilización de gotas de aceite en el sistema. La habilidad emulsificante del caseinato en sistemas aceite en agua ha sido informada en literatura y explicada como resultado del alto contenido de prolina (fracción β -caseína) (Fabra y col., 2008, 2008¹, 2009 y 2010; Sosa-Herrera y col., 2008).

El espesor promedio de las películas fue de 0.11 ± 0.014 mm, y no fue afectado con los cambios en la concentración de aceite.

Color y opacidad

El agregado de lípidos generalmente hace que las películas basadas en proteínas se vuelvan más blanquecinas o lechosas (Yang y Paulson, 2000). En nuestro caso, la adición de aceite de tung a las películas resultó en un marcado incremento en los valores de opacidad, los cuales aumentan con la concentración de aceite (Fig. 6.1). Un comportamiento similar se encontró en películas de gelatina y *brazilian elemi* (Bertan y col., 2005), en películas de gluten de trigo y aceite de soja (Shaw y col., 2002), en películas de caseinato de sodio y ácido oleico-cera de abeja (Fabra y col., 2009) y en películas de gelatina y mezclas de aceite de girasol (Pérez-Mateos y col., 2009). Monedero y col (2010) encontraron que tanto el agregado de ácido oleico como el de cera de abeja provocaban, en películas de caseinato de sodio, una disminución en la transparencia y el desarrollo de un color más amarillento.

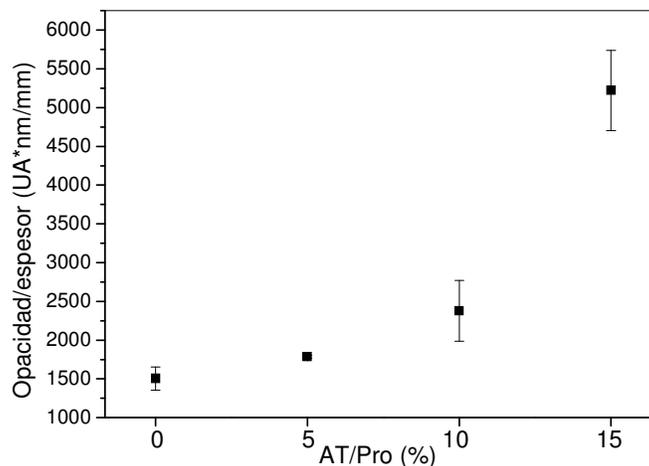


Figura 6.1. Valores de opacidad de películas plastificadas de caseinato-aceite de tung.

Yang y Paulson (2000) informaron que las diferencias en opacidad de las películas resultaron determinadas por las propiedades ópticas de los lípidos incorporados. Asimismo, se sabe que la presencia de una fase dispersa y no miscible promueve la opacidad en función de las diferencias en los índices de refracción de las distintas fases y de la concentración y tamaño de partícula de la fase dispersa (Villalobos y col., 2005; Monedero y col., 2009). Entonces, estos cambios en la absorción de la película tienen su origen en la dispersión de luz producida por las gotas lipídicas (diferencia entre los índices de refracción de las fases dispersa y continua) dispersas en la emulsión o distribuidas completamente en la red polimérica que constituye la película (Yang y Paulson, 2000), lo que provoca la reducción global de la luz transmitida a través de ella (Prodpran y col., 2007). La incorporación de aceite de tung en concentraciones superiores a 10% p/p conduce a un incremento apreciable en la opacidad, lo cual puede asociarse a una ancha distribución de tamaños y en particular a las gotas más grandes de aceite de tung en la emulsión formadora de la película.

Aunque en muchas aplicaciones es indeseable un aumento de la opacidad, se encuentra bastante bien documentado que las películas con altos valores de absorbancia pueden presentar propiedades de barrera interesantes, previniendo la oxidación lipídica de los alimentos inducida por la luz UV, cuando estas películas son usadas como envases o recubrimientos (Andreuccetti y col., 2009).

Para entender mejor las propiedades ópticas de las películas de caseinato con distintos contenido de aceite, se analizaron los parámetros de color L^* , a^* , b^* y WI, y se determinó la diferencia de color (ΔE) de las películas preparadas con el agregado de lípidos con respecto a la película control de caseinato. La Tabla 6.1 muestra los valores de los parámetros ópticos para las películas estudiadas. Como se puede observar, todas las películas muestran alta luminosidad (L^*), siendo mayores los valores para la película de caseinato sin aceite, como fue observado también en películas de caseinato de sodio con ácido oleico y cera de abeja (Monedero y col., 2010) y en películas de proteína de soja con cera de abeja (Monedero y col., 2009). El agregado de lípidos torna a las películas de caseinato levemente más oscuras. El parámetro ΔE da una idea del cambio de color de las películas respecto a una película control (en este caso la película preparada sin aceite de tung), y el índice de blancura (WI), puede ser usado como una medida de la transparencia de las películas dado que las mediciones se hicieron a partir de una referencia blanca estándar. En este sentido, mientras que ΔE aumenta con el

contenido de aceite, sobre todo por la contribución del valor b^* (azul-amarillo), WI disminuye, es decir, que las películas se vuelven cada vez más amarillentas y menos transparentes al incrementar el contenido de lípido. Monedero y col (2009) también observaron que el WI de películas de proteína de soja se reducía al incrementar el contenido de cera de abeja, al mismo tiempo que ΔE aumentaba.

Tabla 6.1. Parámetros de color de películas de caseinato-aceite de tung plastificadas (28% gli/pro).

AT/Pro (%)	L^*	a^*	b^*	ΔE^1	WI
0	87.95± 1.29	0.58± 0.08	-2.11± 1.09	---	88.49± 0.49
5	86.62± 1.09	-0.32± 0.17	4.59± 2.78	6.88± 2.81	85.85± 1.53
10	87.43± 0.73	-0.85± 0.29	8.11± 1.69	10.21± 1.88	85.06± 1.27
15	85.95± 0.69	-0.45± 0.15	12.2± 2,08	13.89± 1.91	81.88± 1.65

¹Los valores de ΔE están calculados con respecto a la película de caseinato de sodio sin aceite de tung (AT/Pro=0).

Microscopías electrónica de barrido (SEM)

Con el objetivo de estudiar la morfología de las películas, y de comprobar la existencia y distribución de gotas de aceite en las películas conteniendo aceite de tung, se obtuvieron las micrografías electrónicas de barrido de la superficie del espesor (fractura criogénica) y de las superficies superior (en contacto con aire durante el secado en el molde) e inferior (en contacto con el molde) de la película. No se muestran las micrografías SEM de las superficies inferiores ya que resultaron ser similares a las de la muestra control (sin aceite). Las demás micrografías SEM se presentan en la Figura 6.2.

No se encontraron diferencias importantes en la sección transversal de las distintas películas (Figuras B), aunque la película sin aceite de tung muestra una superficie de fractura más rugosa. Por el contrario, cuando se observan la superficies de la películas (Figuras A), se confirma claramente la existencia de una fase rica en lípidos. Como se puede ver en la Figura 6.2, la película control (28 % glicerol, sin aceite) muestra una superficie suave y continua. Por otro lado, con el agregado de aceite de tung, se obtiene una estructura heterogénea, formada por una matriz proteica con inclusiones de glóbulos lipídicos más o menos distribuidos de manera homogénea.

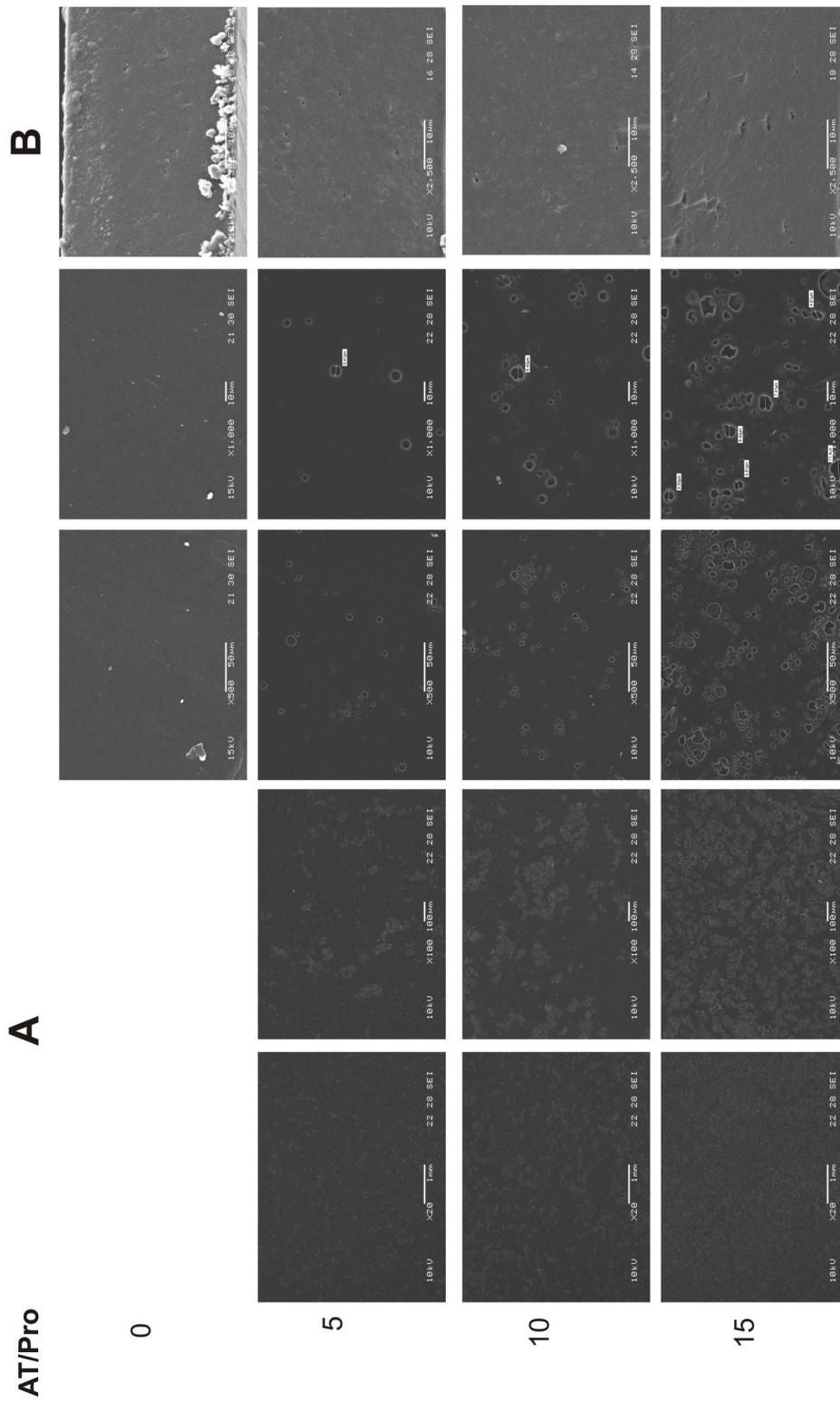


Figura 6.2. Micrografías SEM de películas de caseinato- aceite de tung (0, 5, 10 y 15 % p/p AT/proteína. a) superficie superior, y b) sección transversal.

Como era de esperar, la cantidad de glóbulos lipídicos aumenta a medida que la concentración de aceite también lo hace. Una observación más cercana revela que en las muestras con las menores concentraciones de aceite (5 y 10 % p/p de aceite) estos glóbulos están formados por gotas discretas esféricas de 3 a 8 μm de diámetro promedio. Para las películas que contienen 15% p/p de aceite, la forma de la gota se vuelve más irregular, y aparecen gotas más grandes, siendo algunas de ellas mayores a los 10 μm .

Por otro lado, el hecho de que las micrografías de la superficie inferior de las películas no muestren dos fases indica claramente que durante el proceso de secado, el componente hidrofóbico tiende a migrar hacia la superficie en contacto con aire. La diferencia de densidades de ambas fases colabora con este proceso.

En resumen, el análisis de las micrografías SEM confirma los resultados obtenidos en los espectros de absorbancia, es decir, una dispersión pobre de gotas de aceite para concentraciones superiores al 10 % p/p. Las películas con 15 % de AT muestran una distribución lipídica heterogénea, que resulta de la limitada capacidad de dispersión del aceite y de la pobre estabilidad de las emulsiones, tal como fue observado por Yang y Paulson (2000) en películas de gelatina conteniendo más de 25 % p/p de lípido.

Microscopías ópticas de transmisión (TOM)

La distribución de glóbulos lipídicos y el tamaño de las gotas se determinaron también por microscopía óptica. En la Figura 6.3 se observan las fotos obtenidas a distintas magnificaciones. El análisis de estas fotos nos lleva a obtener las mismas conclusiones que la observación de las micrografías SEM: el tamaño de las inclusiones lipídicas aumenta al aumentar la concentración de aceite de tung, mientras que el tamaño de gota individual se mantiene aproximadamente constante, debido a la capacidad del caseinato de sodio para actuar como estabilizante de emulsiones, hasta el 10% de aceite. Las muestras con 15% de lípido presentan, nuevamente, una distribución mucho más heterogénea. Por otro lado, las microscopías ópticas parecen presentar mayor cantidad de glóbulos lipídicos por unidad de superficie que las SEM. Esto se explica teniendo en cuenta que las microscopías ópticas se obtuvieron en modo transmisión y por consiguiente se observan los glóbulos contenidos en los distintos planos de la película (y no sólo los posicionados sobre la superficie, como en las SEM).

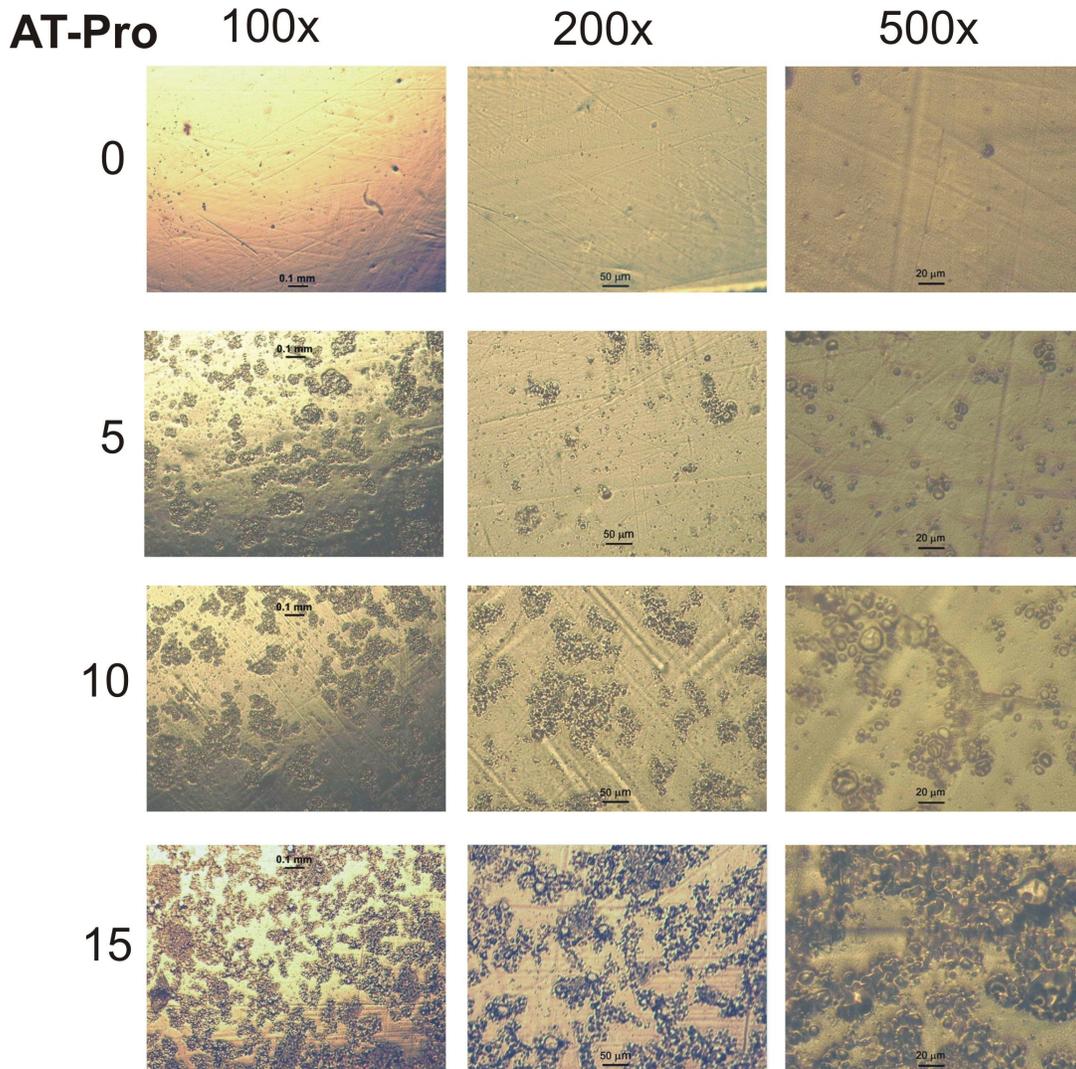


Figura 6.3. Microscopías ópticas de películas de caseinato- aceite de tung (0, 5, 10 y 15 % p/p AT/proteína).

