



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
MAR DEL PLATA**
Facultad de Ingeniería



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

“RELACION ESTRUCTURA- PROPIEDADES EN MATERIALES BASADOS EN GELATINA”

Trabajo de tesis presentado por:

Lic. Josefa Fabiana Martucci

Para optar por el grado académico de:
Doctor en Ciencia de los Materiales

Director: **Dra. Roxana A. Ruseckaite**

Co-director: **Dra. Analía Vázquez**

Marzo 2008



RINFI es desarrollado por 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/).



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
MAR DEL PLATA**
Facultad de Ingeniería



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

“RELACION ESTRUCTURA- PROPIEDADES EN MATERIALES BASADOS EN GELATINA”

Trabajo de tesis presentado por:

Lic. Josefa Fabiana Martucci

Para optar por el grado académico de:
Doctor en Ciencia de los Materiales

Director: **Dra. Roxana A. Ruseckaite**

Co-director: **Dra. Analía Vázquez**

Marzo 2008

A mis padres...

Agradecimientos

Esta tesis esta dedicada a mis padres, a quienes agradezco con todo el corazón por su amor, cariño y comprensión. Por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos, ellos lo hicieron posible.

Quiero agradecer especialmente a mi Directora de Tesis, Dra. Roxana Ruseckaite, por haberme dirigido y guiado en la realización de este trabajo y por todo lo que aprendí a su lado. Por brindarme su capacidad y experiencia científica, pero fundamentalmente por su amistad.

A la Dra. Analía Vázquez por su calidez, sus consejos, enseñanzas y ayuda.

A los Profesores Iñaki Mondragón y Alfonso Jiménez por haberme recibido en sus Universidades. Por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo

A la comisión de seguimiento: Dra. Teresita Cuadrado, Dra. Mirta I. Aranguren y Dr. Roberto J.J. Williams, por sus valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo.

A Lore y Marian por su calidez y compañerismo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos durante la realización de los experimentos. Por su presencia incondicional y amistad.

A Vera por las interminables charlas de pasillo, por acompañarme en los momentos difíciles y por supuesto... por los mates!.

A mis compañeros de la División Polímeros por su continuo y afectuoso aliento. Especialmente a Oscar, Zeque y Juano por su permanente predisposición.

A mi familia y amigos, por brindarme su apoyo constante.

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

Y finalmente...

A mi hija, que es el motivo de mi vida, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría.

A mi hermana por confiar en mí, por su presencia incondicional y por acompañarme en todos los momentos importantes.

Y a vos amor, por enseñarme a no perder la fe...

Resumen

La gelatina es un biopolímero que presenta propiedades promisorias para su uso en la fabricación de envases. Tiene la particularidad de generar películas con buenas propiedades de barrera a gases en ambientes secos, es biocompatible y no tóxica. Además proviene de recursos renovables ya que puede obtenerse a partir de residuos o subproductos de la industria alimenticia. Esto último le da una ventaja adicional desde el punto de vista ecológico, respecto de los polímeros tradicionales derivados del petróleo. Sin embargo, sus características fisicoquímicas deben ser mejoradas a fin de obtener materiales competitivos para ser aplicados en el campo del envasado.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un laminado de bajo impacto ambiental basado en películas individuales de gelatina bovina modificadas, con propiedades competitivas frente a las de los laminados basados en polímeros tradicionales. En general las películas laminadas tradicionales se diseñan de forma tal que las capas externas brinden buena resistencia a la humedad y propiedades mecánicas, mientras que la capa interna sea barrera específica a gases.

Se desarrolla y evalúa una formulación destinada a conformar la capa externa del laminado. La resistencia a la humedad y la mejora en la respuesta mecánica de las películas de gelatina se logra mediante entrecruzamiento químico. Éste se lleva a cabo con tres agentes químicos diferentes: glutaraldehído, butildiglicidil éter y almidón dialdehído polimérico, con la adición de 30% de glicerol como plastificante. El entrecruzamiento produce una mejora en las propiedades mecánicas en tracción y en la resistencia a la humedad, siendo la formulación con mejores propiedades la que contiene un 10% de almidón dialdehído polimérico y 30% de glicerol.

Se estudia el efecto de la adición de montmorillonita sódica (Na^+MMt) como nanorefuerzo sobre las propiedades de barrera al oxígeno de las películas gelatina a fin de desarrollar una formulación para la capa interna para el laminado. Se estudia el efecto de la adición de distintos porcentajes de arcilla sobre la gelatina en ausencia de plastificantes. Se analiza la evolución de las morfologías con el contenido de arcilla y la relación entre éstas y las propiedades térmicas, mecánicas y de barrera a la humedad. Los resultados revelan que la formulación con 5% de refuerzo presenta el mejor conjunto de propiedades y se evidencia la necesidad del agregado de plastificantes que mejoren la elongación a la rotura sin detrimento de la resistencia a la humedad.

Se estudia el efecto del agregado de plastificantes polihidroxiados como el sorbitol y glicerol sobre películas reforzadas con 5% de arcilla. El estudio de las propiedades revela que si bien las películas con sorbitol exhiben una mayor resistencia a la humedad y una mejora en la respuesta al impacto, el glicerol resulta más efectivo como plastificante y presenta mejores propiedades de barrera al oxígeno.

Para el diseño del laminado (dos capas externas resistentes a la humedad y una interna de barrera para el oxígeno) se utilizan las formulaciones basadas en gelatina entrecruzada con almidón dialdehído polimérico y plastificada con 30% de glicerol como capas externas y la de gelatina reforzada con 5% de montmorillonita y plastificada con 30% de glicerol, como capa interna. La película laminada obtenida no evidencia delaminación macroscópica ni microscópica, lo que se asigna a la interdifusión de las láminas individuales que incrementa su compatibilidad. La película laminada exhibe una mejora en la resistencia a la humedad, permeabilidad al vapor de agua, de barrera al oxígeno y en la respuesta mecánica, comparado a las láminas individuales de igual espesor. Por lo tanto, el material desarrollado podría ser considerado como un candidato potencial para reemplazar en algunas aplicaciones a los comercialmente disponibles, con la ventaja adicional de provenir de un recurso renovable y biodegradable.

Finalmente, se evalúa el comportamiento biodegradativo del laminado en suelo. Se analiza la pérdida de masa y absorción de agua así como los cambios macroscópicos y microscópicos de las películas individuales y del laminado en función del tiempo de exposición al medio degradativo. Se analiza la biosusceptibilidad al medio de los distintos materiales que conforman el laminado y resulta que el almidón (proveniente de la cadena del agente de entrecruzamiento de la capa externa) y el glicerol son los materiales más sensibles al ataque microbiano. El laminado puede considerarse un material de degradación rápida ya que a partir del octavo día las muestras no pueden ser recuperadas. Esto indica que pese a las modificaciones químicas, la presencia de refuerzos inorgánicos y a las condiciones de procesamiento aplicadas, el laminado desarrollado es aún biodegradable.

Abstract

Ecological concerns have resulted in a renewed interest in natural, renewable resources-based materials. For this reason, proteins has attracted industrial and research attention as potential candidates for replacing at least a fraction of non-biodegradable polymers, mainly in those applications where biodegradability gives added value. Among all proteins, gelatin has been successfully used in many applications due to its well recognized merits including film forming ability, effective barrier properties against gases and aroma, and biodegradability. Moreover, because it can be produced from industrial waste of food processing, it offers an ecological advantage over polymers made from petroleum. However, and in order to produce gelatin-based materials of commercial interest for the food packaging industry, some properties still must be improved. The aim of this thesis was to prepare and evaluate gelatine-based films with modulate properties intended to produce laminate films with competitive performance characteristics to those of existing laminate films, but with the additional benefit of being degradable at the end of film life.

Commercial multilayer films currently comprise a number of layers of different polymers. In most applications, the outer layers consist of water barrier polymers with good mechanical properties and the inner layers consist of materials which offer good gas-barrier properties. Therefore, the transformation from traditional to gelatin-based laminate system required of the formulation of the different layers.

Chemical crosslinking combined to plasticizing was used to produce gelatin based films with improved water resistance and mechanical properties. Gelatin films were crosslinked with low content of glutaraldehyde, 1,4-butanodiol dyglycidyl ether and polymeric starch dialdehyde, and glycerol was added as plasticizer. The extent of the crosslinking reactions was followed by the decrease in the number of free-amino group and the crosslinking density was estimated by calculating the number-average molecular weight of chain segments between two crosslinking points, according to the Flory-Renher equation. Films transparency, water resistance (liquid and vapor), thermal and tensile properties were evaluated for all formulations developed. The best set of properties was obtained for gelatin films crosslinked with 10wt.% of starch dialdehyde and plasticized with 30wt.% of glycerol. Therefore, this film was chosen as the outer layer of the laminate.

Oxygen barrier properties were improved by blending gelatin with sodium montmorillonite in the absence of plasticizers and crosslinking agents. Nanocomposite films were obtained by solution-intercalation method assisted by ultrasound for a wide range of montmorillonite contents (1 to 20wt.%). The produced nanocomposite films were characterized by X ray diffraction (XRD) and morphologies developed were analyzed by atomic force microscopy (AFM). Interactions between matrix and reinforcement were studied by infrared spectroscopy. Tensile and dynamical-mechanical properties were also evaluated. Properties resulted strongly dependent on the nanocomposite structure, as observed by XRD and AFM. The best set of properties, including water vapour permeability and oxygen barrier properties, was obtained for nanocomposites with 5wt.% clay, in agreement with the exfoliated/intercalated morphology. The results also revealed the need of adding plasticizers in order to enhance the elongation at break and to improve impact properties without decreasing water resistance.

The addition of glycerol and sorbitol to nanocomposites reinforced with 5wt.% of clay was therefore studied. Plasticization with sorbitol yielded an improvement in impact response and decreased water vapour permeability. These improvements may be related with the ability of sorbitol to crystallize during aging, which is a drawback for using this plasticizer. On the other hand, nanocomposites plasticized with 30wt.% glycerol showed a reduction in surface hydrophilicity and water vapour permeability, meanwhile the elongation at break was significantly enhanced. Oxygen barrier properties were also improved by comparing to the un-plasticized counterpart. Therefore the gelatin-based film containing 5wt.% of clay and 30wt.% of glycerol was designed as the inner layer of the laminate.

Laminated films were prepared by combining the crosslinked gelatin films as the outer layers and nanocomposite film based on 5wt.% montmorillonite as the inner layer. The laminated film showed improvements in terms of water resistance, water vapor permeability, oxygen barrier and mechanical behaviour compared to the individual components. Laminates neither showed macroscopic nor microscopic delamination, which was attributed to the compatibility between layers due to their similar chemical nature. This avoids the use and cost of compatibilizers and additional adhesive layers. The results showed the potential of crosslinked and reinforced gelatin films as materials for producing laminate materials.

Degradation of laminate and individual films was evaluated by indoor soil burial experiments. Laminated films can be considered a fast degradation material since they can not be recovered after eight days of degradation. Water absorption and weight loss were measured as a function of the degradation time. The weight loss pattern of the laminate was attributed to the low restriction in water absorption imposed by the outer layers which limits the microbial attack. After this period, biodegradation was promoted by the presence of montmorillonite, which serve as support for the attack of the microorganisms.

Therefore, in spite of the chemical modification by crosslinking, the addition of clay as reinforcing agent and the processing conditions, the obtained laminated film remains biodegradable.

INDICE

Capítulo I. Introducción

OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS	1
I.1. INTRODUCCIÓN GENERAL	2
I.1.1 Estabilización de películas de gelatina	6
I.2. PELICULAS MULTICAPA BASADAS EN BIOPOLÍMEROS	11
I.3. HIPOTESIS	13
I.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA TESIS	13
I.5. REFERENCIAS	15

Capítulo II. Materiales y Técnicas Experimentales 21

II.1 MATERIALES	22
II.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES	24
II.2.1. Obtención de las películas de gelatina	24
II.2.2. Determinación del peso molecular promedio	26
II.2.3. Espectrofotometría UV-visible	26
II.2.4. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	28
II.2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	28
II.2.6. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	28
II.2.7. Difracción de Rayos X (DRX)	29
II.2.9. Difracción de Rayos X de bajo ángulo (WADX)	29
II.2.9. Calorimetría Diferencial Dinámica (DSC)	29
II.2.10. Análisis termogravimétrico (TGA)	29
II.2.11. Absorción de agua	31
II.2.12. Absorción de humedad. Ecuación empírica de Peleg. Coeficientes de difusión	32
II.2.13. Determinación del ángulo de contacto	34
II.2.14. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	35
II.2.15. Velocidad de transmisión de oxígeno	37
II.2.16. Ensayos Dinámico-Mecánicos (DMA)	37
II.2.17. Ensayos Mecánicos de Tracción	38
II.2.18. Ensayos Mecánicos de Impacto (IFWI)	38
II.2.19. Degradación en suelo	39
II.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	40
II.3.1. Caracterización de la Gelatina en Polvo y de las Películas obtenidas	40
II.3.2. Caracterización del almidón dialdehído polimérico (SD)	48
II.3.3. Caracterización de la montmorillonita sódica (MMt)	50
II.4. REFERENCIAS	53

Capítulo III. Entrecruzamiento Químico 57

III.1. INTRODUCCION	58
III.2. PREPARACION DE LAS PELÍCULAS	63
III.2.1. Técnica de <i>casting</i>	63
III.2.2. Técnica de moldeo por compresión	66
III.2.3. Aspecto macroscópico de las películas	66
III.3. RESULTADOS Y DISCUSION	68

III.4. CONCLUSIONES PARCIALES	84
III.5. REFERENCIAS	85
Capítulo IV. Refuerzo con Cargas Inorgánicas	89
IV.1. INTRODUCCION	90
IV.2. PREPARACION Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PELICULAS	91
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
IV.4. CONCLUSIONES PARCIALES	111
IV.5. REFERENCIAS	112
Capítulo V. Refuerzo con cargas inorgánicas en presencia de plastificantes	115
V.1. INTRODUCCION	116
V.2. PREPARACION Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PELICULAS	117
V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
V.4. CONCLUSIONES PARCIALES	132
V.5. REFERENCIAS	133
Capítulo VI. Obtención y caracterización de películas multicapa	136
VI.1. INTRODUCCION	137
VI.2. PREPARACION Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PELICULAS	138
VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	141
VI.4. CONCLUSIONES PARCIALES	146
VI.5. REFERENCIAS	147
Capítulo VII. Degradación en suelo	149
VII.1. INTRODUCCION	150
VII.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	153
VII.3. CONCLUSIONES PARCIALES	165
VII.4. REFERENCIAS	166
Capítulo VIII. Conclusiones	168
Referencias integradas	172
Índice de Figuras	182
Índice de Tablas	186

Capítulo I

Introducción

Capítulo I

Introducción

Objetivo General

El objetivo de este trabajo es evaluar el uso potencial de la gelatina en el desarrollo de laminados de bajo impacto ambiental destinados a aplicaciones masivas. Las potencialidades de la gelatina, permiten prever la posibilidad de desarrollar distintos materiales con propiedades moduladas para un fin específico y finalmente combinarlos para la obtención de una película multicapa que presentará propiedades específicas. La Figura I.1 esquematiza el objetivo final del presente trabajo: obtener laminados basados en sistemas biodegradables similares a los tradicionales.

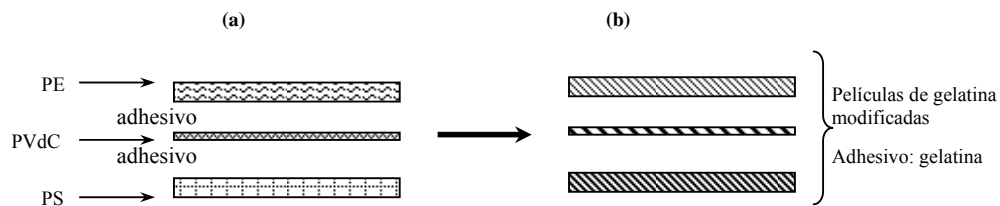


Figura I.1. Esquema de películas multicapa (a) tradicionales (b) biodegradables basados en gelatina

I.1. **Introducción General**

Los polímeros tradicionales han sido desarrollados como materiales durables adaptados a aplicaciones específicas con un balance favorable propiedades/costo. Sin embargo, el amplio uso de estos materiales ha provocado en los últimos años una creciente preocupación sobre cuestiones medioambientales. La mayoría de los polímeros tradicionales utilizados en aplicaciones masivas no son biodegradables y provienen del petróleo. La durabilidad, que ha sido una de las propiedades más deseadas durante la vida útil y aplicación de los polímeros, resulta una desventaja cuando se considera su persistencia en el medioambiente (recalcitrancia) y complica su disposición final ([Davis y Song 2006](#)).

Esta problemática ha impulsado la búsqueda de materiales alternativos compatibles con el medio ambiente, capaces de reemplazar al menos una franja de polímeros tradicionales ([Bigi y col. 1998](#)). El reemplazo de los polímeros sintéticos convencionales por biodegradables para ser utilizados en aplicaciones masivas, puede contribuir a reducir el uso de materiales derivados del petróleo y a disminuir la acumulación de residuos por medio del reciclado biológico ([Amass y col. 1998](#)).

Algunos biopolímeros, tales como polisacáridos y proteínas, han sido introducidos en los últimos años como materiales alternativos en formulaciones de envases ([Arvanitoyannis y col. 1998](#); [Sobral y col. 2001](#); [Mathew y Dufresne 2002](#)). Estos biopolímeros cumplen con los requerimientos deseables de ser procedentes de recursos renovables y por lo tanto, intrínsecamente biodegradables. El uso de estos materiales de bajo costo contribuye a transformar un material de desecho o subproducto en productos de mayor valor agregado.

Si bien en este momento el desarrollo de materiales poliméricos provenientes de recursos renovables está poco favorecido en la competencia económica con los provenientes del petróleo ([Yu y col. 2006](#)) el uso de los desechos del agro es uno de los puntos clave en los cuales se basa la política agroindustrial actual en el mundo. Un ejemplo concreto de un sistema integrado entre la industria, el agro, el cuidado del medioambiente y la economía regional es la biorrefinería de Novamont s.p.a. (Terni, Italia) generada en 2006 que integra el uso de recursos naturales (maíz, aceite vegetal) con la producción de sus bioplásticos Mater-Bi® y Origo-Bi® (www.novamont.com).

Este nuevo concepto de biorrefinería brinda soluciones a varios problemas, tales como la disminución de recursos fósiles y el alza del precio de petróleo; la crisis del sector agrícola y el problema medioambiental generado por la acumulación de residuos plásticos, ya que los bioplásticos producidos son completamente biodegradables y pueden utilizarse como fertilizantes, con limitado impacto ambiental durante su ciclo de vida.

Los biopolímeros pueden provenir de la biomasa, de residuos y subproductos del agro, de residuos de la industria alimenticia (ej. cárnica), etc. Estos pueden clasificarse en tres categorías principales basadas en su origen y producción como se representa en el esquema de la Figura I.2 ([Olabarrieta 2005](#))

- *Categoría 1:* Polímeros extraídos directamente de la naturaleza (biomasa). Ejemplos: polisacáridos (como almidón y celulosa) y proteínas (como gelatina, caseinato y gluten)

- *Categoría 2:* Polímeros producidos por síntesis química utilizando monómeros de fuentes naturales renovables. Un ejemplo es el ácido láctico que se utiliza para la obtención de un biopoliéster. Los monómeros pueden producirse por fermentación de carbohidratos.

- *Categoría 3:* Polímeros producidos por microorganismos o bacterias genéticamente modificadas. Este grupo consiste principalmente de polihidroxicanoatos, pero también se halla en desarrollo la obtención de celulosa bacteriana.

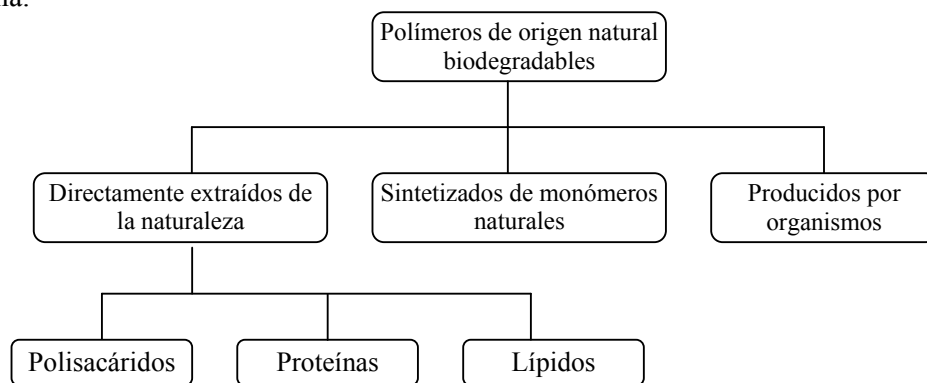


Figura I.2. Clasificación de los biopolímeros

Los biopolímeros más estudiados para la obtención de películas biodegradables son aquellos que se extraen directamente de la biomasa (categoría 1), siendo los más comunes los basados en proteínas, polisacáridos y lípidos ([Jolley 1970](#); [Yannas 1972](#); [Koslov 1983](#); [Fraga y Williams 1985](#); [Arvanitoyannis y col. 1998](#); [Bigi y col. 2001](#), [Chiellini y col. 2001a](#); [Olabarrieta 2005](#); [Gomez-Guillen y col. 2007](#)). El mayor inconveniente que presentan estos biopolímeros es que deben alcanzar los mismos niveles de propiedades mecánicas, térmicas y de barrera para poder competir en el mercado con los polímeros tradicionales ([Chiellini y col. 2001a](#); [Bigi y col. 2001](#); [Gennadios 2002](#)).

Las proteínas se han aplicado desde hace algunos años en la formulación de películas digeribles (edibles) y/o biodegradables para alimentos, solas o mezcladas con otros polímeros de origen natural, tales como almidón ([Arvanitoyannis y col. 1998](#)). Las más utilizadas son las derivadas del gluten ([John y col. 1998](#); [Hernández Muñoz y col. 2004](#); [Tunc y col. 2007](#)), soja ([Rhim y col. 1998](#); [Pu Chen y Zhang 2006](#); [Huang y Netravali 2006](#)), de semillas de algodón ([Grevellec y col. 2001](#)), de semillas de girasol ([Orliac y col. 2002](#)), caseinato ([Audio y Chaufer 2005](#)), beta-lactoglobulinas ([Sothorvit y Krochta 2001](#)), colágeno ([Zeeman 1998](#)) y gelatina de pescado ([Fraga y Williams 1985](#); [Fraga y col. 1988](#); [Arnesen y Gildeberg 2007](#); [Gomez-Guillén y col. 2007](#)) y de mamíferos ([Bigi y col. 1998](#); [Chiellini y col. 2001a](#); [Apostolov y col. 2002](#); [Apostolov y col. 2003](#)).

La gelatina se obtiene por desnaturalización del colágeno (Figura I.3), que es el constituyente principal de los tejidos animales. El proceso de obtención involucra la ruptura de enlaces no-covalentes que provoca el desenrollamiento reversible de la triple hélice del colágeno ([Bigi y col. 1998](#)), liberando la estructura primaria de la gelatina, que se presenta como hebras. Dicho proceso se denomina desnaturalización y puede ocurrir por tratamiento térmico o por degradación química ([Fraga y Williams 1985](#); [Fraga y col. 1988](#); [Bigi y col. 2001](#)). La gelatina obtenida por degradación química, puede ser de dos tipos dependiendo del medio en que se lleve a cabo la desnaturalización. La degradación en medio alcalino produce gelatina de tipo B, mientras que en medio ácido se obtiene la tipo A. La diferencia entre ambas radica en el contenido de grupos ácidos en el polvo de gelatina obtenido ([Zeeman 1998](#); [Informe técnico Rousselot](#)).

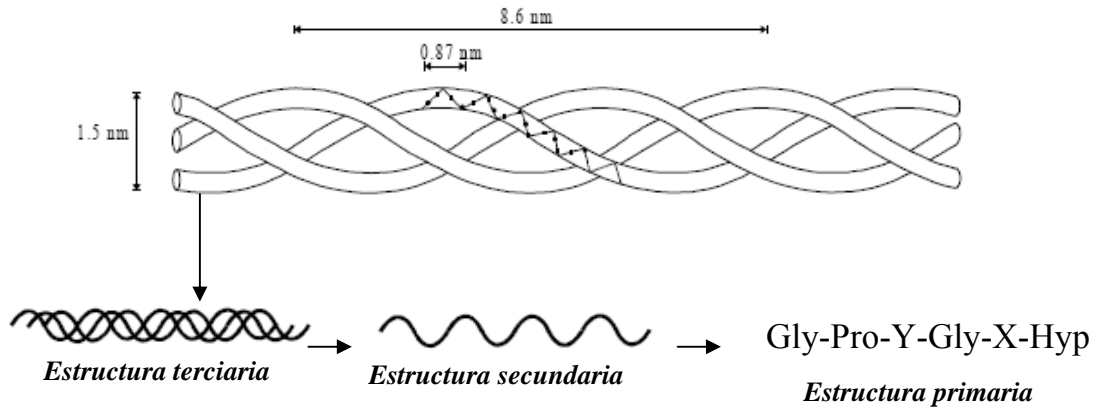


Figura I.3. Esquema de desnaturalización del colágeno ([Zeeman 1998](#))

La estructura primaria de la gelatina está conformada por al menos 18 aminoácidos diferentes y su secuencia completa depende marcadamente del origen de la misma. En general para una gelatina bovina, la composición aminoacídica tipo es la que se detalla en la Figura I.4.

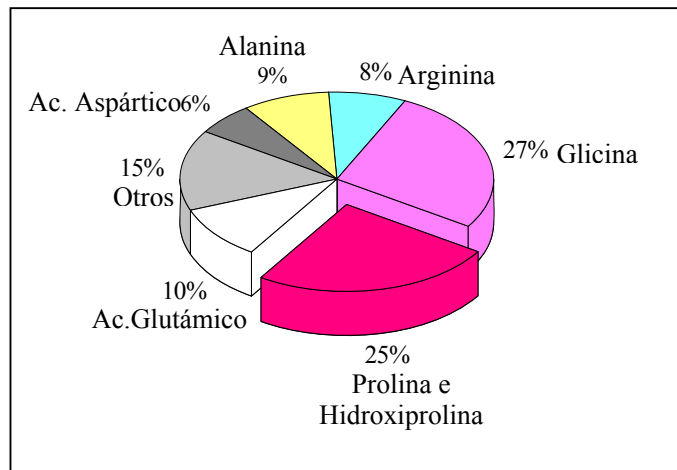


Figura I.4. Composición aminoacídica de la gelatina bovina ([Rousselot informe técnico](#))

El punto isoelectrico (pI) de la gelatina depende del método de obtención: las gelatinas Tipo A presentan un valor en el rango de 7 a 9, mientras que para las tipo B varía entre 4.7 y 5.2 ([Bigi y col. 2001](#); [Informe técnico Rousselot](#)).

Estructuralmente, la gelatina puede describirse como un copolímero en bloque compuesto por triadas de α -aminoácidos, con glicina (Gly) cada tercera posición; y triadas compuestas principalmente por los iminoácidos prolina (Pro) e hidroxiprolina

(Hypro), que también presentan Gly cada tercera posición. Los bloques de aminoácidos se los denomina "blandos" y los de iminoácidos, "rígidos" ([Fraga y Williams 1985](#)). La gelatina se caracteriza por su alta solubilidad en agua caliente, carácter de polianfolito, además de su biodegradabilidad, su bajo costo, atoxicidad y biocompatibilidad ([Arvanitoyannis y col. 1998](#); [Apostolov y col. 2000](#); [Zheng y col. 2002](#)).

Particularmente, la gelatina tiene la capacidad de generar *geles termorreversibles* cuando se encuentra en solución y a temperaturas menores de 30°C ([Koslov 1983](#)). Los mismos surgen por la recombinación de las 3 hebras de aminoácidos en la triple hélice de tipo colágeno. Este entrecruzamiento físico, revierte a temperaturas altas. Esto junto con la baja resistencia a la humedad y pobres propiedades mecánicas, limita el uso de la gelatina en el campo de los materiales, siendo las principales aplicaciones de la gelatina como espesante de alimentos (55%), farmacia (35%) y otros (5%) ([Fraga y Williams 1988](#); [Zeeman 1998](#); [Bigi y col. 2001](#); [Informe técnico Rousselot](#)).

Con el objetivo de obtener materiales estables y con propiedades moduladas, los geles pueden estabilizarse mediante distintas estrategias. La mayoría son pre-tratamientos, es decir que conducen a cambios durante la formación de la película. Otras son post-tratamientos, aplicados sobre la película ya formada.

I.1.1 Estabilización de películas de gelatina

- ***Entrecruzamiento por Radiación Gamma (γ) y ultravioleta (UV)***

Puede ser aplicado como pre-tratamiento sobre la solución formadora de la película o como post-tratamiento sobre la película ya formada; el entrecruzamiento se induce utilizando radiación gamma o ultravioleta ([Zeeman 1998](#); [Sionkowska 2000](#); [Joa y col. 2005](#)).

- ***Tratamiento térmico***

Se aplica sobre la solución, las propiedades de las películas proteicas formadas son muy dependientes del tratamiento térmico al que se someta a solución, como también de la temperatura de secado de las películas ([Jolley 1970](#); [Gennadios 2002](#); [Gontard y col. 1992](#)).

- ***Mezcla con otros polímeros naturales o biodegradables***

Un método utilizado para mejorar las propiedades de las películas relacionadas a su característica hidrofílica consiste en la incorporación de compuestos hidrofóbicos, como lípidos en la solución formadora de la película ([Shellhammer y Krochta 1997](#); [Darder y col. 2003](#); [Saito y col. 2004](#); [Gomez-Guillén y col. 2007](#)).

- ***Entrecruzamiento químico y enzimático***

La presencia de grupos reactivos en la cadena polipeptídica de la proteína, hace posible el entrecruzamiento a través de tratamientos químicos ([Kuijpers y col. 1999](#); [Bigi y col. 2001](#); [Saito y col. 2004](#)) o enzimáticos ([Mahmoud y Savello 1992,1993](#); [Larré y col. 2000](#); [Crescenzi y col. 2002](#); [de Carvalho y Grosso 2004](#)). Este tratamiento puede ser aplicado sobre la solución formadora de la película por adición de algún agente de entrecruzamiento o bien sobre la superficie de la película ya formada ([Zeeman 1998](#)).

Los agentes mas utilizados son: glutaraldehído (GTA) ([Chatterji 1989](#); [Akin y Hasirci 1995](#); [Jayakrishnan y Jameela 1996](#); [Bigi y col. 1998, 2001](#); [Marquie 2001](#); [Charulatha y Rajaram 2003](#)), formaldehído ([Robinson 1964](#); [Fraga y Williams 1985](#); [Honda y col. 1997](#); [Galietta y col. 1998](#); [Marquie 2001](#)), gliceraldehído ([Vandelli y col. 2001](#)), almidón dialdehído ([Schacht y col. 1997](#); [Rhim y col. 1998](#); [Li y col. 2003](#)), genipin ([Bigi y col. 2002](#); [Butler y col. 2003](#)), isocianatos multifuncionales ([Apostolov y col. 2000](#); [Charulatha y col. 2003](#)), compuestos epoxi ([Zemanova y col. 1981](#); [Sung y col. 1996](#); [Zeeman y col. 1999](#); [Patil y col. 2000](#)), compuestos fenólicos ([Wu y col. 2001](#); [Strauss y Gibson 2004](#)) y carbodiimida ([Kuijpers y col. 2000](#)).

El entrecruzamiento químico produce una mejora considerable en las propiedades térmicas y mecánicas, ya que introduce enlaces covalentes estables entre las cadenas de gelatina ([Fraga y Williams 1985](#); [Arvanitoyannis y col. 1998](#); [Bigi y col. 1998, 2001](#); [Chiellini y col. 2001b](#)). Dependiendo del grado de entrecruzamiento y naturaleza de la reacción, los materiales generados pueden requerir de la adición de plastificantes, en concentraciones de hasta 40%p/p; de manera de reducir la fragilidad, mejorar la flexibilidad e incrementar la tenacidad y la resistencia al impacto de las películas obtenidas ([Zeeman y col. 1999](#); [Apostolov y col. 2000](#); [Bigi y col. 2001](#); [Chiellini y col. 2001b](#)). Los agentes de entrecruzamiento, pueden favorecer o inhibir la

renaturalización de la triple hélice, dependiendo de las velocidades relativas de formación de la triple hélice y del proceso de entrecruzamiento ([Koslov 1983](#)). [Watanabe y col. \(1997\)](#) analizaron el efecto del entrecruzamiento sobre la regeneración de la triple hélice por medio de dicroísmo circular (DC) y fluorescencia. Para esto último, estudiaron el medio ambiente cercano a puntos de entrecruzamiento fluorescentes. Los autores determinaron que un bajo grado de entrecruzamiento promueve la regeneración, mientras que un alto grado (80%) restringe o inhibe la regeneración.

- ***Refuerzo con fibras naturales o arcillas***

Actualmente, también se desarrolla la obtención de nanocompuestos, donde el refuerzo que se adiciona a la matriz se halla en escala nanométrica. La ventaja principal que presentan es que la adición de fibras o arcillas naturales permite obtener materiales eco-compatibles, de bajo costo, baja densidad y buenas propiedades térmica, mecánicas, de barrera a gases, incluso mejora la biodegradabilidad para matrices biodegradables, aún para bajos porcentajes de carga (1-5%) ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Zheng y col. 2002](#); [Darder y col. 2003](#); [Ray y Bousmina 2005](#)).

Algunos ejemplos de estos nanorefuerzos son las arcillas ([Zheng y col. 2002](#); [Li y col. 2003](#); [Darder y col. 2005](#)), nanofibras de celulosa ([Matsumura y Glasser 2000](#)), nanotubos de carbono ([Nabeta y Sano 2005](#))

Las nanocargas de origen natural (arcillas, nano *whiskers* de quitina) ya han sido aplicadas en matrices biodegradables como; PLA ([Paul y col. 2005](#)) y PCL ([Lepoittevin y col. 2002](#)); y de origen natural como: almidón ([Park y col 2002](#); [Huang y col. 2004](#); [Pandey y Singh 2005](#)), quitosano ([Darder y col. 2003](#)), proteínas del suero de la leche ([Hedenqvist y col. 2006](#); [Dangaran y Krotcha 2007](#)), proteínas de trigo ([Tunc y col. 2007](#)), proteína de soja ([Lu y col. 2004](#); [Pu Chen y Zhang 2006](#); [Huang y Netravali 2006](#); [Huang y Netravali 2007](#)) y gelatina ([Zheng y col. 2002](#); [Zheng y col. 2003](#)).

La montmorillonita (MMt) es el silicato más utilizado en la obtención de sistemas nanocompuestos de matriz polimérica debido a su alta disponibilidad y su bajo costo. Se trata de una arcilla de tipo esmectita, con una estructura natural en capas, con plaquetas que tienen grosores de 1 nm y longitudes de superficie del orden de 100 - 1.000 nm ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Ray y Okamoto 2003](#); [Ray y Bousmina 2005](#);

[Lingaiah y col. 2005](#)). La MMT pertenece a la familia de los filosilicatos, cuya unidad estructural básica son tetraedros de silicio y oxígeno (SiO)₄⁻⁴. Dichos tetraedros se unen compartiendo tres de sus cuatro oxígenos con otros vecinos formando capas, de extensión infinita y fórmula (Si₂O₅)⁻² (capa tetraédrica), que constituyen la unidad fundamental de los filosilicatos. El silicio tetraédrico puede estar sustituido, en parte, por Al³⁺ o Fe³⁺; estas sustituciones isomórficas dan lugar a cargas libres. Los oxígenos del cuarto vértice del tetraedro (oxígenos apicales), se dirigen perpendicularmente a la capa y forman parte de una capa octaédrica adyacente, formada por octaedros de grupos OH⁻ que se unen compartiendo las aristas. Los cationes de la capa octaédrica son Al³⁺ y Mg²⁺. El plano de unión entre ambas capas está formado por los oxígenos apicales, y por grupos oxhidrilos, (OH)⁻, de la capa octaédrica, de forma que, en este plano, quede un (OH)⁻ en el centro de cada hexágono formado por 6 oxígenos apicales. El resto de los (OH)⁻ son reemplazados por los oxígenos de los tetraedros. Una unión similar ocurre en la superficie opuesta de la capa octaédrica. A la unidad formada por la unión de una capa octaédrica más dos tetraédricas se la denomina lámina y al espacio existente entre dos láminas consecutivas se lo denomina galería (Figura I.5.).

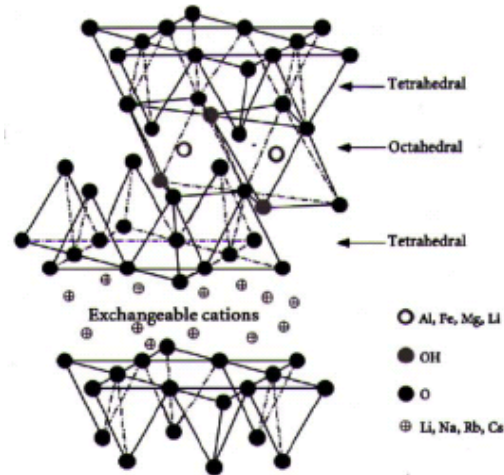


Figura I.5. Estructura de la montmorillonita (MMT)

En las galerías se localizan iones de metales alcalinos que mantienen la neutralidad eléctrica de las arcillas. Las fuerzas que unen las diferentes unidades estructurales son más débiles que las existentes entre los iones de una misma lámina, por ese motivo todos los filosilicatos tienen una clara dirección de exfoliación, paralela

a las láminas ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Ray y Okamoto 2003](#); [Lingaiah y col. 2005](#); [Ray y Bousmina 2005](#)).

Dependiendo de la naturaleza de los componentes utilizados y del método de preparación, tres tipos de compuestos pueden ser obtenidos cuando la arcilla se asocia al polímero: microcompuestos, nanocompuestos intercalados y nanocompuestos exfoliados. En la Figura I.6. se representan esquemáticamente estos tres tipos de materiales. Los nanocompuestos intercalados consisten en la inserción de la matriz polimérica entre las láminas de arcilla manteniendo un orden cristalográfico; mientras que en los nanocompuestos exfoliados las láminas individuales de arcilla son separadas en una matriz polimérica continua, sin presentar orden alguno. Si además la matriz es de origen natural o biodegradable, se pueden denominar bionanocompuestos.

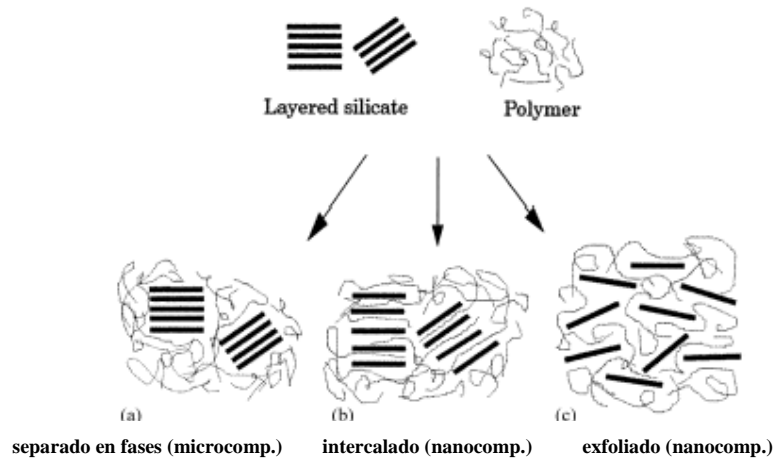


Figura I.6. Esquema de los tres tipos de nanocompuestos: a) aglomerado, b) intercalado, c) exfoliado.

Diferentes estrategias permiten preparar nanocompuestos de matriz polimérica basados en silicatos, siendo las más utilizadas: polimerización in-situ, intercalación en fundido y el método de intercalación en solución ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Zheng y col. 2002](#); [Ray y Bousmina 2005](#)).

I.2. Películas multicapa basadas en biopolímeros

En los últimos años se ha observado un desarrollo acelerado de materiales poliméricos multicapa (laminados) para diversas aplicaciones, especialmente en la industria alimenticia. Las películas multicapa comerciales se componen de 3 a 9 capas de diferentes polímeros: la capa externa suele ser de un material de bajo costo, con buenas propiedades mecánicas y que actúa como barrera al agua como el polietileno (PE) o poliestireno (PS); mientras que las capas internas están constituidas por materiales específicos con propiedades de barrera a gases como el cloruro de polivinilideno (PVdC), el polietilenterftalato (PET) o las poliamidas (PA) (Figura I. 7; [Fang y col. 2005](#)).

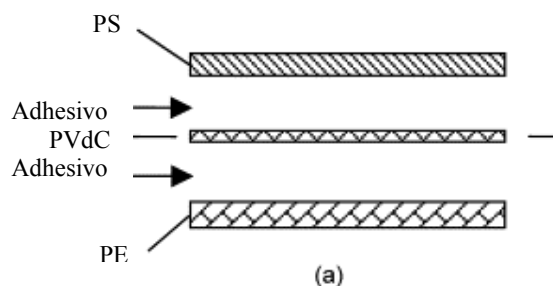


Figura I.7. Esquema de una película multicapa ([Fang y col. 2005](#))

A pesar de que la mayoría de los polímeros con propiedades de barrera son fácilmente asequibles, en general son costosos y no son procedentes de recursos renovables o biodegradables ([Lange y col. 2001](#)). Por lo tanto, es evidente que existe una real demanda de nuevas soluciones para las películas barrera.

En particular, el desarrollo de materiales multicapa basados en películas de biopolímeros se halla muy poco explorado. La información existente combina polímeros como el PE o polipropileno (PP) con biopolímeros como quitosano o pectinas. En general, la superficie del PP debe tratarse previamente (ej. Tratamiento corona) a fin de hacer apta la superficie para combinarla con biopolímeros por inmersión en forma repetida de las películas de PP en soluciones de biopolímeros ([Elsabee y col. 2008](#)). Por su parte, [Fang y col. \(2005\)](#) han propuesto un laminado formado por una capa interna de almidón reforzado con arcilla y dos capas externas de ácido poliláctico (PLA). Lo interesante, es que los autores proponen utilizar la técnica

de coextrusión y el equipamiento preexistente para termoplásticos con mínimas modificaciones. Sin embargo, no se han informado nuevos resultados o estudios respecto de este sistema. [Martin y col. \(2001\)](#) han aplicado la coextrusión a laminados de almidón y distintos poliésteres alifáticos biodegradables y han observado delaminación, sin embargo reconocen una mejora en las propiedades de barrera al vapor de agua.

A pesar de que las películas de proteínas emergen como una alternativa de bajo impacto mediambiental para ser utilizadas como barrera para gases, solo algunos trabajos contemplan el uso de películas de proteínas recubiertas o laminadas. En este campo, los materiales más simples desarrollados son películas comestibles basadas en proteínas recubiertas con ceras o grasas para impartirles resistencia a la humedad ([Weller y col. 1998](#); [Anker y col. 2002](#); [Gällestedt y Hedenqvist 2002](#); [Kristo y col. 2007](#)).

El desarrollo de películas laminadas a partir de proteínas es un poco más reciente. [Rhim y col. \(2006, 2007\)](#) desarrollaron una película basada en aislado de proteína de soja (SPI) como capa interna, laminada con PLA como capa externa. Los laminados (PLA/SPI/PLA) se obtuvieron por *casting* de una solución de SPI sobre una película de PLA obtenida por *casting*, y luego de secado, el laminado se termina con una última capa de PLA por *casting* sobre el bicapa ya obtenida. Los autores indican que estos laminados no sufrieron delaminación debido a que las capas se mantienen firmemente unidas por interacciones de hidrógeno. Esto condujo a materiales con propiedades mecánicas y de barrera superiores a las de películas de SPI control ([Rhim y col. 2006](#)). Otra posibilidad, es la obtención de películas de SPI recubiertas por PLA, simplemente por inmersión de las películas de SPI en una solución concentrada de PLA ([Rhim y col. 2007](#)). Las propiedades de barrera de estas películas recubiertas, resultaron similares a las de acetato de celulosa (CA), usualmente aplicadas en envases de alimentos. [Apostolov y col. \(2002, 2003\)](#) desarrollaron laminados de gelatina, gelatina/almidón y tela de seda con buenas propiedades mecánicas y biodegradables. Sin embargo, no se informan mejoras en la resistencia a la humedad ni en las propiedades de barrera a gases.

El análisis bibliográfico permite inferir que existe la necesidad de desarrollar películas multicapa basadas en recursos renovables, biodegradables y con buenas propiedades mecánicas y de barrera.

I.3. Hipótesis

- Las películas de gelatina pueden estabilizarse mediante entrecruzamiento químico o mediante el agregado de refuerzos en escala nanoscópica
- Es posible desarrollar películas multicapa basadas en gelatina con propiedades mejoradas respecto de las películas individuales estabilizadas en términos de sus propiedades mecánicas, térmicas, de barrera al oxígeno y con mayor resistencia a la humedad.
- Potencialmente, las películas resultantes podrían reemplazar algunos laminados basados en polímeros tradicionales con la ventaja adicional de ser biodegradables.

I.4. Objetivos

El objetivo principal del trabajo de tesis es:

- Evaluar el uso potencial de la gelatina en el desarrollo de películas laminadas con propiedades específicas, de bajo impacto ambiental y destinadas a aplicaciones masivas.

Para esto se abordaran los siguientes objetivos parciales:

- Analizar el efecto del entrecruzamiento químico sobre la estabilización de películas de gelatina utilizando distintos agentes químicos. Se evaluarán las propiedades térmicas, mecánicas y de barrera a la humedad y gases de los materiales obtenidos en presencia y ausencia de plastificantes.

- Evaluar el efecto del agregado de nanocargas sobre la estabilidad y propiedades de las películas de gelatina. Analizar la relación entre las morfologías generadas y las propiedades finales. Evidenciar la presencia de interacciones entre la gelatina y la montmorillonita y su influencia en las propiedades.
- Analizar el efecto del agregado de plastificantes sobre las propiedades de los bionanocompuestos basados en gelatina y montmorillonita. Evaluar las interacciones en este sistema y su influencia sobre las morfologías y propiedades finales.
- Seleccionar las formulaciones que permitan diseñar las distintas capas de un laminado obtenido por moldeo por compresión de capas individuales y evaluar su eficiencia mediante el estudio de sus propiedades de barrera y mecánicas.
- Estudiar la biodegradación en suelo de las películas individuales y del laminado, y analizar el efecto de los distintos tratamientos sobre el comportamiento degradativo.

I.5. Referencias

- Akin H.**, Hasirci N. Preparation and characterization of crosslinked gelatin microspheres. *J. Appl. Polym. Sci.* 58 (1995) 95-100
- Alexandre M.**, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mat. Sci. Eng.* 28 (2000) 1-63
- Amass W.**, Amass A., Tighe B. A. Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradable Studies. *Polym. Int.* 47 (1998) 89-144
- Anker M.**, Berntsen J., Hermansson A-M., Stading M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3 (2002) 81-92
- Apostolov A.A.**, Boneva D., Vassileva E., Mark J.E., Fakirov S. Mechanical properties of native and crosslinked gelatins in a bending deformation. *J. Appl. Polym. Sci.* 76 (2000) 2041-2048
- Apostolov A.A.**, Fakirov S., Evstatiev M., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable Laminates Based on Gelatin, 1. Preparation and Mechanical Properties. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 693-697
- Apostolov A.A.**, Fakirov S., Evstatiev M., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable Laminates Based on Gelatin, 2a. Weathering, Sliding Wear and Abrasion Resistance. *Macromol. Mater. Eng.* 288 (2003) 228-234
- Arnesen J.A.**, Gildeberg A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Biores. Technol.* 98 (2007) 53-57
- Arvanitoyannis I.S.**, Nakayama A., Aiba S. Chitosan and gelatine based edible films; state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr. Polym.* 37 (1998) 371-382
- Arvanitoyannis I.S.** "Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings" en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed., Ed. A. Gennadios; CRC Press, 2002; 275-304
- Audic J-L.**, Chaufer B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 1934-1942
- Avella M.**, de Vlieger J.J., Errico M.M., Fischer S., Vacca P., Volpe M.G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chem.* 93 (2005) 467-474
- Bigi A.**, Bracci B., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials* 19 (1998) 2335-2340
- 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 (2001) 763-768
- Bigi A.**, Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K. Stabilization of gelatine films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 23 (2002) 4827-4832
- Butler M.F.**, Yiu-Faing, Pudney P.D.A. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 41 (2003) 3941-3953
- Charulatha V.**, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials* 24 (2003) 759-767

- Chatterji P.R.** Gelatin with hydrophilic/hydrophobic graft and glutaraldehyde crosslinks. *J. Appl. Polym. Sci.* 37 (1989) 2203-2212
- Joa C.**, Hojin Kang, Lee N.Y., Kwon J.H., Byun M.W. Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. *Radiat. Phys. Chem.* 72 (2005) 745–750
- Chiellini E.**, Cinelli P., Grillo Fernandes , Kenawy El Refaye S., Lazzeri A. Gelatin-based blends and composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. *Biomacromolecules* 2 (2001a) 806-811
- Chiellini E.**, Cinelli P., Corti A., Kenawy El Refaye. Composite films based on waste gelatin: Thermal-mechanical properties and biodegradation testing. *Polym. Degrad. Stabil.* 73 (2001b) 549-555
- Crescenzi V.**, Francescangeli A., Taglienti A. New Gelatin-Based Hydrogels via Enzymatic Networking. *Biomacromolecules* 3 (2002) 1384-1391
- Dangaran K.L.**, Krotcha J.M. Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by plasticiser crystallisation in whey protein films. *Int. J. Food Sci. Technol.* (2007) en prensa
- Darder M.**, Colilla M., Ruiz-Hitzky E. Biopolymer-Clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chem. Mater.* 15 (2003) 3774-3780
- Darder M.**, Colilla M., Ruiz-Hitzky E. Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. *Appl. Clay Sci.* 28 (2005) 199-208
- Davis G.**, Song J.H. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Ind. Crop. Prod.* 23 (2006) 147–161
- de Carvalho R.A.**, Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloid.* 18 (2004) 717-726
- Dufresne A.**, Vignon M.R. Improvement of starch films performances using cellulose microfibrils. *Macromolecules* 31 (1998) 2693-2696
- Elsabee M.Z.**, Abdou E.S., Nagy K.S.A., Eweis M. Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydr. Polym.* 71, 2 (2008) 187-195
- Fang J.M.**, Fowler P.A., Escrig C., Gonzalez R., Costa J.A., Chamudis L. Development of biodegradable laminate films derived from naturally occurring carbohydrate polymers. *Carbohydr. Polym.* 60 (2005) 39-42
- Fraga A.N.**, Willimas R.J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer* 26 (1985) 113-118
- Fraga A.N.**, Williams RJJ, Galak M, Perera H. Gelatin films derived from fish skin. *J. Polym. Mater.* 5 (1988) 49-55
- Galiotta G.**, Di Gioia L., Guilbert S., Cuq B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 3123-3130
- Gällstedt M.**, Tornqvist J., Hedenqvist M.S. Properties of Nitrocellulose-Coated and Polyethylene-Laminated Chitosan and Whey Films. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 39 (2001) 985–992
- Gällstedt M.**, Hedenqvist M.S. Oxygen and water barrier properties of coated whey protein and chitosan films. *J. Polym. Environ.* 10 (2002) 1-4
- Gennadios A.** “Soft gelatine capsules” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed.. Ed. A. Gennadios, CRC Press, 2002; 393-444

- Gómez –Guillen M.C.**, Ihl M., Bifani V., Silva A., Montero P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni Molinae Turcz*). *Food Hydrocolloid*. 21,7 (2007) 1133-1143
- 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 (1992) 190-199
- Grevellec J.I.**, Marquie C., Ferry L., Crespy A., Vialettes V. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomacromolecules* 2 (2001) 1104-1109
- Hedenqvist M.S.**, Backman A., Gällstedt M., Boyd R.H., Gedde U.W. Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 66 (2006) 2350–2359
- 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 (2004) 415-421
- Honda I.**, Arai K., Mitomo H. Characterization of Cross-links introduced in gelatine. *J. Appl. Polym. Sci.* 64 (1997) 1879-1892
- Huang M-F.**, Yu J-G., Ma X-F. Studies on the properties of montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites. *Polymer* 45 (2004) 7017–7023
- Huang X.**, Netravali A. Characterization of flax fiber reinforced soy protein resin based green composites modified with nano-clay particles. *Compos. Sci. Technol.* 67 (2007) 2005-2014
- Huang X.**, Netravali A. Characterization of Nano-clay reinforced phytigel-modified soy protein concentrate resin. *Biomacromolecules* 7 (2006) 2783-2789
- Informe técnico de Rousselot** (Argentina).www.rousselot.com
- Jayakrishnan A.**, Jameela S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* 17 (1996) 471-484
- John J.**, Tang J., Bhattacharya M. Processing of biodegradable blends of wheat gluten and modified polycaprolactone. *Polymer* 39 (1998) 2883-2895
- Jolley J.E.** The Microstructure of photographic gelatine binders. *Photographic Sci. Eng.* 14 (1970) 169-177
- Kaminska A.**, Sionkowska A. The effect of UV radiation on the values of thermal parameters of collagen containing b-carotene. *Polym. Degrad. Stabil.* 65 (1999) 87-90.
- Kampeerappun P.**, Aht-ong D., Pentrakoon D., Srikulkit K. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydr. Polym.* 67 (2007) 155-163
- Kozlov P.V.** The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* 24 (1983) 651-666
- Kristo E.**, Biliaderis C.G., Zampraka A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry* 101 (2007) 753–764
- Kuijpers A.J.**, Engbers G.H.M., Feijen J., De Smedt S.C., Meyvis T.K.L., Demeester J., Krijgsveld J., Zaat S.A.J., Dankert J. Characterization of the Network Structure of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Gels. *Macromolecules* 32 (1999) 3325-3333
- Kuijpers A.J.**, Engbers G.H.M., Krijgsveld J., Zaat S.A.J., Dankert J., Feijen J. Cross-linking and characterisation of gelatine matrices for biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 11-3 (2000) 225-243

- Lange J.**, Stenroos E., Johanson M., Malmström E. Barrier coatings for flexible packaging based on hyperbranched resins. *Polymer* 42 (2001) 7403-7410
- Larré C.**, Desserme C., Barbot J., Gueguen J. Properties of deaminated gluten films enzymatically cross-linked. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5444-5449
- Lepoittevin B.**, Pantoustier N., Devalckenaere M., Alexandre M., Kubies D., Calberg C., Jérôme R., Dubois Ph. Poly(ϵ -caprolactone)/clay nanocomposites by in-situ intercalative polymerization catalyzed by dibutyltin dimethoxide. *Macromolecules* 35 (2002) 8385-8390
- Li P.**, Zheng J.P., Ma Y.L., Yao K.D. Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. II. Swelling behaviour. *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 322-328
- Lingaiah S.**, Shivakumar K.N., Sadler R., Sharpe M. A method of visualization of dispersion of nanoplatelets in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 65 (2005) 2276-2280
- Lu Y.**, Weng L., Zhang L. Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules* 5 (2004) 1046-1051
- Mahmoud R.**, Savello P.A. Mechanical properties of and water vapour transferability through whey protein films. *J. Dairy Sci.* 75 (1992) 942-946
- Mahmoud R.**, Savello P.A. Solubility and hydrolysability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 29-35
- Marquie C.** Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde, and Glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4676-4681
- Martin O.**, Schwach E., Avérous L., Couturier Y. Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Plasticized Wheat Starch. *Starch/Stärke* 53 (2001) 372-380
- Mathew A.P.**, Dufresne A. Plasticized Waxy Maize Starch: Effect Of Polyols And Relative Humidity On Material Properties. *Biomacromolecules* 3 (2002) 1101-1108
- Matsumura H.**, Glasser W.G. Cellulosic nanocomposites. II. Studies by Atomic Force Microscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 78 (2000) 2254-2261
- Nabeta M.**, Sano M. Nanotube foam prepared by gelatin gel as a template. *Langmuir* 21 (2005) 1706-1708
- 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.
- 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 (2002) 5417-5425
- Pandey J.K.**, Singh R.P. Green Nanocomposites from renewable resources: Effect of plasticizer on the structure and material properties of clay-filled starch. *Starch/Stärke* 57 (2005) 8-15
- Park H-M.**, Li X., Jin C., Park C., Cho W., Ha C. Preparation and properties of Biodegradable Thermoplastic Starch/Clay Hybrids. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 553-558
- Patil R.D.**, Mark J.E., Apostolov A., Vassileva E., Fakirov S. Crystallization of water in some crosslinked gelatins. *Eur. Polym. J.* 36 (2000) 1055-1061.
- Paul M-A.**, Delcourt C., Alexandre M., Degée Ph., Monteverde F., Dubois Ph. Polylactide/montmorillonite nanocomposites: Study of the hydrolytic degradation. *Polym. Degrad. Stabil.* 87 (2005) 535-542
- Pu Chen**, Zhang L. Interaction and properties of highly exfoliated soy protein/ Montmorillonite nanocomposites. *Biomacromolecules* 7 (2006) 1700 -1706

- Ray S.S.**, Okamoto M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1539-1641
- Ray S.S.**, Bousmina M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Prog. Mater. Sci.* 50 (2005) 962-1079
- Rhim J-W.**, Gennadios A., Weller C.L., Cezeirat C., Hanna M.A. Soy Protein Isolate-Dialdehyde Starch films. *Ind. Crop. Prod.* 8 (1998) 195-203
- Rhim J-W.**, Mohanty K.A., Singh S.P., Ng P.K.W. Preparation and properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Soy Protein Isolate and Poly(lactide). *Ind.Eng.Chem.Res.* 45 (2006) 3059-3066
- Rhim J-W.**, Lee J.H., Ng P.K.W. Mechanical and barrier properties of biodegradable soy protein isolate-based films coated with polylactic acid. *LWT* 40 (2007) 232-238
- Robinson I.D.** Rate of crosslinking of gelatine in aqueous solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 8 (1964) 1903-1918
- Saito H.**, Taguchi T., Kobayashi H., Kataoka K., Tanaka J., Murabayashi S., Mitamura Y. Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. *Mat. Sci. Eng. - C Bio. S* 24 (2004) 781-785
- Schacht E.**, Bogdanov B., Van Den Bulcke A., De Rooze N. Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde. *React. Funct. Polym.* 33 (1997) 109-116
- Shellhammer T.H.**, Krochta J.M. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *J. Food. Sci.* 62 (1997) 390-394
- Sionkowska A.** Modification of collagen films by ultraviolet irradiation. *Polym. Deg. Stabil.* 68 (2000) 147-151
- Sobral P.J.A.**, Menegalli F.C., Hubinger M.D., Roques M.A. Mechanical, water barrier thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloid.* 15 (2001) 423-432
- Starti B.**, Scandola M. Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly(vinyl alcohol) blends. *Biomaterials* 16 (1995) 785-792
- Sthornvit R.**, Krotcha J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* 50 (2001) 149-155
- Strauss G.**, Gibson S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloid.* 18 (2004) 81-89
- Sung H-W.**, Hsu H-L., Shih C-C., Lin D-S. Cross-linking characteristics of biological tissues with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials* 17 (1996) 1405-1410
- Tunc S.**, Angellier H., Cahyana Y., Chalier P., Gontard N., Gastaldi E. Funtional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *J. Membrane Sci.* 289 (2007) 159-168
- Vandelli M.A.**, Rivasi F., Guerra P., Forni F., Arletti R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 175-184
- Watanabe K.**, Tezuka Y, Ishii T. Configuration between re formed collagen triple helices and artificially introduced cross-links in gelatin gels. *Macromolecules* 30 (1997) 7910 - 7913
- Weller C.L.**, Gennadios A., Saraiva R.A. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 31 (1998) 279-285
- Wu J.**, Chiu S-C., Pearce E.M., Kwei T.K. Effects of Phenolic Compounds on Gelation Behavior of Gelatin Gels. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 39 (2001) 224-231

Yannas I.V. Collagen and gelatin in solid state. *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol. Chem.* 7 (1972) 49-104

Yao C., Liu B., Chang C., Hsu S., Chen Y. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Mater. Chem. Phys.* 83 (2004) 204-208

Yu L., Dean K., Li L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 576-602

Zeeman R. Cross-linking of collagen-based materials. Tesis doctoral, Universidad de Twente, 1998.

Zeeman R., Dijkstra P.J., van Wachem P.B., van Luyn M.J.A., Hendriks M., Cahalan P.T., Feijen J. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials* 20 (1999) 921-931

Zemanová I., Turková J., Capka M., Nakhapetyan L.A., Svec F., Kálal J. Effect of the nature of proteins on their coupling to different epoxide-containing supports. *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 229-232

Zheng J.P., Li P., Ma Y.L., DeYao K. Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposite. I. Preparation and Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189-1194

Zheng J.P., Xi L.F., Zhang H.L., De Yao K. Correlation between reaction environment and intercalation effect in the synthesis of gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. *J. Mater. Sci. Lett.* 22 (2003) 1179-1181

Capítulo II

Materiales y Técnicas

Experimentales

Capítulo II

Materiales y Técnicas Experimentales

En este capítulo se describen los materiales utilizados y su caracterización, así como las técnicas y métodos empleados.

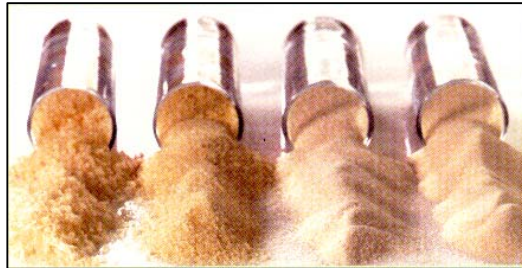


Figura II. 1. Gelatina comercial

II.1. Materiales

Gelatina (Ge) bovina tipo B, número de Bloom 150, pH 5.3, gentilmente provista por Russelot (Buenos Aires, Argentina).

Agentes de entrecruzamiento químico (Figura II.2)

- Solución de Glutaraldehído (GTA) 50%p/v grado analítico (Q.B.S, Buenos Aires, Argentina).
- 1,4-Butildiglicidiléter (BDGE) equivalente epoxy: 114.9 g/mol (Ciba-Geigy, Buenos Aires, Argentina).
- Almidón dialdehído polimérico (SD) (Sigma- Aldrich,USA) .

Carga Inorgánica.

Montmorillonita sódica sin modificar (Na⁺MMt) (nombre comercial: Cloisite Na⁺, Southern Clay Products Inc., Texas, USA), capacidad de intercambio iónico (CEC) 92.6 meq/100 mg de arcilla y un espaciado entre capas de 1.21 nm (determinado por difracción de rayos X sobre el polvo seco) (informe técnico).

Plastificantes (Figura II.2)

- Sorbitol (S) monohidratado, P.A. (Anedra, Buenos Aires, Argentina).
- Glycerol (Gly) (Química DEM, Mar del Plata, Argentina).