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La morfología (parámetros cualitativos) y la rugosidad (parámetros cuantitativos) de la superficie de las películas se analizaron por AFM. La Figura 6.4 muestra los gráficos 3D obtenidos de la altura de las películas con respecto a un plano de referencia, en el área superficial analizada, donde se puede observar una marcada influencia de la concentración de aceite de tung sobre la rugosidad superficial.

Como se observó en las micrográficas SEM (Figura 6.2), la superficie de la película control es prácticamente lisa, sin irregularidades, y sólo se observan algunos poros pequeños. Las películas preparadas con aceite de tung presentan irregularidades en la superficie que se acentúan fuertemente a medida que se incrementa el contenido de

lípidico. Se observa la formación de relieves bruscos en las películas con el agregado de aceite, aumentando así la rugosidad superficial. Este fenómeno también fue observado por Fabra y col. (2009) en películas de caseinato de sodio con ácido oleico/cera de abeja a medida que se incrementaba el contenido de cera.

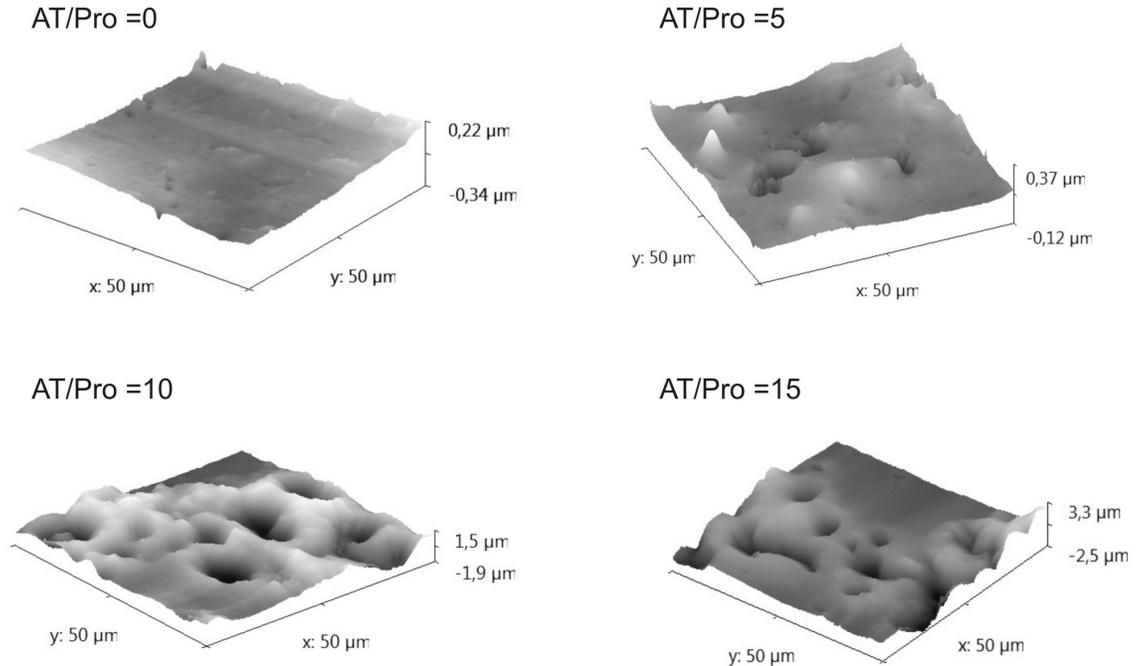


Figura 6.4. Gráficos 3D a partir de AFM de las distintas películas, a un tamaño de barrido de $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$. Estas imágenes se eligieron como representativas de cada muestra.

La Tabla 6.2 muestra los distintos parámetros (R_a y R_q) definidos en el capítulo 2 (ec. 2.2.4 y 2.2.5), que permiten cuantificar la rugosidad superficial obtenida del análisis de datos de los gráficos 3D. Aunque estos parámetros a veces no reflejen la esencia de la topografía de la superficie, ya que dos muestras pueden tener el mismo valor pero diferente frecuencia espacial de las irregularidades, juntos son muy útiles para describir la rugosidad de la misma. Como se muestra en la Tabla 6.2 todos los parámetros aumentan bruscamente, comparados con la película control, al introducir un contenido de aceite tan bajo como el 5 % p/p. También se observa un cambio muy importante al incrementar el contenido de aceite del 5 al 10% p/p, mientras que el incremento en la concentración de aceite desde 10 % y hasta un 15 % p/p no produce cambios tan evidentes.

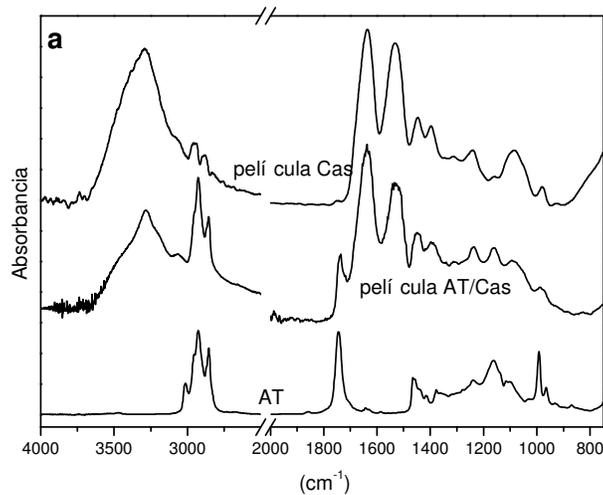
Tabla 6.2. Parámetros de rugosidad obtenidos de las imágenes de AFM: R_a y R_q (Se analizaron cinco imágenes en cada caso).

AT/Pro (%)	R_a (nm)	R_q (nm)
0	27.9± 2.5	37.2± 11.3
5	88.6± 4.7	111.6± 6.1
10	522.3± 43.1	641.7± 58.8
15	556.5± 36.4	738.3± 47.3

Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 6.5a muestra los espectros FTIR correspondientes al aceite de tung y a las películas de caseinato sin plastificar (sin glicerol), con y sin el agregado del lípido.

El espectro FTIR del aceite de tung muestra una banda de absorción prácticamente nula a 3400-3500 cm^{-1} indicando un contenido despreciable de grupos -OH, tal como se esperaba. El pico a 3015 cm^{-1} corresponde a las insaturaciones conjugadas *trans-trans* y el pico a 1745 cm^{-1} a los carbonilos de los grupos éster de las moléculas de triglicéridos. La existencia de un pico fuerte a 993 cm^{-1} se atribuye a la presencia de conjugaciones *trans-trans* en las cadenas elaeostéaricas. Los picos pequeños a 964 cm^{-1} y a 735 cm^{-1} son el resultado de la presencia de insaturaciones *cis*.



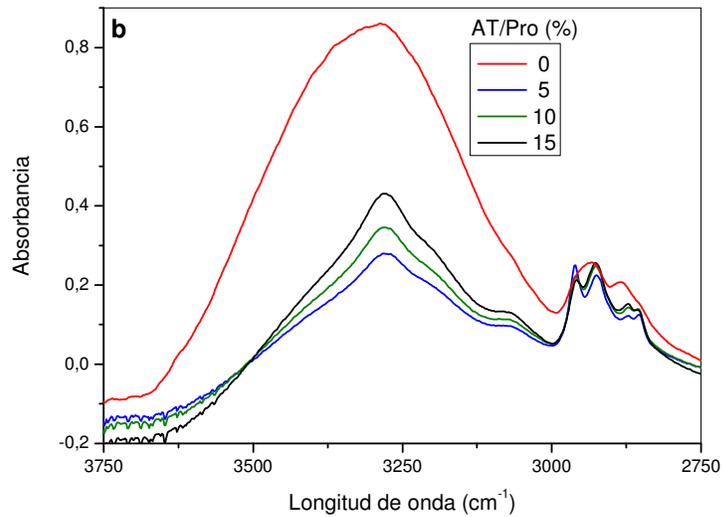


Figura 6.5. Espectros FTIR de: a) AT, película de Cas control y película Cas-AT (15% AT/Pro); b) Películas de Cas plastificadas con glicerol y modificadas con distintas concentraciones de aceite de tung.

El espectro FTIR de la película de caseinato de sodio control ya fue analizado en detalle en el capítulo 3 (Bellamy, 1975; Pereda y col., 2008).

Por otro lado, el espectro de la película obtenida a partir de la emulsión preparada con 15% de aceite de tung muestra tanto los picos distintivos del AT como las bandas características atribuidas al caseinato de sodio. Sin embargo, este espectro no puede construirse exitosamente a partir de las contribuciones en peso de los espectros de aceite de tung y caseinato de sodio, lo cual puede deberse a un cierto grado de interacción entre las dos fases.

Finalmente, la Figura 6.5b muestra la región entre 4000-2500 cm^{-1} para las películas de caseinato de sodio preparadas tanto con aceite de tung (aditivo lipídico) como con glicerol (plastificante, 28% p/p). La banda centrada alrededor de 3300 cm^{-1} (asociada a puentes de H inter e intramoleculares) se reduce a medida que se incrementa el contenido de aceite de tung, sugiriendo una reducción en el carácter hidrofílico de estas películas.

Propiedades mecánicas en tracción

En la literatura relacionada se demuestra que la mayor parte de los aceites o ácidos grasos pueden actuar como plastificantes en películas basadas en proteínas (Bertan y col., 2005; Andreuccetti y col., 2009; Monedero y col., 2009; Monedero y

col., 2010); por ello, se evaluó la viabilidad del aceite de tung en este sentido. Las primeras tres filas de la Tabla 6.3 muestran el comportamiento en tracción de las películas de caseinato preparadas sin plastificante, con 15% glicerol y con 15% de aceite de tung, respectivamente; siempre respecto al contenido de proteína. La película no plastificada y sin AT exhibe valores de módulo y tensión última altos a expensas de una elongación reducida. Se observa el comportamiento opuesto (bajo módulo) para las muestras con glicerol, confirmando su rol plastificante. Además, la tensión a la ruptura también se reduce debido a la disminución de la cohesión entre las cadenas de caseinato, dado que el glicerol es un plastificante polar que puede distribuirse uniformemente a través de la matriz polimérica, interactuando con las cadenas proteicas a través de puentes de H y rompiendo algunas de las interacciones primarias proteína-proteína. Por otro lado, la película preparada con 15% de AT muestra valores de módulo y resistencia última reducidos en comparación con la película de caseinato control, pero mayores que los correspondientes a las películas plastificadas con glicerol. También presenta una deformación última muy baja, aún menor que la correspondiente a la película de caseinato puro. Esta característica determina que las películas no puedan plegarse sin romperse, indicando así que el aceite de tung no es útil para aumentar la flexibilidad de las películas de caseinato de sodio. Consecuentemente, para el siguiente análisis se prepararon películas con contenido de glicerol constante del 28% (respecto al contenido de proteína), y con diferentes contenidos de aceite. Las propiedades mecánicas de estas películas plastificadas con glicerol se informan también en la Tabla 6.3. Se puede observar un aumento en el módulo elástico y en la resistencia última a medida que el contenido de AT aumenta desde 5 a 15% p/p. Como el aceite de tung constituye una fase emulsificada, no miscible en las soluciones formadoras de películas, las cadenas proteicas tienden a segregarse, formando una fase rica en proteínas. La agregación proteica, que aumenta con la cantidad de aceite agregado, favorece el desarrollo de interacciones proteína-proteína en mayor grado y, como consecuencia se observan mayores valores de módulos y resistencia a la tracción en comparación con los medidos para las películas sin aceite. Estas observaciones son consistentes con los resultados informados por Prodpran y col. (2007) y Wang y col. (2009) para sistemas de aceite de palma-proteína y aceite de maíz-gelatina, respectivamente. Por otro lado, el glicerol (completamente soluble en el aceite de tung) podría migrar parcialmente a la

fase lipídica durante la formación de la película, disminuyendo su efecto plastificante y aumentando así la rigidez de las películas.

Tabla 6.3. Propiedades mecánicas en tracción de películas de caseinato- aceite de tung.

AT/Pro (%)	Gli/Pro (%)	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
0	0	2908.0± 121.9	57.0± 0.3	4.0± 0.5
0	15	802.8± 63.2	13.6± 1.3	11.6± 5.6
15	0	1202.4± 62.5	25.8± 2.7	3.0± 0.6
0	28	251.0± 20.3	6.3± 0.2	63.2± 6.0
5		298.4± 30.5	7.1± 0.4	45.1± 12.8
10		325.3± 47.8	8.3± 0.8	46.9± 17.2
15		330.2± 34.3	8.3± 0.4	45.9± 17.7

Al mismo tiempo, se observa una disminución en la elongación a la ruptura. Prodpran y col. (2007) y Zinoviadou y col. (2009) atribuyen este comportamiento a la reducción de la cohesividad y continuidad de la red proteica debido a la presencia de glóbulos lipídicos en la película. Las discontinuidades introducidas por la incorporación del aceite pueden afectar la capacidad de elongación de las películas, dependiendo de las características del lípido agregado. Wang y col. (2009) explicaron este comportamiento indicando que el aceite de maíz ocupa el espacio libre en la red proteica de gelatina, limitando así la capacidad de estiramiento y movilidad de las películas. Dado que el agua absorbida puede actuar como plastificante en películas hidrofílicas (Quezada Gallo y col., 2000), el menor contenido de agua de las películas que contienen lípidos (menor efecto plastificante) pueden también llevar a la reducción de la elongación de la misma. En el lenguaje específico del tema, esto se conoce como efecto antiplastificante del aceite de tung sobre el caseinato de sodio. Algunos autores han informado un efecto similar analizando la respuesta mecánica de películas de metilcelulosa modificadas con lípidos líquidos (Debeaufort y col., 2000), y de películas proteicas conteniendo aceite de palma (Prodpran y col., 2007). En contraste, otros estudios sobre la incorporación de grasas o lípidos en películas comestibles han mostrado que la capa lipídica puede actuar como plastificante en películas biopoliméricas (Anker y col., 2002; Yang y Paulson, 2000; Shaw y col., 2002; Bertan y

col., 2005; Fabra y col., 2008¹, Zinoviadou y col., 2009), lo que ha sido atribuido a la pérdida de integridad estructural de la capa lipídica. Este efecto ha sido relacionado con el desarrollo de una estructura heterogénea, donde los lípidos actúan como discontinuidades en la matriz proteica, haciéndolas menos resistentes a la fractura, pero más deformables. El efecto del tipo de lípido difiere de acuerdo a la matriz proteica (Monedero y col., 2010). Por ejemplo, mientras que el agregado de ácido oleico puro conduce a una gran disminución del módulo y la tensión a la ruptura, y a un aumento de la deformación en películas de caseinato de sodio, la incorporación de cera de abeja lleva a una recuperación de esos valores. En cambio, en películas de caseinato de calcio no se observaron cambios en los valores de E y σ_b con el tipo de lípido incorporado (Monedero y col., 2010).