Tabla II.1. Propiedades de los agentes de entrecruzamiento y plastificantes utilizados

	PM (g/mol)	Solubilidad H ₂ O 50°C	Teb. (°C)	Tfus. (°C)	Tdeg. (°C)	d (20°C) (g/mL)	eq./g	Fórmula
GTA	100	si	187	-14	---	0.7	0.02	C ₅ H ₈ O ₂
BDGE	202	si	266	---	---	1.1	0.01	C ₁₀ H ₁₈ O ₄
SD	300/5000kDa	no	---	---	170	---	---	----
Glicerol	92	si	290	17.8	---	1.26	---	C ₃ H ₈ O ₃
Sorbitol	182	si	295	110/112	---	---	---	C ₆ H ₁₄ O ₆

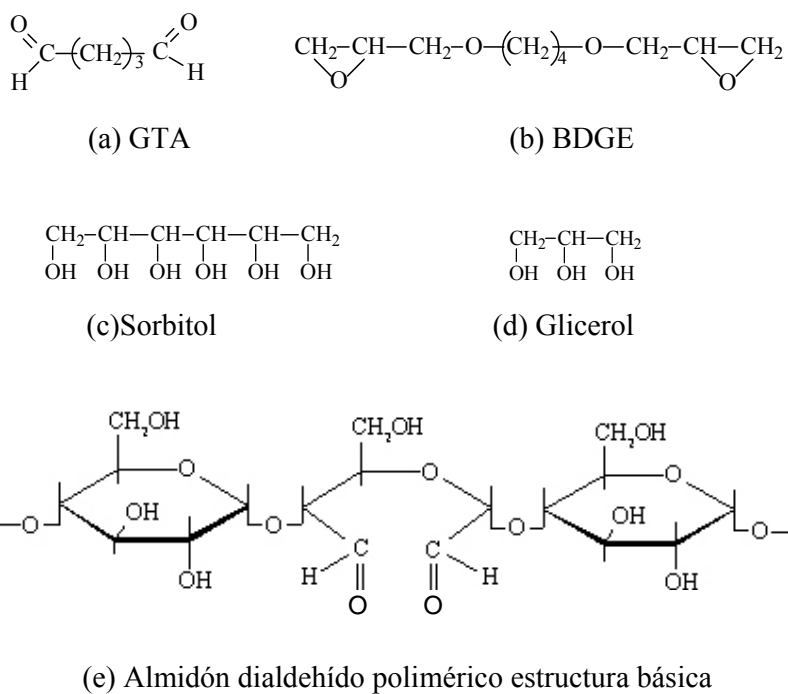


Figura II. 2. Estructuras químicas de reactivos utilizados

Otros reactivos utilizados

- Solución buffer pH 10±0.2, (Anedra, Buenos Aires, Argentina).
- Solución buffer pH 7±0.2 (Anedra, Buenos Aires, Argentina).
- Cloruro de sodio anhidro (NaCl), PA, (Cicareli, Buenos Aires, Argentina).
- Cloruro de potasio anhidro (KCl), PA, (Cicareli, Buenos Aires, Argentina).
- 2,2-dihidroxi-1,3-indaenona (NHN); nombre comercial: Ninhidrina, (Sigma-Aldrich., USA).
- Etilenglicol (Aldrich Co., USA)
- Diiodometano (Aldrich Co., USA)

II.2. Métodos y Técnicas

II.2.1. Obtención de las Películas de Gelatina.

- *Técnica de disolución y evaporación del solvente (casting)*

Esta técnica es la más simple y ampliamente utilizada para la obtención de películas basadas en proteínas ([Jolley 1970](#); [Fraga y Williams 1985](#); [Bigi y col. 1998](#); [Zeeman y col. 1999](#); [Chiellini y col. 2001](#); [Gomez-Guillén y col. 2007](#); [Tunc y col. 2007](#)). En la Figura II.3 se representa esquemáticamente el proceso. En una primera etapa, se prepara una solución homogénea del polímero y se vierte en cajas de petri recubiertas con papel autoadhesivo antiadherente (Teflón ®). Se fijan entonces las condiciones de evaporación del solvente y secado (temperatura, tiempo) que favorecen la consecuente formación de la película. Para el caso de las películas con gelatina, se utilizó agua destilada como solvente y la evaporación se realizó a $T > 30^{\circ}\text{C}$.

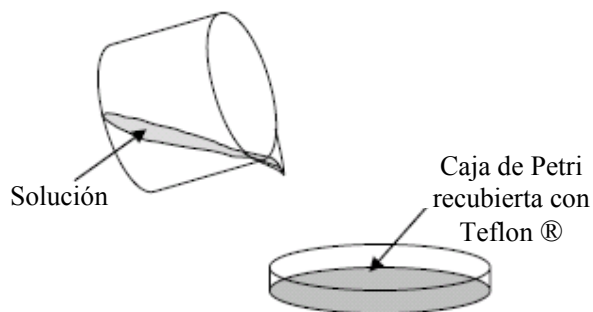


Figura II. 3. Esquema de la obtención de películas de gelatina

Según lo detallado por [Koslov \(1983\)](#), las condiciones utilizadas en el proceso de *casting* tienen marcada influencia en las propiedades finales de las películas de gelatina. El estado conformacional que asumen las moléculas de gelatina queda determinado por parámetros como la temperatura y velocidad de secado, concentración de la solución de gelatina y la presencia de aditivos o agentes de entrecruzamiento. Cuando la evaporación se lleva a cabo a temperatura por debajo de la de la temperatura de renaturalización de la triple hélice (cerca a $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$), las hebras de gelatina tienden a adoptar una estructura helicoidal de tipo colágeno que restringen la movilidad de las macromoléculas ([Kozlov 1983](#); [Achet y He 1995](#)). Por otra parte, en las películas

preparadas por evaporación de solvente a temperaturas superiores, las macromoléculas asumen una conformación de ovillo estadístico sin exhibir ningún tipo de orden y su movilidad aumenta. El efecto de la concentración de gelatina en la solución inicial se encuentra fuertemente relacionado con las condiciones de temperatura utilizadas durante la formación de la película. Cuanto mas cercana sea la temperatura de evaporación a la de la transición ovillo estadístico-renaturalización (*helix - coil*) mayor será la concentración necesaria para obtener un grado de renaturalización considerable ([Kozlov 1983](#)).

Debido a que el grado de renaturalización de la gelatina es muy variable con las condiciones y puede modificarse durante el almacenamiento, se seleccionaron como parámetros de procesamiento temperaturas comprendidas entre 30°C-50°C que restringen la renaturalización de la triple hélice, minimizando la degradación térmica de la gelatina. Esto asegura la obtención de películas amorfas ([Fraga y Williams 1985](#)).

• ***Moldeo por compresión***

Esta técnica permite obtener las películas a partir de la mezcla homogénea de la matriz y los aditivos a incorporar, en ausencia de solvente y por aplicación de presión y temperatura. El proceso se esquematiza en la Figura II. 4.

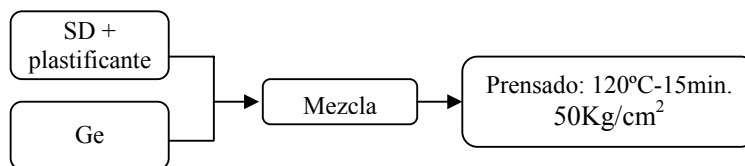


Figura II. 4. Obtención de las películas por moldeo por compresión

La principal ventaja de esta técnica es su posibilidad de aplicación industrial debido a que los tiempos son mas cortos que para *casting* y las condiciones son más controlables y por lo tanto, más reproducibles. El ciclo de presión y temperatura se establece en función de las temperaturas de fusión y degradación (T_m y T_{deg}) de la matriz y los aditivos, y de la temperatura de reacción, en el caso de utilizar agentes de entrecruzamiento.

II.2.2 Determinación del peso molecular promedio

La determinación del número de Bloom permite estimar la masa molar promedio en número de la gelatina mediante una correlación que se indica en la Tabla II.2 (NORMA BS757:195). La determinación consiste en una medida de la fuerza requerida para deprimir un área prescrita de la superficie de un gel de gelatina de 6.67% a 10°C, a una distancia de 4mm.

Tabla II. 2. Relación entre el número de Bloom y la masa molar

Número de Bloom	Masa molar promedio (Da)
50-125	20000-25000
125-225	40000-50000
225-325	50000-100000

II.2.3. Espectrofotometría UV-visible

Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu 1601 PC, en modo transmisión.

Evaluación del porcentaje de entrecruzamiento químico

El porcentaje de grupos aminos involucrados en la reacción de entrecruzamiento se determinó mediante espectrofotometría UV-visible, utilizando la reacción de la ninhidrina (2,2-dihidroxi-1,3-indaenona) con los grupos amino residuales luego del tratamiento con distintos agentes de entrecruzamiento ([Shen y col. 1994](#); [Sun y col. 1996](#)). La ninhidrina (NHN) forma un aducto de color púrpura (púrpura de *Ruhemann*) con la funcionalidad α -amino según la reacción descrita en la Figura II. 5. ([Strayer 1995](#)). La absorbancia de la solución es medida a $\lambda = 570\text{nm}$ (la longitud de onda del color púrpura) y resulta proporcional a la cantidad de grupos amino libres luego de la reacción de entrecruzamiento.

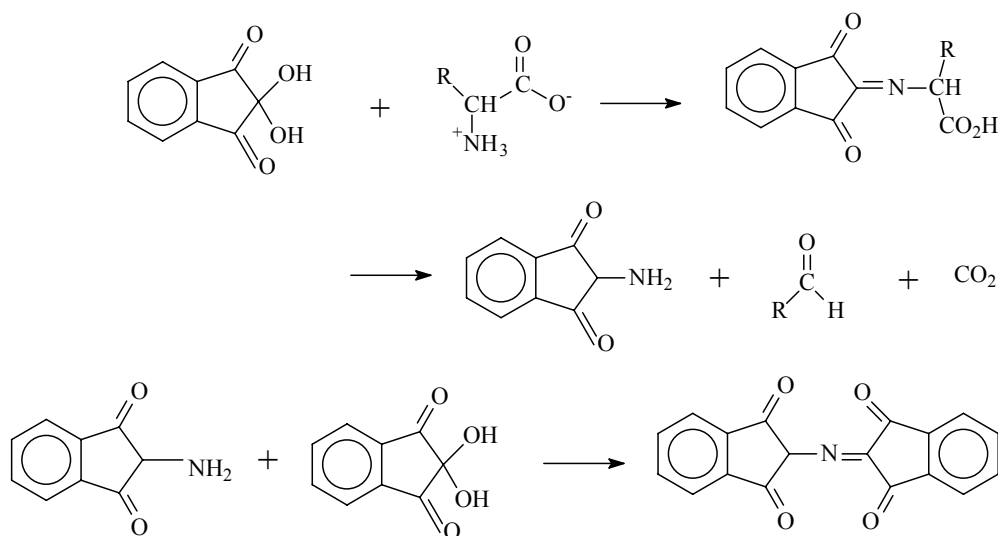


Figura II. 5. Reacción de los grupos amino terminales con NHN, generando un compuesto coloreado que absorbe en el UV-visible ($\lambda_{\text{máx}}$ 570nm)

Las películas se secaron previamente en estufa de vacío a temperatura ambiente hasta alcanzar masa constante. Una masa determinada de muestra (aproximadamente 100 mg) se trató con una solución de NHN al 0.5% en peso y se calentó a ebullición durante 20 minutos. La absorbancia de la solución coloreada resultante se determinó a $\lambda = 570\text{nm}$. El porcentaje de entrecruzamiento se expresa considerando a la película de gelatina sin entrecruzar con un 100% de grupos amino libres, según la siguiente relación:

$$\%AL = \frac{100 * m_{gel} * Ab_m}{m_m * Ab_{gel}} \quad (\text{II.1})$$

donde %AL es el porcentaje de grupos amino libres, m_{gel} es la masa de gelatina, m_m es la masa de muestra, Ab_{gel} y Ab_m son las absorbancias a 570 nm de la gelatina sin entrecruzar y de la muestra entrecruzada, respectivamente.

Determinación de la Opacidad

La opacidad permite evaluar el grado de transparencia de las películas. Consiste en calcular el área bajo una curva de absorción de radiación en el rango 400-800 nm mediante el procedimiento de integración. Las películas de gelatina se cortaron en

forma rectangular y se colocaron en el interior de una celda de cuarzo. La opacidad se expresa en unidades de absorbancia por nanómetros (UA*nm), informando el espesor de las películas ([Gontard y col. 1992](#); [García y col. 2004](#); [Vanin y col. 2005](#))

II.2.4. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier Mattson Genesis II. Las películas fueron ensayadas por la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) o transmisión. Las muestras se analizaron entre 4000 y 400 cm^{-1} . Se empleó un mínimo de 32 barridos.

II.2.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las superficies de las películas (criofracturadas o resultantes de ensayos mecánicos) se evaluaron utilizando un microscopio electrónico Philips 505. La superficie a observar fue recubierta por una fina película de oro.

II.2.6. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Se utilizó un microscopio de fuerza atómica Nanoscope IIIa Multimode™ (Digital Instruments) en el modo “*hard tapping*” (HTM-AFM), a una frecuencia de 1Hz.

Esta técnica se utilizó para examinar la morfología de los materiales compuestos con montmorillonita. Usualmente, las morfologías generadas y la distribución de nanocargas se evalúan mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Sin embargo, en el caso de los compuestos de gelatina, esta técnica no pudo aplicarse debido a que el material se dañaba durante las operaciones de corte con el ultramicrotomo. Por lo tanto, se evaluó la posibilidad de utilizar la AFM como una técnica alternativa que permite la observación directa de la distribución del nanorefuerzo con sólo disponer de una superficie libre de irregularidades o polvo ([Matsumura y Glasser 2000](#); [Yalcin y Cakmak 2004](#))

Las películas de gelatina reforzadas con montmorillonita (Ge/MMt) se sumergieron previamente en nitrógeno líquido a fin de obtener una superficie de fractura frágil, poco rugosa y libre de residuos y polvo. Las fotos obtenidas fueron utilizadas sin ningún tratamiento previo.

II.2.7. Difracción de Rayos X (DRX)

Los ensayos se realizaron en un equipo PHILIPS PW1830/00, provisto de una fuente de Co ($\lambda=0.179$ nm) en el rango de $2\theta = 5$ a 70° y una velocidad de $1^\circ/\text{min}$.

II.2.8. Difracción de Rayos X de bajo ángulo

Esta técnica permite estimar la distancia entre planos cristalinos para distancias mayores a los 2nm. ([Cullity 2001](#)). Los difractogramas se obtuvieron en un equipo PHILIPS PW1700, con una fuente de radiación de Cu ($\lambda = 0.1546\text{nm}$), el rango de $2\theta = 2$ a 20° , con una velocidad de barrido de $2^\circ/\text{min}$.

II.2.9. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se utilizó un calorímetro Perkin Elmer Pyris 1. Los análisis dinámicos se realizaron en atmósfera inerte (N_2) en el rango de temperaturas entre 20 y 250°C a una velocidad de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ y en cápsulas de aluminio selladas. La masa ($5-7$ mg) se determinó antes y después del primer barrido de temperatura a fin de evaluar la pérdida de volátiles.

II.2.10. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se llevó a cabo en una termobalanza Shimadzu TG-DTGA, en un rango de temperaturas comprendido entre temperatura ambiente y 900°C , a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ y bajo atmósfera de nitrógeno o helio ($20\text{mL}/\text{min}$) a fin de preservar las muestras de procesos termooxidativos.

A través de las curvas de degradación térmica, puede calcularse un índice que indica la estabilidad térmica del material. (Menon y col. 1996; Wu y col. 2002). El IPDT (*Integral Procedural Decomposition Temperature*), se calcula de acuerdo al esquema de la Figura II.6 (Menon y col. 1996).

A partir de la curva de degradación y acorde a lo indicado en la Figura II.6, se obtienen las áreas de las distintas zonas (S_1 , S_2 , S_3) mediante integración de la curva.

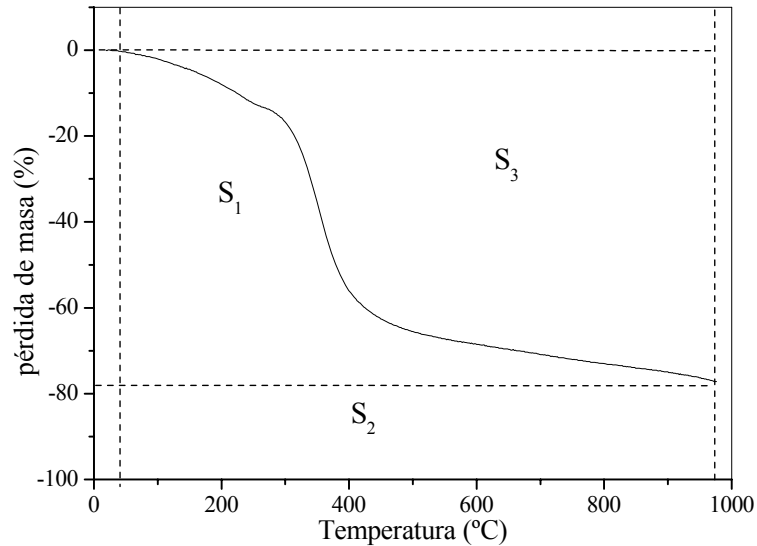


Figura II.6. Curva de degradación térmica, zonas consideradas para el cálculo del IPDT.

Luego, utilizando estos valores se obtiene el IPDT según las ecuaciones II.2, II.3 y II.4.

$$B = \frac{S_1 + S_2}{S_1 + S_2 + S_3} \quad (\text{II.2})$$

$$K = \frac{S_1 + S_2}{S_1} \quad (\text{II.3})$$

$$IPDT = B * K * (T_f - T_0) + T_0 \quad (\text{II.4})$$

Donde T_0 corresponde a la temperatura de inicio del proceso degradativo, que se determina considerando una pérdida de masa del 5%, y T_f la temperatura de finalización.

Puede observarse que un aumento en la temperatura de inicio de la degradación, una disminución en la pendiente o un incremento en el valor del residuo final,

conlleven a un mayor valor de S_1 y/o S_2 y a una disminución en S_3 , ocasionando un incremento en B, K y en el valor de IPDT.

II.2.11. Absorción de Agua

La absorción de agua se determinó gravimétricamente de acuerdo con la norma ASTM D570-81. Las muestras se cortaron en rectángulos de dimensiones $1 \times 3 \times 0.02$ cm^3 , se sumergieron en agua y se extrajeron a tiempos predeterminados. Las muestras húmedas se secaron con papel de filtro para remover el exceso de líquido superficial y luego se pesaron en una balanza analítica. La cantidad de agua absorbida se expresa según:

$$m(\%) = \frac{100 * (m_w - m_d)}{m_d} \quad (\text{II.5})$$

donde m_w y m_d los pesos de la muestra húmeda y seca respectivamente (gramos).

A través del valor de equilibrio de absorción de agua (W_{eq}), y utilizando la expresión de Flory-Rhener modificada ([Flory y Rhener 1943](#); [Bohidar y Jena 1993](#); [Akin y Hasirci 1995](#); [Apostolov y col. 2000](#); [Patil y col. 2000](#)), puede calcularse la masa molar promedio entre puntos de entrecruzamiento (M_c):

$$M_c = \frac{-d * V_1 * \left(V^{1/3} - \frac{2V}{F} \right)}{\chi * V^2 + \ln(1 - V) + V} \quad (\text{II.6})$$

donde χ es el parámetro de interacción polímero-solvente igual a 0.49 para gelatina-agua ([Patil y col. 2000](#)), F es la funcionalidad del agente de entrecruzamiento, d es la densidad del polímero seco, V_1 es el volumen molar del solvente y V es la fracción volumétrica del polímero hinchado, se calcula suponiendo aditividad de los volúmenes específicos de gelatina y agua en las muestras, según:

$$V = \frac{m_d * d_w}{m_w * d - m_d * (d - d_w)} \quad (\text{II.7})$$

siendo d_w la densidad del agua a la temperatura de trabajo.

II.2.12. Absorción de Humedad. Ecuación Empírica de Peleg. Coeficientes de Difusión

Para la determinación de la capacidad de absorción de las películas, se diseñaron cámaras de humedad controlada a través del uso de soluciones salinas saturadas. Se utilizaron recipientes de 6l de capacidad, en los que se incorporó 1l de solución salina saturada. El procedimiento se llevó cabo de acuerdo a la norma ASTM E104-95, que estipula el uso de distintas sales que asegura distintos porcentaje de humedad relativa (%HR): NaCl (75%) y KCl (83%).

Las muestras, previamente acondicionadas en estufa de vacío hasta peso constante, se colocaron en la cámara de humedad controlada, soportadas sobre una malla metálica. A intervalos de tiempo determinados, se retiraron y se pesaron con una precisión de ± 0.1 mg. Todas las determinaciones se realizaron por quintuplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

El contenido de humedad (w_t) como función del tiempo (t) (ec. II.12) se obtuvo a partir del balance de masa total y parcial (H_2O) en función del tiempo:

$$m_0 = m_g + m_p \quad (II.8)$$

$$m_t = m_0 + m_w \quad (II.9)$$

$$w_0 * m_0 = m_G * w_G + m_P * w_P \quad (II.10)$$

$$w_t * m_t = m_0 * w_0 + m_w * 100\% \quad (II.11)$$

$$w_t = \frac{m_0 * w_0 + (m_t - m_0) * 100\%}{m_t} \quad (II.12)$$

donde m_G y m_P corresponden a la masa de gelatina y de plastificante en la película respectivamente expresados en gramos; m_w es la masa de agua ganada con el tiempo, m_0 es la masa inicial de la película en gramos y m_t es la masa de la película en función del tiempo (t). w_G , w_P y w_0 son los contenidos de humedad iniciales en la gelatina, en el plastificante y en la película respectivamente y w_t es el contenido de humedad del sistema en función del t , expresados en %masa. El valor de w_0 se determina a través de

análisis termogravimétrico de las películas acondicionadas en estufa de vacío hasta peso constante.

Ajuste de la absorción de agua: Ecuación empírica de Peleg

La ecuación de Peleg ([Peleg 1988](#)) relaciona el contenido de humedad del sistema en función del tiempo (w_t) con el contenido inicial (w_0) según la siguiente ecuación:

$$w_t = w_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (\text{II.13})$$

donde K_1 es la constante de velocidad de Peleg (min/(%masa agua/ sólido)) y K_2 es la constante de capacidad de Peleg (1/%masa agua/sólido). K_1 es una constante relacionada a la transferencia de masa; cuanto mayor es su valor, menor velocidad de absorción inicial. Por otra parte, K_2 es una constante vinculada con la capacidad máxima de absorción de agua, una disminución en K_2 indica una mayor capacidad de absorción ([Peleg 1988](#)).

Cuando el tiempo tiende a infinito, puede obtenerse el contenido de humedad en el equilibrio como una función de K_2 únicamente ([Peleg 1988](#)).

$$w_E = \lim w_t = w_0 + \frac{1}{K_2} \quad (\text{II.14})$$

Cálculo del Coeficiente de Difusión Aparente

Utilizando los valores de absorción de humedad puede determinarse el coeficiente de difusión aparente de las películas (D_{app}), a partir de la expresión:

$$\frac{m_t - m_0}{m_\infty - m_0} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 * \pi^2} \exp\left(\frac{-D_{app} * (2n+1)^2 * \pi^2 * t}{e^2}\right) \quad (\text{II.15})$$

donde m_0 , m_t y m_∞ son las masas iniciales, en el tiempo y en el equilibrio de las películas y e es el espesor de la película. Para tiempos cortos la ecuación II.15 se reduce a:

$$\frac{m_t - m_0}{m_\infty - m_0} = \left(\frac{D_{app} * t}{\pi * e^2}\right)^{1/2} \quad (\text{II.16})$$

Si $\frac{m_t - m_0}{m_\infty} < 0.5$, el error en usar la ecuación II.16 en lugar de la II.15 para determinar el coeficiente de difusión es del orden del 0.1% ([Dufresne y col. 1999](#); [Anglès y Dufresne 2000](#)).

II.2.13. Determinación del Ángulo de Contacto

La polaridad de la superficie de las películas se evaluó a partir de la determinación de la tensión superficial utilizando el método del ángulo de contacto, que resulta una de las aproximaciones más ampliamente aplicadas. Este método se basa en el hecho de que cuando una gota de líquido se deposita sobre la superficie de un sólido y alcanza el equilibrio, se forma un ángulo θ con la superficie denominado ángulo de contacto (Figura II.7.).

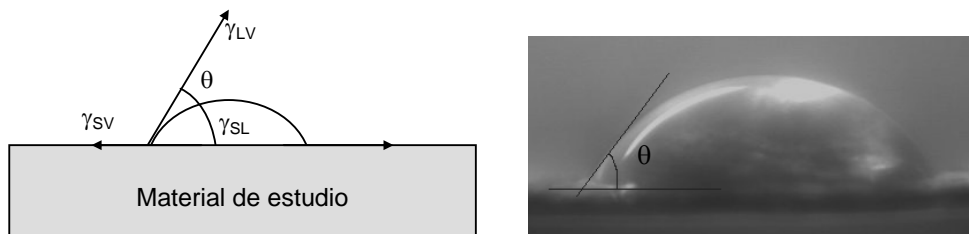


Figura II. 7. Determinación del ángulo de contacto

El cálculo de la tensión superficial se basa en la relación conocida como ecuación de Young (II.17). En principio, el ángulo de contacto de una gota de líquido sobre una superficie queda determinada por el equilibrio mecánico bajo la acción de tres tensiones interfaciales; líquido-vapor, γ_{LV} , sólido-vapor, γ_{SV} , y sólido-líquido, γ_{SL} ([Shimizu y Demarquete 2000](#)) de acuerdo con:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cdot \cos \theta \quad (II.17)$$

donde θ es el ángulo de contacto de Young. Las únicas variables de la ecuación de Young (II.17) que pueden medirse son γ_{LV} y θ . Para obtener γ_{SV} y γ_{SL} se propone que la energía intermolecular entre dos materiales es la suma de las contribuciones de dos componentes: el dispersivo y el polar. Dado que la tensión superficial es proporcional a la energía intermolecular, γ_s puede considerarse como la suma de los componentes dispersivo γ^d y polar γ^p .

Aplicando la ecuación geométrica puede determinarse la tensión interfacial entre un líquido y un sólido:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_{LV} - 2 \cdot \left[(\gamma_{LV}^d \cdot \gamma_S^d)^{1/2} + (\gamma_{LV}^p \cdot \gamma_S^p)^{1/2} \right] \quad (II.18)$$

Combinando las ecuaciones (II.17) y (II.18) se llega a:

$$\gamma_{LV} \cdot (1 + \cos \theta) = 2 \cdot \left[(\gamma_{LV}^d \cdot \gamma_S^d)^{1/2} + (\gamma_{LV}^p \cdot \gamma_S^p)^{1/2} \right] \quad (II.19)$$

Determinando el ángulo de contacto para dos líquidos de γ^d y γ^p conocidos, es posible resolver la ecuación II.19 y determinar los valores de γ_S^d y γ_S^p para el sólido.

La polaridad de la superficie se obtiene a través de:

$$x_p = \frac{\gamma_S^p}{\gamma_S} * 100 \quad (\%) \quad (II.20)$$

Para la obtención de los valores de ángulo de contacto, se depositan gotas de dos solventes de distinta polaridad (etilenglicol y diiodometano, Aldrich Co.) sobre la superficie de las películas a analizar mediante el uso de una micropipeta (volumen de gota: 0.5 μ L.). Luego de un período de tiempo en el cual el sistema llega al equilibrio (4 minutos aproximadamente) se toma una fotografía, que luego permitirá calcular el ángulo de contacto mediante *Microsoft Photoeditor Software*. Los ensayos se realizaron por sextuplicado.

En la Tabla II.3 se muestran los componentes polares y dispersivos de los líquidos utilizados para determinar el ángulo de contacto.

Tabla II. 3. Tensión superficial de los líquidos de referencia

Líquido	γ^d	γ^p	γ
Etilenglicol	30.1	17.6	47.7
Diiodometano	50.8	0.0	50.8

II.2.14. Permeabilidad al Vapor de Agua (WVP)

Los valores de permeabilidad al vapor de agua se determinaron utilizando el método del desecante, siguiendo la norma ASTM E96-95. Las películas se colocaron en la cámara de humedad controlada por un período de tres días hasta alcanzar el

equilibrio. Luego de este período, las películas equilibradas se fijaron sobre cápsulas especialmente diseñadas siguiendo las especificaciones de la norma ASTM mencionada previamente. La Figura II.8 presenta un esquema de las cápsulas utilizadas.

En cada cápsula se coloca el desecante (CaCl_2) de modo de cubrir toda la superficie y dejando un espacio vacío de 0.5cm. Las películas con un diámetro de 5.0 cm se colocaron sobre las cápsulas de ensayo, sellando con grasa de siliconas todas las uniones del sistema, a fin de prevenir pérdidas de estanqueidad. Todas las películas se dispusieron orientando la cara generada durante el secado sobre la cápsula de Petri hacia el lado de menor humedad. El espesor de cada película se determinó como un promedio de cinco medidas realizadas con micrómetro.

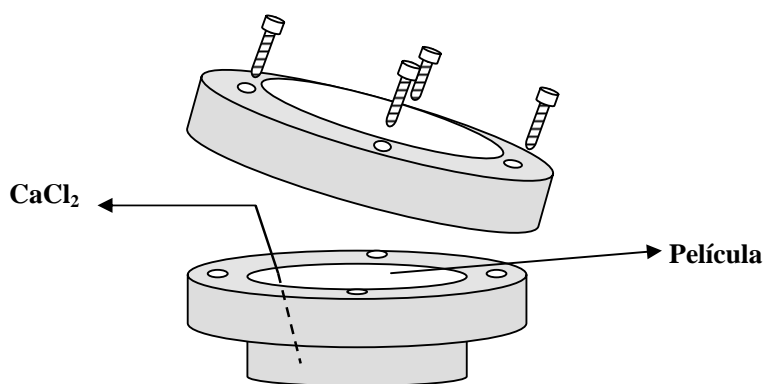


Figura II. 8. Cápsulas diseñadas para la determinación de WVP

Luego todo el sistema se colocó en una cámara de humedad y temperatura controladas, con 65% HR y temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. El incremento de masa se evaluó cada hora, hasta obtener entre seis y siete mediciones. Estos valores experimentales se representaron como la variación de la masa Δm (g) vs. t (h), de la pendiente se obtiene la velocidad de permeación del vapor de agua a través de la película acorde lo indicado por la norma ASTM E96-95. Para cada muestra se realizó por sextuplicado.

La transmisión del vapor de agua se calcula como:

$$WVT = \frac{f}{A} \quad (\text{g/h.cm}^2) \quad (\text{II.21})$$

donde f es la velocidad de transmisión (g/h) y A es el área de la superficie de la película expuesta al vapor de agua o permeante (cm^2). Luego, la permeabilidad se calcula como:

$$WVP = \frac{WVT * e}{S * (RH_1 - RH_2)} \quad (\text{g/Pa.h.cm}) \quad (\text{II.22})$$

donde e es el espesor de la película (cm), S es la presión de vapor de agua pura a la temperatura de ensayo (Pa) y $(RH_1 - RH_2)$ es el gradiente de humedad relativo utilizado en el ensayo.

II.2.15. Velocidad de Transmisión de Oxígeno (OTR)

La permeación del oxígeno a través de las películas fue determinada utilizando un Permeation Analyser Systech Instruments-Model 8500. El equipo monitorea la cantidad de oxígeno que atraviesa la película por unidad de tiempo y área hasta alcanzar un estado estacionario y funciona conforme a la norma ASTM3985. Este dato es informado como un flujo de transmisión de oxígeno (OT (cm³/m².día)).

El coeficiente de permeabilidad de las películas puede obtenerse utilizando el valor de flujo de transmisión de oxígeno en estado estacionario (OT_∞), según:

$$PO = \frac{OT_{\infty} * e}{\Delta P} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{día} \cdot \text{Pa}) \quad (\text{II.23})$$

donde e es el espesor de la película y ΔP el gradiente de presión parcial a través de la película polimérica. Dado que ΔP se mantiene constante para todos los experimentos, el coeficiente de permeabilidad es proporcional al flujo de permeante y a Q (cm³.m/m².día), con $Q = OT_{\infty} * e$ ([Valente y col. 2007](#)).

II.2.16. Ensayos Dinámico-mecánicos (DMA)

El comportamiento dinámico-mecánico de las películas se analizó utilizando un analizador dinámico mecánico Perkin Elmer (DMA7). Los ensayos dinámicos se llevaron a cabo en el modo de flexión sobre probetas de 13x4 con un espesor de 0.2mm, siendo la relación de tensiones dinámica/ estática optima de 1.2.

II.2.17. Ensayos Mecánicos de Tracción

Los ensayos de tracción se llevaron a cabo en una Máquina de Universal de ensayos Instron modelo 8501. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, a una velocidad de 3mm/min.

La tensión de rotura (σ_b), la elongación a la rotura (ϵ_b) y el módulo elástico (E) se calcularon acorde a lo descrito por la norma ASTM D638-94b.

Las muestras se cortaron en forma de hueso siguiendo la norma ASTM D1708-93. Los ensayos se realizaron por quintuplicado a partir de probetas extraídas de al menos 3 películas de igual composición. El espesor de las películas se determinó como un promedio de cinco lecturas realizadas al azar sobre la misma muestra, utilizando un micrómetro manual 0-25 mm, con una resolución de 0.02 mm. En todos los casos, las películas fueron acondicionadas durante cuatro días en cámaras de humedad relativa, para asegurar una HR constante.

II.2.18. Ensayos de Impacto (IFWI)

Los ensayos de impacto se realizaron utilizando un equipo Fractovis, Ceast. Las muestras con un diámetro de 14cm., se sujetaron en un soporte de 75mm. de diámetro, y se golpearon con un dardo de punta semiesférica. Las curvas de fuerza-deformación se adquirieron durante 80mseg. Cada ensayo se realizó por sextuplicado.

De los fractogramas se obtienen los siguientes parámetros:

a) La máxima tensión alcanzada (σ_d), que se relaciona con la iniciación de la fractura de acuerdo a:

$$\sigma_d = \frac{2,5 * F_{\max}}{e^2} \quad (\text{II. 24})$$

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

b) La energía de iniciación de la fractura (Ei) normalizada por el espesor:

$$E_i = \frac{1}{t} \int_0^{X_{\max}} F dx \quad (\text{II.25})$$

donde X es la deformación alcanzada durante el ensayo del material

II.2.19. Degradación en suelo

El experimento se llevó a cabo en una serie de cajas plásticas de 80x15x10cm conteniendo suelo caracterizado tipo Pinocha y se utilizó la microflora natural para el experimento. Se utilizaron 10 muestras de cada serie obtenidas de distintas películas cortadas en forma de rectángulos de 2x3 cm. Las muestras se colocaron en contenedores fabricados con tejido de aluminio. Estos contenedores permiten el fácil acceso de los microorganismos y agua así como la fácil recuperación de las muestras luego del tiempo determinado de exposición. Los contenedores con las muestras se enterraron a 10cm de la superficie, separados entre sí por 5 cm. La humedad relativa se mantuvo alrededor de 43% (casi en el valor de saturación determinado por la norma ASTM D5209-92) y la temperatura fue $20 \pm 2^\circ\text{C}$. A tiempos predeterminados las muestras se extrajeron, se lavaron con agua destilada y se secaron superficialmente y pesaron. Luego se secaron en estufa de vacío hasta peso constante. Se determinó la absorción de agua (W_s) y la pérdida de peso (W_L) según:

$$W_s(\%) = \frac{m_h - m_t}{m_0} * 100 \quad (\text{II.26})$$

$$W_L(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} * 100 \quad (\text{II.27})$$

donde m_0 es el peso de la película inicial, m_h es el peso de la película húmeda y m_t el peso seco, ambos con el tiempo.

II.3. Caracterización de los Materiales

II.3.1. Caracterización de la Gelatina en Polvo y de las Películas Obtenidas

Estructuralmente la gelatina puede describirse como un copolímero en bloque compuesto por triadas de α -aminoácidos, donde se ubica glicina (Gly) cada tercera posición; y triadas compuestas principalmente por los iminoácidos prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hypro) que también presentan Gly cada tercera posición. La estructura puede representarse como:



donde A y B indican otros aminoácido presentes en la gelatina. A los bloques de aminoácidos se los denomina "blandos" y a los de iminoácidos, "rígidos". La restricción en la rotación impuesta por el segmento rígido conduce a un aumento en la rigidez de la cadena polimérica. Las propiedades macroscópicas de la gelatina son muy sensibles a la variación en el contenido de aminoácidos ([Fraga y Williams 1985](#); [Fraga y col. 1998](#); [Bigi y col. 2001](#)). La estructura de copolímero, se corresponde con las dos temperaturas de transición vítrea (T_g) observadas por [Fraga y Williams 1985](#), para gelatina obtenida de la piel de merluza. La gelatina de mamíferos presenta un alto contenido de iminoácidos conduciendo a una estructura secundaria bien desarrollada, que podría verse como una matriz rígida con un bajo contenido de bloques blandos dispersos; mientras que la de pescado de agua fría contiene una proporción mayor de bloques blandos, lo que puede visualizarse como una goma reforzada ([Fraga y Williams 1985](#); [Bigi y col. 1998, 2001](#)). Las temperaturas de transición vítrea para la gelatina es un tema que ha sido tratado ampliamente en la literatura. Se han determinado por diferentes técnicas tales como análisis termomecánico (TMA) ([Fraga y Williams 1985](#)), calorimetría diferencial dinámica ([Starti y Scandola 1995](#)), análisis dinámico mecánico ([Chiellini y col. 2001a,b](#)), análisis térmico diferencial (DTA) ([Kaminska y Sionkowska 1999](#)). La Tabla II.4 recopila algunos valores de temperatura de fusión (T_m) y T_g de la literatura de los últimos años. Es evidente que existe una gran variabilidad en los resultados, que depende de muchos factores tales como la variación en composición de la gelatina según su origen, método de obtención, procesamiento, historia térmica, así

como del uso de diferentes técnicas en condiciones poco descritas en la literatura. Todo esto hace que los resultados obtenidos en cada trabajo sean difícilmente comparables.

Tabla II.4. Recopilación bibliográfica de valores de Tm y Tg, de películas basadas en gelatina.

Fuente	Tm (°C)	Tg (°C)	Método	Referencia
Tendón de vaca	145	95	Dilatometría	Flory y Garret 1958
Piel de cerdo	220	180/200	Viscoelást./DTA	Yannas y Tobolski 1964
Tendón de cola de rata	230	200	DTA	Yannas y Tobolski 1968
Piel de pescado	200	120/190	TMA	Fraga y Williams 1985
Gelatina bacteriana	nr	80/180	DSC	Akin y Hasirci 1995
Tendón	225	214	DSC	Fakirov y col. 1997
Tendón entrecruzado	225	195	DSC/DMTA	Fakirov y col. 1997
Piel de becerro	226	212	DTA	Arvanitoyannis 2002
Gelatina farmacéutica plastificada		-30/70	DSC	Chiellini y col. 2001b
Gelatina bovina	220	103/195	DSC/DMA	Martucci y col. 2007

Como se ha mencionado antes, la gelatina tiene la capacidad de generar geles termorreversibles mediante una transformación de una conformación desordenada (*random coil*) a una triple hélice ordenada (*helix*) tipo colágeno. Cuando la gelatina se encuentra en solución, dependiendo de la temperatura, las cadenas pueden adoptar una u otra conformación. A temperaturas cercanas a 30°C o por encima, las cadenas de gelatina se encuentran en conformación de *random-coil*, y la solución se presenta en estado de *sol*. Si esta solución se enfría (o bien se elimina el agua, concentrando la solución de gelatina), las cadenas tienden a recuperar la estructura de triple hélice del colágeno, regenerando las uniones de hidrógeno entre cadenas, que producen un entrecruzamiento físico (gel termorreversible). Esta *regeneración o renaturalización* de la triple hélice puede considerarse como un grado de cristalinidad, que puede alcanzar hasta 20% ([Jolley 1970](#); [Koslov 1983](#); [Bigi y col. 2001](#)), y presenta una temperatura de fusión característica ([Starti y Scandola 1995](#); [Koslov 1983](#); [Zeeman 1998](#); [Kaminska y Sionkowska 1999](#); [Chiellini y col. 2001b](#)). Si este gel se calienta, se produce la transformación inversa de la triple hélice a ovillo al azar o estadístico (*random coil*) y el gel se transforma en un líquido viscoso.

La naturaleza del solvente utilizado también determinará el porcentaje de renaturalización. El reemplazo de agua por solventes como dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF) inhiben la formación de la triple hélice, mientras que la

adición de urea, por ejemplo, favorece la renaturalización ([Jolley 1970](#); [Koslov 1983](#)). Asimismo, el agregado de plastificantes polihidroxilados, restringen la regeneración de la triple hélice, interrumpiendo las uniones de hidrógeno entre cadenas ([Marquié y Guilbert 2002](#))

La presencia de cierto porcentaje de triple hélice, modifica las propiedades de los materiales. Se ha determinado que a medida que el contenido de triple hélice aumenta en las películas de gelatina, el módulo de Young aumenta y se reduce el grado de hinchamiento en agua ([Chiellini y col 2001 a, b](#)).

Determinación del peso molecular promedio

Con el objetivo de caracterizar el polvo de gelatina se determinó el número de Bloom (Sección II.2.2). El valor del número de Bloom obtenido fue de 150 lo que corresponde a una masa molar de aproximadamente 45kDa.

Obtención de la película de gelatina (Ge)

La técnica utilizada para la obtención de películas de Ge es la técnica de evaporación de solvente o casting. Para ello, el polvo de Ge es disuelto en agua destilada a 50°C, con agitación constante durante 30 minutos de modo de obtener una solución homogénea con concentración de 10g/100mL y pH 6. La solución se vertió en moldes circulares de material antiadherente para realizar la evaporación del solvente a 35°C.

Aspecto de las películas de gelatina

La Figura II.9.a muestra el aspecto macroscópico de una película de gelatina sin entrecruzar. Se observa que la misma es transparente y aparentemente sin imperfecciones. Microscópicamente (Figura II.9.b) la misma película presenta estrías que no son fácilmente observables macroscópicamente, que resultan de la capacidad de la gelatina de copiar el diseño de la superficie maquinada del molde antiadherente. Superficies similares fueron observadas para películas de gelatina por [Bigi y col. \(2001\)](#) y [Carvalho y Grosso \(2004\)](#). Además pueden identificarse zonas caracterizadas por fisuras distribuidas al azar, provenientes probablemente de la formación de estrías durante el proceso de secado.

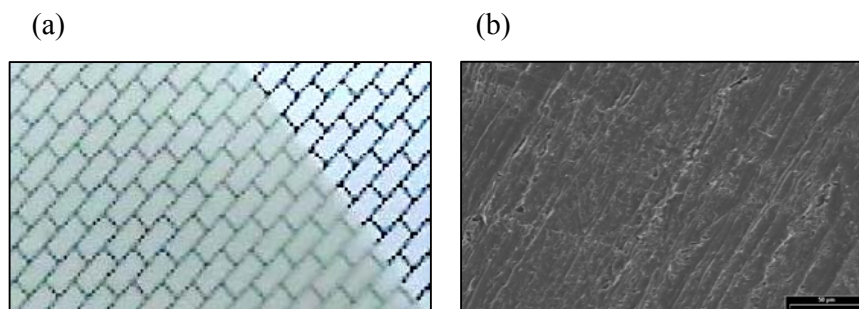


Figura II.9. Película de gelatina obtenida por *casting*
 (a) Aspecto macroscópico. (b) Fotomicrografiade SEM (barra = 50 µm)

Caracterización por FTIR

La Figura II.10 muestra el espectro infrarrojo de la película de gelatina obtenida. Como puede observarse, el espectro es bastante complejo dada la diversidad de monómeros presentes en la macromolécula (20 residuos aminoácidos diferentes). En la Figura II.10 pueden distinguirse las bandas correspondientes al enlace amida de la cadena proteica. La banda amida I (estiramiento C=O) y amida II (deformación N-H y estiramiento C-N) en 1656 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} respectivamente. La banda amida III (estiramiento C-N y deformación en el plano N-H), en torno a los 1200 cm^{-1} , que se halla en una zona compleja donde se encuentran las vibraciones de los grupos CH_2 de la glicina y de las cadenas laterales de prolina ([Sionkowska y col. 2004](#)).

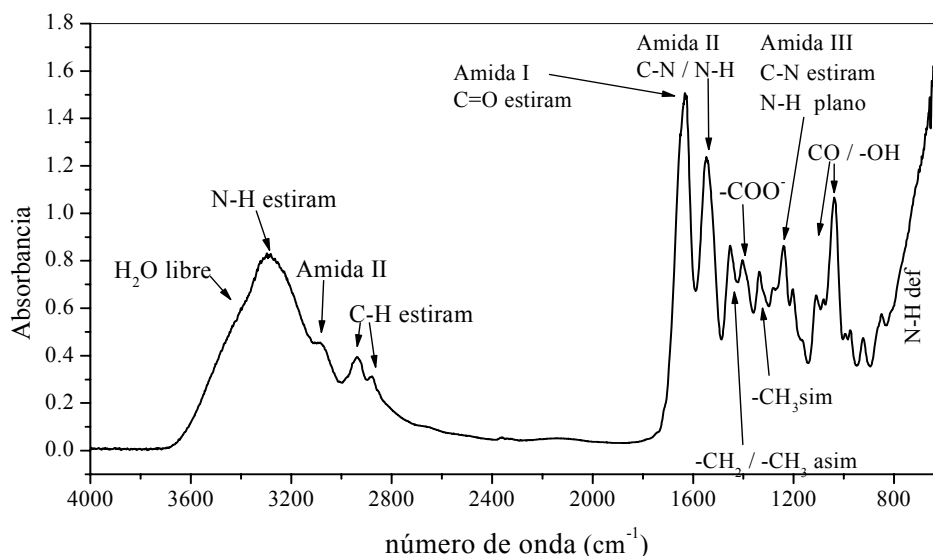


Figura II.10. Espectro de absorción infrarroja de las películas de gelatina.

El espectro obtenido presenta gran similitud con el informado por [Yannas \(1972\)](#) para películas de gelatina obtenidas por *casting* a elevada temperatura. Cabe destacar que el espectro de películas elaboradas a partir de distintas proteínas presentan diferencias debido a variaciones estructurales de la macromolécula y a las condiciones de procesamiento ([Arvanitoyannis 2002](#)).

Calorimetría diferencial dinámica, difracción de rayos X y termogravimetría

La Figura II.11 muestra los termogramas obtenidos para las películas de gelatina procesadas por *casting*. En el mismo gráfico se representan el primer barrido de temperatura (línea llena) y el segundo (línea punteada), obtenido luego de dejar enfriar rápidamente la misma muestra.

Como ya se mencionó antes, la gelatina se describe como un copolímero formado por bloques blandos y duros. La devitrificación de cada bloque puede asociarse con una Tg. En el caso de gelatina procedente de mamíferos, los bloques duros prevalecen sobre los blandos, siendo por lo tanto la segunda Tg la que gobierna la transición vidrio-goma del material ([Fraga y Williams 1985](#)). Además, la gelatina puede adoptar la estructura de triple hélice si en las condiciones de procesamiento la solución pasa por el estado de gel, por lo que podría observarse una temperatura de fusión ([Jolley 1970](#); [Koslov 1983](#)).

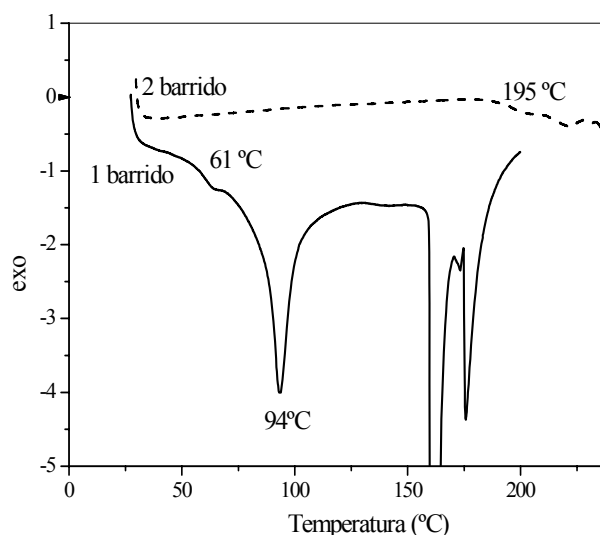


Figura II. 11. Termogramas de una película de gelatina
 ___ primer barrido, --- segundo barrido (5°C/min, N₂)

El termograma resultante del primer barrido de temperatura presenta una serie de eventos térmicos que se inician con una transición endotérmica a aproximadamente 61°C, una segunda transición endotérmica centrada en 94°C, y una tercera transición, en el rango comprendido entre 158-188°C. Esta última transición compleja fue observada por otros autores ([Chiellini y col. 2001a](#); [Barreto y col. 2003](#)), quienes asignan este tercer evento a la fusión de zonas cristalinas generadas durante el procesamiento. Las condiciones del proceso por *casting* tienen marcada influencia en la estructura final del polímero obtenido.

En función de la estructura y las condiciones de procesamiento, la primera transición (61°C) se asignó a la devitrificación de segmentos blandos, plastificados por el agua remanente que se evapora en el siguiente evento térmico (94°C), tal como se confirmó por la disminución de masa observada luego del primer barrido. La tercera transición compleja (158-188°C) puede relacionarse con la desnaturalización de la triple hélice superpuesta con la devitrificación de los segmentos rígidos ([Fraga y Williams 1985](#); [Chiellini y col. 2001b](#)), que se hace evidente en el segundo barrido (195°C).

La presencia de la tercera transición evidencia que a pesar de mantener una temperatura mayor que la de renaturalización durante las etapas de disolución y evaporación, parte de la gelatina ha podido reconstruir al menos en un bajo porcentaje, la triple hélice. Esto pudo comprobarse por difracción de rayos X (DRX). En la Figura II.12. se representan el difractograma del polvo de gelatina y de una película procesada por *casting*.

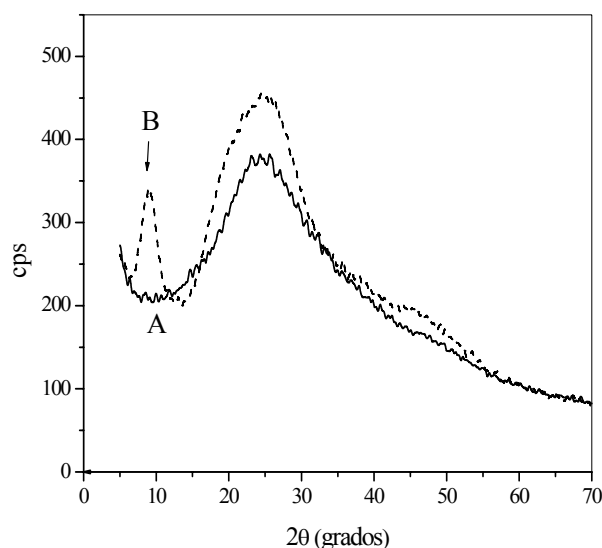


Figura II. 12. DRX de: A) polvo de gelatina, B) película de gelatina

El polvo de gelatina presenta un difractograma típico de proteínas amorfas ([Grevellec y col. 2001](#)), mientras que la película de gelatina presenta un pico de difracción centrado en $2\theta = 8^\circ$ asignado a la renaturalización de las cadenas de gelatina en la estructura de triple hélice, dado que el espaciado de la estructura de colágeno es de 1.16nm, correspondiendo a un valor de $2\theta = 7.6^\circ$ ([Bigi y col. 2000](#)). La intensidad de la banda permite estimar que el grado de cristalinidad de los películas alcanza un porcentaje del orden de 4.5%. Este porcentaje es suficientemente bajo como para asegurar la transparencia de las películas obtenidas.

Durante el segundo barrido de temperatura (Figura II.11) se borra la historia térmica del material y se evidencia una T_g a 195°C , asociada a la devitrificación de los bloques rígidos de aminoácidos ([Fraga y Williams 1985](#)). Casi inmediatamente después se produce la degradación térmica del material.

La degradación térmica de las películas de gelatina se analizó por termogravimetría en modo dinámico. La Figura II.13 muestra las curvas de pérdida de masa normalizadas y sus respectivas derivadas tanto para la gelatina en polvo como procesada en forma de películas.

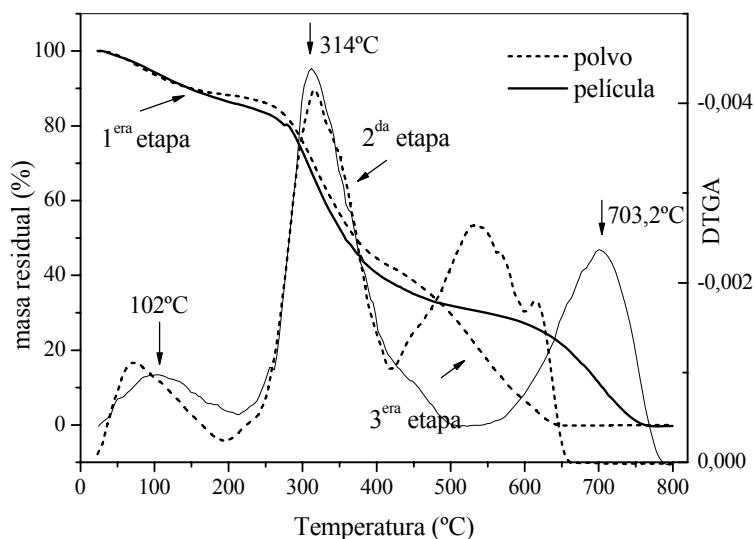


Figura II. 13. Análisis termogravimétrico (---) polvo (___) película de gelatina

La degradación térmica del polvo se presenta como un proceso continuo con tres etapas consecutivas de pérdida de masa. La primera, con un máximo en torno a los 100°C puede asociarse a la pérdida de volátiles, fundamentalmente agua remanente

(pico endotérmico a 95°C observada en DSC, primer barrido). El contenido de agua determinado por TGA es del orden de 13 a 15% en todos los casos. [Kozlov 1983](#) indica que el contenido de agua unido directamente a la gelatina es de 12-14% y corresponde a la llamada capa monomolecular. El segundo escalón en la curva de pérdida de masa, está asociado a reacciones de pirólisis de la cadena polipeptídica y es el principal evento térmico ([Fraga y Williams 1985](#); [Barreto y col. 2000](#); [Chiellini y col. 2001a](#)). Esta etapa comienza alrededor de los 267°C y se extiende hasta 600°C, con un máximo en 314°C y contribuye con 55% a la pérdida de masa. Esto sugiere que las diferentes estructuras primarias y secundarias no afectan significativamente la estabilidad térmica de la proteína ([Barreto y col. 2003](#)). Finalmente, la tercera etapa, $T > 600^\circ\text{C}$, se asocia a la descomposición de estructuras más estables producidas por reacciones de entrecruzamiento durante el calentamiento ([Chiellini y col. 2001b](#)).

Puede observarse que la formación de la película no altera el segundo paso de la degradación, que es el de mayor interés al momento del procesamiento. Las diferencias más marcadas se observan en la última etapa y pueden asociarse con los procesos difusivos de los volátiles a partir de gelatina en polvo o en forma de película. Se observó que los residuos de la pirólisis luego de la segunda etapa poseen características diferentes. Analizado por microscopía óptica, el residuo obtenido para el polvo de gelatina resultó ser un polvo grisáceo con aspecto de cenizas, mientras que para la película el residuo podía asimilarse al de una película espumada.

Análisis dinámico-mecánico

Se determinaron el módulo de almacenamiento (G') que indica la respuesta elástica a la deformación y $\tan \delta$ (módulo de almacenamiento/módulo de pérdida = G'/G'') que se utiliza para determinar la T_g del material.

La Figura II.14 muestra la dependencia de ambos parámetros con la temperatura. Como puede observarse, las películas de gelatina exhiben un módulo de almacenamiento de 0.74GPa a temperatura ambiente. Temperaturas superiores a 140°C producen el ablandamiento del material e imposibilitan continuar el análisis. La transición a 104°C en la curva de $\tan \delta$ puede ser asociada con la T_g del material debida a los segmentos blandos de la proteína, en ausencia de plastificación por humedad, ya que el análisis se realizó sobre películas secas en estufa de vacío hasta peso constante. La segunda T_g no pudo determinarse ya que por encima de la T_g de los segmentos blandos el material ablanda y se suelta de la mordazas, imposibilitando el análisis.

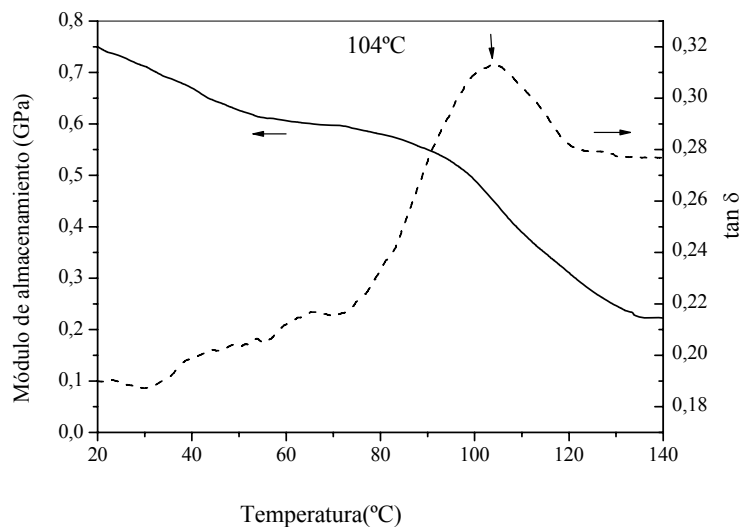


Figura II. 14. Análisis dinámico-mecánico de la película de gelatina

II.3.2. Caracterización de almidón dialdehído polimérico

El almidón dialdehído polimérico (SD) es un aldehído obtenido por oxidación de almidón nativo con ácido periódico. La reacción de oxidación es altamente específica, el ácido rompe el enlace entre el C2 y C3 del anillo de glucopiranososa. Esto genera la formación de un grupo aldehído en cada uno de los carbonos ([Spence y col. 1995](#)). En contraste con aldehídos de bajo peso molecular, el SD exhibe una baja toxicidad ([Wilson 1959](#)).

A diferencia de los otros entrecruzantes utilizados, este es una molécula polimérica por lo que su estructura fue analizada mediante ensayos de FTIR y TGA. La Figura II.15 muestra el espectro FTIR del polvo de almidón dialdehído polimérico. Pueden identificarse las bandas características del almidón ([Shi y col. 2006](#)) en las siguientes posiciones: $3350\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento O–H), 2850 y 2920 cm^{-1} (estiramiento C–H), 1640 cm^{-1} (O–H flexión de agua absorbida), 1462 cm^{-1} (CH_2 flexión), $1445\text{--}1325\text{ cm}^{-1}$ (C–H flexión), $1243\text{--}1205\text{ cm}^{-1}$ (O–H flexión) ([Ciardelli y col. 2005](#)). El grupo C–O de C–O–C posee una frecuencia de vibración de 1020 cm^{-1} mientras que el grupo C–O de C–O–H se halla a 1156 y 1081 cm^{-1} ([Yu y col. 2005](#)). Finalmente, a 1740 cm^{-1} puede identificarse la banda correspondiente al estiramiento C=O del aldehído terminal ([Fan y col. 2001](#); [Kim y col. 2004](#)).

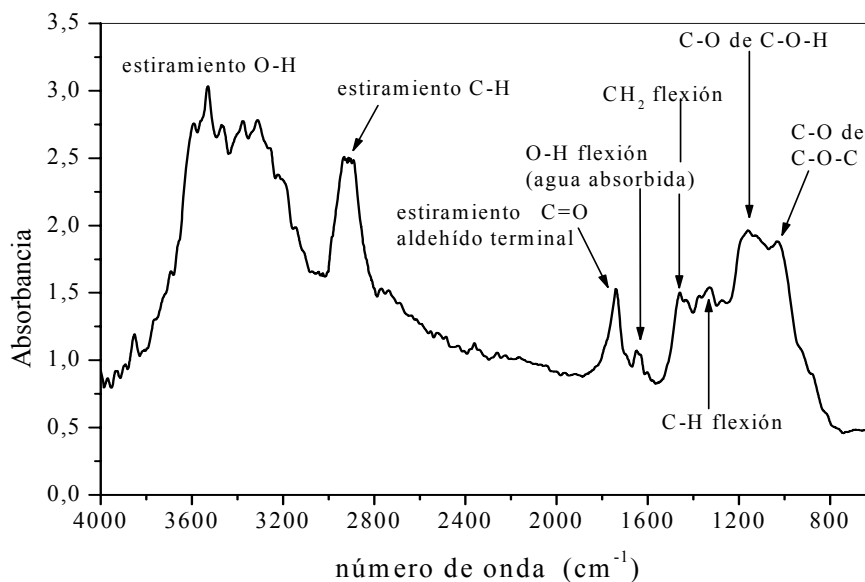


Figura II.15. Espectro de absorción infrarroja del polvo de SD.

En la Figura II.16 se muestra la curva de pérdida de masa de SD en polvo y su respectiva derivada obtenidas en atmósfera inerte y a 10°C/min. Se observan dos etapas en el proceso degradativo. La primera con un máximo en torno a los 70°C y una pérdida de masa del orden del 5%, se asocia a la volatilización del agua absorbida. La segunda etapa representa un 65% de pérdida de la masa total, y presenta dos máximos a 227 y 289°C.

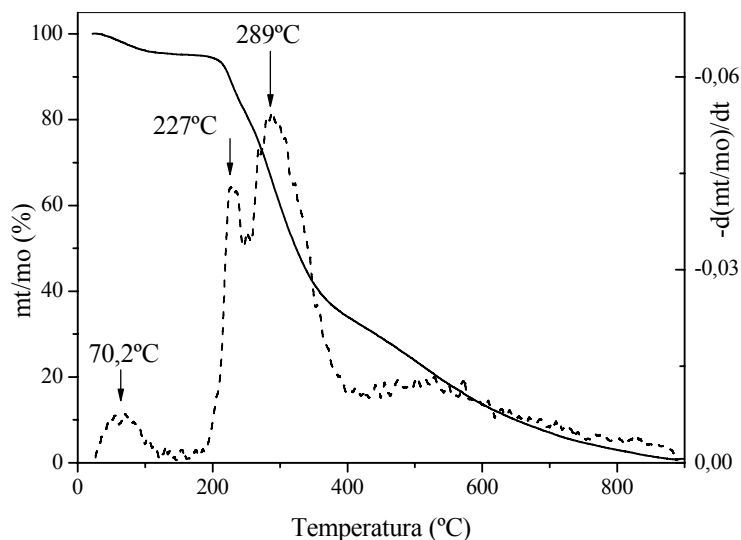


Figura II. 16. Análisis termogravimétrico del polvo de SD

Esta etapa se asocia a la degradación de la cadena polimérica principal, que resulta una mezcla de almidón original y modificado según lo observado por [Aggarwal y Dollimore 1998](#) sobre almidón modificado por intercambio iónico con una sal de amonio cuaternario. Los autores indican que luego de la modificación, el inicio de la degradación del almidón original se desplaza de los 260°C ([Aggarwal y Dollimore 1998](#); [Fringant y col. 1998](#); [Cyras 2001](#); [di Franco y col. 2004](#)) a 230°C, y se produce un desdoblamiento del máximo con temperaturas de 230 y 275°C.

II.3.3. Caracterización de montmorillonita sódica

La montmorillonita (MMt) es el filosilicato más utilizado en la obtención de sistemas nanocompuestos de matriz polimérica debido a su alta disponibilidad y su bajo costo. Se trata de una arcilla de tipo esmectita, con una estructura natural en capas, con plaquetas que tienen grosores de 1 nm y longitudes de superficie del orden de 100 - 1.000 nm) ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Ray y Okamoto 2003](#); [Lingaiah y col. 2005](#)).

La Figura II.17 muestra el patrón de difracción de rayos X de la montmorillonita sódica. Puede observarse que presenta distintos picos, relacionados a planos de la estructura cristalina de la arcilla ([Cullity y Stock 2001](#)). El plano de interés para evaluar la distancia entre las galerías de la MMt es el d_{001} ([Zheng y col.2002](#); [Ray y Okamoto 2003](#); [Ryu y col. 2004](#)). Aplicando la ley de Bragg sobre el pico de interés puede hallarse la distancia entre galerías de la arcilla nativa, que en este caso es de 1.21nm.