Propiedades termomecánicas

La Figura 6.6 muestra las curvas de $\tan \delta$ como función de la temperatura para películas plastificadas (28% glicerol, respecto de proteína) con diferentes contenidos de aceite de tung. De la misma forma que en capítulos anteriores, se considera arbitrariamente que la temperatura de transición vítrea es la que corresponde al cambio abrupto en la curva de $\tan \delta$ vs temperatura y se observa una gran dispersión en las determinaciones, asociadas directamente al contenido de humedad de las películas en el momento del ensayo. En la Figura 6.6 se observa que el agregado de aceite ocasiona un aumento de la T_g de la película plastificada respecto a la que no contiene aceite. Por otro lado, y mientras que la película preparada con 5% de aceite de tung presenta la mayor temperatura de transición vítrea ($\sim 85^\circ\text{C}$), mayores contenidos de lípido producen una leve disminución de este valor ($\sim 79^\circ\text{C}$). Dado que a mayor contenido lipídico mayor es la hidrofobicidad de la película, este efecto no puede explicarse por plastificación con vapor de agua y debe ser explicado por la segregación de la fase proteica en presencia de aceite, como en las secciones anteriores. Sin embargo, en este tipo de ensayos la sollicitación de la muestra no es solamente mecánica, sino que también se aplica un programa de calentamiento, lo que podría ocasionar la desestabilización de las emulsiones en concentraciones de aceite más bajas que las observadas en las secciones previas y que explicaría la disminución de la T_g de las películas preparadas con concentraciones mayores al 10% de aceite de tung.

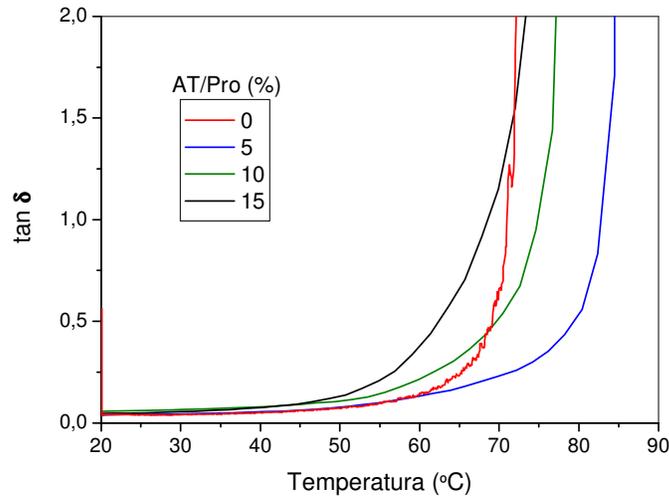


Figura 6.6. Curvas $\tan \delta$ vs temperatura de películas plastificadas de caseinato de sodio con diferentes contenidos de aceite de tung.

Termogravimetría (TGA)

En las Figuras 6.7a y 6.7b se presentan las curvas termogravimétricas de la película proteica y de las películas preparadas a partir de emulsiones con aceite de tung. La degradación térmica de las películas preparadas con caseinato de sodio y glicerol se estudió en detalle en el capítulo 3, por lo tanto en esta sección se hará solamente un análisis cualitativo. De todas formas, es necesario remarcar que por situaciones fuera de nuestro control, las curvas mostradas en las Figuras que siguen se obtuvieron a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, en lugar de a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ como las presentadas en el capítulo 3, por lo que la comparación directa es inviable. La pérdida de masa de las distintas películas no presenta diferencias hasta aproximadamente 150°C ; a partir de esa temperatura, las curvas correspondientes a las películas que contienen aceite de tung comienzan a degradar a una velocidad levemente menor que la matriz plastificada con glicerol. Sin embargo, las diferencias entre las películas con distintos contenidos de aceite de tung recién aparecen a temperaturas mayores a 300°C , donde se observa un aumento de la velocidad de degradación con el contenido de lípido. Entonces, se puede resumir el comportamiento frente a la degradación térmica indicando que el aceite actúa protegiendo a la red proteica hasta que alcanza su temperatura de degradación térmica.

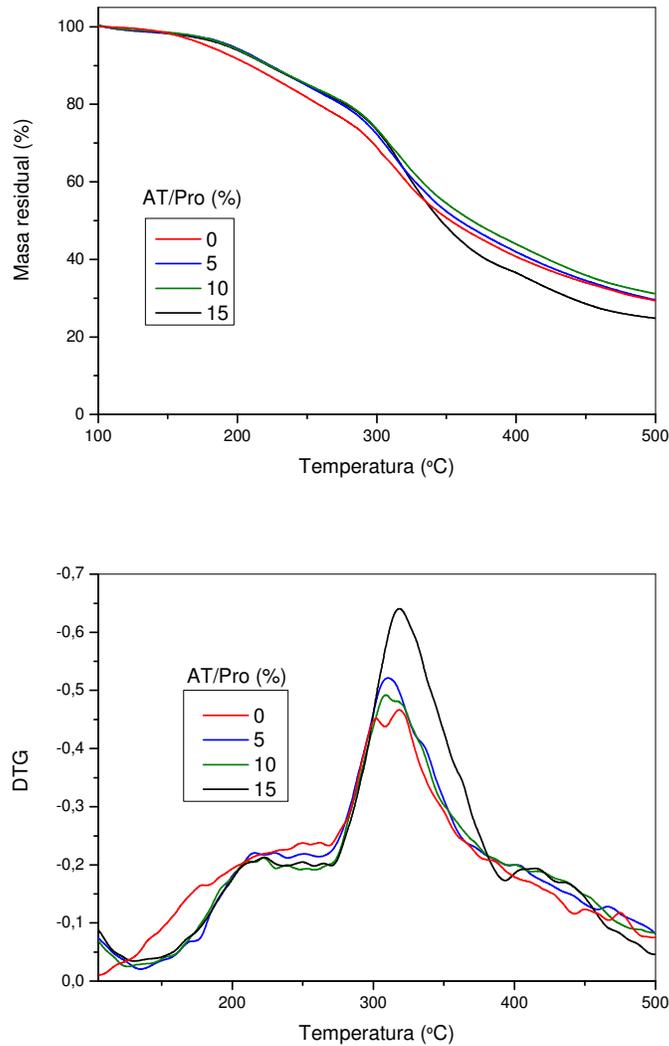


Figura 6.7. Patrones de degradación térmica de películas de caseinato- aceite de tung: a) Curvas TG, b) curvas DTG.

Ángulo de contacto

El principal objetivo de este estudio es reducir la hidrofiliidad de las películas agregando lípidos al sistema, por lo tanto, se utilizó el método de ángulo de contacto para determinar la hidrofiliidad superficial de las mismas. En la Tabla 6.4 se presentan los resultados de las mediciones de ángulo de contacto usando etilenglicol como solvente polar, realizadas en las dos caras de las películas: la superior, que fue la que estuvo en contacto con el aire durante la etapa de secado y la inferior, que estuvo en contacto con el molde de Teflón.

Tabla 6.4. Valores de ángulo de contacto de películas de caseinato- aceite de tung.

AT/Pro (%)	$\theta_{\text{etilenglicol}} (^{\circ})$	
	cara inferior	cara superior
0	26.31± 1.59	
5	46.57± 3.43	48.38± 3.80
10	58.96± 1.95	61.75± 3.91
15	55.93± 3.02	70.60± 3.59

Los valores de ángulo de contacto aumentan con el agregado de aceite de tung, tal como se esperaba, debido a la naturaleza hidrofóbica del lípido agregado. Comparando los valores medidos para la superficie inferior, se obtuvo un aumento del 78% en los valores de ángulo de contacto con el agregado de la menor cantidad de aceite (5% p/p) usada en este estudio. Un mayor contenido de aceite (10% p/p) lleva a un aumento mayor del ángulo de contacto, pero el cambio respecto al valor anterior no es tan importante, probablemente debido a que el contenido de AT está cercano a la capacidad de emulsificación máxima de estas películas. A concentraciones de aceite del 15% p/p, los valores de ángulo de contacto disminuyen levemente. Los valores medidos para la superficie superior varían entre muy similares (teniendo en cuenta la desviación estándar) a levemente mayores que los de la superficie inferior para bajas concentraciones de aceite; y mucho más altos para las muestras con 15% de aceite, indicando que la fase lipídica tiende a concentrarse en esa superficie, dado que los componentes hidrofóbicos tienden a migrar a la interface con aire, lo que, en este caso, es favorecido además por la diferencia de densidad entre las dos fases. Nuevamente esta observación es consistente con una emulsión saturada en aceite.

Absorción de humedad

Para investigar el efecto de aceite de tung sobre las películas de caseinato de sodio, se llevó a cabo un estudio de absorción de vapor de agua, a 75 % HR y 24°C. Las isotermas de absorción se muestran en la Figura 6.8. Los datos de absorción de humedad experimentales indican una velocidad de absorción alta a tiempos cortos, para finalmente alcanzar un contenido de humedad en equilibrio que depende del contenido de aceite de tung, siendo más bajo a medida que la concentración de aceite aumenta debido a la naturaleza hidrofóbica del lípido. Los datos de absorción de humedad

experimentales se modelaron de acuerdo a la ley de Fick (ecuación 2.2.10), mostrando un ajuste razonable hasta aproximadamente los 400 minutos (ver Figura 6.8). A mayores tiempos las predicciones del modelo se desvían sustancialmente de los datos experimentales. Por esta razón, los coeficientes de difusión efectivos (parámetros de ajuste, reportados en Tabla 6.5) se obtuvieron usando las mediciones de absorción de agua a 400 min como el contenido de humedad de equilibrio para el comportamiento fickiano (FEMC). Se debe notar que estos FEMC difieren de los EMC informados en Tabla 6.5, dado que los últimos se midieron luego de 1500 minutos de exposición; las tendencias sin embargo son las mismas.

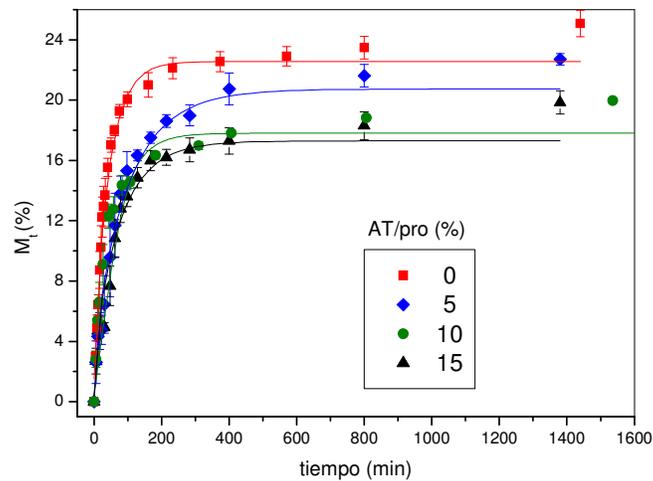


Figura 6.8. Isotermas de absorción de vapor de agua de películas de caseinato- aceite de tung (75% HR, 24°C).

Como fue discutido en capítulos anteriores, se espera una dependencia del coeficiente de difusión con la humedad, debido al carácter hidrofílico del caseinato de sodio, lo cual no está considerado por la Ley de Fick (Pereda y col., 2009). Sin embargo, los coeficientes de difusión efectivos (ver Tabla 6.5) claramente aumentan con el incremento de la concentración de aceite de tung, indicando que las moléculas de agua son menos retenidas en la película a medida que el carácter hidrofílico disminuye, como fue observado en trabajos previos (Pereda y col., 2009; Pereda y col., 2009a). Sin embargo, la película control está fuera de esta tendencia, probablemente debido a que fue obtenida a partir de una solución de única fase

Tabla 6.5. Absorción de humedad de películas de caseinato-aceite de tung.

AT/Pro (%)	Espesor (mm)	EMC (%)	Modelo de Fick $D_{ef}(m^2 s^{-1}) \times 10^{13}$
0	0.09± 0.02	25.08± 0.87	2.83± 0.73
5	0.10± 0.01	22.71± 0.37	1.81± 0.21
10	0.08± 0.02	20.13± 0.83	2.47± 0.36
15	0.12± 0.00	19.84± 0.77	3.14± 0.41

Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La Tabla 6.6 informa los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas de caseinato con aceite de tung. El comportamiento observado muestra una mejora leve de la permeación al vapor de agua con la incorporación de lípido, como consecuencia de una reducida afinidad al agua y de un aumento en la tortuosidad del camino para difusión de vapor a través de la película debido a la presencia de glóbulos lipídicos (Anker y col., 2002). Sin embargo, el agregado de aceite de tung en la matriz de caseinato reduce sólo marginalmente la WVP en cualquiera de los tres niveles empleados. El mismo comportamiento fue observado por Zinoviadou y col. (2009) en películas plastificadas de proteína de suero que contenían aceite de orégano ($2.4 \cdot 10^{-9}$ y $2.53 \cdot 10^{-9}$ g.m/Pa.s.m², sin y con 1.5% p/p de aceite, respectivamente, ensayadas a un gradiente 100:53% HR), por Ghanbarzadeh y col (2008) en sus intentos de reemplazar el glicerol por aceite de oliva en las películas de zeína ($1.4 \cdot 10^{-9}$ y $1.94 \cdot 10^{-9}$ g.m/Pa.s.m² para zeína/aceite de oliva y zeína/glicerol, respectivamente a 100:50% RH) o por Monedero y col. (2009) para películas de proteína de soja sin y con 25% de lípido respecto a la proteína ($1.8 \cdot 10^{-9}$ y $1.1 \cdot 10^{-9}$ g.m/Pa.s.m², respectivamente, medidos a 100:58% RH). Esto ilustra que a veces las películas formadas a partir de una emulsión siguen siendo una barrera pobre contra el vapor de agua, dado que las moléculas de agua todavía permean a través de la fase no lipídica. Por el contrario, otros estudios relacionados con la incorporación de grasa y lípidos en películas comestibles, han mostrado mejoras en las propiedades de barrera al vapor de agua, por ej. Weller y col. (1998) reducen la permeabilidad de sus películas de zeína de $2.5 \cdot 10^{-9}$ a $2.7 \cdot 10^{-11}$ g.m/Pa.s.m² mediante el agregado de cera y triglicéridos; Fabra y col (2008¹) observan, aplicando un gradiente de 100:58%, valores de $1.13 \cdot 10^{-9}$ y $7.2 \cdot 10^{-10}$ para películas de caseinato plastificadas con 30% de glicerol y conteniendo además 25% de cera de abeja,

respectivamente. Mejoras similares se informan para películas de gelatina modificadas con *brazilian elemi* (Bertan y col., 2005) y películas proteicas de soja con ácido oleico y cera de abeja (Monedero y col., 2010), sin embargo, en estos estudios se agregaron concentraciones más altas del componente lipídico (relación proteína: lípido 1:0.5).

Tabla 6.6. WVP de películas plastificadas de caseinato de sodio- aceite de tung.

AT/Pro (%)	Espesor (mm)	WVP (g.m/Pa.s.m ²) x 10 ¹⁰
		% RH 0/ 64.5
0	0.088	1.288± 0.230
5	0.104	0.923± 0.045
10	0.118	1.103± 0.058
15	0.118	0.986± 0.091

Por otro lado, se observó que el proceso de desgasificación de las emulsiones deterioraba, en cierta medida, la estabilidad de las mismas, produciendo una distribución algo más heterogénea del aceite en la matriz de proteína. Este efecto también fue observado por Yang y Paulson (2000) en películas de gelatina con aceites palmítico y esteárico. Sin embargo, aunque la desaireación tiene un efecto perjudicial sobre la emulsificación, es necesaria para obtener películas no porosas. Sin esta etapa, el aire atrapado en la emulsión origina pequeños poros dentro de la película final, lo que resulta en altos valores de WVP (Wang y Padua, 2005; Ghanbarzadeh y col., 2007). En realidad, los pequeños poros dentro de las películas, observados en las micrográficas SEM (Figura 6.2), contribuyen fuertemente a este comportamiento, facilitando el transporte de moléculas de agua a través de las películas.

Además, se ha comprobado que los valores de WVP de las películas compuestas por diferentes biopolímeros y lípidos dependen fuertemente del tipo, cantidad y estructura del lípido incorporado (longitud de cadena y grado de saturación) (Bertan y col., 2005). Pommet y col (2003) encontraron que la WVP disminuye con el aumento de la longitud de cadena de ciertos ácidos grasos saturados. Los lípidos sólidos (ceras) muestran mejores propiedades de barrera al vapor de agua que los lípidos líquidos (aceites) (Bertan y col., 2005). Esto fue explicado en términos de solubilidad relativa del vapor de agua en la fase líquida/sólida y en base a consideraciones sobre la organización molecular de los lípidos.