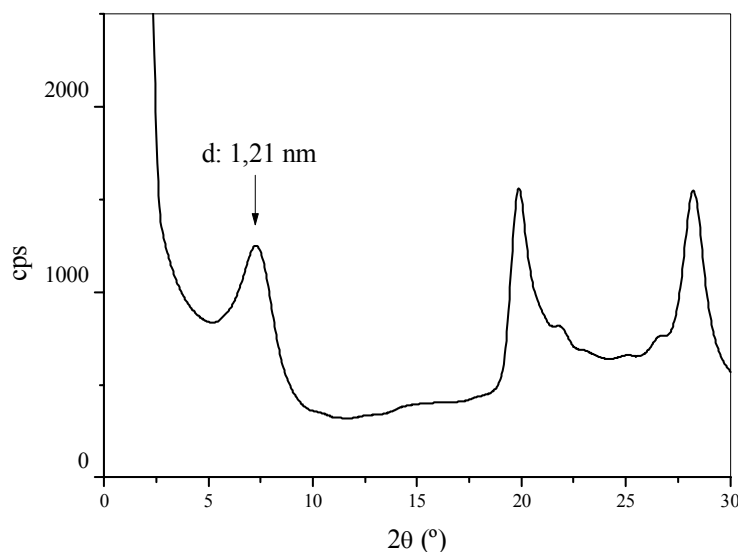


Figura II. 17. WADX de montmorillonita sódica en polvo

Espectroscopia infrarroja

La Figura II.18.a muestra el espectro infrarrojo de la arcilla en polvo. Como se sabe, la MMT pertenece a la familia de los filosilicatos, cuya unidad estructural básica son tetraedros de silicio y oxígeno $(\text{SiO})_4^{-4}$. Dichos tetraedros se unen compartiendo tres de sus cuatro oxígenos con otros vecinos formando capas, de extensión infinita y fórmula $(\text{Si}_2\text{O}_5)^{-2}$ (capa tetraédrica), que constituyen la unidad fundamental de los filosilicatos. Los oxígenos del cuarto vértice del tetraedro (oxígenos apicales), se dirigen perpendicularmente a la capa y forman parte de una capa octaédrica adyacente, formada por octaedros de grupos OH^- que se unen compartiendo las aristas. ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Ray y Okamoto 2003](#); [Lingaiah y col. 2005](#)).

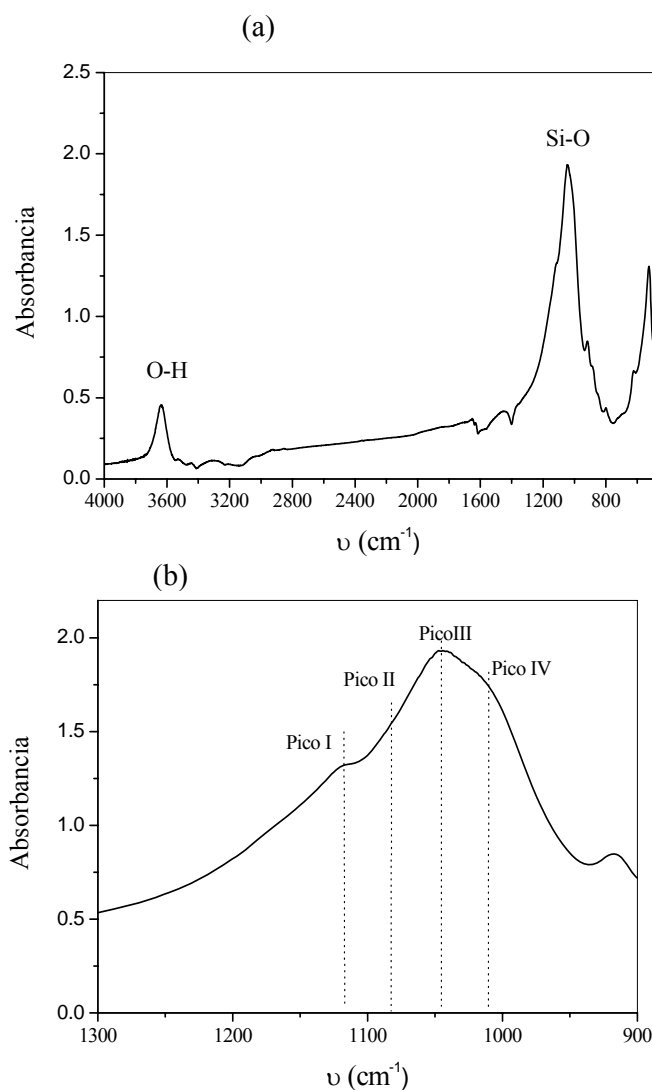


Figura II. 18. FTIR de MMT Na^+ . (a) espectro completo: $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$
 (b) zona de vibraciones Si-O: $1300\text{-}900\text{cm}^{-1}$

La Figura II.18.b es una ampliación de la zona correspondiente a las vibraciones de los grupos Si-O. Por deconvolución del espectro original pueden definirse 4 picos: 1120 (I), 1081 (II), 1046 (III) y 1002 (IV) cm^{-1} . Los picos I, III y IV se asignan a los estiramientos en el plano del enlace Si-O ([Johnston y Premachandra 2001](#); [Pu Chen y Zhang 2006](#)). Por otra parte el pico II se atribuye a vibraciones fuera de plano, relacionadas a la orientación de las capas de arcilla ([Pu Chen y Zhang 2006](#)).

Análisis termogravimétrico

A fin de evaluar la estabilidad térmica de la arcilla se realizaron ensayos de termogravimetría. La Figura II.19 muestra el termograma obtenido. Se observa una primera pérdida de masa asociada a la pérdida de agua; y luego un proceso degradativo en el rango de 528 a 676°C, con un máximo en 634°C, que solo produce una pérdida del 5% de masa; atribuible a la dehidroxilación de las capas de arcilla ([Pramoda y col. 2003](#)). Acorde a lo esperado para este tipo de materiales, la arcilla exhibe una elevada estabilidad térmica, al menos hasta 900°C, que es la máxima temperatura utilizada en este estudio.

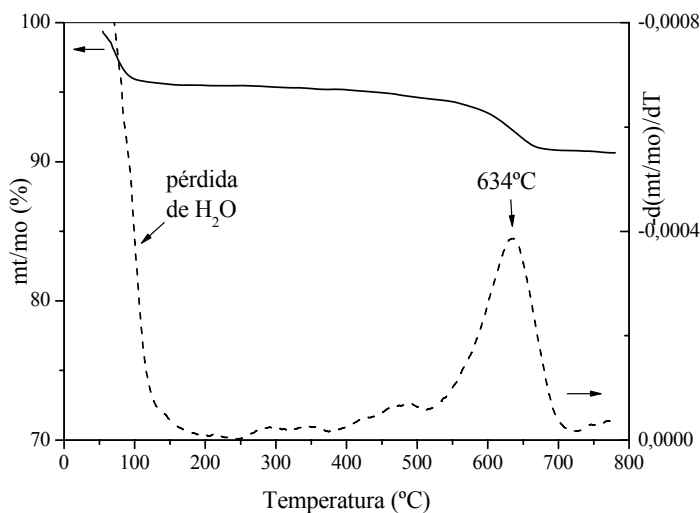


Figura II. 19. Curva de pérdida de masa y su correspondiente derivada de Na⁺MMt

II.4. Referencias

- Akin H.**, Hasirci N. Preparation and characterization of crosslinked gelatin microspheres. *J. Appl. Polym. Sci.* 58 (1995) 95-100
- Alexandre M.**, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mater. Sci. Eng. C* 28 (2000) 1-63
- Arvanitoyannis I.S.** “Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed., Ed. A. Gennadios; CRC Press, 2002; 275-304
- Achet D.**, He X.W. Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer* 36 (1995) 787-790
- Aggarwal P.**, Dollimore D. The effect of chemical modification on starch studied using thermal análisis. *Thermochimica Acta* 324 (1998) 1-8
- Anglès M.N.**, Dufresne A. Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Análisis. *Macromolecules* 33 (2000) 8344-8353
- Apostolov A.A.**, Boneva D., Vassileva E., Mark J.E., Fakirov S. Mechanical properties of native and crosslinked gelatins in a bending deformation *J. Appl. Polym. Sci.* 76 (2000) 2041-2048
- 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. Stab.* 79 (2003) 147-152
- Bigi A.**, Bracci B., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials* 19 (1998) 2335-2340
- Bigi A.**, Borghi M., Cojazzi G., Fichera A.M., Panzavolta S., Roveri N. Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *J. Therm. Anal. Cal.* 61 (2000) 451-459
- Bigi A.**, Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K. Stabilization of gelatine films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 23 (2002) 4827-4832
- Bohidar H.B.**, Jena S.S. Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatine. *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 8970-8977
- Ciardelli G.**, Chiono V., Vozi G., Pracella M., Ahluwalia A., Barbani N., Cristaalini C., Giusti P. Blends of Poly(ϵ -caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 6 (2005) 1961-1976
- Chiellini E.**, Cinelli P., Grillo Fernandes, Kenawy El Refaye S., Lazzeri A. Gelatin-based blends and composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. *Biomacromolecules* 2 (2001a) 806-811
- Chiellini E.**, Cinelli P., Corti A., Kenawy El Refaye. Composite films based on waste gelatin: Thermal-mechanical properties and biodegradation testing. *Polym. Degrad. Stab.* 73 (2001b) 549-555
- Cullity B.D.**, Stock S.R. “Geometry of crystals” en *Elements of X-Ray Diffraction*. 3era. Edición, Ed. Prentice Hall; 2001; cap 2: pp.34-87.
- Cyras V.P.** Relación estructura, propiedades y procesamiento del material compuesto biodegradable obtenido a partir de policaprolactona/almidón y fibra sisal. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, 2001.
- de Carvalho R.A.**, Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloid.* 18 (2004) 717-726
- 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 (2004) 95-103

- Dufresne A.**, Kellerhals M. B., Witholt B. Transcrystallization in Mcl-PHAs/cellulose whiskers composites. *Macromolecules* 32, 22 (1999) 7396-7401
- Fan Q.G.**, Lewis D.M., Tapley K.N. Characterization of cellulose aldehyde using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 8 (2001) 1195–1202
- Flory P.J.**, Rehner J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *J. Chem. Phys.* 11 (1943) 521
- Fraga A.N.**, Willimas R.J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer* 26 (1985) 113-118
- Fraga A.N.**, Williams R.J.J., Galak M., Perera H. Gelatin films derived from fish skin. *J. Polym. Mater.* 5 (1988) 49-55
- Fringant C.**, Rinaudo M., Foray M., Bardet M. Preparation of mixed esters of starch or use of an external plasticiser: Two different ways to change the properties of starch acetate films. *Carbohydr. Polym.* 35 (1998) 97–106
- García M.A.**, Pinotti A., Martino M.N., Zaritzky N.E. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydr. Polym.* 56 (2004) 339-345
- Gómez –Guillen M.C.**, Ihl M., Bifani V., Silva A., Montero P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni Molinae Turcz.*). *Food Hydrocolloid.* 21,7 (2007) 1133-1143
- 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 (1992) 190-199
- Grevellec J.I.**, Marquie C., Ferry L., Crespy A., Vialettes V. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomacromolecules* 2 (2001) 1104-1109
- Johnston C.T.**, Premachandra G.S. Polarizad ATR –FTIR study of smectite in aqueous suspension. *Langmuir* 17 (2001) 3712-3718
- Jolley J.E.** The Microstructure of photographic gelatine binders. *Photographic Sci. Eng.* 14 (1970) 169-177
- Kaminska A.**, Sionkowska A. The effect of UV radiation on the values of thermal parameters 9of collagen containing b-carotene. *Polym. Degrad. Stabil.* 65 (1999) 87-90
- Kim U-J.**, Wada M., Kuga S. Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydr. Polym.* 56 (2004) 7-10
- Kozlov P.V.** The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* 24 (1983) 651-666
- Lingaiah S.**, Shivakumar K.N., Sadler R., Sharpe M. A method of visualization of dispersion of nanoplatelets in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 65 (2005) 2276-2280
- Marquié C.**, Guilbert S. “Formation and properties of cottonseed proteins films and coatings” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed., Ed. A. Gennadios; CRC Press, 2002; 275-304
- Martucci J.F.**, Vazquez A., Ruseckaite R.A. Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite. Morphological and ternal studies. *J. Therm. Anal. Cal.* 89 (2007) 117-122
- Matsumura H.**, Glasser W.G. Cellulosic nanocomposites. II. Studies by Atomic Force Microscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 78 (2000) 2254-2261
- Menon A.R.R.**, Pillai C.K.S., Nando G.B. Thermal degradation characteristics of natural rubber vulcanizates modified with phosphorylated cashew nut shell liquid. *Polym.Degrad. Stabil.* 52 (1996) 265-271

- Patil R.D.**, Mark J.E., Apostolov A., Vassileva E., Fakirov S. Crystallization of water in some crosslinked gelatins. *Eur. Polym. J.* 36 (2000) 1055-1061
- Peleg M.** An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.* 53 (1988) 1216-1219
- Pramoda K.P.**, Liu T., Liu Z., He C., Sue H-J. Thermal degradation behavior of polyamide 6/clay nanocomposites. *Polym. Degrad. Stabil.* 81 (2003) 47-56
- Pu Chen**, Zhang L. Interaction and Properties of Highly Exfoliated Soy Protein /Montmorillonite Nanocomposites. *Biomacromolecules* 7 (2006) 1700 -1706
- Ray S.S.**, Okamoto M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1539-1641
- Reporte Técnico** Southern Clay Products Inc. (Texas, USA)
- Ryu J.G.**, Park S.W., Kim H., Lee J.W. Power ultrasound effects for in situ compatibilization of polymer-clay nanocomposites. *Mat. Sci. Eng.* 24 (2004) 285-288
- Shen S.H.**, Sung H.W., Tu R., Hata C., Lin D., Noishiki Y., Quijano R.G. Characterization of polyepoxy compound fixed porcine heart valve bioprosthesis. *J. Appl. Biomat.* 5 (1994) 159-162
- Shi R.**, Ding T., Liu Q., Han Y., Zhang L., Chen D., Tian W. In vitro degradation and swelling behaviour of rubbery thermoplastic starch in simulated body and simulated saliva fluid and effects of the degradation products on cells. *Polym. Degrad. Stabil.* 91 (2006) 3289-3300
- Shimizu R.N.**, Demarquette N.R. Evaluation of surface energy of solid polymers using different models. *J. Appl. Polym. Sci.* 76 (2000) 1831-1845
- Sionkowska A.**, Wisniewski M., Skopinska J., Kennedy C.J., Wess T.J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials* 25 (2004) 795-801
- Spence K.E.**, Jane J., Pometto A.L. Dialdehyde Starch and zein plastic: Mechanical properties and biodegradability. *J. Environ. Polym. Degrad.* 3 (1995) 69-74
- Starti B.**, Scandola M. Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly(vinyl alcohol) blends. *Biomaterials* 16 (1995) 785-792
- Stryer L.** *Biochemistry*. 4ta Edición, W.H. Freeman & Company. New York, USA 1995, 1064pp.
- Sung H-W.**, Hsu H-L., Shih C-C., Lin D-S. Cross-linking characteristics of biological tissues with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials* 17 (1996) 1405-1410
- Tunc S.**, Angellier H., Cahyana Y., Chalier P., Gontard N., Gastaldi E. Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *J. Membrane Sci.* 289 (2007) 159-168
- Valente A.J.M.**, Jimenez A., Simoes A.C., Burrows H.D., Polishchuk A.Ya, Lobo V.M.M. Transport of solutes through calix[4]pyrrole-containing cellulose acetate films. *Eur. Polym J.* 43 (2007) 2433-2442
- Vanin F.M.**, Sobral P.J.A., Menegalli F.C., Carvalho R.A., Habitate A.M.Q.B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloid.* 19 (2005) 899-907
- Wilson R.H.** Utilization and Toxicity of Dialdehyde and Dicarboxyl- Starches. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102 (1959) 735-737
- Wu C-S.**, Liu Y-L., Chiu Y-C., Chiu Y-S. Thermal stability of epoxy resins containing flame retardant components: an evaluation with thermogravimetric analysis. *Polym. Degrad. Stabil.* 78 (2002) 41-48

Yalcin B., Cakmak M. The role of plasticizer on the exfoliation and dispersion and fracture behaviour of clay particles in PVC matrix: a comprehensive morphological study. *Polymer* 45 (2004) 6623-6638

Yannas I.V. Collagen and gelatin in solid state. *J. Macromol. Sci., Rev. Macromol.Chem.* 1 (1972) 49-104

Yu J.G., Wang N., Ma X.F. The Effects of Citric Acid on the Properties of Thermoplastic Starch Plasticized by Glycerol. *Starch/Stärke* 57 (2005) 494–504

Zeeman R. Cross-linking of Collagen-based Materials. Tesis doctoral, Universidad de Twente, 1998.

Zeeman R., Dijkstra P.J., van Wachem P.B., van Luyn M.J.A., Hendriks M., Cahalan P.T., Feijen J. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials* 20 (1999) 921-931

Zheng J.P., Li P., Ma Y.L., De Yao K. Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposite. I.Preparation and Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189-1194

Capítulo III

Entrecruzamiento químico

Capítulo III

Entrecruzamiento químico

En este capítulo se describen los métodos de obtención de las películas entrecruzadas químicamente. Se utilizan como agentes de entrecruzamiento glutaraldehído (GTA), almidón dialdehído polimérico (SD) y butildiglicidil éter (BDGE). Se evalúa la eficiencia del entrecruzamiento lograda en cada caso, las propiedades de las películas obtenidas y la necesidad de incorporación de plastificante. Se seleccionan las formulaciones que exhiben las mejores propiedades desde el punto de vista mecánico, de absorción de agua y estabilidad térmica.

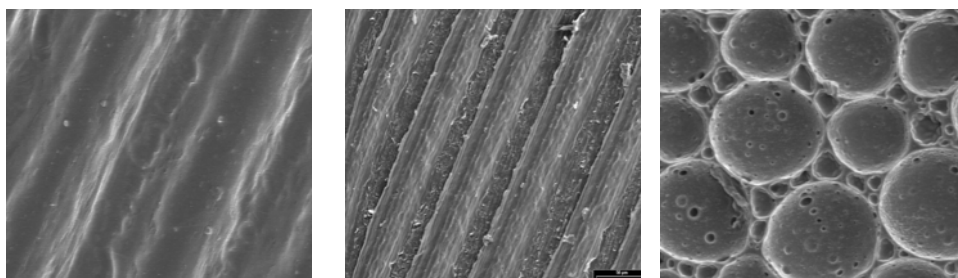


Figura III. 1. Microscopía electrónica de barrido de películas entrecruzadas (a) Ge-BDGE1 (b) Ge-GTA1 (c) Ge-BDGE5

III.1. Introducción

Una alternativa que permite controlar las propiedades mecánicas y la resistencia a la humedad de los materiales basados en gelatina consiste en introducir enlaces covalentes entre las cadenas polipeptídicas por entrecruzamiento químico ([Fraga y Williams 1985](#); [Bigi y col. 2001](#); [Apostolov y col. 2002](#); [de Carvalho y col. 2004](#)).

En esta parte del estudio se analizará el efecto del entrecruzamiento químico sobre las propiedades finales de las películas obtenidas. Se utilizarán tres agentes diferentes: glutaraldehído, butildiglicidiléter y almidón dialdehído polimérico.

Entrecruzamiento con glutaraldehído (GTA)

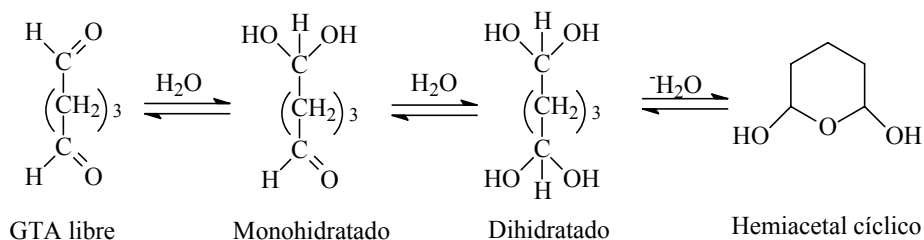
Dentro de los agentes de entrecruzamiento más utilizados, el glutaraldehído (GTA) es uno de los más eficientes para materiales basados en colágeno ([Chatterji 1989](#); [Akin y Hasirci 1995](#); [Jayakrishnan y Jameela 1996](#); [Bigi y col. 1998, 2001](#); [Charulatha y Rajaram 2003](#)), comparado con: formaldehído ([Robinson 1964](#); [Fraga y Williams 1985](#); [Honda y col. 1997](#); [Galiotta y col. 1998](#)), gliceraldehído ([Vandelli y col. 2001](#)), almidón dialdehído polimérico ([Schacht y col. 1997](#); [Rhim y col. 1998](#); [Li y col. 2003](#)), genipin ([Bigi y col. 2002](#); [Butler y col. 2003](#)), isocianatos multifuncionales ([Apostolov y col. 2000](#); [Charulatha y col. 2003](#)) compuestos epoxi ([Zemanova y col. 1981](#); [Sung y col. 1996](#); [Zeeman y col. 1999](#); [Patil y col. 2000](#)) compuestos fenólicos ([Wu y col. 2001](#); [Strauss y Gibson 2004](#)) y carbodiimida ([Kuijpers y col. 2000](#)). El GTA permite obtener materiales con un alto grado de entrecruzamiento en un corto tiempo de reacción. Los tiempos de gelación informados en la literatura para concentraciones entre 1-2% p/p son menores a 1 minuto ([Robinson 1964](#); [Bigi y col. 2001](#)).

La reacción involucrada durante el entrecruzamiento del GTA con proteínas ha sido extensivamente estudiada ([Jayakrishnan y Jameela 1996](#); [Marquié y col. 1997](#), [Zeeman 1998](#); [Marquié y Gilbert 2002](#)), pero el mecanismo de reacción es muy complejo y no está completamente dilucidado debido a que las soluciones acuosas de GTA consisten en una mezcla de diferentes especies en equilibrio, que incluyen aldehído libre, aldehído mono y dihidratado, hemiacetales poliméricos y monoméricos.

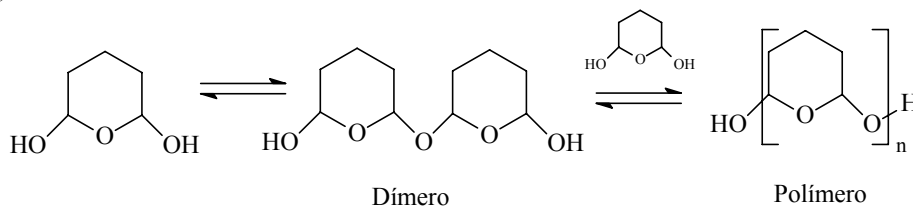
La Figura III.2 resume las especies presentes en solución. Dada la facilidad de hidratación y ciclación, la concentración de aldehído libre en soluciones comerciales

concentradas es baja ([Olde Damink y col. 1995](#); [Jayakrishnan y Jameela 1996](#)). Además, las soluciones de GTA pueden contener polímeros α - β insaturados generados por auto-condensación aldólica durante el almacenamiento ([Zeeman 1998](#)), los cuales pueden incluir hasta ocho moléculas individuales de GTA ([Marquié y Gilbert 2002](#)). La polimerización del GTA tiene lugar principalmente en soluciones acuosas de pH alcalino, pero cierto grado de polimerización puede ser observado hasta pH 5 ([Marquié y Guilbert 2002](#)).

a) Monómero



b) Hemiacetales



c) Polímeros α - β insaturados

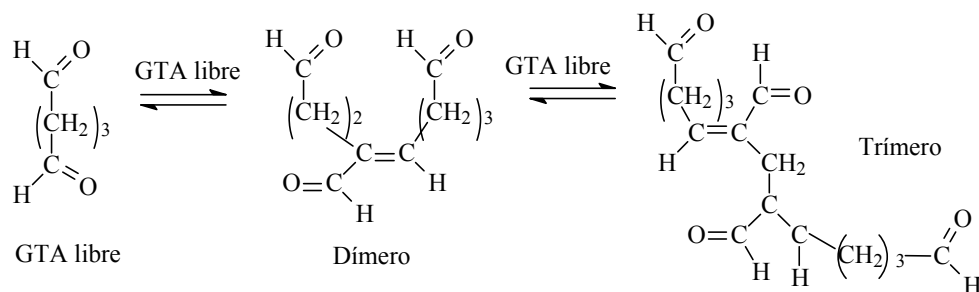


Figura III.2. Posibles estructuras de GTA en solución acuosa ([Zeeman 1998](#))

El GTA reacciona por adición nucleofílica de los grupos amino presentes en los aminoácidos básicos de la gelatina (arginina, lisina, hidroxilisina) para generar iminas (bases de Schiff) ([Akin y Hasirci 1995](#); [Jayakrishnan y Jameela 1996](#); [Bigi y col. 2001](#)) (Figura III.3). Las bases de Schiff son inestables y pueden hidrolizar para regenerar las

aminas, promoviéndose la condensación aldólica entre aldehídos adyacentes, introduciendo nuevas funcionalidades aldehído que pueden considerarse potenciales sitios de entrecruzamiento ([Gennadios 2002](#); [Olde Damink y col. 1995](#)). Si bien el mecanismo de reacción no ha sido completamente dilucidado, [Marquié y Guilbert 2002](#) proponen dos tipo de estructuras que podrían obtenerse por reacción de la solución de GTA con las cadenas de Ge: (a) el GTA reacciona con los grupos amino de los residuos de lisina, generando grupos pendientes sobre la cadena de gelatina; o (b) el GTA reacciona por ambos extremos con cadenas diferentes de Ge, generando un puente que, dada la naturaleza polimérica que puede presentar el GTA en solución, puede ser de diversas longitudes.

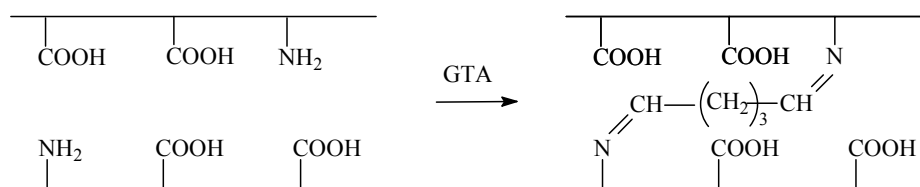


Figura III.3. Reacción de Ge con GTA

Las principales desventajas del GTA como agente de entrecruzamiento son la coloración anaranjada característica de las bases de Schiff, la dificultad en el control de la velocidad de gelación (del orden de 1 minuto para concentraciones del orden de 0.1% en peso ([Bigi y col. 1998](#); [Zeeman 1998](#); [Bigi y col. 2002](#); [deCarvalho y Grosso 2004](#))) y sus características citotóxicas para concentraciones >10-25ppm ([Bigi y col. 2001](#)), relacionadas a la posibilidad de hidrólisis de la cadena del entrecruzante con liberación del monómero citotóxico ([Rousseau y Gagnieu, 2002](#)). A pesar de estas desventajas, el GTA es un agente de entrecruzamiento económico, fácilmente asequible y que introduce una gran estabilización de la estructura proteica, por lo que ha sido clínicamente aceptado ([Wissemann y Jacobson 1985](#); [Jayakrishnan y Jameela 1996](#)) y utilizado para materiales de aplicación biomédica ([Lin y col. 1998](#)). A fin de minimizar la respuesta citotóxica del GTA, [Bigi y col. \(2001\)](#) han desarrollado formulaciones con concentraciones comprendidas entre 0.05 y 2.5 %GTA. Los autores observaron que una concentración del orden de 1%GTA es suficiente como para alcanzar un grado de entrecruzamiento del orden del 98% y obtener materiales con propiedades moduladas y de baja toxicidad.

Una alternativa para reducir la citotoxicidad del GTA por hidrólisis y liberación de monómero es la reducción de las bases de Schiff generadas mediante el uso de un agente reductor. De este modo, no solo se estabiliza el material obtenido sino también se reduciría la coloración de las películas. El principal inconveniente que se presenta es la elección del agente reductor. Por ejemplo, la reducción catalítica es incompatible con la presencia de dobles y triples enlaces C-C y de otros grupos funcionales como nitro y ciano ([Tarasevich y Koslov, 1999](#)). El cianoborohidruro y los hidruros de estaño son altamente tóxicos y generan productos tóxicos. Otros hidruros como el borohidruro de zinc o níquel presentan un poder reductor mayor que afecta a grupos cetona, éster, amida y nitro. Existen trabajos donde se está desarrollando una técnica de reducción de los grupos imida sin afectar a otros grupos funcionales presentes mediante el uso de borohidruro de sodio. Sin embargo, dada la gran diversidad de grupos funcionales presentes en la matriz proteica el uso de esta técnica requiere de un análisis más profundo.

Entrecruzamiento con almidón dialdehído polimérico (SD)

El almidón dialdehído (SD) es un aldehído polimérico obtenido por oxidación de almidón nativo con ácido periódico. La reacción de oxidación es altamente específica; el ácido rompe el enlace entre el C2 y C3 del anillo de glucopiranososa. Esto genera la formación de un grupo aldehído en cada uno de estos carbonos ([Spence y col. 1995](#)).

Este agente de entrecruzamiento ha sido utilizado sobre materiales proteicos desde 1950 ([Filachione y col. 1958](#)) y hasta la actualidad ([Rhim y col. 1998](#); [Kosmala y col. 2000](#); [Li y col. 2003](#)) con éxito variable.

En contraste con aldehídos de bajo peso molecular, el SD exhibe una baja toxicidad, como fue demostrado por los estudios clínicos sobre ratas realizados por [Wilson \(1959\)](#).

El SD ha sido utilizado no sólo como agente de entrecruzamiento sino como plastificante interno en películas basadas en proteínas presentes en la clara del huevo ([Gennadios y col. 1998](#)) y proteínas de soja ([Rhim y col. 1998](#); [Lim y col. 2002](#)).

La reacción del SD con las proteínas es similar a la del GTA: la formación de una base de Schiff ([Spence y col. 1995](#); [Gennadios y col. 1998](#); [Rhim y col. 1998](#); [Lim y col. 2002](#)). Este entrecruzante aventaja al GTA en que presenta una baja toxicidad, una velocidad de reacción más controlable y que puede actuar como plastificante interno ([Rhim y col. 1998](#)).

Entrecruzamiento con butildiglicidil éter (BDGE)

Los compuestos poliepoxiados han sido ampliamente usados para la estabilización de materiales basados en colágeno ([Zemanová y col. 1981](#); [Sung y col. 1996](#); [Zeeman y col. 1999](#)) y en gelatina ([Patil y col. 2000](#)). [Zeeman \(1998\)](#), analizó en detalle la reacción entre colágeno de piel de oveja y epóxidos mono y polifuncionales, entre ellos el butildiglicidil éter (BDGE). La gran versatilidad de estos agentes queda demostrada por el hecho de que los grupos oxirano pueden reaccionar por ataque nucleofílico tanto con los grupos amino como con los ácidos carboxílicos presentes en el colágeno (y en las cadenas de gelatina). La reacción puede hacerse más selectiva sólo modificando el pH del medio de reacción. En medio básico, se favorece la reacción con los grupos amino, mientras que a pH ácido, se favorece la reacción con los ácidos carboxílicos (Figura III.4) pendientes de la cadena principal de colágeno o gelatina. La selección de las condiciones de entrecruzamiento resultará en materiales con diferentes propiedades. [Zeeman y col. \(1999\)](#) observaron que el colágeno entrecruzado con BDGE a pH 8-10 exhibe mayor resistencia a la degradación enzimática, mayor rigidez y fragilidad que su análogo entrecruzado a pH 4-6.

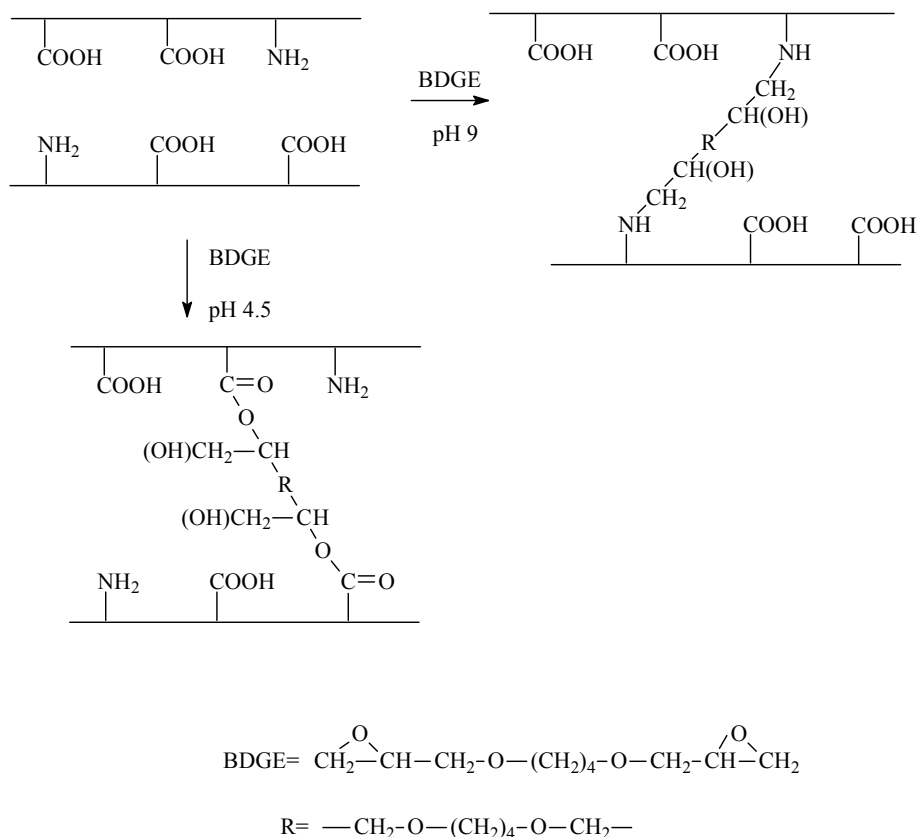


Figura III.4. Reacción de las proteínas con compuestos epoxidados ([Zeeman 1998](#))

La reacción entre el colágeno y compuestos epoxidados en medio básico, genera entrecruzamientos estables con propiedades mecánicas comparables a los materiales entrecruzados con GTA ([Xi y Liu 1992](#); [Lee y col. 1994](#); [Zeeman 1998](#)). Bajo esas condiciones, el BDGE reacciona con los grupos amino de los residuos de lisina e hidroxilisina ([Shechter y Wynstra 1956](#); [Shechter y col. 1956](#); [Zeeman 1998](#)) generando puntos de entrecruzamiento y grupos pendientes (*masking*). La relación entrecruzamiento/ grupos pendientes dependerá de la velocidad de reacción de los grupos oxirano con los amino de la cadena proteica, pero también, de la disponibilidad de un segundo grupo amino para la reacción con el anillo oxirano pendiente luego del primer paso de reacción (Figura III.5). [Zeeman \(1998\)](#) realizó un exhaustivo análisis de la cinética de reacción del BDGE con el colágeno a distintos pH. A pH 10 se obtienen materiales que presentan tanto puntos de entrecruzamiento como grupos pendientes, siendo la relación de productos aproximadamente 1:1.

Las películas entrecruzadas y plastificadas se obtuvieron por el mismo procedimiento. Alícuotas de la solución de GTA se adicionaron sobre la solución de Ge y plastificante, de modo de obtener películas con concentraciones de 0.1 a 5% en masa de GTA sobre peso seco de Ge. Se utiliza como nomenclatura para estas películas **Ge-GTAX/30Gly** con *X* igual al porcentaje de agente entrecruzante.

Las distintas soluciones se vertieron en moldes circulares con material antiadherente para realizar la evaporación del solvente a 35°C.

Para la obtención de las películas entrecruzadas con BDGE se realizó una suspensión de gelatina al 10g/100mL en solución buffer pH 10 a 50°C ([Zeeman 1998](#)), con agitación constante durante 15 minutos. Luego se incorporó el agente de entrecruzamiento en concentraciones que variaron entre 0.5 y 5% en masa (respecto de gelatina seca). La mezcla resultante se agitó por 15 minutos a 50°C. Las soluciones se vertieron en moldes circulares de material antiadherente y se utilizó un ciclo de reacción para la obtención de las películas. Se utiliza como nomenclatura para estas películas **Ge-BDGEX** con *X* igual al porcentaje de agente entrecruzante. Este agente de entrecruzamiento es el único que permite calcular el número de equivalentes que se introduce en la mezcla, dado que no presenta reacciones de autocondensación como sucede con el GTA y su masa molar es conocida. Posee 0.017eq/g, con lo cual el número de equivalentes incorporados (*n*) puede calcularse como:

$$n = \text{masa adicionada (g)} \times 0.017\text{eq/g} \quad (\text{III.1})$$

A fin de proponer un protocolo para que la reacción alcance la máxima conversión posible, se analizó la reacción de gelatina con 5%BDGE a 70°C. Se extrajeron muestras a distintos tiempos y se determinó el porcentaje de grupos amino libres por espectroscopía UV-Visible. La Figura III.6, indica que aún al cabo de 4 horas de reacción, quedan grupos amino sin reaccionar.

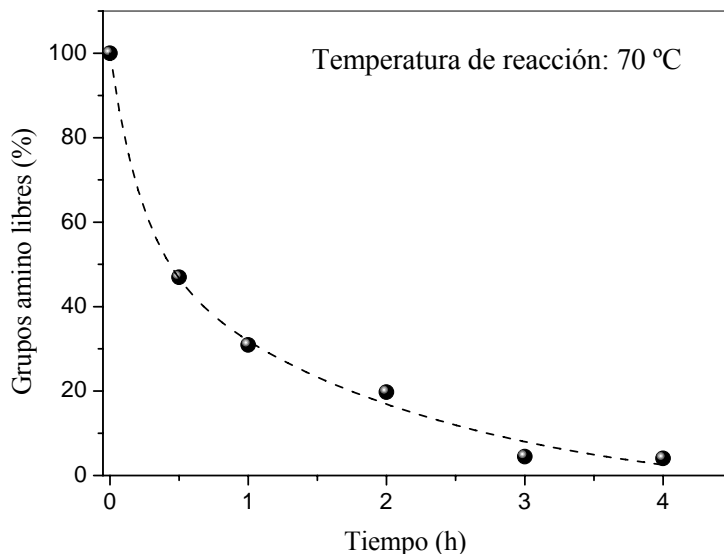


Figura III.6. Consumo de grupos amino en función del tiempo de reacción con BDGE a 70°C

Este resultado se confirmó por calorimetría diferencial dinámica. La Figura III.7, presenta los termogramas obtenidos. Las curvas A-B representan el comportamiento térmico de los películas de Ge-BDGE5 a distintos tiempos de reacción a 70°C. Al cabo de 2 horas, se observa un pico exotérmico centrado en 172°C, asignado a la reacción entre BDGE y gelatina (Figura III.7-Curva A). A medida que la reacción procede, el calor residual disminuye, hasta que desaparece luego de aplicar el siguiente ciclo: 4 horas a 70 °C y 1 hora a 120°C (Figura III.7-Curva B).

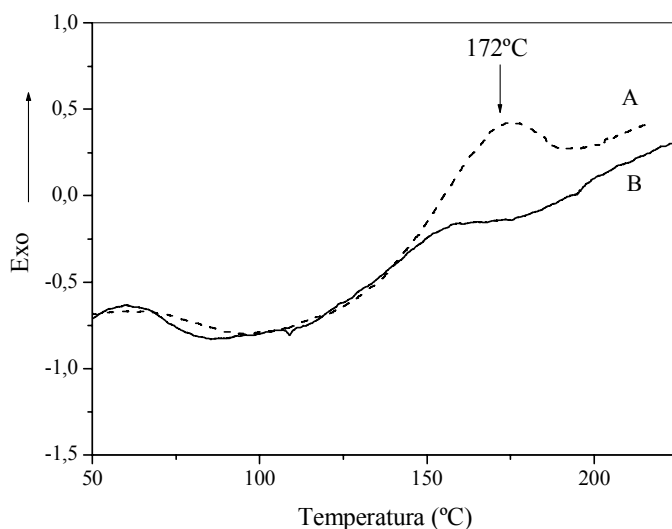


Figura III.7. Termogramas para distintos tiempos de reacción: a) 2 h, b) ciclo

Las películas plastificadas **Ge-BDGEX**, se obtuvieron agregando el plastificante a la solución regulada de gelatina (pH 10) antes del agregado del agente de entrecruzamiento. Se utiliza como nomenclatura para estas películas **Ge-BDGEX/30GI** donde **X** corresponde al porcentaje de agente entrecruzante.

III.2.2. Técnica de moldeo por compresión

Dado que el SD no pudo ser llevado a solución mediante el uso de un solvente común a la matriz de gelatina, fue necesario aplicar una técnica de procesamiento diferente para la obtención de las películas. Se seleccionó como técnica de procesamiento el moldeo por compresión, que presenta la ventaja de una mayor aplicación industrial ([Grevellec y col. 2001](#); [Wu y Zhang 2001](#); [Apostolov y col. 2002](#)).

El almidón dialdehído debió ser plastificado previamente con glicerol (30% en masa) a fin de favorecer su procesamiento a temperaturas menores que la de degradación. De esta forma el SD se comporta en forma similar a un almidón termoplástico (TPS) y puede procesarse con mínimo riesgo de descomposición térmica ([Anglés y Dufresne 2000](#)).

La cantidad requerida de SD para preparar mezclas con contenidos entre 5 y 50% en masa (respecto de la gelatina seca) se dejó hinchar por el glicerol durante varias horas y luego se adicionó el polvo de gelatina. Una vez obtenida la mezcla, ésta se llevó a la prensa y se aplicó una presión de 50Kg/cm² durante 10 minutos a 120°C ([Wu y Zhang 2001](#); [Park y col. 2007](#)). Se utiliza como nomenclatura para estas películas **Ge-SDX** con **X** igual al porcentaje de agente entrecruzante.

III.2.3. Aspecto macroscópico de las películas

La Figura III.8 muestra el aspecto macroscópico de las películas entrecruzadas con distintos agentes. Las películas entrecruzadas con aldehídos exhiben la coloración anaranjada característica de las bases de Schiff (Figura III.8. a-d) ([Akin y Hasirci 1995](#); [Bigi y col. 2001](#); [Bigi y col. 2002](#)).

Las películas entrecruzadas con GTA resultaron más rígidas que su contraparte no entrecruzada. La reacción es extremadamente rápida y procede a tiempos inferiores a

los 5 minutos aún para bajos porcentajes de GTA, lo que concuerda con lo informado en la literatura ([Robinson 1964](#); [Akin y Hasirci 1995](#)). A medida que el contenido de GTA se incrementó, tanto la velocidad de reacción como la contracción de las películas aumentaron como consecuencia del incremento en la densidad de entrecruzamiento.

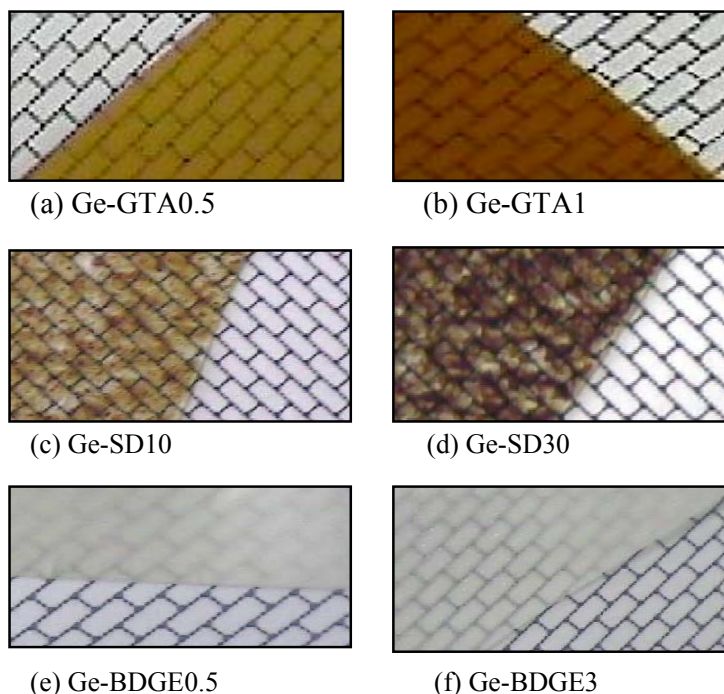


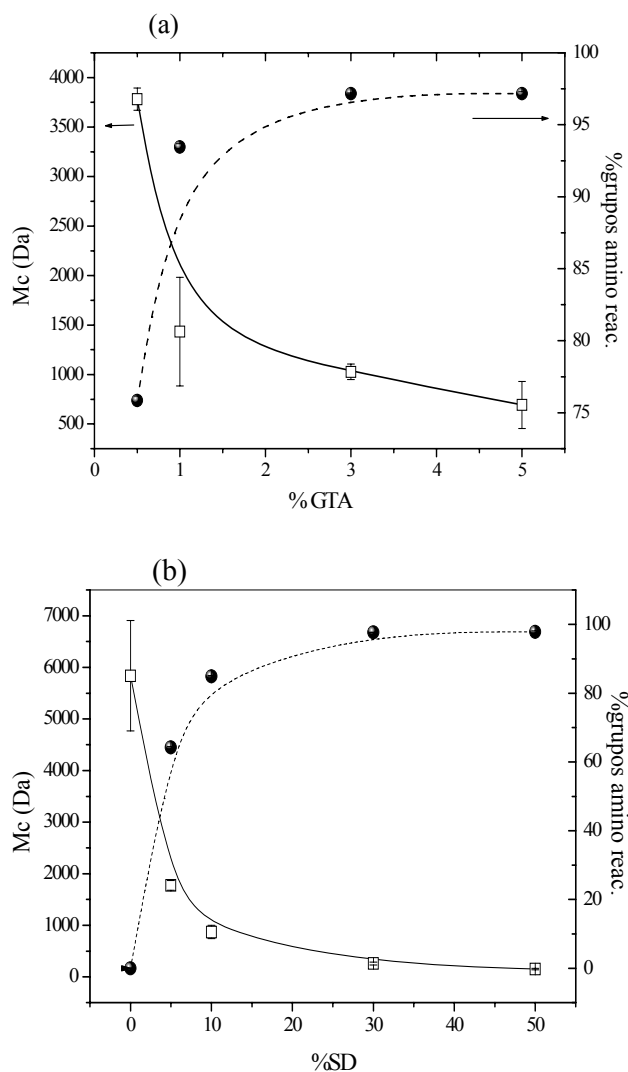
Figura III.8. Películas de gelatina con distinto agentes de entrecruzamiento

Si bien la reacción de la gelatina con SD también produce bases de Schiff, la coloración de las películas es menor, así como la contracción. Esto último se puede atribuir a que la velocidad de reacción de entrecruzamiento es más controlable, y al efecto plastificante, tanto por el entrecruzante polimérico ([Rhim y col. 1998](#)) como por la presencia de glicerol.

Por su parte la reacción entre BDGE y gelatina es más lenta y por lo tanto, más controlable que la de GTA. Macroscópicamente, el material presenta menor contracción y es más flexible. Asimismo, debido a la naturaleza de la reacción, el producto no presenta coloración (Figura III.8. e-f) ([Zeeman 1998](#)).

III.3. Resultados y discusión

La eficiencia del entrecruzamiento se evaluó mediante el consumo de grupos amino determinado por espectrometría UV-visible. Se utilizó como referencia el contenido de grupos amino de la película de gelatina sin entrecruzar. Las densidades de entrecruzamiento se estimaron calculando el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (M_c) a partir de los valores de absorción de agua en el equilibrio y utilizando la expresión de Flory-Rhener modificada (Capítulo II, Ecuación II.6) ([Akin y Hasirci 1995](#); [Patil y col. 2000](#)). La Figura III.9 (a-c) muestra la variación del M_c y el consumo de grupos amino en función del porcentaje de agente entrecruzante.



cont.

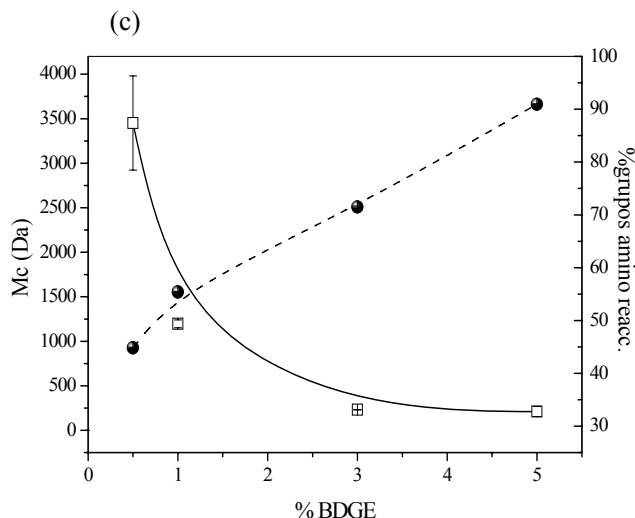


Figura III.9. Peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (Mc) para distintos porcentajes de agente entrecruzante. (a) GTA, (b) SD, (c) BDGE

Se observa que a medida que aumenta el porcentaje de agente de entrecruzamiento, el Mc disminuye, lo que es indicativo de que el grado de entrecruzamiento aumenta. Para el GTA, el grado de entrecruzamiento aumenta de 75% para 0.5%GTA hasta un 98% para 3%GTA, mientras que los valores de Mc decrecen desde 3780Da hasta 1020Da, respectivamente. En realidad, 1%GTA es suficiente para producir materiales con 96% de entrecruzamiento y un valor de Mc de 1430Da (Tabla III.1), por lo que esta baja concentración de GTA puede considerarse adecuada para obtener un alto grado de entrecruzamiento (Figura III.9.a). Para porcentajes superiores al 3%GTA no se observaron variaciones considerables del número de grupos amino reaccionados, indicando que se ha alcanzado la conversión máxima. Para explicar estos resultados debe tenerse en cuenta que durante la reacción no sólo se generan bases de Schiff sino que también se producen otras reacciones secundarias que generan potenciales puntos de entrecruzamiento ([Marquié y Guilbert 2002](#)), obteniéndose materiales altamente entrecruzados. El alto grado de entrecruzamiento alcanzado impone una restricción en la movilidad de cadenas y se alcanza una conversión máxima. [Fraga y Williams \(1985\)](#) observaron resultados similares para gelatina de peces de agua fría entrecruzada con formaldehído. Los autores describen este efecto como el arresto de reacción por vitrificación en sistemas termorrígidos.

Para las películas entrecruzadas con SD (Figura III.9.b) el comportamiento resultó similar al de GTA, sólo que se requieren concentraciones de un orden de magnitud mayor para alcanzar la conversión máxima de alrededor del 97% (50%SD).

Este resultado puede asociarse a la ausencia de reacciones de auto condensación en SD limitadas por la longitud de cadena polimérica del SD y confirma que en el caso de GTA esta reacción secundaria provee nuevas funcionalidades aldehído, incrementando el grado de entrecruzamiento.

Cabe destacar que los valores de Mc para las películas plastificadas y moldeadas por compresión son sustancialmente diferentes. Esto puede deberse a que la presencia de plastificante introduce interacciones de tipo puente de hidrógeno con la matriz que reducen la disponibilidad de sitios de entrecruzamiento ([García y col. 2000](#)) y a que durante el procesamiento por moldeo por compresión se genera cierto grado de entrecruzamiento en la matriz ([Apostolov y col. 2002](#)). El valor de Mc para la película de Ge/30Gly procesada por moldeo por compresión es un 85% menor que el de Ge obtenida por *casting* (Tabla III.1).

Tabla III.1. Cálculo de Mc para las películas entrecruzadas

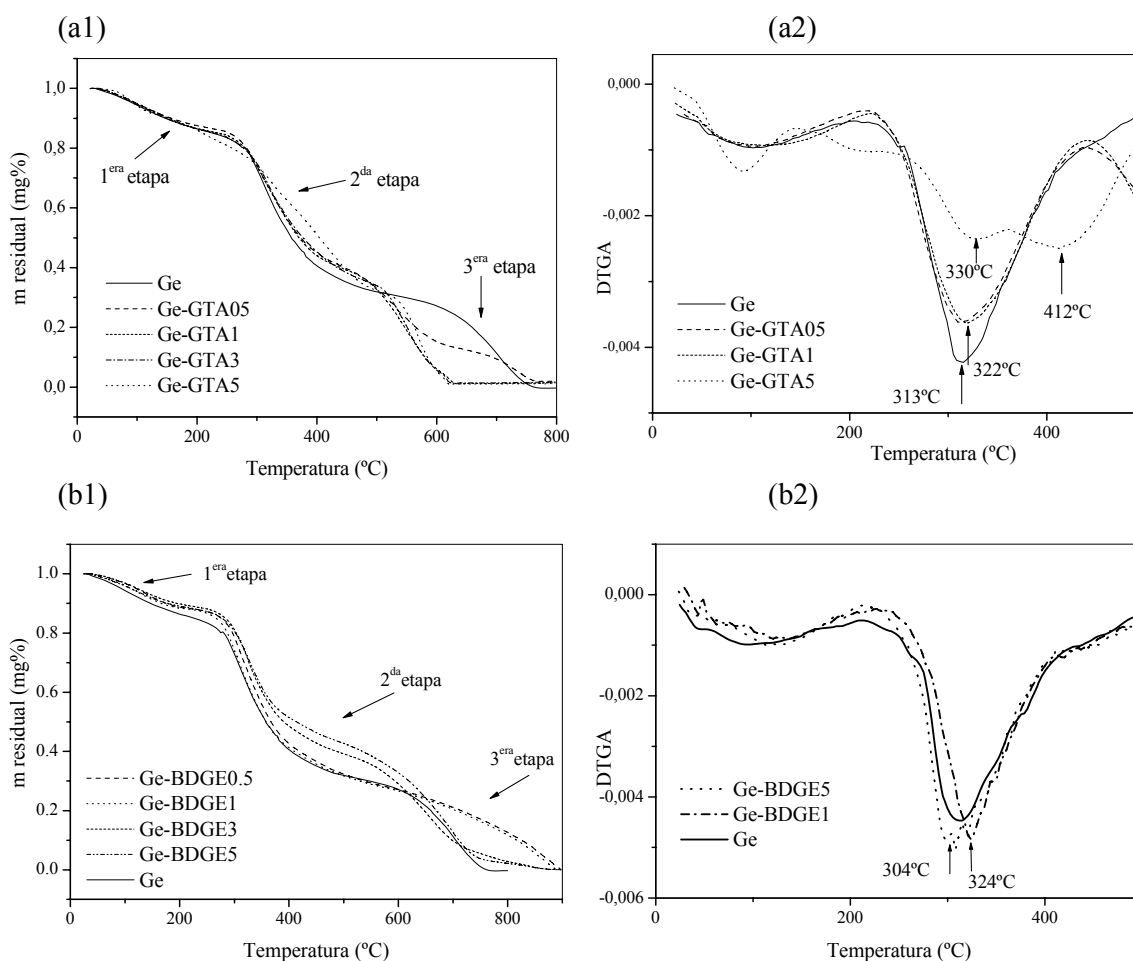
		d (mg/ml)	V (ml)	Mc (Da)
MPC 30% Gly.	Ge	1001.7 ± 0.6	0.13 ± 0.02	5757 ± 108
	Ge-SD5	1002.2 ± 0.2	0.21 ± 0.01	1772 ± 92
	Ge-SD10	1003.0 ± 0.5	0.26 ± 0.01	868.8 ± 29.1
	Ge-SD30	1003.8 ± 0.4	0.37 ± 0.01	258.1 ± 28.7
	Ge-SD50	1006.5 ± 1.1	0.42 ± 0.01	151.4 ± 13.6
Casting	Ge	1002.8 ± 0.5	0.07 ± 0.01	37283 ± 5779
	Ge-GTA05	1003.1 ± 0.7	0.16 ± 0.02	3781 ± 112
	Ge-GTA1	1004.0 ± 0.9	0.22 ± 0.03	1434 ± 548
	Ge-GTA3	1006.4 ± 0.8	0.25 ± 0.01	1027 ± 78
	Ge-GTA5	1006.5 ± 1.0	0.28 ± 0.03	692 ± 238
	Ge-BDGE05	1003.6 ± 0.4	0.17 ± 0.01	3451 ± 529
	Ge-BDGE1	1004.3 ± 0.3	0.23 ± 0.01	1196 ± 43
	Ge-BDGE3	1003.3 ± 0.7	0.39 ± 0.03	231.7 ± 3.3
Ge-BDGE5	1002.4 ± 0.3	0.38 ± 0.01	211.7 ± 55.9	

MPC : Moldeo por compresión

En cuanto a las películas entrecruzadas con BDGE (Figura III.9.c) se observa un incremento del porcentaje de grupos amino consumidos desde un 45% para concentraciones de 0.5% BDGE hasta valores de 91% para 5% BDGE, mientras que los valores de Mc decrecen desde 3450 Da hasta 210Da, respectivamente (Tabla III.1). El consumo de grupos amino no puede ser tomado como una medida de la eficiencia del entrecruzamiento ya que, como se mencionó antes, a pH 10 pueden producirse también ramificaciones en un porcentaje considerable ([Zemanová y col. 1981](#), [Zeeman 1998](#), [Zeeman y col.1999](#)). Dado que este agente no presenta reacciones de condensación

como el GTA, es de esperar que la cantidad de equivalentes adicionados para un mismo porcentaje sea superior (Ec. III.1), con lo que la mayor reducción del M_c se debe al entrecruzamiento y a la contribución de la reacción de *masking*.

Uno de los principales efectos del entrecruzamiento es el incremento en estabilidad térmica de los materiales proteicos ([Gennadios 1998](#)). La Figura III.10 muestra las curvas de TG/DTG obtenidas y la Tabla III.2 resume los valores de los parámetros de degradación térmica de las películas. En todos los casos puede verse un proceso degradativo en tres etapas consecutivas. La primera en el rango 70-220°C que se asigna a la pérdida de componentes de bajo peso molecular y agua. El contenido de agua determinado por TGA es del orden de 13 a 15% en todos los casos. [Kozlov \(1983\)](#) indica que el contenido de agua unido directamente a la gelatina es de 12-14% y corresponde a la llamada capa monomolecular.



Cont.

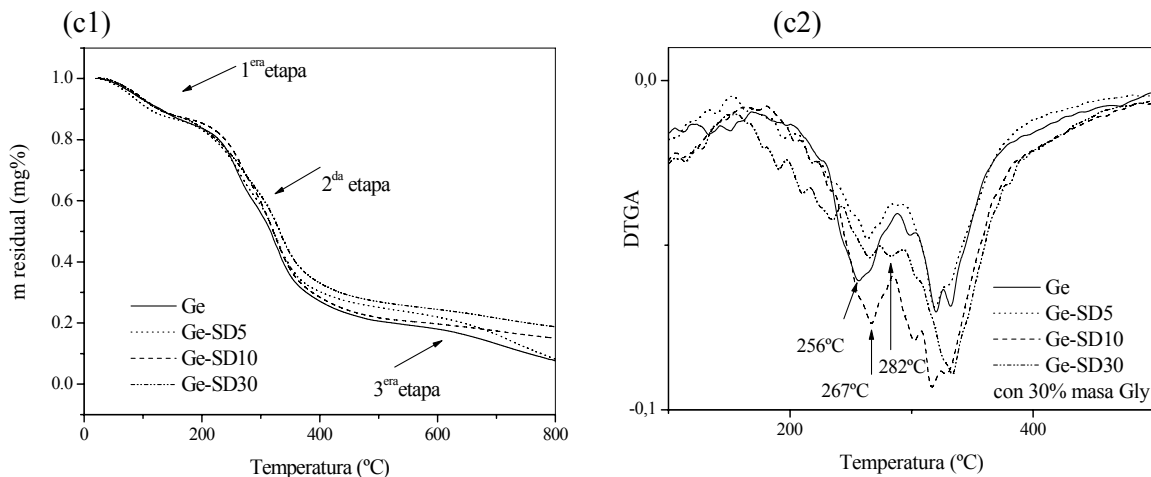


Figura III.10. Termogramas de las películas de gelatina con los distintos agentes de entrecruzamiento. (a) GTA, (b) BDGE, (c) SD. (1) masa residual % (2) DTGA.

El efecto del entrecruzamiento con GTA se manifiesta particularmente en una disminución de la velocidad de degradación, como puede deducirse de las pendientes de las curvas correspondientes a 3 y 5 % de GTA, en la Figura III.10.a1 la presencia de GTA no induce variaciones apreciables en la temperatura de inicio de la degradación. Sin embargo, para Ge-GTA5, la pérdida de masa en el rango de 200-600°C, tiene 2 peldaños, con máximos en 330°C (asociado a la degradación de la estructura proteica) y a 412°C, que podría asociarse a la estructura entrecruzada con GTA, que presenta mayor resistencia térmica (Figura III.10 .a2).

Tabla III.2. Parámetros de degradación térmica de las películas

	Muestra	IPDT (°C)	2da. Etapa (185-546°C)		Mres 800°C (%)
			Tmax ¹	Tmax ²	
Moldeo por casting	Ge	469	313	----	4.4
	GTA0.5	424	314	----	6.7
	GTA1	399	322	----	1.4
	GTA3	406	330	412	1.2
	BDGE05	523	323	----	8.0
	BDGE1	536	324	----	8.9
	BDGE3	642	313	----	23.4
	BDGE5	515	304	----	12.7
MPC* 30%Gly	Ge	438	256	318/333	7.6
	SD5	458	263	318/333	8.1
	SD10	556	267	318/333	15.0
	SD30	634	268/282	333	18.8

*MPC: moldeo por compresión

Para las películas entrecruzadas con BDGE se observa una disminución en la velocidad de degradación para contenidos de hasta 1%BDGE, y luego un incremento para concentraciones superiores (Figura III.10.b1). A partir del análisis de las curvas de la Figura III.10.b2 se observa que existe un corrimiento del máximo de degradación de aproximadamente 20°C para las películas menos entrecruzadas indicando una mayor estabilización térmica. A partir de ese valor, el efecto se invierte, observándose una disminución del máximo de degradación para la película con 5%BDGE (Tabla III.2).

En cuanto al SD todas las películas exhiben dos máximos de degradación para la etapa de análisis (Figura III.10.c2). La primera asociada a la presencia de almidón y la segunda a la gelatina. A medida que se incrementa el porcentaje de agente entrecruzante, se incrementa la estabilidad térmica de las películas, siendo el efecto más marcado para una concentración del 30% en masa (Tabla III.2).

La formación de estructuras más reticuladas influirá en la respuesta mecánica de los materiales tratados químicamente. La Figura III.11, representa una curva típica de tensión-deformación de los ensayos de tracción realizados sobre las películas de gelatina entrecruzadas con diferentes porcentajes de GTA. Las películas entrecruzadas con BDGE no pudieron ser analizadas por su elevada fragilidad.

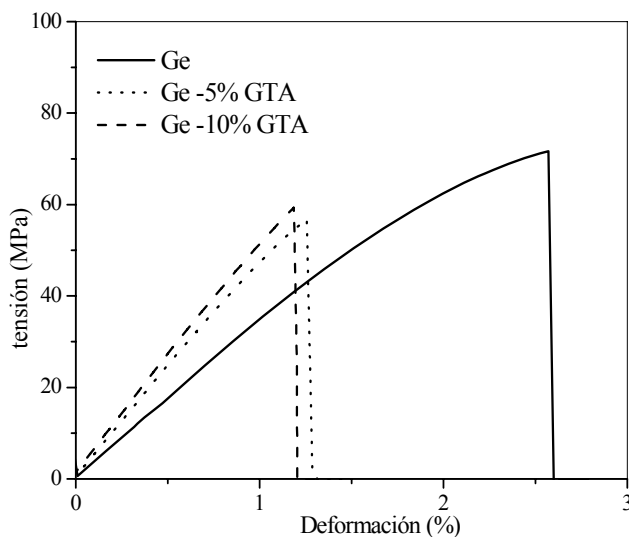


Figura III. 11. Curvas tensión-deformación de las películas de Ge-GTA.

Todas las películas tratadas con GTA y control, mostraron un comportamiento típicamente frágil caracterizado por un valor de tensión a la rotura alto y bajo porcentaje de elongación. Como puede observarse en la Figura III.11 sólo las películas con

contenidos de GTA menores que 1% pudieron ser analizadas debido a que mayores contenidos de GTA conducen a películas altamente entrecruzadas y frágiles que no pueden ser analizadas en ausencia de plastificante.

Los valores de las propiedades mecánicas determinadas se resumen en la Tabla III.3. El módulo elástico se incrementó con el contenido de GTA en concordancia con el desarrollo de una estructura más rígida debido al entrecruzamiento químico. Los resultados obtenidos concuerdan con los informados por [Bigi y col. \(2001\)](#) para formulaciones similares. El alto módulo obtenido para la película de gelatina control (3.7GPa) se relaciona con la considerable cohesión entre cadenas de gelatina ([Bigi y col. 1998](#); [Chiellini y col. 2001a](#); [Gennadios 2002](#)). Por lo tanto, la adición de plastificantes resultó imprescindible. Los plastificantes actúan interrumpiendo las fuerzas intermoleculares entre cadenas peptídicas y ayudan a incrementar la movilidad de cadenas, que conducen a un incremento en la elongación con la concomitante reducción del módulo ([Jerez y col. 2005](#); [Vanin y col. 2005](#)).