Considerando los resultados previos en conjunto (propiedades en tracción, valores de opacidad, mediciones de ángulo de contacto, absorción de humedad), se puede concluir que la cantidad máxima de aceite de tung que conviene agregar a las películas de caseinato con el objetivo de obtener propiedades mejoradas está alrededor del 10 % p/p respecto al contenido de proteína. Por este motivo, esta formulación fue seleccionada para ser entrecruzada mediante tratamiento térmico (calentamiento), ya que, de acuerdo a los resultados presentados a lo largo del Capítulo 4 (sección 4.3) y a los que se encuentran en literatura (Pérez-Gago y col., 1999; Rhim y col., 2000; Micard y col., 2000; Kim y col., 2002; Pereda y col., 2009) la mayoría de las propiedades de las películas proteicas pueden mejorarse mediante el calentamiento.

Resultados preliminares (capítulo 4, Pereda y col., 2009b) indican que una etapa de calentamiento de 6 horas a 95 °C es suficiente para obtener películas de caseinato de sodio con buenas propiedades balanceadas, es decir, solubilidad en agua reducida (medida como TSM) y buena rigidez mecánica, sin demasiada disminución de la deformación última. Por ello, se seleccionó este tratamiento para ser aplicado a las películas de caseinato con 10% de aceite de tung (ATH). Las propiedades resultantes son comparadas en la Tabla 6.7 con las correspondientes a las películas sin tratamiento (AT).

Tabla 6.7. Propiedades físicas y mecánicas de películas caseinato de sodio- aceite de tung (AT/Pro=0.1), con y sin tratamiento térmico.

	AT	ATH
E(MPa)	325.3± 47.8	600.9± 33.3
Propiedades mecánicas		
σ_b(MPa)	8.3± 0.8	12.0± 0.4
ϵ_b (%)	46.9± 17.2	33.7± 8.8
Parámetros de color		
WI	85.06± 1.27	74.19± 1.48
ΔE	10.21± 1.88	22.46± 2.00
Opacidad/ Espesor (Au*nm/mm)	2378.3± 389.6	3600.3± 353.5
Angulo de contacto (°)	58.9± 1.9	57.8± 1.3
WVP¹ (g.m/Pa.s.m²) x 10¹⁰	9.50± 0.25	7.60± 1.17
EMC (%)	18.9± 0.9	16.9± 0.6
TSM (%)	100.0± 0.0	56.7± 4.2

¹% HR dentro-fuera: 100/ 64.5

El tratamiento térmico causa la reducción del material soluble (TSM=56.7%) como resultado del entrecruzamiento de la muestra, lo cual se debe a las uniones proteína-proteína formadas a altas temperaturas, específicamente puentes disulfuro (Maté y col., 1996; Gerrard, 2002). Este entrecruzamiento es acompañado por una mejora en las propiedades mecánicas (módulo y resistencia a la tracción) (ver Tabla 6.7) y también por una reducción en el contenido de humedad en equilibrio (del 19 al 17 %), de acuerdo con la naturaleza menos hidrofílica de las películas tratadas térmicamente. El entrecruzamiento y los enlaces fuertes generados entre las cadenas proteicas durante el calentamiento, llevan a una reducción de la afinidad por el agua y por ende a un contenido de agua final menor dado que hay menos grupos polares disponibles para interactuar o para retener moléculas de agua. Similarmente la WVP, esta vez medida en las condiciones menos favorables (mayor presión de vapor de agua, 100/64.5 en vez de 0/64.5 como en las mediciones previas), disminuye con el tratamiento térmico. Sin embargo, los valores de opacidad aumentan en un 50 % respecto de las películas sin tratar (AT), debido al color más amarillento alcanzado, como también fue observado por otros autores en películas proteicas de soja (Kim y col., 2002) y películas de gluten (Micard y col., 2000). De la misma manera, el WI disminuye y la diferencia de color total aumenta apreciablemente. La hidrofiliidad superficial no está muy afectada por este tratamiento, como es evidenciado por los valores casi sin modificar de ángulo de contacto (se informan ángulos de contacto levemente menores).

6.4. Conclusiones

Se prepararon y caracterizaron películas de caseinato de sodio con distintos contenidos de aceite de tung. El agregado de lípidos hace que las películas se vuelvan blanquecinas, resultando en un aumento marcado en opacidad. De acuerdo a las observaciones por microscopía SEM y óptica, las películas preparadas con 15% de aceite de tung presentan una distribución heterogénea del lípido, lo que probablemente se deba a la limitada capacidad de dispersión del lípido utilizado en las soluciones de caseinato de sodio.

El contenido de aceite de tung afecta la respuesta mecánica de las películas, aumentando la resistencia en tracción y el módulo elástico, pero disminuyendo la extensibilidad. Se explican estos resultados considerando la mayor agregación de las moléculas de proteína en la fase rica en ésta y la migración parcial del plastificante a la fase lipídica de la película.

Las mediciones de ángulo de contacto junto con los ensayos de absorción de agua confirman la menor hidrofiliidad de las muestras (mayores θ y menores EMC). El agregado de aceite de tung en la matriz de caseinato no afecta significativamente la WVP a ninguno de los tres niveles empleados, lo que puede ser atribuido, al menos parcialmente, a la presencia de pequeños poros en las películas.

Las películas de caseinato con 10 % de aceite de tung se entrecruzaron mediante calentamiento (95°C, 6 horas). Este tratamiento físico produce grandes mejoras respecto a las películas sin tratamiento térmico, que consisten, principalmente, en un marcado aumento de la integridad de las películas en agua (TSM=56.7%), menor EMC y mejores propiedades mecánicas (σ_b y E), manteniendo la extensibilidad en niveles aceptables.

6.5. Referencias

- Anker, M.; Berntsen, J.; Hermansson, A.-M.; Stading, M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3: 81-92 (2002).
- Andreuccetti, C.; Carvalho, R.A.; Grosso C.R.F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films *Food Research International* 42: 1113–1121 (2009).
- Bellamy, L. J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*; Cambridge UK: Chapman and Hill, University Press, 1975, p 226.
- Bertan, L.C.; Tanada-Palmu, P.S.; Siani, A.C.; Grosso C.R.F. Effect of fatty acids and ‘Brazilian elemi’ on composite films based on gelatin *Food Hydrocolloids* 19: 73–82 (2005).
- Dalgleish, D.G.; Goff, H.D., Brun, J.M., Luan, B., Exchange reactions between whey proteins and caseins in heated soya oil-in-water emulsion systems. overall aspects of the reaction, *Food Hydrocolloids* 16:303-311 (2002).
- Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J.-A.; Delporte, B.; Voilley, A. Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films *Journal of Membrane Science* 180: 47–55 (2000).
- Fabra, M. J.; Hambleton, A.; Talens, P.; Debeaufort, F.; Chiralt, A. and Voilley, A. Aroma Barrier Properties of Sodium Caseinate-Based Films *Biomacromolecules* 9: 1406-1410 (2008²).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of alginate and k-carrageenan on tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate–lipid based films *Carbohydrate Polymers* 74: 419–426 (2008).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures *Journal of Food Engineering* 85: 393–400 (2008¹).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures *Food Hydrocolloids* 23: 676–683 (2009).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films *Journal of Food Engineering* 96 356–364 (2010).
- Gerrard JA, Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science Technology*, 13, 391–399 (2002).

- Ghanbarzadeh, B.; Musavib, M.; Oromiehiec, A. R.; Rezayib, K.; Razmi Radb, E.; Milani, J. Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films *LWT-Food Sci Technol*, 40: 1191-1197 (2007).
- Ghanbarzadeh, B.; Oromiehi, A.R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 209–215 (2008).
- Jia, D.; Fang Y. and Yao, K. Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan–chitosan–soy protein isolate edible films *Food and Bioproducts Processing* 8: 7–10 (2009).
- Kim, K. M. Weller, C. L. Hanna M. A. and Gennadios A. Heat Curing of Soy Protein Films at Selected Temperatures and Pressures. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 140–145 (2002).
- Maté, J.I. and Krochta, J.M. Comparison of Oxygen and Water Vapor Permeabilities of Whey Protein Isolate and beta-Lactoglobulin Edible Films. *J. Agric. Food Chem.*, 44(10), 3001-3004.(1996).
- Micard, V.; Belamri, R.; Morel, M.-H. y Guilbert S. Properties of Chemically and Physically Treated Wheat Gluten Films. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2948-2953 (2000).
- Monedero, F. M.; Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of calcium and sodium caseinates on physical characteristics of soy protein isolate–lipid films *Journal of Food Engineering* 97: 228–234 (2010).
- Monedero, F. M.; Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films *Journal of Food Engineering* 91: 509–515 (2009).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E. Characterization of chitosan/ caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2):1080-1090 (2008).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E., Water vapor absorption and permeability of films based on chitosan and sodium caseinate. *Journal of Applied Polymer Science*, 111 (6), 2777-2784 (2009).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E. Effect of crosslinking on the properties of sodium caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*. APP-2009-07-2072.R1 (2009a).
- Pereda, M.; Racz, I.; Marcovich, N.E. “Development and characterization of partially and/or completely biodegradable polymer films using cellulose” *ARCHIPOL’09. V Simposio Argentino- Chileno De Polímeros*, Los Cocos, Argentina.18-21 Octubre (2009b).
- Pérez-Gago, M. B.; Nadaud, P.; Krochta, J. M. Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat- denatured versus native whey protein films *J Food Sci*, 64: 1034-1037 (1999).

- Pérez-Mateos, M. Montero, P. Gómez-Guille M.C. Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends *Food Hydrocolloids* 23: 53–61 (2009).
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M.-H., & Guilbert, S.. Study of wheat plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44: 115–122 (2003).
- Prodpran, T.; Benjaku, S.; Artharn, A.; Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 605–614 (2007).
- Rodriguez, M.S. Albertengo, L.A. Agullo, E. Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydr. Polym.* 48, 271–276 (2002).
- Quezada Gallo, J.-A.; Debeaufort, F.; Callegarin, F.; Voilley, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films *Journal of Membrane Science* 180: 37–46 (2000).
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L. And Hanna, M. A. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 4937–4941 (2000).
- Sharma, V.; Kundu, P.P. Addition polymers from natural oils—A review, *Prog. Polym. Sci.* 31 : 983–1008 (2006).
- Shaw, N.B.; Monahan, F.J; O’Riordan E.D.; O’Sullivan, M.; Effect of soya oil and glicerol on physical properties of composite WPI films, *Journal of Food Engineering*, 51: 299-304 (2002).
- Sosa-Herrera, M.G.; Berli, C.L.A.; Martínez-Padilla L.P. Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures *Food Hydrocolloids* 22: 934–942 (2008).
- Villalobos, R.; Chanona, J.; Hernández, P.; Gutiérrez G. and Chiralt A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure *Food Hydrocolloids* 19 (1): 53-61 (2005).
- Wang, Q.; Padua, G. W. Properties of zein films coated with drying oils *J Agric Food Chem*, 53: 3444-3448 (2005).
- Wang, L.; Auty, M. A.E.; Rau, A.; Kerry, J. F.; Kerry, J. P. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films, *Journal of Food Engineering* 90: 11–19 (2009).
- Weller, C. L.; Gennadios, A.; Saraiva, R. A. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 31: 279- 285 (1998).
- Yang, L.; Paulson A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film *Food Research International* 33: 571-578 (2000).

Zinoviadou, K. G.; Koutsoumanis, K. P.; Biliaderis, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef *Meat Science* 82: 338–345 (**2009**).

Capítulo 7

Conclusiones generales

Conclusiones generales

El trabajo de investigación de esta Tesis consistió en la obtención, caracterización y optimización de películas biodegradables basadas en caseinato de sodio para ser utilizadas como recubrimientos o envases para alimentos. Se aplicaron diferentes alternativas y/o metodologías para subsanar las desventajas inherentes de las películas basadas en proteínas, prestando especial atención a la mejora de las propiedades mecánicas así como a la reducción de la absorción de humedad y la permeabilidad al vapor de agua de estas películas.

La caracterización inicial de las películas de caseinato de sodio permitió identificar las propiedades que necesitaban ser modificadas/mejoradas. Se pudo reducir la fragilidad propia de estas películas mediante el agregado de un agente plastificante como el glicerol, que permitió obtener películas flexibles y aptas para usarse en embalaje/envasado. El agregado de plastificante produjo además, el aumento de la hidrofiliidad de estos materiales y de la permeabilidad al vapor de agua de las películas.

Distintos métodos de modificación de las películas proteicas permitieron mejorar sus propiedades, en especial su capacidad de absorción de humedad. A partir de los resultados obtenidos se concluyó que:

i) el entrecruzamiento químico permite aumentar la estabilidad estructural en agua. El módulo de tracción y la resistencia de las películas de caseinato aumentan con la concentración de entrecruzante, aunque sólo las muestras preparadas con más de 5% GTA presentan comportamiento mejorado con respecto a la película de caseinato no entrecruzada. Por otro lado, la hidrofiliidad global (volumétrica) y la absorción de humedad no resultan mejoradas. Los agujeros y grietas inducidos por la contracción de la película durante el proceso de secado contribuyen al aumento de la permeabilidad al vapor de agua. Este comportamiento se explica por la formación de una red entrecruzada pero flexible, que aumenta la movilidad de los segmentos de cadena y contribuye positivamente a la difusión de moléculas de agua.

ii) el entrecruzamiento térmico también permite aumentar la estabilidad estructural en agua. Las películas tratadas a 95°C por 6 hs presentan mejores propiedades físicas (WVP y absorción de humedad relativamente bajos), mecánicas y

mayor estabilidad térmica comparadas con la películas de caseinato de sodio y con las películas entrecruzadas químicamente con GTA; y sin las complicaciones inherentes asociadas con el uso de GTA (tóxico a altas concentraciones). A partir de este estudio resulta claro que el entrecruzamiento inducido por tratamiento térmico es una alternativa valiosa y atractiva para mejorar las propiedades de las películas basadas en caseinato de sodio.

iii) la formación del complejo polielectrolítico a partir de la mezcla quitosano-caseinato conduce a importantes mejoras en las propiedades mecánicas, de absorción de humedad, estabilidad estructural en agua y como barrera microbiológica. En particular, la película Quit-Cas presenta un efecto sinérgico mostrando mejores propiedades mecánicas (en tracción e impacto) que las películas individuales. Además, tanto la película de quitosano como la compleja inhiben sustancialmente el crecimiento de bacterias mesófilas, psicrótrofas, hongos y levaduras. El desarrollo de interacciones iónicas fuertes entre la proteína aniónica y el carbohidrato catiónico es considerado la razón de estas mejoras.

iv) la incorporación de lípidos en las películas de caseinato permiten reducir la hidrofiliidad de las películas (mayores ángulos de contacto y menores contenidos de humedad de equilibrio). La utilización de aceite de tung resulta además en el aumento de la rigidez de estos materiales. Concentraciones superiores al 10% de aceite de tung llevan a morfologías heterogéneas. La combinación del agregado de lípido con el tratamiento térmico permite obtener películas de buena integridad estructural en agua, con mejores propiedades mecánicas y de absorción de agua.

El trabajo realizado a lo largo de esta Tesis Doctoral demuestra la aptitud del caseinato de sodio y de varias de las modificaciones analizadas (principalmente el tratamiento térmico y la complejación polielectrolítica) como formadores de películas con posible aplicación en el envasado/recubrimiento de alimentos.