Tabla III.3. Parámetros mecánicos de películas de Ge-GTA. Secas en estufa de vacío a peso constante

	Grupos amina reacc. (%)	E (GPa)	Elongación a la rotura (%)	Tensión de rotura (MPa)
Ge	0	3.7±0.2	2.5±0.4	75.2±12.6
GTA05	75.8±0.3	4.7±0.1	2.1±0.8	76.1±19.6
GTA1	93.5±0.2	4.9±0.2	1.3±0.3	56.0±15.3

A fin de analizar el efecto de plastificación sobre las propiedades mecánicas, se adicionó el mismo porcentaje de glicerol a todas las películas. Como ya se había mencionado previamente, las películas entrecruzadas con SD debieron plastificarse con 30%Gly para poder procesarlas. Por lo tanto, a fin de mantener constante este valor, se agregó 30%Gly a las formulaciones de Ge-GTA y Ge-BDGE.

La Figura III.12 a-b, representa las curvas de tensión-deformación de los ensayos de tracción realizados sobre los películas de gelatina entrecruzadas con GTA y con BDGE y plastificadas con 30%Gly. Se observa que el comportamiento es análogo en presencia de ambos agentes de entrecruzamiento. La adición de plastificante produce un incremento en el porcentaje de elongación, acompañado de una clara fluencia (Figura III.12). El incremento en la elongación se encuentra contrabalanceado con una disminución en el módulo elástico, comparado con el de su contraparte sin plastificar (Tabla III.4). [Chiellini y col. \(2001a\)](#), observaron resultado similares para de gelatina

plastificadas y entrecruzadas con GTA. Las películas de Ge/30Gly exhibieron endurecimiento por deformación durante el ensayo de tracción. Esto se evidenció por el emblanquecimiento de las probetas y se asocia a que las cadenas proteicas se ordenan por efecto del estiramiento y se producen interacciones de tipo puente de hidrógeno entre ellas que mejoran las propiedades mecánicas del material. Basados en este fenómeno [Bigi y col. 1998](#) obtuvieron películas de Ge con una mejora en las propiedades mecánicas. Esto no se observa en las películas entrecruzadas ya que el entrecruzamiento restringe la movilidad de las cadenas.

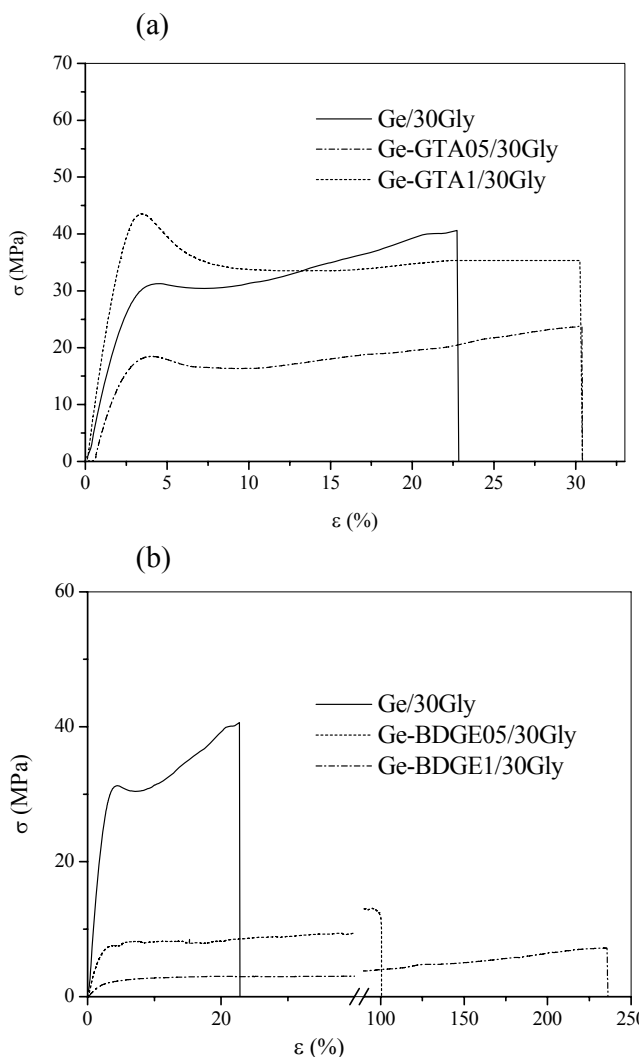


Figura III.12. Curvas tensión-deformación de películas entrecruzadas con adición de 30% de Gly. (a) GTA, (b) BDGE.

El análisis de la Tabla III.4 revela que el BDGE produce un efecto más marcado que el GTA en las propiedades mecánicas. En particular, se observa que la adición de porcentajes de BDGE del orden del 3% (o mayores) produce una disminución en el

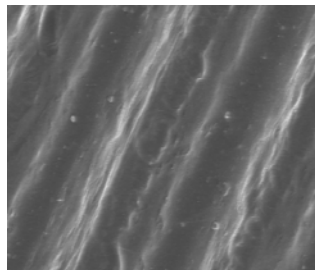
valor del módulo y elongación a la rotura. [Zeeman y col. \(1999\)](#), obtuvieron resultados similares para colágeno con BDGE y atribuyen esto al hecho de que a elevadas concentraciones de BDGE se generan gran cantidad de grupos pendientes que provocan una disminución en la elongación del material.

Tabla III.4. Parámetros mecánicos de películas entrecruzadas con 30%masa de Gly. Secas en estufa de vacío a peso constante

Plastificante 30%Gly	Grupos amina reacc. (%)	E (MPa)	Elongación a la rotura (%)	Tensión de rotura (MPa)
Ge	0	1113 ± 123	20.7 ± 3.2	45.9 ± 2.5
GTA05	75.9±0.3	696 ± 83	30.4 ± 2.2	33.3 ± 4.7
GTA1	93.5±0.2	1536 ± 264	30.4 ± 11.7	33.9 ± 2.4
BDGE 05	44.8±0.1	304.6 ± 22.3	95.6 ± 10.2	13.0 ± 1.2
BDGE1	55.4±0.1	568 ± 70	235.6 ± 8.7	6.8 ± 0.5
BDGE3	71.5±0.2	79.7 ± 12.1	65.6 ± 37.9	13.0 ± 2.2

A fin de analizar en profundidad el comportamiento observado para las películas entrecruzadas con BDGE y plastificadas, se analizaron por SEM las superficies de fractura de las películas ensayadas en tracción. Los resultados revelaron que las morfologías de los materiales evoluciona con el incremento de BDGE desde una estructura compacta, suave y sin defectos para un contenido de 1%BDGE (Figura III.13 a), hacia una microestructura con dominios dispersos para concentraciones de BDGE mayores de 3% (Figura III.13.b) característica de una película donde se produce separación de fases inducida por evaporación del solvente ([Menut y col. 2008](#)). Este comportamiento puede atribuirse a que para éstas concentraciones se encontraría cerca del límite de miscibilidad del agente entrecruzante y el solvente utilizado, y explica el cambio observado para contenidos mayores de 3%BDGE en las propiedades mecánicas. Este comportamiento del sistema Ge-BDGE limita su aplicación para los fines propuestos pero merece un estudio sistemático más profundo.

(a) Ge-BDGE1



(b) Ge-BDGE5

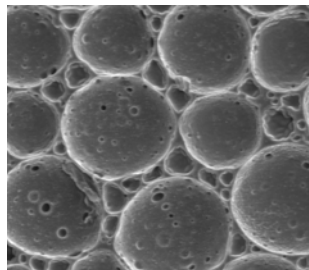


Figura III. 13. Microfotografía de las superficies de las películas

La Figura III.14 presenta una curva típica de tensión deformación para las películas entrecruzadas con 5 y 10%SD y plastificadas con 30%Gly, procesadas por moldeo por compresión.

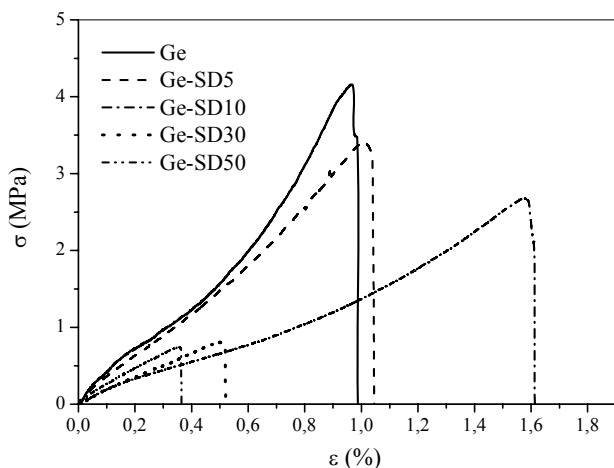


Figura III.14. Curvas tensión-deformación de películas de Ge-SD.

La Tabla III. 5 exhibe los parámetros mecánicos obtenidos. Se observa que para concentraciones de hasta 10%SD aumenta la elongación a la rotura y disminuye el módulo elástico del material comparados a la película de Ge control. Esto puede atribuirse a la longitud de cadena del entrecruzante que le permite actuar como un efectivo plastificante interno. El entrecruzamiento que involucra al SD (agente entrecruzante polimérico) no puede compararse al de compuestos de bajo peso molecular que incrementan la rigidez de las películas (Gennadios y col. 1998; Lim y col. 2002). El enlace covalente de las cadenas de SD a la cadena proteica, no produce una restricción severa de la matriz polimérica, por lo que mejora las propiedades mecánicas del material obtenido; siendo óptimas para 5% SD donde el valor del módulo y la tensión de rotura no presentan tanto cambio y se gana en flexibilidad. Gennadios y col. (1998) obtuvieron resultados similares para películas basadas en proteínas presentes en la clara del huevo observando que la formulación con 5%de SD presentó las mejores propiedades mecánicas.

Es importante mencionar que no es posible realizar una comparación directa entre los resultados obtenidos para las películas entrecruzadas con SD (producidas por moldeo por compresión, con 30% de Gly) y los observados para películas entrecruzadas con BDGE y GTA (producidas por *casting*, con 30% de Gly). Sin embargo, del análisis de las Tablas III.4 y 5 se puede concluir que las formulaciones que mostraron las

mejores propiedades fueron Ge-GTA1/30Gly y Ge-BDGE1/30Gly, Ge-SD5/30Gly y Ge-SD10/30Gly. Por lo tanto, estas películas se seleccionaron para analizar el efecto del entrecruzamiento sobre la resistencia a la humedad.

Tabla III.5. Parámetros mecánicos de películas de Ge-SD/30Gly

HRE: 75%	Grupos amina reacc. (%)	E (MPa)	Elongación a la rotura (%)	Tensión de rotura (MPa)
Ge	0	3.7 ± 0.7	96.9 ± 11.9	3.9 ± 1.0
SD5	64.2 ± 0.2	3.5 ± 0.7	158.2 ± 23.6	3.5 ± 0.3
SD10	84.9 ± 0.2	1.9 ± 0.3	111.8 ± 12.1	2.7 ± 0.4
SD30	97.7 ± 0.1	2.0 ± 0.3	55.3 ± 12.9	1.1 ± 0.5
SD50	97.8 ± 0.3	2.6 ± 0.3	30.9 ± 5.8	0.7 ± 0.1

La baja resistencia a la humedad de los materiales basados en gelatina es tal vez, la mayor limitación que éstos presentan para ser utilizados en aplicaciones técnicas ([Chiellini y col. 2001a](#); [Bigi y col. 2001](#); [Gennadios 2002](#)). El agua es un plastificante ubicuo que puede formar puentes de hidrógeno con los grupos polares de la gelatina y de esta manera hincharla, haciendo que las películas pierdan estabilidad dimensional y sean mas susceptibles tanto a degradación hidrolítica como al ataque por microorganismos ([Klamer y col. 2004](#); [Abrusci y col. 2006](#)). En general, los plastificantes (polihidroxilados) interactúan con los grupos hidrofílicos no reaccionados de la gelatina (ej.: OH, COOH, NH₂) por interacciones de tipo puente de hidrógeno. Estas interacciones sumadas a los enlaces covalentes generados por entrecruzamiento químico, disminuyen considerablemente el volumen libre de la red, y así la absorción de agua ([García y col. 2000](#)).

La absorción de humedad de las películas entrecruzadas y plastificadas se evaluó por inmersión de las muestras en agua y determinando gravimétricamente el incremento de masa en función del tiempo. La Figura III.15 representa las curvas obtenidas. Se observa que las curvas muestran dos zonas bien definidas: a tiempos < 15 minutos la absorción de agua es rápida, mientras que en la segunda zona la velocidad disminuye hasta alcanzar un valor de equilibrio. La película control Ge/30Gly es la que absorbe más agua, de manera constante y que no alcanza el equilibrio al menos en el tiempo del experimento (120 minutos). Tiempos mayores de ensayo mostraron que la masa de la película control comienza a disminuir, probablemente debido a la hidrólisis de la cadena peptídica ([Chiellini y col. 2001b](#)).

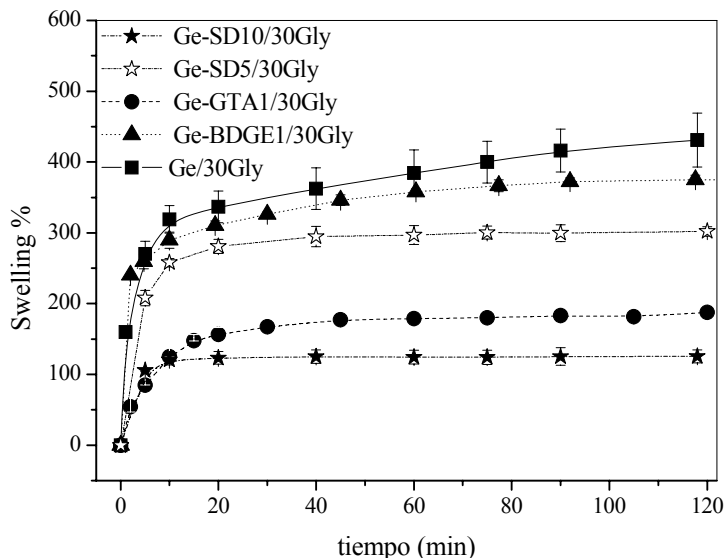


Figura III.15. Absorción de agua de películas de Ge entrecruzadas y plastificadas

La película que resultó más estable fue la Ge-SD10/30Gly (absorbe aproximadamente 100% en el equilibrio). Una explicación plausible para este comportamiento es que el plastificante y la cadena polihidroxilada del agente de entrecruzamiento interactúen con los grupos polares de la gelatina, disminuyendo la capacidad de absorción de las películas. Las películas entrecruzadas con 5%SD y 1%BDGE resultaron las menos estables, en concordancia con una menor grado de entrecruzamiento. Por lo tanto se puede inferir que las películas más estables en ensayos de absorción de agua por inmersión fueron las Ge-SD10/30Gly y Ge-GTA1/30Gly.

El comportamiento de estas películas y el de sus pares sin plastificar también se evaluó en condiciones de humedad ambiente del 75%. Las curvas de absorción se ajustaron por la ecuación empírica de Peleg (Capítulo II- Ecuación II.13) ([Peleg 1988](#); [Nashed y col. 2003](#)). La Figura III.16 muestra el ajuste de los valores experimentales para diversas películas entrecruzadas. Nuevamente, las películas entrecruzadas con GTA y SD, tanto plastificadas como sin plastificar, resultaron las más estables. La presencia de plastificantes incrementa levemente el máximo de absorción para ambos materiales (aproximadamente 5%, Fig. III.16.a) respecto de sus contrapartes sin plastificar (Fig. III.16.b). Por su parte, la película Ge-BDGE1/30Gly resultó ser aún menos estable que la película Ge/30Gly control (Fig. III.16.a).

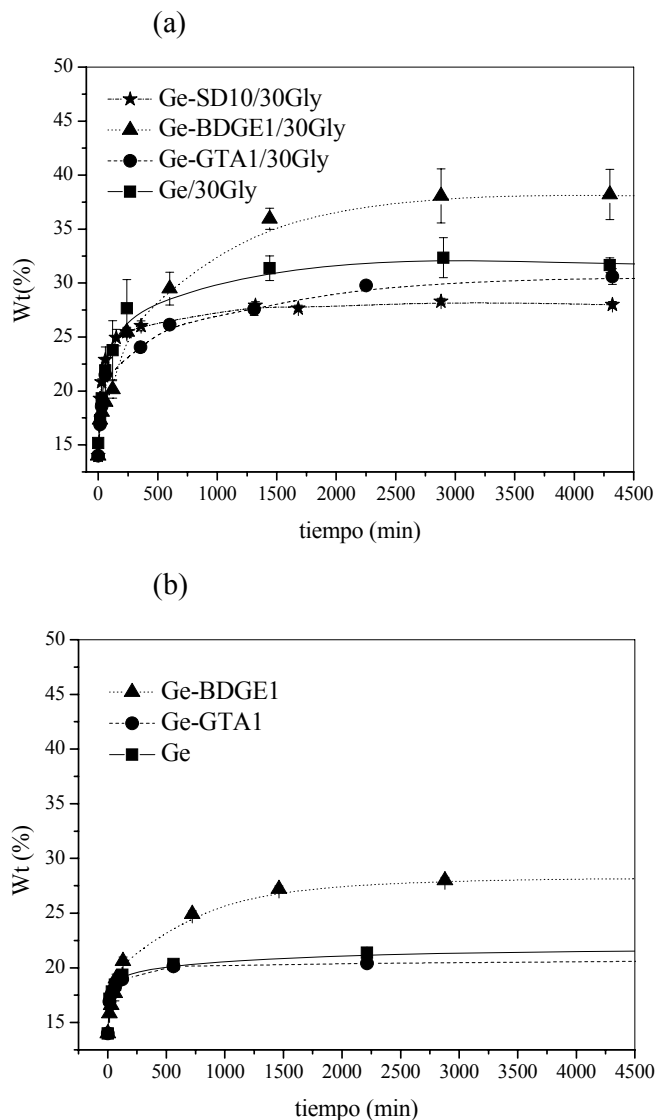


Figura III.16. Ajuste de los datos experimentales de absorción de agua (HRE75%), por la ecuación de Peleg para diversas películas entrecruzadas. Puntos: datos experimentales, líneas: ajuste del modelo (a) películas plastificadas 30%Gly, (b) sin plastificar.

En la Tabla III.6 se resumen los valores de las constantes K_1 y K_2 obtenidas del ajuste para cada una de las películas evaluadas. El valor de K_1 se asocia a la capacidad de absorción inicial del sistema y el de K_2 a la capacidad de absorción final. Un incremento en el valor de estas constantes implica una reducción de la capacidad de absorción correspondiente. A partir de los parámetros de ajuste recopilados en la Tabla III.6, se deduce que el comportamiento varía para los distintos agentes. Esto está relacionado con la estructura de cada uno de ellos. Para el GTA se produce un leve incremento de K_2 , asociado a una disminución de la capacidad de absorción de agua. El

GTA posee una cadena hidrocarbonada corta y una alta eficiencia de entrecruzamiento. Esto favorece la formación de una red más densa, con disminución de volumen libre y consumo de grupos hidrofílicos por lo que exhibe la menor capacidad de absorción en el equilibrio ([Gontard y col.1992](#); [Zeeman 1998](#); [Marquié y Guilbert 2002](#)). Esto se observa tanto en el sistema sin plastificar como en el plastificado.

Para el caso del BDGE, se observa un incremento del valor de K_1 , comparado con el obtenido para la película de gelatina control, siendo el efecto más marcado que para el GTA. Esto se asocia a los dos tipos de estructuras que se generan cuando actúa este agente: grupos pendientes o *masking* y entrecruzamiento de cadenas y a la presencia de grupos polares con capacidad de generar enlaces de hidrógeno con la matriz. (Figura III.5, [Zeeman 1998](#)).

Tabla III.6. Parámetros de ajuste de la ecuación empírica de Peleg a los datos experimentales de absorción de humedad. HRE 75%

HRE: 75%	K_1(min/%)	$K_2 * 10^2$(%⁻¹)	r^2	W_E (%)
Ge	4.1 ± 0.7	13.6 ± 0.5	0.97	21.7 ± 0.1
Ge-BDGE1	15.4 ± 1.7	6.8 ± 0.2	0.99	28.0 ± 0.4
Ge-GTA1	4.2 ± 0.5	15.3 ± 0.3	0.98	20.7 ± 0.2
Ge/30Gly casting	4.4 ± 0.4	5.6 ± 0.1	0.99	31.5 ± 0.5
Ge-BDGE1/30Gly	11.9 ± 1.5	3.9 ± 0.3	0.98	37.4 ± 0.3
Ge-GTA1/30Gly	6.4 ± 1.4	6.3 ± 0.2	0.97	29.9 ± 0.1
Ge-SD10/30Gly	2.3 ± 0.2	7.2 ± 0.1	0.99	27.9 ± 0.4
Ge/30Gly (MPC)	9.4 ± 1.0	6.7 ± 0.15	0.99	28.7 ± 1.0

MPC: moldeo por compresión

En cuanto al SD, el entrecruzamiento reduce considerablemente el valor de K_1 , indicando una mayor velocidad de absorción inicial. Este comportamiento se debe a las características hidrofílicas de la larga cadena de unidades D-glucosa presentes en su estructura polimérica ([Gennadios y col. 1998](#); [Lim y col. 2002](#)).

Es importante analizar el efecto que produce la adición de plastificantes. Se observa que el valor de K_2 de las películas plastificadas se reduce en aproximadamente un 50% comparado a sus pares sin plastificar (Tabla III.6). Esto indica una mayor capacidad de absorción final debida a la capacidad de los plastificantes polihidroxilados de interactuar con el agua ([Gennadios 2002](#)).

A partir de las curvas de absorción, pueden determinarse los valores de los coeficientes de difusión aparentes de las películas (D_{app}) (Capítulo II- Ecuación II.15). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III.7.

Tabla III.7. Coeficientes de difusión en 75% de HRE. T: 25°C.

	Espesor (mm)	$D_{app} * 10^8$ (cm ² /s)
Ge	0.21 ± 0.01	2.6 ± 0.7
Ge/30Gly casting	0.18 ± 0.03	6.8 ± 1.2
Ge-GTA1	0.19 ± 0.01	3.2 ± 0.6
Ge-GTA1/30Gly	0.21 ± 0.02	0.6 ± 0.1
Ge-BDGE1	0.20 ± 0.03	0.7 ± 0.1
Ge-BDGE1/30Gly	0.21 ± 0.01	0.4 ± 0.0
Ge/30Gly MPC	0.20 ± 0.01	2.3 ± 0.6
Ge-SD10/30Gly	0.29 ± 0.01	4.5 ± 0.7

MPC: moldeo por compresión

Para todas las películas el comportamiento del D_{app} se correlaciona con la tendencia observada en la constante K_1 de la ecuación de Peleg (Tabla III.6). El incremento en el grado de entrecruzamiento conduce a una estructura más densa que dificulta la difusión de las moléculas de agua a través de la película. La adición de plastificante refuerza este efecto dado que introduce enlaces de tipo puente de hidrógeno con la matriz que disminuye la disponibilidad de grupos hidrofílicos durante el primer estadio de absorción. Una excepción es el caso del SD, para el cual los valores de D_{app} obtenidos son superiores a los de Ge control, debido a que actúa como plastificante interno. Los valores numéricos obtenidos son similares a los informados en bibliografía, de 3×10^{-8} cm²/seg para películas basadas en caseinato y almidón ([Buonocore y col. 2003](#)) y 1.76×10^{-9} cm²/seg para películas de almidón plastificado ([Anglés y Dufresne 2000](#)).

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de absorción a 75% confirman que la película Ge-BDGE1/30Gly es la que presenta la menor resistencia a la humedad, incluso menor que la de la película control. Por lo tanto, se puede concluir que las formulaciones que conducen a una mejora en las propiedades térmicas, mecánicas y de resistencia a la humedad son Ge-SD10/30Gly y Ge-GTA1/30Gly.

Finalmente y a fin de confirmar la aptitud potencial de las películas Ge-SD10/30Gly y Ge-GTA1/30Gly para el diseño de envases, se determinó la permeabilidad al vapor de agua (WVP). Los valores obtenidos fueron de $2.6 \pm 0.2 \times 10^{-13}$

Kg.m/Pa.s.m² para la película de Ge-GTA1/30Gly y $1.7 \pm 0.05 \times 10^{-13}$ Kg.m/Pa.s.m² para la de Ge-SD10/30Gly, en concordancia con la capacidad de absorción de agua de cada sistema.

El análisis global de los resultados obtenidos permite concluir que la formulación Ge-SD10/30Gly presenta el mejor conjunto de propiedades sumado a la ventaja adicional de que el SD que presenta baja citotoxicidad ([Wilson 1959](#)) lo que abre nuevas oportunidades para su aplicación en envases alimentarios.

III.4. Conclusiones parciales

Se obtuvieron materiales basados en gelatina modificada con tres agentes químicos: glutaraldehído, almidón dialdehído polimérico y butildiglicidil éter.

El glutaraldehído resultó ser el agente de entrecruzamiento más eficiente. La alta densidad de entrecruzamiento generada produce la contracción de las películas lo que restringe la estabilidad dimensional de las mismas y limita su aplicación en el área de envasado. La adición de 30% de glicerol a Ge-GTA1 permitió obtener una formulación con propiedades mecánicas adecuadas y bajo contenido de GTA, sin embargo éste agente presenta efectos citotóxicos.

En cuanto al BDGE, el agregado de hasta 3 % permitió obtener películas térmicamente más estables que la Ge control. Dada la elevada fragilidad de las películas fue necesario adicionar un 30% de glicerol como plastificante. Se observó que la única formulación con posibilidades de competir con las películas entrecruzadas con GTA fue Ge-BDGE1/30Gly; sin embargo presentó menor resistencia a la humedad que Ge/30Gly control. Cabe destacar que las películas con mayor concentración del entrecruzante exhibieron una disminución en sus propiedades mecánicas asociada a un cambio en la morfología del material. Esto puede atribuirse a un proceso de separación de fases inducido por evaporación del solvente.

Las películas entrecruzadas con SD exhibieron una mejora en la estabilidad térmica comparadas con las películas control. Las propiedades mecánicas resultaron óptimas para concentraciones de 5-10%SD, donde el valor del módulo y la tensión de rotura disminuyen levemente comparadas a Ge/30Gly, con un incremento en la ductilidad del material de hasta un 50%. La resistencia al agua de la película Ge-SD10/30Gly resultó superior a todas las analizadas con igual concentración de plastificante, observándose una disminución de la absorción de agua por inmersión de alrededor de un 250% comparado con la película control.

El análisis global de los resultados obtenidos permite concluir que la formulación Ge-SD10/30Gly presenta el mejor conjunto de propiedades, sumado a la ventaja adicional de que el SD presenta baja citotoxicidad ([Wilson 1959](#)) lo que abre nuevas oportunidades para su aplicación en envases alimentarios

III.5. Referencias

- Abrusci C.**, Marquina D., Del Amo A., Corrales T., Catalina F. A viscometric study of the biodegradation of photographic gelatin by fungi isolated from cimetographic films. *Inter. Biodeter Biodegr* 58, 3-4 (2006) 142-149
- Akin H.**, Hasirci N. Preparation and characterization of crosslinked gelatin microspheres. *J. Appl. Polym. Sci.* 58 (1995)95-100
- Anglés M.N.** y Dufresne A. Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Analysis. *Macromolecules* 33 (2000) 8344-8353
- Apostolov A.A.**, Boneva D., Vassileva E., Mark J.E., Fakirov S. Mechanical Properties of Native and Crosslinked Gelatins in a Bending Deformation. *J. Appl. Polym. Sci.* 76 (2000) 2041-2048
- Apostolov A.A.**, Fakirov S. Evstatiev M., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable Laminates Based on Gelatin, 1. Preparation and Mechanical Properties. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 693-697
- Arvanitoyannis I.S.**, "Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings" en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed., Ed. A. Gennadios; CRC Press, 2002; 275-304
- 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 (2003) 147-152
- Bigi A.**, Bracci B., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials* 19 (1998) 2335-2340
- Bigi A.**, Borghi M., Cojazzi G., Fichera A.M., Panzavolta S., Roveri N. Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *J. Therm. Anal. Cal.* 61 (2000) 451-459
- 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 (2001) 763-768
- Bigi A.**, Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K. Stabilization of gelatine films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 23 (2002) 4827-4832
- Buonocore G.G.**, Del Nobile M.A., Di Marino C., Gambacorta G., La Notte E., Nicolais L. Modeling the water transport properties of casein-based edible coating. *J Food Eng* 60 (2003) 99-106
- Butler M. F.**, Yiu-Faing, Pudney P.D.A. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 41 (2003) 3941-3953
- Charulatha V.**, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials* 24 (2003) 759-767
- Chatterji P.R.** Gelatin with hydrophilic/hydrophobic graft and glutaraldehyde crosslinks. *J. Appl. Polym. Sci.* 37 (1989) 2203-2212
- Chiellini E.**, Cinelli P., Grillo Fernandes, Kenawy El Refaye S., Lazzeri A. Gelatin-based blends and composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. *Biomacromolecules* 2 (2001a) 806-811
- Chiellini E.**, Cinelli P., Corti A., Kenawy El Refaye. Composite films based on waste gelatin: Thermal-mechanical properties and biodegradation testing. *Polym. Degrad. Stabil.* 73 (2001b) 549-555

- de Carvalho R.A.**, Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloid*. 18 (2004) 717-726
- Doyle C.D.** Estimating thermal stability of experimental polymers by empirical thermogravimetric analysis. *Anal. Chem.* 33 (1961) 77-79
- Filachione E.M.**, Harris M.L., Fern A.H., Korn J.N., Wells P.A. Tanning studies with dialdehyde starch. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 53 (1958) 77-85.
- Fraga A.N.**, Willimas R.J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer* 26 (1985) 113-118
- Galiotta G.**, Di Gioia L., Guilbert S., Cuq B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 3123-3130
- García M.A.**, Martino M.N., Zaritzky N.E. Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch/Stärke* 52 (2000) 118-124
- Gennadios A.**, Handa A., Froning G.M., Weller C.L., Hanna M.A. Physical properties of egg white-dialdehyde starch films. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1297-1302
- Gennadios A.** "Soft gelatine capsules" en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed.. Ed. A. Gennadios, CRC Press, 2002; 393-444
- Gontard N.**, Guilbert S., and Cuq J-L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* 57 (1992) 190-199
- Grevellec J.I.**, Marquie C., Ferry L., Crespy A., Vialettes V. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomacromolecules* 2 (2001) 1104-1109
- Honda I.**, Arai K, Mitomo H. Characterization of Croos-links introduced in gelatine. *J. Appl. Polym. Sci.* 64 (1997) 1879-1892
- Jayakrishnan A.**, Jameela S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* 17 (1996) 471-484
- Jerez A.**, Partal P., Martinez I., Gallegos C., Guerrero A. Rheology and processing of gluten based bioplastics. *Biochem. Eng. J.* 26 (2005) 131-138
- Jolley J.E.** The Microstructure of photographic gelatine binders. *Photographic Sci. Eng.* 14 (1970) 169-177
- Kaminska A.**, Sionkowska A. The effect of UV radiation on the values of thermal parameters of collagen containing b-carotene. *Polym. Degrad. Stabil.* 65 (1999) 87-90
- Klamer M.**, Morsing E., Husemoen T. Fungal growth of different insulation materials exposed to different moisture regimes. *Inter. Biodegr. Biodeter.* 54 (2004) 277-282
- Kozlov P.V.** The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* 24 (1983) 651-666
- Kosmala J.D.**, Henthorn D.B., Brannon-Peppas L. Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials. *Biomaterials* 21 (2000) 2019-2023
- Kuijpers A.J.**, Engbers G.H.M., Krijgsveld J., Zaat S.A.J., Dankert J. , Feijen J. Croos-linking and characterisation of gelatine matrices for biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 11 (2000) 225-243
- Lee J.M.**, Pereira C.A., Kan L.W.K. Effect of molecular structure of poly (glycidyl ether) reagents on crosslinking and mechanical properties of bovine pericardial xenograft materials. *J. Biomed. Mat. Res.* 28 (1994) 981-992
- Li P.**, Zheng J.P., Ma Y.L., Yao K.D. Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. II. Swelling behaviour. *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 322-328