Referencias integradas

Referencias integradas

- Abu Diak, O.; Bani-Jaber, A.; Amro, B.; Jones D.; and Andrews G. P. The Manufacture and characterization of casein films as novel tablet coatings *Food and Bioproducts Processing*, 85(3): 284–290 (2007).
- Acha, B. A.; Marcovich, N. E.; Karger- Kocsis, J. Biodegradable jute cloth reinforced thermoplastic copolyester composites: fracture and failure behaviour. *Plastics Rubber Compos*, 35: 73-82 (2006).
- Acha, B. A.; Reboredo, M. M.; Marcovich, N. E. Effect of coupling agents on the thermal and mechanical properties of polypropylene–jute fabric composites. *Polym Int*, 55: 1104-1113 (2006).
- Akin, H. and Hasirci, N., Preparation and Characterization of Crosslinked Gelatin Microspheres, *Journal of Applied Polymer Science*, 58 (1): 95-100 (1995).
- Alemdar, A. Sain M. Biocomposites from wheat straw nanofibers: Morphology, thermal and mechanical properties *Composites Science and Technology* 68: 557–565 (2008).
- Ali Y, Ghorpade VM and Hanna MA, Properties of thermally-treated wheat gluten films. *Industrial Crops and Products*, 6: 177-184 (1997).
- Alvarez, V.A.; Ruseckaite, R.A.; Vazquez A. Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. *Polym Degrad Stab*, 91: 3156-3162 (2006).
- Amanatidou, A., Slump, R. A., Gorris, L. G. M., & Smid, D. High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots. *Journal of Food Science*, 65(1): 61–66 (2000).
- Andreuccetti, C.; Carvalho, R.A.; Grosso C.R.F. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films *Food Research International* 42: 1113–1121 (2009).
- Anker, M., M. Stading, and A.-M. Hermansson, Mechanical Properties, Water Vapor Permeability, and Moisture Contents of b-Lactoglobulin and Whey Protein Films Using Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5): 1820-1829 (1998).
- Anker, M.; Berntsen, J.; Hermansson, A.-M.; Stading, M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3: 81-92 (2002).
- Argin-Soysala, S. Kofinasb, P.; Lo Y.M. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels *Food Hydrocolloids* 23: 202–209 (2009).
- Arvanitoyannis I, Biliaderis CG. Physical properties of polyol plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemical*; 62(3):333–42 (1998).

- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., & Yamamoto, N. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols. Part III. *Food Chemistry*, 60: 593–604 (1997).
- Arvanitoyannis, I.; Kolokuris, I.; Nakayama, A.; Yamamoto, N.; Aiba, S. Physico-chemical studies of chitosan–poly (vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 34: 9-19 (1997).
- Arvanitoyannis, I.S., Totally and Partially Biodegradable Polymer Blends Based on Natural and Synthetic Macromolecules: Preparation, Physical Properties, and Potential as Food Packaging Materials. *Polymer Reviews*, 39: 205-271 (1999).
- Arvanitoyannis, S.; Nakayama, A.; Aiba, S. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, 37: 371- 382 (1998).
- ASHRAE, American Society of Heating Refrigerating and Air Conditioning Engineers, Inc. Commodity storage requirements (pp. 25.1-25.3). Atlanta. USA: ASHRAE (1994).
- Audic J-L, Chaufer B, Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, 41: 1934–1942 (2005).
- Audic JL, Poncin-Epaillard F, Reyx D, Brosse JC. Cold plasma surface modification of conventionally and nonconventionally plasticized PVC-based flexible films. Global and specific migration of additives into isooctane. *Journal Applied Polymer Science*; 79:1384–1393 (2001).
- Ayhllon-Meixueiro, F., Vaca-Garcia, C., & Silvestre, F. Biodegradable films from isolate of sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3032–3036 (2000).
- Bae H.J., Darby D.O., Kimmel R.M., Park H. J., Whiteside W.S. Effects of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin–nanoclay composite film. *Food Chemistry*; 114: 180–189 (2009).
- Barreto P.L.M., Pires A.T.N., Soldi V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym. Degrad. Stabil.*, 79: 147–152 (2003).
- Barreto, P.L.M.; Roeder, J.; Crespo, J.S.; Maciel, G.R.; Terenzi, H.; Pires, A.T.N. ; Soldi, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/ sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chemistry*, 82: 425–431 (2003).
- Barry-Ryan, C., Pacussi, J. M., & O_Beirne, D. Quality of shredded carrots as affected by packaging film and storage temperature. *Journal of Food Science*, 65(4): 726–730 (2000).
- Bautista Baños, S; Hernández-Lauzardo, A.N; Velázquez del Valle, M.G; Bosquez-Molina, B; Sánchez-Domínguez, D. Quitosano: una alternativa natura para reducir microorganismos

- postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Rev Iber Tecnología Postcosecha*, 7(1):1-6 (2005).
- Beachley, V. Wen X. Fabrication of nanofiber reinforced protein structures for tissue engineering *Materials Science and Engineering C* 29: 2448–2453 (2009).
- Bellamy, L. J. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*; Cambridge UK: Chapman and Hill, University Press, p 226 (1975).
- Bendahou, A Kaddami, H. Dufresne A. Investigation on the effect of cellulosic nanoparticles' morphology on the properties of natural rubber based nanocomposites doi:10.1016/j.eurpolymj.2009.12.025 (2010).
- Bergera, J. Reista, M. Mayera, J.M. Felth, O. Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57: 35–52 (2004).
- Bergo, P. Sobral P.J.A., Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*; 21: 1285–1289 (2007).
- Bertan, L.C.; Tanada-Palmu, P.S.; Siani, A.C.; Grosso C.R.F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin *Food Hydrocolloids* 19: 73–82 (2005).
- Bertuzzi, M.A. Castro Vidaurre, E.F. Armada, M. Gottifredi J.C. Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*; 80: 972–978. (2007).
- Bigi A., Bracci B., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials*, 19: 2335-2340 (1998).
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K. Stabilization of gelatine films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, 23: 4827-4832 (2002).
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Rubini K., Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatine films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22: 763-768 (2001).
- Bigi, A. Panzavolta, S. Rubini K.; Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*; 25: 5675–5680 (2004).
- Biliaderis, C. G., Lazaridou, A., & Arvanitoyannis, I. Glass transition and physical properties of polyol-plasticized pullulan-starch blends at low moisture. *Carbohydrate Polymers*, 40: 29–47 (1999).
- Bird, RB, Armstrong, RC y Hassager, O, *Dynamics of Polymer Liquids*, vol1, Fluid Mechanics, 2da ed., Wiley-Interscience, Nueva York (1987).
- Bordenave, N., Grelier, S., & Coma, V. Water and moisture susceptibility of chitosan and paper-based materials: Structure-property relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23): 9479–9488 (2007).
- Bourtoom, T.; Chinnan, M. S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT - Food Science and Technology*, 41 (9): 1633-1641 (2008).

- Butler, B.L., Vergano P.J, Testin, R.F, Bunn, J.M & Wiles, J.L., Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and Storage. *Journal of Food Science*, 61(5): 953-961 (1996).
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-Aminobenzoic or sorbic acid. *Journal of Food Science*, 66(6): 865–870 (2001).
- Chambi, H; Grosso C Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*; 39: 458–466 (2006).
- Chatterji, Prabha R., Gelatin with Hydrophilic/Hydrophobic grafts and Glutaraldehyde crosslinks. *Journal of Applied Polymer Science*, 37: 2203- 2212 (1989).
- Chen H, Wang W. Physical properties of milk protein emulsion films as affected by different melting points lipids. *J Dairy Sci*; 77(suppl. 1):8–15 (1994).
- Chen H, Zhang S. Effects of protein-lipid and proteiplasticizer ratios on functional properties of sodium caseinate-acetylated monoglyceride films. *J Dairy Sci*; 77(suppl. 1):8 (1994).
- Chen H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*; 78:2563–2583 (1995).
- Cheng, M.; Deng, J.; Yang, F.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24: 2871-80 (2003).
- Cheuk-Hang Wan, V., Kim, M.S., y Lee, S.Y. Water vapor permeability and mechanical properties of soy protein isolate edible films composed of different plasticizer combinations. *Journal of Food Science*, 70(6): 387–391 (2005).
- Chick J, Ustunol Z. Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*; 63(6):1024–1027 (1998).
- Chiellini E., Cinelli P., Grillo Fernandes, Kenawy El Refaye S., Lazzeri A. Gelatin-based blends and composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. *Biomacromolecules*, 2: 806-811(2001a).
- Chillo, S. Flores, S. Mastromatteo, M. Conte, A. Gerschenson, L. Del Nobile M.A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*; 88: 159–168 (2008).
- Cho, S. Y., Rhee, C. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *Lebensmitte Wissenschaft und-Technologie*, 37: 833–839 (2004).
- Cho, S. Y.; Rhee, C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *LWT Food Science and Technology*, 35: 151-157 (2002).
- Ciesla, K., Salmieri S., Lacroix M., Le Tien C., Gamma irradiation influence on physical properties of milk proteins. *Radiation Physics and Chemistry*, 71(1-2): 95-99 (2004).

- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., & Deschamps, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3): 1162–1169 (2002).
- Coma, V.; Sebti, I.; Pardon, P.; Pichavant, F. H.; Deschamps, A. Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 51: 265-271 (2003).
- Coupland, J. N.; Shaw, N. B.; Monahan, F. J.; O’Riordan, E. D.; O’Sullivan, M. Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *J Food Eng*, 43: 25-30 (2000).
- Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*, 1st ed.; Clarendon: Oxford, (1956).
- Cuq, B., Gontard, N., Aymard, C., & Guilbert, S. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. *Polymer Gel Networks*, 5(1): 1–15 (1997).
- Dalgleish, D.G.; Goff, H.D., Brun, J.M., Luan, B., Exchange reactions between whey proteins and caseins in heated soya oil-in-water emulsion systems. overall aspects of the reaction, *Food Hydrocolloids* 16:303-311 (2002).
- Darder, M., *Biopolymer-Clay Nanocomposites Based on Chitosan Intercalated in Montmorillonite*. *Chem. Mater*, 15: 3774-3780 (2003).
- De Carvalho R. A. y Grosso R. F. Properties of chemically modified Gelatin films. *Brazilian journal of chemical Engineering*; 23: 45 – 53 (2006).
- De Carvalho R.A., Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids*; 18: 717–726 (2004).
- Deb, S.; Braden, M.; Bonfield, W. Water absorption characteristics of modified hydroxyapatite bone cements, *Biomaterials*, 16, 1095 (1995).
- Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J.-A.; Delporte, B.; Voilley, A. Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films *Journal of Membrane Science* 180: 47–55 (2000).
- Debeaufort, F.; Voilley, A.; Meares, P. Water vapor permeability and diffusivity through methylcellulose edible films. *J Membr Sci*, 91: 125 (1994).
- Del Nobile, M. A.; Fava, P.; Piergiovanni, L. Water transport properties of cellophane flexible films intended for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 53: 295–300 (2002).
- Del Nobile, M. A.; Mensitieri, G.; Netti, P. A.; Nicolais, L. Anomalous diffusion in poly-ether-ether-ketone. *Chemical Engineering*, 49: 633–644 (1994).
- DeMan, J. M. *Principles of Food Chemistry*, 3rd ed.; Aspen: Gaithersburg, MD; p 118. (1999).
- Demicheli, M., *Biodegradable plastics from renewable sources*, in IPTS Report, Vol 10., <http://www.jrc.es>, (1996).

- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M.; Añón, M. C. Montero, P., Mauri, A. N., Gómez-Guillén M. C., Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, doi:10.1016/j.foodhyd.2009.03.007 in press (2009).
- Denavi, G.; Tapia-Blácido D.R.; Añón M.C., Sobral P.J.A., Mauri A.N., Menegalli F.C. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*; 90: 341–349 (2009).
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21: 703–714 (2004).
- Di Franco, C.R.; Cyras, V.P.; Busalmen, J.P.; Ruseckaite, R.A.; Vázquez A. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Polym Degrad Stab*, 86: 95-103 (2004).
- Dinnella, C Gargaro, M T Rossano, R Monteleone, E Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. *Food Chemistry*, 78: 363–368 (2002).
- Domenek, S. Feuilleley, P. Gratraud, J. Morel, M.-H. Guilbert S. Biodegradability of wheat gluten based bioplastics *Chemosphere* 54: 551–559 (2004).
- Dong, H.; Cheng, L.; Tan, J.; Zheng, K.; Jiang, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit *J Food Eng*, 64: 355-358 (2004).
- Dumitriu, S.; Magny, P.; Montane', D.; Vidal, P. F.; Chornet, E. Polyionic Hydrogels Obtained by Complexation between Xanthan and Chitosan: Their Properties as Supports for Enzyme Immobilization. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 9: 184-209 (1994).
- Durango A.M., Soares N.F.F, Andrade N.J. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17: 336-341, (2006).
- Dutta, P.K.; Tripathi , S.; Mehrotra , G.K. ; Dutta, J. Review Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*; 114: 1173–1182 (2009).
- Extrand, C. W., Kumagai, Y. An experimental study of contact angle hysteresis. *Journal of Colloids and Interface Science*, 191: 378–383 (1997).
- Fabra, M. J.; Hambleton, A.; Talens, P.; Debeaufort, F.; Chiralt, A. and Voilley, A. Aroma Barrier Properties of Sodium Caseinate-Based Films *Biomacromolecules* 9: 1406-1410 (2008).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of alginate and k-carrageenan on tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate–lipid based films *Carbohydrate Polymers* 74: 419–426 (2008).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films *Journal of Food Engineering* 96 356–364 (2010).

- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures *Journal of Food Engineering* 85: 393–400 (2008).
- Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt, A. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures *Food Hydrocolloids* 23: 676–683 (2009).
- Fang, S. W., Li, C. F., & Shih, D. Y. C. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of Food Protection*, 56: 136–140 (1994).
- Fernández Cervera, M.; Karjalainen, M.; Airaksinen, S.; Rantanen, J.; Krogars, K.; Heinämäki, J.; Colarte, A. I.; Yliruusi, J. Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58: 69-76 (2004).
- Fernandez-Saiz, P.; Lagaron, J.M.; Ocio, M.J. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area *Food Hydrocolloids* 23: 913–921 (2009).
- Flieger, M., Kantorová, M.; Prell, A.; Řezanka T. and Votruba J. Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiologica*; 48(1): 27-44 (2003).
- Focher, B., Beltrame, P. L., Naggi, A., & Torri, G. Alkaline Ndeacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structural modifications. *Carbohydrate Polymers*, 12: 405–408 (1990).
- Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H. In *Dairy Chemistry and Biochemistry*; Blackie Academic & Professional: Dublin, Ireland; p 368 (1998).
- Fraga A.N., Willimas R.J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer*, 26: 113-118 (1985).
- Gällstedt, M., *Films and Composites Based on Chitosan, Wheat Gluten or Whey Proteins-Their packaging related mechanical and barrier properties*, in *Fibre and Polymer Technology*., Technical Royal School, KTH: Stockholm. (2004).
- García M.A., Pinotti A., Martino M.N., Zaritzky N.E. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohyd. Polym.* 56: 339-345 (2004).
- Gennadios A and Weller CL, Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44(10): 63-69 (1990).
- Gennadios A, *Protein-Based films and coatings*, ed by Gennadios A. USA: CRC Press, (2002).
- Gennadios A., *Formation and Properties of Casein Films and Coatings in Protein-Based Films and Coatings*, Ed by Gennadios A., CRC Press, United States. capítulo 7: 181-211 (2002).
- Gennadios, A., Ghorpade, V. M., Weller, C. L. and Hanna, M. A. Heat curing of soy protein films. *Transactions of the ASAE*, 39: 575–579 (1996).
- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L., & Krochta, J. M. Edible coatings and films based on proteins. In J. M. Krochta, E. A. Baldwin, & M. O. N’isperos-Carriedo (Eds.), *Edible*

- coatings and films to improve food quality (pp. 201–277). Lancaster, PA: Technomic Publishing (1994).
- Gerrard JA, Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. *Trends in Food Science Technology*, 13: 391–399 (2002).
- Ghanbarzadeh, B Musavi, M Oromiehie, A.R. Rezayi, K Razmi R, Elhame Milani J Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *LWT*, 40: 1191–1197 (2007).
- Ghanbarzadeh, B.: Oromiehi A.R Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *Journal of Food Engineering*, 90: 517–524 (2009).
- Ghanbarzadeh, B.; Oromiehi, A.R. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 209–215 (2008).
- Gocho, H. Shimizu, H. Tanioka, A. Chou, J.J. Nakajima, T. Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan, *Carbohydr. Polym.* 41: 87–90 (2000).
- Gontard N, Films et enrobages comestibles: Étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten. Montpellier. Tese (Doutorado)— Biochimie, Biologie Cellulaire et Moleculaire— Science des Aliments, Universite' Montpellier II, França. (1991).
- Gontard N., Guilbert S., Cuq J-L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food. Sci.* 57: 190-199 (1992).
- Gontard, N. and S. Ring, Edible Wheat Gluten Film: Influence of Water Content on Glass Transition Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11): 3474-3478 (1996).
- Gontard, N., Duchez, C; Cuq, J-L; Guilbert, S Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29(1):39-50 (1994).
- Gontard, N. Thubault, R.; Cuq, B. & Guilbert, S., Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4): 1064-9 (1996).
- Gontard, N., S. Guilbert, and J.L. Cuq, 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(1993).
- Gounga, M. E.; Xu, S.; Wang, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, 83: 521–530 (2007).
- Grevellec J, Marquie' C, Ferry L, Crespy A, Vialettes V. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomacromolecules*; 2:1104–9 (2001).

- Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P., & Subirade, M. Influence of plasticizers on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products*, 7: 149–157 (1998).
- Guilbert, S., Cuq, B. y Gontard, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 14(6): 741-751 (1997).
- Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A., & Kindstedt, P. S.. Heat induced modifications of the functional properties of sodium caseinate. *International Dairy Journal*, 6: 473–483 (1996).
- Guyomarc'h, F.; Nono, M.; Nicolai, T.; Durand, D., Heat-induced aggregation of whey proteins in the presence of k-casein or sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*; 23: 1103–1110 (2009).
- Hambleton A, Fabra, M-J; Debeaufort F; Dury-Brun C, Voilley A, Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion-based films used for encapsulation of active food compounds. *Journal of Food Engineering*, 93: 80–88 (2009).
- Han, J, Bourgeois S, Lacroix M Protein-based coatings on peanut to minimise oil migration. *Food Chemistry*, 115: 462–468 (2009).
- Harish Prashantha, K.V.; Lakshmanb, K. Shamalab, T.R. Tharanathan R.N. Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films K.V. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56: 115–120 (2005).
- Helbert, W. Cavaillé, J. Y. Dufresne A. Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. Part I: Processing and mechanical behavior. *Polymer Composites*; 17(4): 604-611 (1996).
- Hernández-Muñoz, P. Villalobos, R. Chiralt, A. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions *Food Hydrocolloids* 18 647–654 (2004).
- Hernández-Muñoz, P. y Hernández R.J. Effect of Storage and Hydrophilic Plasticizers on Functional Properties of Wheat Gluten Glutenin Fraction Films. In *Worldpak2002, 13th Proc IAPRI Conf.* (2002).
- Hernández-Muñoz, P., Kanavouras, A., Perry, K. W. N., & Gavara, R. Development and characterization of biodegradable films made from wheat gluten protein fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 7647–7654 (2003).
- Hernández-Muñoz, P., López-Rubio, A., Lagarón, J. M., and Gavara, R., Formaldehyde Cross-Linking of Gliadin Films: Effects on Mechanical and Water Barrier Properties. *Biomacromolecules*, 5 (2): 415-421 (2004).
- Hirano, S., Production and application of chitin and chitosan in japan, in *Chitin and Chitosan*, A. Skjak-Braek, and Saford, Editor., Elsevier Science Publishing Co.: London. p. 37-43 (1989).
- Hoagland, P.D. y Parris, N. Chitosan/Pectin Laminated Films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44(7): 1915-1919 (1996).

- Huang, S.J., Polymer Waste Management - biodegradation, incineration and recycling. *Journal Macromolecular Science - Pure Applied Chemistry*, 32(4): 593-597 (1995).
- ICMSF, 1983. *Microorganismos de los alimentos*. Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 105–280.
- Irissin-Mangata, J.; Bauduin, G.; Boutevin, B.; Gontard, N. New plasticizers for wheat gluten films. *Eur Polym J*, 37: 1533 (2001).
- Jayakrishnan, A., Jameela, S.R., Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*, 17 (5): 471-484, review (1996).
- Jia, D.; Fang Y. and Yao, K. Water vapor barrier and mechanical properties of konjac glucomannan–chitosan–soy protein isolate edible films *Food and Bioproducts Processing* 8: 7–10 (2009).
- Jiang, Y., Li, Y., Jiang, W., Effects of chitosan on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. *LWT* 38: 757–761 (2005).
- Jo, C.; Kang, H.; Lee, N. Y.; Kwon, J. H.; Byun M. W. Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation *Radiation Physics and Chemistry* 72: 745–750 (2005).
- Karbowiak, T.; Gougeon, R. D.; Rigole, S.; Delmotte, L; Debeaufort, F; and Voilley, A Diffusion of small molecules in edible films: Effect of water and interactions between diffusant and biopolymer. *Food Chemistry*, 106: 1340–1349 (2008).
- Karlsson, S. y Albertsson, A.-C. Biodegradable Polymers and Environmental Interaction. *Polymer Engineering and Science*, 38(8): 1251-1253 (1998).
- Kasaai MR. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent– emperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr Polym*, 68: 477–88 (2007).
- Kasaai, M. R., Arul, J., & Charlet, G.. Intrinsic viscosity –Molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38: 2591–2598 (2000).
- Kayserilioglu, B. S.; Bakir, U.; Yilmaz, L.; Akkas, N Drying Temperature and Relative Humidity Effects on Wheat Gluten Film Properties. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51: 964-968 (2003).
- Kean, T. Thanou, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, doi:10.1016/j.addr.2009.09.004 (2009).
- Khan, T.A., Peh, K.K. and Ch'ng, H.S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3(3): 303-311 (2000).
- Khan, T.A., Peh, K.K. and Ch'ng, H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 205-212 (2002).

- Khor, E.; Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials*, 18: 95-103 (1997).
- Kim, C. T.; Kim, C. J.; Cho; Y. J.; Chun, B. Y. *AIChE Ann Meeting Conf AQ2 Proc*, 8877 (2005).
- Kim, K M Weller, C L. Hanna M A. and Gennadios A Heat Curing of Soy Protein Films at Selected Temperatures and Pressures. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35: 140–145 (2002).
- Kirchmeier, O. *Milchwissenschaft (German)*, 17, 408 (1962).
- Kittur, F. S.; Saroja, N.; Habibunnisa; Tharanathan, R. N. Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. *Eur Food Res Technol*, 213: 306-311 (2001).
- Kittur, F.S., Kumar, K.R. y Tharanathan, R.N. Functional packaging properties of chitosan films. *Z. Lebensm Unters Forsch A*, 206: 44-47 (1998).
- Knorr, D., Recovery and Utilization of Chitin and Chitosan in Food Processing Waste Management. *Food Technology*: 114-122 (1991).
- Kobori, T. Matsumoto, A. Sugiyama S. pH-Dependent interaction between sodium caseinate and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 75: 719–723 (2009).
- Kokoszka, S. Debeaufort, F. Lenart, A., Voilley, A. Water vapor permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films *International Dairy Journal* 20: 53–60 (2010).
- Kolodziejska, I.; Piotrowska, B. The water vapor permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, 103: 295-300 (2007).
- Kolodziejska, I.; Piotrowska, B.; Bulge, M.; Tylingo, R. Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatin–chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 65: 404-409 (2006).
- Korn, AH, Fearheller, SH and Filachione, EM, Glutaraldehyde, Nature of the Reagent. *J Mol Biol*, 65: 525-529 (1972).
- Krasavtsev, V., Maslova, G., Degtyareva, E., Bykova, V. and Noudga, L., Study and selection of chitosan characteristics for packaging materials and preservation of fish products. *Advances in Chitin Science*, 5: 543-546 (2002).
- Kristo, E. Koutsoumanis, K. P. Biliaderis C. G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*; 22: 373–386 (2008).
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Zampraka, A. Water vapor barrier and tensile properties of composite caseinate–pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101: 753–764 (2007).

- Krochta, M. y Mulder-Johnston, C.D. Edible & Biodegradable Polymer Films., Department of Food Science and Technology, University of California- Davis. (1997).
- Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppet, S. L., Hanna, M. A., & Weller, C. L. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74: 115–118 (1997).
- Kurita, K., Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59: 117-120 (1997).
- Lacroix, M. Lea, T.C Ouattaraa, B. Yua, H. Letendrea, M. Sabatoc, S.F. Mateescub, M.A. Patterson G. Use of g-irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functionals characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*, 63: 827–832 (2002).
- Lai, H. M., Padua, G. W. Water barrier properties of zein films plasticized with oleic acid. *Cereal Chemistry*, 75(2): 194–198 (1998).
- Lauber, S; Klostermeyer, H. Y Henle, T., Influence of irreversible casein crosslinking on the gel strength of yoghurt, *Czech Journal of Food Sciences* 18:69-71(2000).
- Lazaridou, A.; Biliaderis, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan- starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate polymers*, 48: 179-190 (2002).
- Li F. and Larock R. C., Synthesis, Structure and Properties of New Tung Oil-Styrene-Divinylbenzene Copolymers Prepared by Thermal Polymerization. *Biomacromolecules*, 4: 1018-1025 (2003).
- Li, F. Hanson, M.V. Larock R.C. Soybean oil–divinylbenzene thermosetting polymers: synthesis, structure, properties and their relationship. *Polymer* 42: 1567–1579 (2001).
- Li, J., Revol, J.F. y Marchessault, R.H. Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites. *Journal of Applied Polymer Science*, 65(2): 373-380 (1997).
- Li, Q.; Duna, E. T.; Grandmaison, E. W.; Goosen, M. F. A. Applications and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4): 370-97 (1992).
- Li, X. Xie, H. Lin, J. Xie, W. Ma X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes *Polymer Degradation and Stability* 94: 1–6 (2009).
- Lieske, B.; Konrad, G. Thermal modification of sodium-caseinate. 2. Influence of temperature and pH on nutritive properties. *Milchwissenschaft*, 49: 71–74 (1994).
- Lim, L. T.; Mine, Y.; Tung, M. A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature, and glycerol content. *Journal of Food Science*, 64: 616–622 (1999).
- Lim, L-T Mine, Y. y Tung, M. A. Transglutaminase Cross-Linked Egg White Protein Films: Tensile Properties and Oxygen Permeability. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4022-4029 (1998).

- Longares, A.; Monahan, F. J.; O’Riordan, E. D.; O’Sullivan, M. Physical properties of edible films made from mixtures of sodium caseinate and WPI. *International Dairy Journal*, 15(12): 1255-1260 (2005).
- López-Caballero, M.E. Gómez-Guillén, M.C. Pérez-Mateos, M. Montero P. A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19: 303–311 (2005).
- Lower, E.S., *Polymer from the Sea: Chitin & Chitosan*. Manufacturing Chemist., p. 47. (1984).
- Luyen, D.v. y Rossbach, V. Chitin and chitosan; potential fiber raw materials. *Technical textiles*, 35: 19-20. (1992).
- Mahmoud, R.; Savello, P. A. Mechanical Properties of and Water Vapor Transferability through Whey Protein Films. *Journal of Dairy Science*, 75: 942-946 (1992).
- Makino, Y. y Hirata, T. Modified atmosphere packaging of fresh produce with a biodegradable laminate of chitosan-cellulose and polycaprolactone. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 247-254. (1997).
- Mali S. Sakanaka, L.S.; Yamashita, F. Grossmann M.V.E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect *Carbohydrate Polymers* 60 283–289 (2005).
- Mali, S.; Grossmann, M. V. E.; Garcia, M. A.; Martino, M. N.; Zaritzky, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56: 129-135 (2004).
- Mangavel, C., Barbot, J. Guéguen, J. y Popineau Y. Molecular Determinants of the Influence of Hydrophilic Plasticizers on the Mechanical Properties of Cast Wheat Gluten Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5): 1447-1452 (2003).
- Mao, I.L.; Buttazzoni, L.G. y Aleandri, R. Effects of polymorphic milk protein genes on milk yield and composition traits in Holstein cattle. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Animal Sci.* 42:1-7 (1992).
- Marcovich, N E., Reboredo, M M., Aranguren, M I. Moisture diffusion in polyester - woodflour composites. *Polymer*, 40(26): 7313-7320 (1999).
- Marquié C., Guilbert S., Formation and properties of cottonseed protein films and coatings en Protein-based films and coatings. 1era. Edicion. Editado por A. Gennadios, Ed. CRC ress; 275-304 (2002).
- Marquié C., Tessier A.M., Aymard C., Guilbert S. HPLC Determination of the reactive Lysine content of cottonseed protein films to monitor the extent of cross-linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde and Glyoxal. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 922-926 (1997).
- Martucci JF, Ruseckaite RA, Tensile Properties, Barrier Properties and Biodegradation in Soil of Compression – Molded Gelatin-Starch Dialdehyde Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 112: 2166–2178 (2009).

- Martucci, J.F.; Ruseckaite, R.A., Vázquez, A., Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. *Materials Science and Engineering A*, 435–436: 681–686 (2006).
- Martucci, JF, Relación estructura propiedades en materiales basados en gelatina, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, INTEMA (2008).
- Masaro, L.; Zhu, X. X. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels, and solids. *Progress in Polymer Science*, 24: 731. (1999).
- Mastromatteo, M.; Barbuzzi, G.; Conte, A.; Del Nobile M.A. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*; 10: 222–227 (2009).
- Maté, J.I. and J.M. Krochta, Comparison of Oxygen and Water Vapor Permeabilities of Whey Protein Isolate and beta-Lactoglobulin Edible Films. *J. Agric. Food Chem.*, 44(10): 3001-3004 (1996).
- Mauer LJ, Smith DE, Labuza TP. Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible beta-casein films. *Int Dairy J*; 10:353–8 (2000).
- Mayachiew, P; Devahastin S; Comparative Evaluation of Physical Properties of Edible Chitosan Films Prepared by Different Drying Methods. *Drying Technology*, 26(2): 176– 185 (2008).
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. Sorbitol vs. glycerol plasticized whey protein edible film: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4): 841–845 (1994b).
- McHugh, T. H.; Krochta, J. M. Milk protein-based edible films and coatings. *Food Technology*, 48: 97-103 (1994).
- McHugh, T.H., J.-F. Aujard, and J.M. Krochta, Plasticized Whey Protein Edible Films: Water Vapor Permeability Properties. *Journal of Food Science*, 59(2): 416-419 (1994).
- Mercier, J-C. y Vilotte, J-L. Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci.* 76:3079-3098 (1993).
- Micard, V., Balamri, R., Morel, M.-H. and Guilbert, S., Properties of Chemically and Physically Treated Wheat Gluten Films. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48: 2948-2953 (2000).
- Miller, K. S.; Chiang, M. T.; Krochta, J. M. Heat curing of edible whey protein films. *J Food Sci*, 62: 1189-1193 (1997).
- Monedero, F. M.; Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of calcium and sodium caseinate on physical characteristics of soy protein isolate–lipid films *Journal of Food Engineering* 97: 228–234 (2010).
- Monedero, F. M.; Fabra, M. J.; Talens, P.; Chiralt A. Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films *Journal of Food Engineering* 91: 509–515 (2009).
- Mosiewicki, M. A. Casado, U. Marcovich, N. E. Aranguren, M. I. Polyurethanes from tung oil: polymer characterization and composites, *Polymer Engineering & Science*. ISSN 0032-3888, 49 (4): 685-692 (2009).

- Mossel, D., Moreno García, B., 1985. Microbiología de alimentos. Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 214–272.
- Mouzakis, D. E.; Harmia, T.; Karger-Kocsis, Fracture behavior of discontinuous long glass fiber reinforced injection molded polypropylene. *J. Polym Polym Comp*, 8: 167-175 (2000).
- Mucha M. Pawlak, A. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*, 427: 69–76 (2005).
- Mucha M.; Ludwiczak, S., Kawinska M., Kinetics of water sorption by chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol) *Carbohydrate Polymers* 62: 42–49 (2005).
- Mujica Paz, H. Guillard, V. Reynes, M. Gontard N. Ethylene permeability of wheat gluten film as a function of temperature and relative humidity. *Journal of Membrane Science*; 256: 108–115 (2005).
- Nair, L.S.; Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials *Prog. Polym. Sci.* 32:762–798 (2007).
- Nashed, G.; Rutgers, R. P. G.; Sopade, P. A., The Plasticization effect of glycerol and water on the gelatinization of wheat starch. *Starch*, 55:31 (2003).
- Nelson, L.N. y Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed., New York: Worth Publishers (2000).
- Nuthong, P.; Benjakul, S.; Prodpran, T.; *Int J Bioll Macromols*, 44: 143-148 (2009).
- Olabarrieta I. Strategies to improve the aging, barrier and mechanical properties of chitosan, whey and wheat gluten protein films. Tesis doctoral. Universidad de Estocolmo (2005).
- Olde Damink L.H.H., Dijkstra P.J., van Luyn M.J.A., van Wachem P.B., Nieuwenhuis P., Feijen J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 6: 460-472 (1995).
- Olivas, G.I.; Barbosa-Cánovas G.V. Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical mproperties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT*; 41: 359–366 (2008).
- Orliac O, Rouilly A, Silvestre F, Rigal L Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*, 18: 91-100 (2003).
- Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L., Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*, 43: 5417–5425 (2002).
- Ostrowska-Czubenko, J; Gierszewska-Druzynska, M. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes *Carbohydrate Polymers*, 77: 590–598 (2009).
- Ouattara, B., Simard, R., Piette, G., Be'gin, A., & Holley, R. A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 139–148 (2000).

- Ozdemir, M., Floros, J.D., Optimizaton of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *Journal of food engineering*, 86: 215-224 (2008).
- Park, S., Hettiarachchy, N., Were, L., Degradation behavior of soy protein–wheat gluten films in simulated soil conditions. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3027–3031 (2000).
- Park, S., Daeschel, M., Zhao, Y., Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *J. Food Sci.* 69 (8), M215–M221 (2004).
- Park, S.; Stan, S.D; Daeschel, M.A.; Zhao, Y. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science*, 74(4): 202-207 (2005).
- Partanen, R. Paananen, A.; Forssell, P.; Linder, M. B., Lille., M.; Buchert, J.; Lantto R. Effect of transglutaminase-induced cross-linking of sodium caseinate on the properties of equilibrated interfaces and foams. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, in press (2009).
- Patil, R.D.; Dalev, P.G; Mark, J.E.; Vassileva, E.; Fakirov, S. Biodegradation of chemically modified gelatin films in lake and river waters *J. Appl Polym Sci*, 76, 29 (2000).
- Pawlak, A. Mucha M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, 396: 153–166 (2003).
- Peleg M. An empirical model for the description of moisturesorption curves. *J. Food Sci.*,53: 1216-1219 (1988).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E. Characterization of chitosan/ caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2):1080-1090 (2008).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E. Effect of crosslinking on the properties of sodium caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*. APP-2009-07-2072.R1 (2009).
- Pereda, M.; Aranguren, M. I.; Marcovich, N. E., Water vapor absorption and permeability of films based on chitosan and sodium caseinate. *Journal of Applied Polymer Science*, 111 (6): 2777-2784 (2009).
- Pereda, M.; Racz, I.; Marcovich, N.E. “Development and characterization of partially and/or completely biodegradable polymer films using cellulose” *ARCHIPOL'09. V Simposio Argentino- Chileno De Polímeros*, Los Cocos, Argentina.18-21 Octubre (2009).
- Pérez-Gago, M. B.; Nadaud, P.; Krochta, J. M. Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat- denatured versus native whey protein films *J Food Sci*, 64: 1034-1037 (1999).
- Pérez-Mateos, M. Montero, P. Gómez-Guille M.C. Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends *Food Hydrocolloids* 23: 53–61 (2009).
- Peter, M.G., Applications and Environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of macromolecular Science- Pure Applied Chemistry*, 32(4): 629-640 (1995).

- Peiyin, L., Barth, M. M. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. *Postharvest Biology and Technology*, 14: 51–60 (1998).
- Pillai, C.K.S. Paul, W; Sharma C P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34: 641–678 (2009).
- Pitkowski, A., Durand, D.; Nicolai, T. Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. *Journal of Colloid and Interface Science* 326: 96–102 (2008).
- Pitkowski, A., Nicolai, T., Durand, D. Stability of caseinate solutions in the presence of calcium. *Food Hydrocolloids*; 23: 1164–1168 (2009).
- Pochat-Bohatier C. , Sanchez J., Gontard N. Influence of relative humidity on carbon dioxide sorption in wheat gluten films *Journal of Food Engineering* 77 (2006) 983–991(2006).
- Pogaku, R.; Eng Seng, C; Boonbeng, L; y Kallu, U R Whey Protein Isolate-Starch System- A Critical Review. *International Journal of Food Engineering*; 3 (6), Available at: <http://www.bepress.com/cgi/siteview.cgi/ijfe/vol3/iss6/art1> (2007).
- Pommet M, Morel M-H; Redl A, Guilbert S, Aggregation and degradation of plasticized wheat gluten during thermo-mechanical treatments, as monitored by rheological and biochemical changes. *Polymer*, 45(20): 6853-6860 (2004).
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M.-H., & Guilbert, S.. Study of wheat plasticization with fatty acids. *Polymer*, 44: 115–122 (2003).
- Ponce, A., Fritz, R., Del Valle, C., Roura, S., Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT* 36: 679–684 (2003).
- Ponce A., Roura S., Del Valle C., And Moreira M. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: in vitro and in vivo studies. *postharvest biology and technology* (49): 294-300 (2008).
- Porter, D.; Vollrath, F.; Tian, K.; Chen, X.; Shao, Z. A kinetic model for thermal degradation in polymers with specific application to proteins. *Polymer*, 50: 1814-1818 (2009).
- Pouplin, M., A. Redl, and N. Gontard, Glass Transition of Wheat Gluten Plasticized with Water, Glycerol, or Sorbitol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2): 538-543 (1999).
- Pranoto, Y. Rakshit, S.K. Salokhe, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT*, 38: 859–865 (2005).
- Prodpran T., Benjakul, S.; Artharn A.; Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 605–614 (2007).
- Quezada Gallo, J.-A.; Debeaufort, F.; Callegarin, F.; Voilley, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films *Journal of Membrane Science* 180: 37–46 (2000).

- Ratajska, M. Boryniec S. Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers *Reactive & Functional Polymers* 38: 35–49 (1998).
- Regan, J.O., Mulvihill, D.M., Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate-maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.045 (2009).
- Remuñán-López, C.; Bodmeier, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of controlled release*, 44: 215-225 (1997).
- Remuñán-López, C; Portero, A; Vila-Jato, J L; Alonso, M J. Design and evaluation of chitosan / ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 55: 143–152(1998).
- Rhim J, Gennadios A, Weller CL, Cezeirat C, Hanna MA, Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Industrial Crops Products*; 8: 195– 203 (1998).
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L. And Hanna, M. A. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 4937–4941 (2000).
- Rhim, J.W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C. L. Hanna M. A., Properties of ultraviolet irradiated protein films. *LWT- Food Science and Technology*, 32(3): 129-133 (1999).
- Rhim, J.W.; Ng, P. K. W. Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Critical Rev Food Sci Nutr*, 47(4): 411-433 (2007).
- Rivero, S. García, M.A Pinotti A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90: 531–539 (2009).
- Rodriguez, M.S. Albertengo, L.A. Agullo, E. Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydr. Polym.* 48, 271–276 (2002).
- Rogers, C. E. In *Polymer Permeability*; Comyn, J., Ed.; Elsevier: New York, p 11. (1985).
- Sanches, A. C., Popineau, Y., Mangavel, C., Larre, C., & Gueguen, J. Effect of different plasticizers on the mechanical and surface properties of wheat gliadin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4539–4544 (1998).
- Sangsuwan, J. Rattanapanone, N. Rachtanapun P. Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cantaloupe and pineapple. *Postharvest Biology and Technology* 49: 403–410 (2008).
- Sarasam, A. Madihally S. V. Characterization of chitosan–polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26: 5500–5508 (2005).
- Schou, M.; Longares, A.; Montesinos-Herrero, C.; Monahan, F. J.; O’Riordan, D.; O’Sullivan, M. Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT Food Science and Technology*, 38: 605 (2005).

- Sebastian, F. Stephane, G. Copinet, A. Coma, V. Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains Carbohydr. Polym. 65: 185–193 (2006).
- See S.C.; Zhang, Z.Y. Richardson M.O.W. A study of water absorption characteristics of a novel nano-gelcoat for marine application Progress in Organic Coatings 65: 169–174 (2009).
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. y Jeon, Y.-J. Food Applications of chitin and chitosan. Trends in Food Science & Technology, 10: 37-51 (1999).
- Sharma, V.; Kundu, P.P. Addition polymers from natural oils—A review, Prog. Polym. Sci. 31 : 983–1008 (2006).
- Shaw, N.B.; Monahan, F.J; O’Riordan E.D.; O’Sullivan, M.; Effect of soya oil and glicerol on physical properties of composite WPI films, Journal of Food Engineering, 51: 299-304 (2002).
- Shepherd, R., Reader, S. y Falshaw, A. Chitosan functional properties. Glycoconjugate journal, 14: 535-542 (1997).
- Shu, X.Z. Zhu K.J. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan complex beads for controlled release drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, 201: 51–58(2000).
- Siew, D. C. W., Heilmann, C., Easteal, A. J., y Cooney, R. P. Solution and Film Properties of Sodium Caseinate/Glycerol and Sodium Caseinate/Polyethylene Glycol Edible Coating Systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3432–3440 (1999).
- Silva, RM; Silva, GA; Coutinho OP; Mano, JF; Reis, RL, Preparation and characterization in simulated conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. Journal of Material Science: Materials in Medicine, 15:1105-1112 (2004).
- Sionkowska A Effects of solar radiation on collagen and chitosan films. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 82: 9–15 (2006).
- Sionkowska A, Wisniewski, M; Skopinska, J.; Jenedy, CJ; Wess, TJ, Molecular interactions in collagen and chitosan blends. Biomaterials, 25:795-801 (2004).
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. Food Hydrocolloids, 15: 423–432 (2001).
- Sosa-Herrera, M.G.; Berli, C.L.A.; Martínez-Padilla L.P. Physicochemical and rheological properties of oil-in-water emulsions prepared with sodium caseinate/gellan gum mixtures Food Hydrocolloids 22: 934–942 (2008).
- Sothornvit, R. y J.M. Krochta, Oxygen Permeability and Mechanical Properties of Films from Hydrolyzed Whey Protein. J. Agric. Food Chem, 48(9): 3913-3916 (2000).
- Sothornvit, R. y J.M. Krochta, Plasticizer Effect on Oxygen Permeability of b- Lactoglobulin Films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(12): 6298-6302 (2000).

- Srinivasa, P. C.; Baskaran, R.; Armes, M. N.; Harish Prashanth, K. V.; Tharanathan, R. N. Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *Eur Food Res Technol*, 215: 504-508 (2002).
- Srinivasa, P. C.; Tharanathan, R. N. Chitin/chitosan-safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Rev Int*, 23: 53-72 (2007).
- Srinivasa, P.C. Ramesh, M.N. Tharanathan R.N. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21: 1113–1122 (2007).
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar, K.R, Tharanathan, R.N. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*; 63: 79–85 (2004).
- Srinivasa, P.C., Ravi R., Tharanathan R.N. Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80: 184–189 (2007).
- Sugama, T. Cook M. Poly(itaconic acid)-modified chitosan coatings for mitigating corrosion of aluminum substrates, *Progress in Organic Coatings*, 38: 79–87(2000).
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A., & Coma, V. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3950-3957 (2005).
- Svagan, A. J. Hedenqvist, M. S. Berglund L. Reduced water vapour sorption in cellulose nanocomposites with starch matrix. *Composites Science and Technology* 69: 500–506 (2009).
- Sztuka K. and Kołodziejaska I., The influence of hydrophobic substances on water vapor permeability of fish gelatin films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). *Food Hydrocolloids* 23: 1062-1064 (2009).
- Tanabe, T.; Okitsu, N.; Tachibana A.; Yamauchi, K. Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials*, 23: 817-825 (2002).
- Tang, C. Liu H. Cellulose nanofiber reinforced poly(vinyl alcohol) composite film with high visible light transmittance *Composites: Part A* 39: 1638–1643 (2008).
- Tang, Ch-H; Xiao, M-L; Chen, Z; Yang X-Q; Properties of Cast Films of Vicilin-rich Protein Isolates from Phaseolus Legumes: Influence of Heat Curing DOI: 10.1016/j.lwt.2009.05.020, in press.
- Tharanathan R.N .Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*; 14 71–78 (2003).
- Tomasula, P.M., Parris, N., Yee, W. and Coffin, D.R., Properties of films made from CO₂-Precipitated casein. *J Agric. Food. Chem.*, 46: 4470-4474 (1998).

- Urbanski, J. Handbook of Analysis of Synthetic Polymers and Plastics, Editors J. Urbanski., W. Czerwinski, K. Janicka, F. Majewska, H. Zowall, John Wiley & Sons, Inc., Polonia. **(1977)**.
- Vachon, C.; Yu, H.-L.; Yefsah, R.; Alain, R.; St-Gelais, D.; and Lacroix, M. Mechanical and Structural Properties of Milk Protein Edible Films Cross-Linked by Heating and ζ -Irradiation. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3202-3209 **(2000)**.
- Van Krevelen, D. W. Properties of Polymers, 3rd ed.; Elsevier: Amsterdam; Chapter 20–21 **(1990)**.
- Vanin F.M., Sobral P.J.A., Menegalli F.C., Carvalho R.A. , Habitante A.M.Q.B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloid*, 19: 899-907 **(2005)**.
- Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2): 536-547 **(2009)**.
- Vásconez, M. B. Flores, S. K. Campos, C. A. Alvarado, J. Gerschenson L. N. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings *Food Research International* 42: 762–769 **(2009)**.
- Velde, A. Introduction to Clay Minerals, Chapman & Hall,: London, , pp. 178 **(1992)**.
- Villalobos, R.; Chanona, J.; Hernández, P.; Gutiérrez G. and Chiralt A. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure *Food Hydrocolloids* 19 (1): 53-61 **(2005)**.
- Wang, L.; Auty, M. A.E.; Rau, A.; Kerry, J. F.; Kerry, J. P. Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films, *Journal of Food Engineering* 90: 11–19 **(2009)**.
- Wang, Q., & Padua, G. W. Properties of zein films coated with drying oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3444–3448 **(2005)**.
- Watari T. Wang H., Kuwahara K., Tanaka, K. Kita, H.; Okamoto K.-i. Water vapor sorption and diffusion properties of sulfonated polyimide membranes. *Journal of Membrane Science* 219: 137–147 **(2003)**.
- Wiles, L., Vergano, P. J., Barron, F. H., Bunn, J. M., & Testin, R. F. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *Journal of Food Science*, 65(7): 1175-1179 **(2000)**.
- Wissemann K.W., Jacobson B.S. Pure gelatin microcarriers: synthesis and use in cell attachment and growth of fibroblast and endothelial cells. *In vitro. Cell. Dev. Biol.* 21: 391-401 **(1985)**.
- Weller, C. L.; Gennadios, A.; Saraiva, R. A. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 31: 279- 285 **(1998)**.

- Wong, D. W. S.; Gastineau, F. A.; Gregorski, K. S.; Tillin, S. J.; Pavlath, A. E. Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4): 540-544 (1992).
- Xu, Y. X.; Kim, K. M.; Hanna, M. A.; Nag, D. Chitosan- starch composite film: preparation and characterization. *Industrial crops and products*, 21(2): 185-192 (2005).
- Yang, L.; Paulson A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film *Food Research International* 33: 571-578 (2000).
- Zeeman R.; Cross-linking of Collagen-based Materials. Tesis doctoral, Universidad de Twente, (1998).
- Zhai, M.; Zhao, L.; Kume, T. Study on antibacterial starch/ chitosan blend film formed under the action of irradiation. *Carbohydrate polymers*, 57: 83-88 (2004).
- Zhang, Y Xue, C Xue, Y Gao, R y Zhang X Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate Research*, 340: 1914–1917 (2005).
- Ziani, K; Oses, J; Coma, V; Mate J I. 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: 2159-2165 (2008).
- Zinoviadou, K. G.; Koutsoumanis, K. P.; Biliaderis, C. G. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef *Meat Science* 82: 338–345 (2009).

Índice de figuras

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1.	3
Clasificación de los polímeros biodegradables, en base a su origen y producción	

Capítulo 2

Figura 2.1.1.	22
Estructura química del glutaraldehído.	
Figura 2.1.2.	23
Estructura química del quitosano.	
Figura 2.1.3.	23
Estructura química del glicerol.	
Figura 2.1.4.	23
Estructura química del ácido α -elaeosteárico.	
Figura 2.2.1.	24
Esquema de la técnica de casting.	
Figura 2.2.2.	25
Técnica de reflexión o reflectancia total atenuada (Attenuated Total Reflectance, ATR)	
Figura 2.2.3.	34
Ángulo de contacto de etilenglicol (θ) sobre la superficie de una película de quitosano.	
Figura 2.2.4.	34
Un líquido en una superficie sólida puede tomar una de estas tres formas distintas: a) puede desparramarse formando una película uniforme ($\theta=0^\circ$), b) puede formar un lente convexo con una sección menor que el radio de curvatura ($30^\circ < \theta < 90^\circ$), o c) puede formar una sección mayor que el radio de curvatura ($\theta > 90^\circ$).	
Figura 2.2.5.	35
Esquema de las cápsulas utilizadas para el ensayo de WVP.	

Capítulo 3.

Figura 3.1.	51
Aspecto macroscópico de la película de caseinato.	
Figura 3.2.	53
Micrografías SEM de la superficie. (a) Películas de caseinato con 50% de glicerol (gli/pro=0.5); (b) películas de caseinato sin glicerol.	
Figura 3.3.	53
Micrografías SEM de la sección transversal obtenida por fractura criogénica. (a) Películas de caseinato con 50% de glicerol (gli/pro=0.5); (b) películas de caseinato sin glicerol.	
Figura 3.4.	55
Espectros FTIR del polvo de caseinato y de la película preparada a partir de éste (sin glicerol).	
Figura 3.5.	56
Espectros de FTIR de películas de caseinato. a) Con y sin glicerol, acondicionadas a 50 % HR; b) Acondicionadas a 50 y a 80 % HR, con gli/pro=0.28.	

Figura 3.6.	57
DRX del caseinato de sodio en polvo y de la película obtenida a partir de éste.	
Figura 3.7.	58
Termogramas del caseinato de sodio en polvo y de la película de caseinato con y sin glicerol. (a) Curvas TG; (b) curvas DTG.	
Figura 3.8.	62
Curvas tensión-deformación de películas de caseinato de sodio formuladas con diferentes relaciones gli/pro, acondicionadas a 23 °C y 50% HR.	
Figura 3.9.	65
Micrografías SEM de la superficie de fractura en tracción de películas de caseinato acondicionadas a 50 % HR. a) Con 50 % (gli/pro); b) sin glicerol.	
Figura 3.10.	65
Micrografías SEM de las superficies de fractura en tracción de películas de caseinato de sodio conteniendo glicerol (gli/pro=0.5). (a) Acondicionadas a 50% HR; (b) Acondicionadas a 80% HR.	
Figura 3.11.	66
Isotermas de absorción de humedad de películas de caseinato de sodio con 28% de glicerol, a 23 °C y acondicionadas en ambientes con distinta HR.	
Figura 3.12.	68
Isotermas de absorción de humedad de películas de caseinato de sodio con distinto contenido de glicerol, a 23 °C y 75 % HR. a) Las líneas sólidas representan el ajuste de la ecuación de Peleg (ec. 2.2.9), b) Las líneas sólidas representan el modelo de Fick (ec. 2.2.10).	
Figura 3.13.	74
WVP en función del contenido de glicerol de películas de caseinato de sodio. (■) valores experimentales y (—) curva modelada.	
Capítulo 4.	
Figura 4.1.	85
Equilibrio del glutaraldehído en solución acuosa.	
Figura 4.2.	85
Polimerización del glutaraldehído acuoso en pH alcalino.	
Figura 4.3.	86
Reacción de glutaraldehído polimerizado con aminas primarias.	
Figura 4.4.	88
Fotografías ópticas de películas de caseinato entrecruzadas con diferente contenido de GTA.	
Figura 4.5.	92
Curvas tan δ vs temperatura de películas de caseinato de sodio plastificadas (gli/pro=0.28) y tratadas térmicamente.	
Figura 4.6.	93
Aspecto microscópico de la superficie de las películas de caseinato entrecruzadas con relaciones GTA/Cas de 0.03 (a) y 0.05 (b). Glicerol/proteína=0.28.	
Figura 4.7.	94
Micrografías SEM del espesor de las películas entrecruzadas de caseinato. Superficies de fractura criogénica. a) Cas, b) CasH, c) 3% GTA, d) 5 % GTA.	
Figura 4.8.	96
Espectros FTIR de películas de caseinato de sodio preparadas sin y con GTA (3 %).	
Figura 4.9.	97
Espectros FTIR de películas de caseinato de sodio plastificadas, sin y con	

tratamiento térmico.	
Figura 4.10.	101
Curvas de degradación térmica de películas entrecruzadas térmicamente y con diferentes contenidos de GTA a) Curvas TG, b) curvas DTG.	
Figura 4.11.	103
Isotermas de absorción de humedad para películas de caseinato de sodio entrecruzadas térmicamente y con diferentes contenidos de GTA, a 23 °C y 75 % HR en función del tiempo.	
Capítulo 5.	
Figura 5.1.	113
Exoesqueleto de los camarones.	
Figura 5.2.	114
Estructuras moleculares de la quitina y el quitosano, x e y varían de acuerdo al grado de acetilación (Pawlak y Mucha, 2003).	
Figura 5.3.	118
Aspecto macroscópico de la película de quitosano.	
Figura 5.4.	118
Micrografías SEM de las películas de quitosano plastificadas (gli/Quit= 0.28). (a) Sección transversal (obtenida mediante fractura criogénica); (b) Superficie inferior.	
Figura 5.5.	120
Espectro FTIR de (a) polvo de quitosano; (b) quitosano (región 1300–800 cm^{-1}): (1) Polvo, (2) Película preparada sin glicerol; (3) Película preparada con glicerol (gli/Quit=0.28).	
Figura 5.6.	121
Patrones de DRX del quitosano en polvo y de la película de quitosano con y sin agregado de glicerol.	
Figura 5.7.	124
Termogramas del quitosano en polvo y de la película de quitosano sin y con plastificante (gli/Quit=0.28), (a) curvas TG; (b) curvas DTG.	
Figura 5.8.	127
Curvas tensión-deformación de películas formuladas con diferente contenido de glicerol (% gli/Quit), acondicionadas a 23 °C y a 50% HR. a) Películas de quitosano; b) películas de caseinato.	
Figura 5.9.	129
WVP en función del contenido de glicerol de películas de caseinato de sodio (■) y de quitosano (□) valores experimentales y (—) curva modelada.	
Figura 5.10.	135
Aspecto macroscópico de la película Quit-Cas.	
Figura 5.11.	136
Micrografías SEM de películas quitosano-caseinato con glicerol en diferentes secciones de la muestra a) superficie y b) sección transversal obtenida por cryo-fractura.	
Figura 5.12.	138
Espectros FTIR de a) Películas de caseinato, quitosano y quitosano-caseinato, todas plastificadas con una relación en peso de 28 % glicerol; b) Películas de quitosano- caseinato: teórica, experimental y diferencia (experimental- teórica).	
Figura 5.13.	139
DRX de las películas de Quit, Cas y quitosano-caseinato con glicerol.	
Figura 5.14.	142
Termogramas de películas de Quit, Cas y de Quit-Cas, sin y con el agregado	

de glicerol (gli/quit 28 %). a) Curvas TG; b) Curvas DTG, corridas verticalmente para su mejor visualización.	
Figura 5.15.	144
Curvas tan δ vs temperatura de películas plastificadas de caseinato, quitosano y quitosano-caseinato.	
Figura 5.16.	145
Comportamiento mecánico en tracción de películas de Quit, Cas y Quit-Cas, todas preparadas con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.	
Figura 5.17.	146
Comportamiento mecánico en impacto de películas de Quit, Cas y Quit-Cas, todas preparadas con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.	
Figura 5.18.	149
Isotermas de absorción de humedad de películas de Quit y Quit-Cas a 23 °C y 75 % HR. a) Las líneas sólidas representan el ajuste de la ecuación de Peleg (ec. 2.2.9), b) Las líneas sólidas representan el modelo de Fick (ec. 2.2.10).	
Figura 5.19.	156
Películas de Quit y Quit-Cas almacenadas a 40% HR y temperatura constante (A y B) a 10° C; (C y D) a 20° C; (●) microflora vegetal; (□) microflora de queso y (▲) microflora carne.	
Figura 5.20.	156
Películas de Quit y Quit-Cas almacenadas a 65% HR y temperatura constante (A y B) a 10° C; (C y D) a 20° C; (●) microflora vegetal; (□) microflora de queso y (▲) microflora carne.	
Figura 5.21.	158
Soluciones formadoras de películas de caseinato, quitosano y quitosano/caseinato.	
Figura 5.22.	158
Alimentos de distinta naturaleza recubiertos con películas de caseinato, quitosano y quitosano/caseinato.	
Figura 5.23.	163
Deterioración macroscópica de películas de caseinato plastificadas (gli/pro=0.28) luego de diferentes tiempos de exposición en el medio de biodegradación.	
Figura 5.24.	167
Deterioración macroscópica de películas de Quit y Quit/Cas plastificadas, luego de diferentes tiempos de exposición en el medio de biodegradación.	
Capítulo 6.	
Figura 6.1.	181
Valores de opacidad de películas plastificadas de caseinato-aceite de tung.	
Figura 6.2.	184
Micrografías SEM de películas de caseinato- aceite de tung (0, 5, 10 y 15 % p/p AT/proteína. a) superficie superior, y b) sección transversal.	
Figura 6.3.	186
Microscopías ópticas de películas de caseinato- aceite de tung (0, 5, 10 y 15 % p/p AT/proteína).	
Figura 6.4.	187
Gráficos 3D a partir de AFM de las distintas películas, a un tamaño	

de barrido de $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$. Estas imágenes se eligieron como representativas de cada muestra.

Figura 6.5. 189

Espectros FTIR de: a) AT, película de Cas control y película Cas-AT (15% AT/Pro);
b) Películas de Cas plastificadas con glicerol y modificadas con distintas concentraciones de aceite de tung.

Figura 6.6. 193

Curvas $\tan \delta$ vs temperatura de películas plastificadas de caseinato de sodio con diferentes contenidos de aceite de tung.

Figura 6.7. 194

Patrones de degradación térmica de películas de caseinato- aceite de tung:
a) Curvas TG, b) curvas DTG.

Figura 6.8. 196

Isotermas de absorción de vapor de agua de películas de caseinato- aceite de tung (75% HR, 24°C).

Índice de tablas

Índice de Tablas

Capítulo 3.

Tabla 3.1.	48
Composición en aminoácidos (Nº) y masas molares de las distintas fracciones de caseína. (Gennadios, 2002).	
Tabla 3.2.	59
Parámetros termogravimétricos del caseinato en polvo y de la película del mismo material, con y sin el agregado de glicerol.	
Tabla 3.3.	60
Valores de opacidad de películas de caseinato de sodio con diferentes contenidos de glicerol.	
Tabla 3.4.	62
Propiedades mecánicas en tracción de películas de caseinato de sodio formuladas con diferentes relaciones gli/pro, acondicionadas a 23°C y 50 % HR.	
Tabla 3.5.	64
Propiedades mecánicas de películas de caseinato de sodio plastificadas con glicerol (gli/pro=0.28) y acondicionadas a diferentes % HR ambiente.	
Tabla 3.6.	68
Coeficientes de difusión efectivos y EMC de películas de caseinato acondicionadas en ambientes con distinta HR.	
Tabla 3.7.	69
Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión efectivos (D_{ef}) de películas de caseinato con diferentes contenidos de glicerol.	

Capítulo 4.

Tabla 4.1.	89
Material soluble total (TSM) de películas de caseinato entrecruzadas con GTA.	
Tabla 4.2.	91
Material soluble total (TSM) de películas de caseinato entrecruzadas mediante tratamiento térmico.	
Tabla 4.3.	91
Propiedades mecánicas en tracción de películas de caseinato entrecruzadas mediante tratamiento térmico.	
Tabla 4.4.	94
Ángulo de contacto con etilenglicol, de películas de caseinato de sodio entrecruzadas.	
Tabla 4.5.	98
Opacidad de películas de caseinato de sodio entrecruzadas.	
Tabla 4.6.	99
Parámetros de color de películas de caseinato entrecruzadas.	
Tabla 4.7.	102
Propiedades mecánicas de películas de caseinato con diferente contenido de GTA.	
Tabla 4.8.	104
Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión efectivos (D_{ef}) de películas de caseinato tratadas térmicamente o con diferentes contenidos de GTA. HR: 75%, temperatura: 25°C.	
Tabla 4.9.	105

Permeabilidad al vapor de agua de películas de caseinato de sodio entrecruzadas térmicamente y con diferentes contenidos de GTA (100:64.5 % HR; 25°C).

Capítulo 5.

Tabla 5.1. Índices de cristalinidad del quitosano y de la película sin plastificante.	122
Tabla 5.2. Parámetros termogravimétricos del quitosano en polvo y de la película con y sin glicerol.	125
Tabla 5.3. Valores de opacidad para películas de quitosano y caseinato con diferente contenido de glicerol.	126
Tabla 5.4. Propiedades mecánicas en tracción de películas de quitosano formuladas con diferentes contenidos de glicerol, acondicionadas a 23°C y 50 % HR.	128
Tabla 5.5. Propiedades mecánicas en tracción de películas de quitosano reportadas por otros autores.	128
Tabla 5.6. Parámetros de ajuste de las curvas WVP vs. contenido de glicerol de las películas de caseinato y quitosano.	131
Tabla 5.7. WVP de películas de quitosano (espesor inicial= 0.085 mm), plastificadas (gli/Quit=0.15), expuestas a diferentes gradientes de humedad relativa.	131
Tabla 5.8. Material soluble total (TSM) de películas plastificadas (22% glicerol) de Quit, Cas y Quitosano-Caseinato.	136
Tabla 5.9. Valores de opacidad de películas de quitosano, caseinato y Quit-Cas, con una relación en peso del 28% de glicerol.	140
Tabla 5.10. Parámetros de color de películas de quitosano, caseinato y quitosano/caseinato plastificadas.	140
Tabla 5.11. Parámetros termogravimétricos para películas plastificadas de Quit, Cas y Quit-Cas (con y sin glicerol).	143
Tabla 5.12. Propiedades de tracción de películas de Cas, Quit y Quit-Cas, con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.	146
Tabla 5.13. Propiedades de impacto de películas de Cas, Quit y Quit-Cas, con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.	147
Tabla 5.14. Medida del ángulo de contacto con etilenglicol correspondiente a la superficie de las películas obtenidas.	148
Tabla 5.15. Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión efectivos (D_{ef}) para películas de Cas, Quit y Quit- Cas, con una relación en peso de glicerol (%) del 28.	150

Tabla 5.16.	152
WVP para películas de Quit, Cas y Quit-Cas, a diferentes gradientes de humedad relativa. Todas las muestras con glicerol en una relación en peso del 28 %.	
Tabla 5.17.	154
Actividades antimicrobianas de películas y soluciones formadoras de películas de Cas, Quit y Quit/Cas, contra la microflora de zanahoria, queso cheddar y salame de Milano.	
Tabla 5.18.	159
Recuentos microbianos (log UFC/g) de bacterias, hongos y levaduras sobre distintos alimentos recubiertos con películas de caseinato de sodio aplicadas por inmersión y como envoltura, durante el almacenamiento a 10°C y 65% HR.	
Tabla 5.19.	159
Recuentos microbianos (log UFC/g) de bacterias, hongos y levaduras sobre distintos alimentos recubiertos con películas de quitosano aplicadas por inmersión y como envoltura, durante el almacenamiento a 10°C y 65% HR.	
Tabla 5.20.	159
Recuentos microbianos (log UFC/g) de bacterias, hongos y levaduras sobre distintos alimentos recubiertos con películas de quitosano-caseinato aplicadas por inmersión y como envoltura, durante el almacenamiento a 10°C y 65% HR.	
Tabla 5.21.	164
Pérdida de peso en función del tiempo de degradación durante el entierro en suelo.	
 Capítulo 6.	
Tabla 6.1.	183
Parámetros de color de películas de caseinato-aceite de tung plastificadas (28% gli/pro).	
Tabla 6.2.	188
Parámetros de rugosidad obtenidos de las imágenes de AFM: R_a y R_q (Se analizaron cinco imágenes en cada caso).	
Tabla 6.3.	191
Propiedades mecánicas en tracción de películas de caseinato- aceite de tung.	
Tabla 6.4.	195
Valores de ángulo de contacto de películas de caseinato- aceite de tung.	
Tabla 6.5.	197
Absorción de humedad de películas de caseinato-aceite de tung.	
Tabla 6.6.	198
WVP de películas plastificadas de caseinato de sodio- aceite de tung.	
Tabla 6.7.	199
Propiedades físicas y mecánicas de películas caseinato de sodio- aceite de tung (AT/Pro=0.1), con y sin tratamiento térmico.	