- Lim L-T**, Mine Y., Britt I.J. Tung M.A., "Formation and properties of egg white films and coatings" en Protein-based films and coatings. 1era. Edicion. Editado por A. Gennadios. Lugar: Ed. CRC Press; **2002**, 233-250
- Lin F-H.**, Yao C-H., Sun J-S., Liu H-C., Huang C-W. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin. *Biomaterials* 19 (**1998**) 905-917
- March J.**, Smith M.B. "Aliphatic Substitution: Nucleophilic and Organometallic" en March's Advanced Organic Chemistry, 6ta.. Edicion. Editado John Wiley & Sons, Inc.; **2006**, 425-656
- 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 (**1997**) 922-926
- 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 Press; **2002**, 275-304
- Menut P.**, Su Y.S., Chinpa W., Pochat-Bohatier C., Deratani A., Wang D.M., Huguet P., Kuo C.Y., Lai J.Y., Dupuy C. A top surface liquid layer during membrane formation using vapor-induced phase separation (VIPS)—Evidence and mechanism of formation. *J. Mem. Sci.* 310, 1-2 (**2008**) 278-288
- Nashed G.**, Rutgers R. P. G., Sopade P. A. The Plasticisation Effect of Glycerol and Water on the Gelatinisation of Wheat Starch. *Starch/Stärke* 55 (**2003**) 131–137
- 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 (**1995**) 460-472
- Patil R.D.**, Mark J.E., Apostolov A., Vassileva E., Fakirov S. Crystallization of water in some crosslinked gelatins. *Eur. Polym. J.* 36 (**2000**) 1055-1061
- Park J.W.**, Whiteside W.S., Cho S.Y. Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. *LWT* x (**2007**) xxx-xxx
- Peleg M.** An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.* 53 (**1988**) 1216-1219
- Rhim J-W.**, Gennadios A., Weller C.L., Cezeirat C., Hanna M.A.. Soy Protein Isolate-Dialdehyde Starch films. *Ind. Crops Prod.* 8 (**1998**) 195–203
- Robinson I.D.** Rate of crosslinking of gelatine in aqueous solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 8 (**1964**) 1903-1918
- Rousseau C.F.**, Gagnieu C.H. In vitro cytocompatibility of porcine type I atelocollagen crosslinked by oxidized glycogen. *Biomaterials* 23 (**2002**) 1503-1510
- Schacht E.**, Bogdanov B., Van Den Bulcke A., De Rooze N. Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde. *React. Funct. Polym.* 33 (**1997**) 109-116
- Shechter L.**, Wynstra J., Kurkij R.P. Glycidyl ether reactions with amines. *Ind. Eng. Chem.* 48 (**1956**) 94-97
- Spence K.E.**, Jane J., Pometto A.L. Dialdehyde Starch and zein plastic: Mechanical properties and biodegradability. *J. Environ. Polym. Degrad.* 3 (**1995**) 69-74
- Sthornvit R.**, Krotcha J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* 50 (**2001**) 149-155
- Strauss G.**, Gibson S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloid.* 18 (**2004**) 81–89

- Sung H-W.**, Hsu H-L., Shih C-C., Lin D-S. Cross-linking characteristics of biological tissues with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials* 17 (1996) 1405-1410
- Tarasevich**, Koslov P.V. Reductive amination of oxygen-containing organic compounds, Russ Chem REV. 1999
- Vandelli M.A.**, Rivasi F., Guerrra P., Forni F., Arletti R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Int. J.Pharm.* 215 (2001) 175-184
- 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 (2005) 899-907
- Wilson R.H.** Utilization and Toxicity of Dialdehyde- and Dicarboxyl- Starches. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102 (1959) 735-737
- 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 (1985) 391-401
- WuJ.**, Chiu S-C., Pearce E.M., Kwei T.K. Effects of Phenolic Compounds on Gelation Behavior of Gelatin Gels. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 39 (2001) 224-231
- Wu Q.**, Zhang L. Properties and Structure of Soy Protein Isolate-Ethylene Glycol Sheets Obtained by Compression Molding *Ind. Eng. Chem. Res.*40 (2001) 1879-1883
- Xi T.**, Liu F. Effect of pretreatment with epoxy compounds on the mechanical properties of bovine pericardial bioprosthetic materials. *J. Biomat. Appl.* 7 (1992) 61-75
- Zeeman R.**; Cross-linking of Collagen-based Materials. Tesis doctoral, Universidad de Twente, 1998.
- Zeeman R.**, Dijkstra P.J., van Wachem P.B., van Luyn M.J.A., Hendriks M., Cahalan P.T., Feijen J. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials* 20 (1999) 921-931
- Zemanová I.**, Turková J., Capka M., Nakhapetyan L.A., Svec F., Kálal J. Effect of the nature of proteins on their coupling to different epoxide-containing supports. *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 229-232
- Zheng J.P.**, Li P.,Ma Y.L, DeYao K. Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposiote. I.Preparation and Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189-1194

Capítulo IV

Refuerzo con cargas inorgánicas

Capítulo IV

Refuerzo con cargas inorgánicas

En este capítulo se sintetizan películas de gelatina reforzadas con montmorillonita en ausencia de aditivos tales como plastificantes o agentes de entrecruzamiento. Esta parte del estudio se centra en analizar y evidenciar la presencia de interacciones entre la matriz y la carga y su efecto sobre las morfologías desarrolladas. Finalmente se evalúa el efecto de tales interacciones y morfologías sobre las propiedades finales.

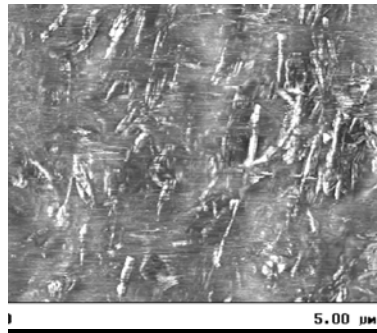


Figura IV. 1. Fotografía de HT-AFM de la superficie de fractura de Ge/10MMt

IV.1. Introducción

Con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera a gases de las películas de Ge, se combina la matriz proteica con silicatos en capas de origen natural de modo de producir nanocompuestos polímero/silicato eco-compatibles y biodegradables ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Zheng y col. 2002](#); [Yalcin y Cakmak 2004](#); [Ray y Bousmina 2005](#)). La presencia de nanocargas dispersas en la matriz actuará como barrera física al pasaje de oxígeno a través del nanocompuesto ([Pereira de Abreu y col. 2007](#)). Dado que las propiedades finales de estos materiales es fuertemente dependiente de la morfología obtenida, esta parte del estudio se centra en analizar y evidenciar la presencia de interacciones entre la matriz y la carga y su efecto sobre las morfologías desarrolladas.

Diferentes estrategias permiten preparar nanocompuestos de matriz polimérica basados en silicatos, siendo las más utilizadas: polimerización in-situ, intercalación en fundido y el método de intercalación en solución ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Zheng y col. 2002](#); [Ray y Bousmina 2005](#)). La afinidad de las proteínas con los silicatos se informa en la literatura ([De Cristofaro y Violante 2001](#); [Zheng y col. 2002](#); [Li y col. 2003](#); [Zheng y col. 2003](#); [Chaudhari y col. 2004](#); [Olabarrieta 2005](#)). Debido a su naturaleza hidrofílica, las proteínas pueden intercalarse fácilmente en las galerías de los filosilicatos ([De Cristofaro y Violante 2001](#)), lo que permite la obtención de los nanocompuestos mediante técnicas de disolución. En este proceso, la aplicación de cizalla durante el mezclado ayuda a la exfoliación y a la dispersión.

El objetivo de este capítulo está centrado en el análisis de la relación estructura - propiedades de películas de gelatina/montmorillonita (Ge/MMt).

IV.2. Preparación y caracterización de las películas

Los nanocompuestos basados en gelatina y montmorillonita (Ge/MMt) se prepararon por el método de intercalación en solución ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Olabarrieta 2005](#); [Ray y Bousmina 2005](#)). Este método se basa en el uso de un solvente en el cual el polímero sea soluble y el silicato pueda hincharse. Cuando ambas soluciones se mezclan en condiciones adecuadas, las cadenas poliméricas tienden a intercalarse y desplazar al solvente de las galerías del silicato (Figura IV. 2).

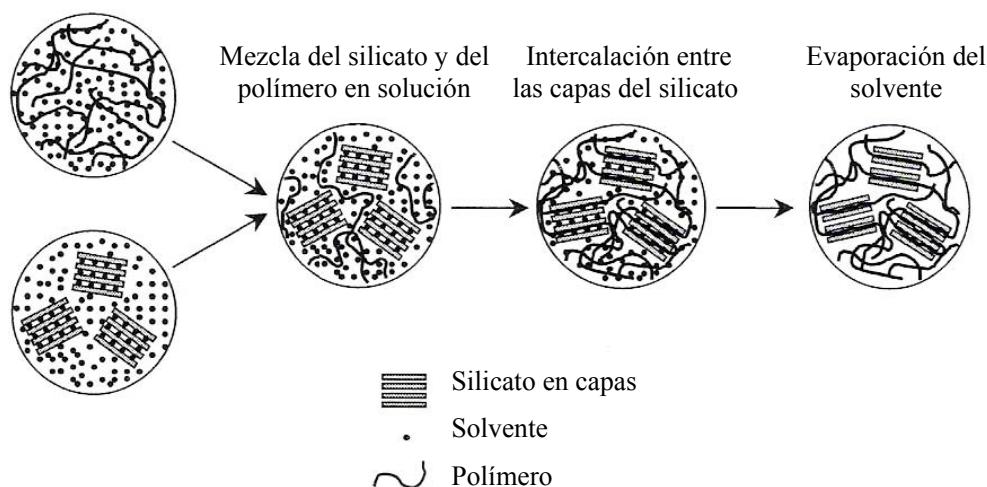


Figura IV. 2. Método de disolución para la obtención de nanocompuestos

Se siguió el procedimiento propuesto por [Zheng y col. \(2002\)](#) y [Li y col. \(2003\)](#). La Figura IV.3 muestra en forma esquemática los pasos del proceso. Básicamente, el polvo de Ge se hidrata con agua destilada en una relación 10g/100mL, a 50°C, pH 7 y bajo agitación constante hasta su completa disolución. En paralelo, distintas cantidades de MMt (1-20 %en masa de Ge) se dispersan por ultrasonido en agua destilada a 50°C durante 20 minutos. Finalmente, la solución de Ge y la suspensión de MMt se mezclan y se someten a agitación constante durante 15 minutos a 50°C. La suspensión resultante se vierte en moldes circulares cubiertos por material antiadherente y la evaporación del solvente se realiza en estufa a 35°C durante 15hs. El control sobre el volumen determinará aproximadamente el espesor final de las películas. Los materiales obtenidos se denominarán **Ge/YMMt**, donde Y corresponde al porcentaje en masa de la arcilla incorporada.

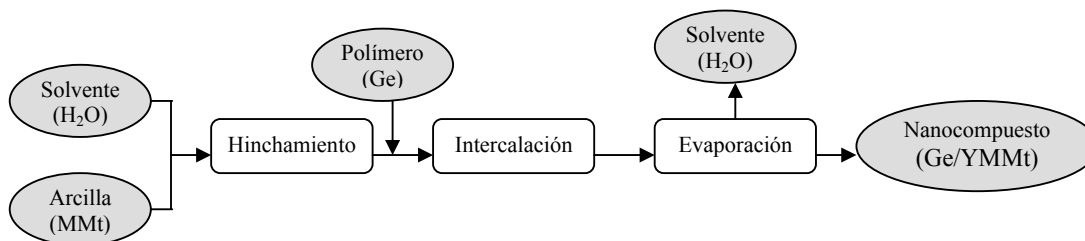


Figura IV. 3. Técnica para la obtención de películas de Ge/MMt. Evaporación del solvente por *casting*

Como ya se mencionó en el Capítulo III, las condiciones aplicadas durante el proceso de casting determinarán el estado conformacional que asumirá la Ge ([Koslov 1983](#)). Asimismo, la concentración de Ge en la solución original también afecta la conformación final obtenida. Cuanto más se acerca la temperatura de secado a la de la transición “triple hélice-ovillo al azar” se requiere de mayor concentración de Ge para obtener un alto grado de renaturalización ([Koslov 1983](#)). Por lo tanto, es necesario establecer las condiciones óptimas del proceso a fin obtener materiales reproducibles. Estas resultaron: concentración de la solución de Ge de 10g/100mL y una temperatura de mezclado de 50°C.

Otro parámetro a tener en cuenta en la preparación de las películas es el pH de las soluciones. Es necesario trabajar a un pH mayor de 5, dado que con mayor acidez puede producirse una alteración estructural de los filosilicatos ([Darder y col. 2003](#)). Por otro lado no hay que olvidar las características anfotéricas de la proteína, gobernadas por el punto isoeléctrico (pI) que es alrededor de 4.5-5 para la gelatina ([Informe técnico Rousselot](#)). Por lo tanto, el pH se fijó en 7, de manera que a este pH la proteína presenta una carga neta negativa. Estos grupos cargados negativamente pueden interactuar a través de interacciones de tipo puente de hidrógeno con los oxhidrilos presentes en las galerías de la arcilla, favoreciendo la exfoliación de la carga. Si el pH es aún más alto, las fuerzas repulsivas entre los aniones presentes en la gelatina y en la arcilla prevalecen sobre las interacciones de tipo puente de hidrógeno y, en consecuencia, restringen el grado de inserción del polímero ([De Cristofaro y Violante 2001](#); [Zheng y col. 2002](#); [Chen y Evans 2005](#)).

Finalmente, para promover una buena inserción del polímero en las galerías del silicato se procede a su dispersión en agua, mediante un tratamiento por ultrasonido. De este modo se produce el hinchamiento de la arcilla por hidratación de los cationes inorgánicos presentes en las galerías (Na^+) ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Pu Chen y Zhang](#)

[2006](#)). Para fijar el tiempo de tratamiento, se siguió la evolución de una dispersión de montmorillonita por DRX. La intercalación de las cadenas de polímero entre las capas de arcilla incrementa el espaciado d_{001} ([Zheng y col.2002](#); [Ray y Okamoto 2003](#); [Ryu y col. 2004](#)); conduciendo a un corrimiento en el pico de difracción hacia ángulos menores. Cuando se produce la exfoliación de la montmorillonita, no se evidencia ningún pico de difracción debido a que la distancia entre láminas excede los 8 nm (para las estructuras ordenadas) o bien porque no se presenta orden en la estructura final obtenida.

La Figura IV.4 representa los resultados de DRX obtenidos para Ge/MMt con distintos tiempos de sonicado. Luego de 20 minutos (Figura IV.4.a), se observa que el pico original de la Cloisita ($2\theta = 7.3$ que corresponde a un espaciado en el plano (d_{001}) calculado por la ecuación de Bragg, $\lambda = 2 d \sin \theta$, de 1.21 nm), se ensancha y casi desaparece en el compuesto. La ausencia de un pico en DRX se asocia a un espaciado mayor entre las placas de silicato (exfoliación) o con una dispersión desordenada en el compuesto (intercalación). Tiempos mayores de sonicación (30 minutos), conducen a estructuras aglomeradas, fácilmente observables por microscopía óptica. Menores tiempos (del orden de 10 minutos), conducen al ensanchamiento de la banda original de la MMt, relacionado con estructuras intermedias entre exfoliadas e intercaladas (Figura IV.4.b).

Como conclusión, para obtener nanocompuestos Ge/MMt homogéneos, se fijaron las siguientes condiciones experimentales: concentración de gelatina 10g/100mL, temperatura de mezcla 50°C, pH 7, tiempo de aplicación de ultrasonido: 20 minutos y temperatura de secado: 35°C.

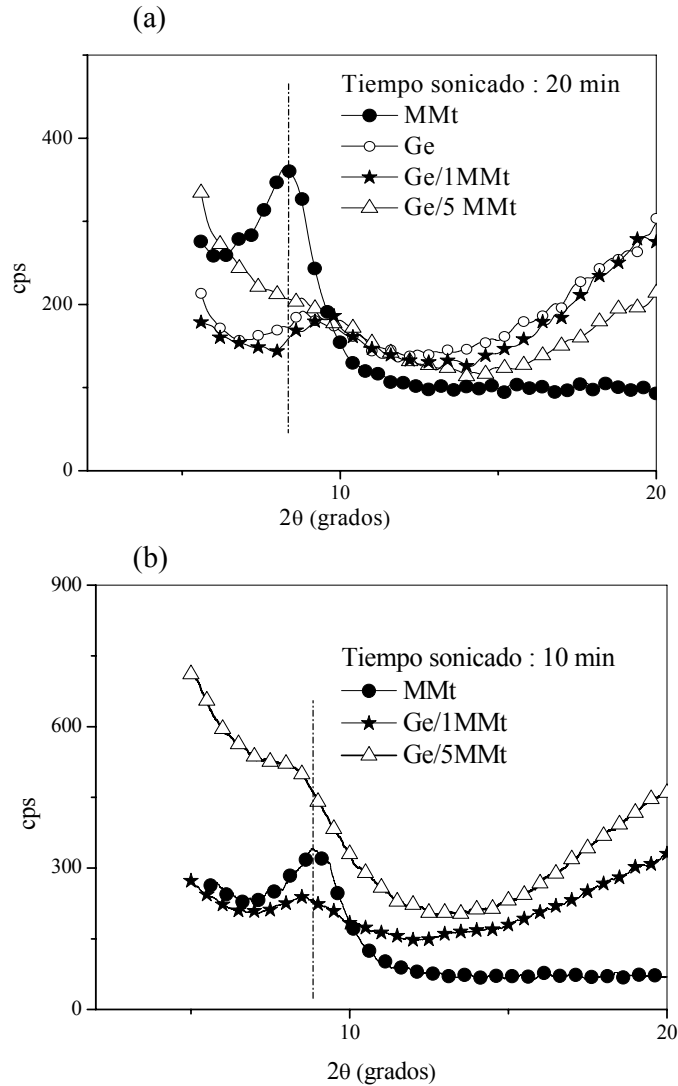


Figura IV. 4. Patrones de difracción de rayos de películas de Ge/MMt.

Aspecto macroscópico de las películas de Ge/MMt

La Figura IV.5 muestra el aspecto macroscópico de las películas de gelatina con MMt (0-15%). Se observa que las mismas son transparentes aún para los porcentajes más altos, lo que sugiere que no hay separación macroscópica entre los componentes durante la formación del nanocompuesto. La montmorillonita parece estar homogéneamente dispersa en la matriz ([Matsumura y Glasser 2000](#); [Liu y col. 2003](#)).

La coloración amarillenta se asociada a la presencia de arcilla y se incrementa con el aumento de carga en la matriz

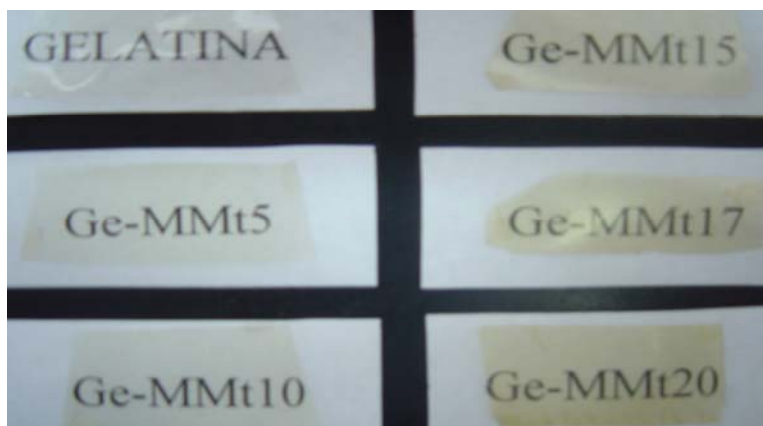


Figura IV. 5. Aspecto macroscópico de películas de gelatina con MMT obtenidas por *casting*.

La Tabla IV.1 exhibe los valores de opacidad obtenidos para las películas de Ge/MMt. Como puede observarse se produce un incremento con el contenido de arcilla, sin embargo, para todos los porcentajes las películas se mantienen transparentes.

Los valores hallados para las películas de Ge/MMt se compararon con los de películas de almidón informados en la literatura ([Mali y Zaritsky 2004](#)). Los valores se encuentran en el rango de 85 - 100 UA*nm y los autores asocian estos valores a películas transparentes. Si se considera que los valores determinados para Ge/MMt varían entre 25 y 94 UA.nm (Tabla IV.1), la transparencia es aún mayor.

Tabla IV. 1. Opacidad de películas de Ge/MMt.

	Opacidad (UA.nm)	Espesor (mm)
Ge	25.9 ± 3.3	0.14 ± 0.05
Ge/5MMt	28.8 ± 3.8	0.18 ± 0.03
Ge/10MMt	64.0 ± 2.2	0.22 ± 0.01
Ge/15 MMt	94.6 ± 6.6	0.22 ± 0.03

IV.3. Resultados y Discusión

Se utilizaron dos técnicas complementarias para caracterizar las morfologías desarrolladas, DRX y microscopía de fuerza atómica (AFM).

La Figura IV. 6 muestra los patrones de DRX de la arcilla y de las películas obtenidas con 0 a 17% de MMT. Se observa que el pico original de la MMT sódica se

ensancha y casi desaparece en los compuestos. La ausencia de un pico en DRX se asocia a un espaciado mayor entre las láminas de silicato (exfoliación) o con una dispersión desordenada en el compuesto que puede combinar exfoliación al mismo tiempo que intercalación. A medida que se incrementa el contenido de arcilla desde 1% hasta un valor crítico cercano al 10%, la agregación de las partículas de carga parece ser inevitable, y eso se evidencia por un hombro en el patrón de difracción en 4.3° (2.05 nm), indicando que la arcilla se encuentra sólo parcialmente exfoliada. Por otra parte, las películas de Ge presentan un pico de difracción en $2\theta = 8.6^\circ$ asociado a la renaturalización de la triple hélice en la estructura de colágeno ([Bigi y col. 2000](#)). El agregado de MMt parece disminuir el grado de cristalinidad de la gelatina (alrededor de un 4%). En la Figura IV.6.a se observa que el pico de renaturalización disminuye a medida que el contenido de MMt aumenta. La presencia de las láminas o partículas de MMt parecen restringir la movilidad de las cadenas de gelatina y así, disminuyen la posibilidad de renaturalización de la triple hélice. La Figura IV.6.b se halla normalizada respecto a la película de Ge; se observa que el pico de MMt solo desaparece para 1% de MMt y se ensancha para contenidos de arcilla superiores.

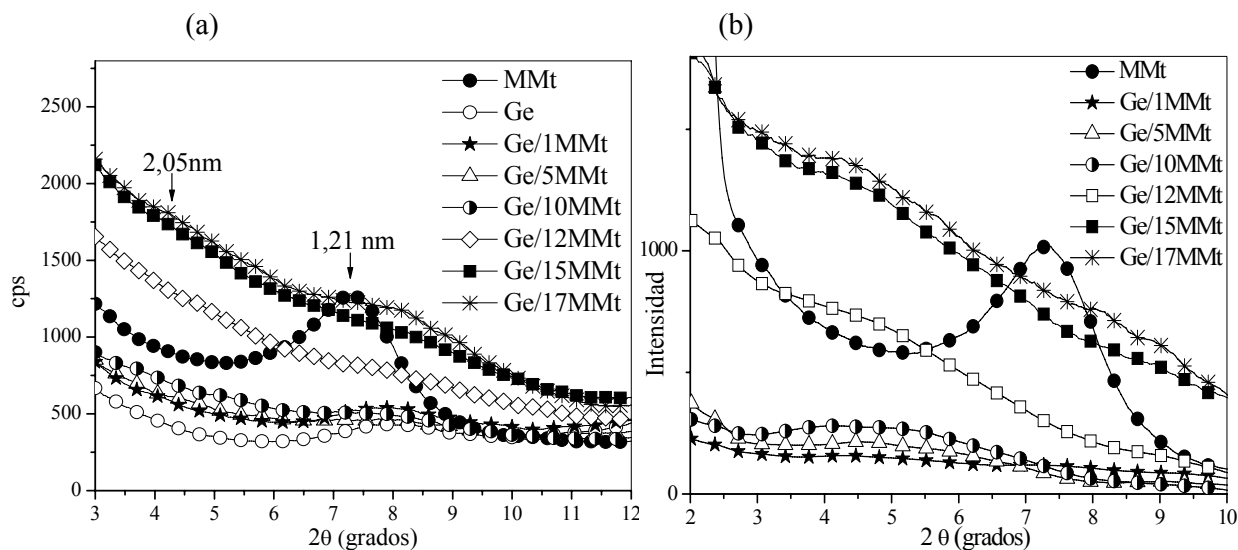
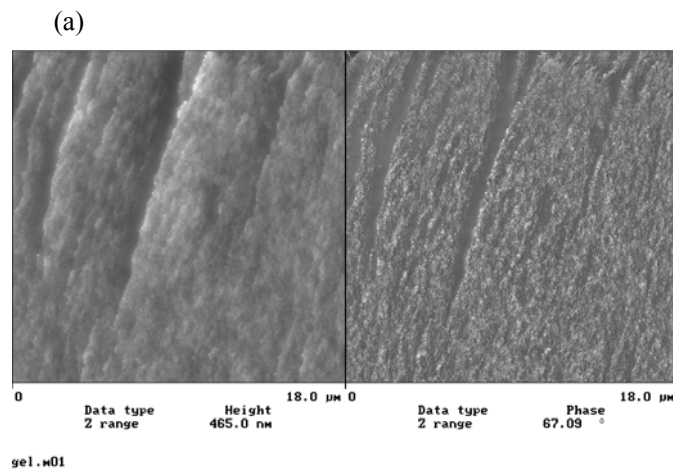


Figura IV. 6. (a) DRX de películas de Ge con carga. (b) normalizado respecto a Ge

A pesar de que DRX da una idea de la posible estructura del nanocompuesto, esta técnica falla cuando las partículas se encuentran exfoliadas. En estos casos, se recurre usualmente a la microscopía electrónica de transmisión (TEM) ([Le Baron y col.](#)

[1999](#); [Ray y Bousmina 2005](#)). Sin embargo, para el caso de la matriz de gelatina esta técnica es difícil de utilizar debido a que el corte con ultracriomicrotomo daña las muestras.

En este trabajo, se recurrió a la microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo *hard tapping* (HT), ya que es una poderosa herramienta que permite el estudio de las superficies de nanocompuestos en escala micrométrica y en algunos casos hasta nanométrica ([Becker y col. 2002](#); [Yalcin y Cakmak 2004](#)). La Figura IV.7 exhibe las imágenes de altura y fase obtenidas utilizando HT-AFM para muestras de Ge/MMt (0-15%) crio-fracturadas. La superficie de la gelatina pura (Figura IV.7. a) muestra algunas irregularidades atribuidas al proceso de *casting*. Por el contrario, en los materiales compuestos las partículas de silicatos se visualizan como líneas claras en las imágenes de fase (Figura IV.7. b-d) ([Viville y col. 2003](#); [Yalcin y Cakmak 2004](#); [Tao Jiang y col. 2005](#)).



cont.

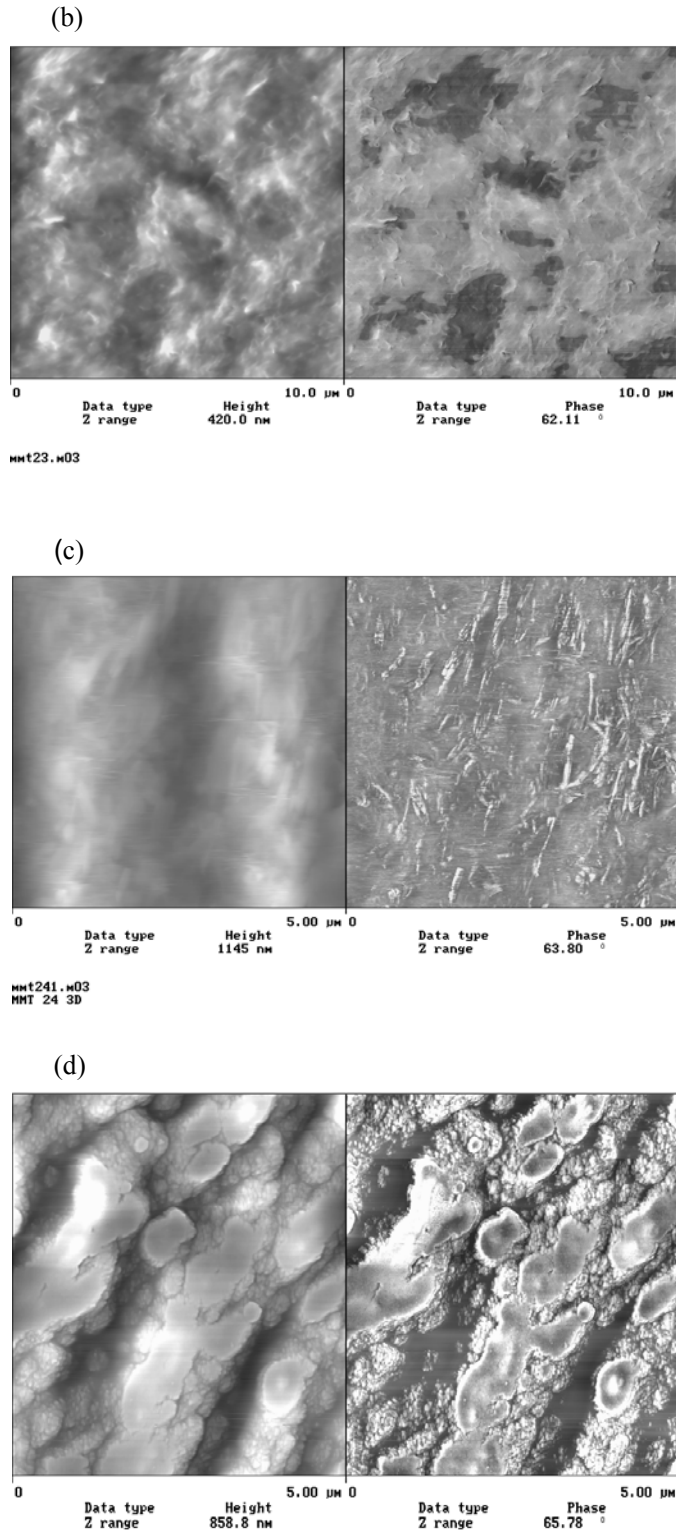


Figura IV. 7. Imágenes de HT-AFM (a) Ge; (b) Ge/5MMt (c) Ge/10MMt (d)Ge/15MMt

Las observaciones de AFM permiten inferir que las morfologías generadas cambian de exfoliadas a exfoliadas/intercaladas y aún a aglomeradas a medida que se incrementa el contenido de arcilla en la matriz. Con bajos contenidos de arcilla (entre 1 y 5%p/p) pueden observarse las láminas de arcilla delaminadas, dispersadas homogéneamente en la matriz polimérica; indicando la exfoliación del nanocompuesto (Figura IV. 7.b). La Figura IV.7.c muestra que contenidos de arcilla de un 10%p/p llevan a una morfología principalmente intercalada, donde la distribución de las capas de arcillas no es homogénea y se producen pequeños aglomerados. Para concentraciones de arcilla mayores se observa la aglomeración de la arcilla en la matriz debido a las restricciones espaciales impuestas (Figura IV.7.d) ([Yalcin y Cakmak 2004](#); [Jiang y col. 2005](#)).

Con el objetivo de analizar la presencia de interacciones específicas entre la arcilla y la gelatina en los nanocompuestos se utilizó la técnica de FTIR. Interacciones entre la matriz y arcilla ya han sido evidenciadas para otros biopolímeros y polímeros biodegradables reforzados con arcillas ([Viville y col. 2003](#); [Huang y col. 2004](#); [Chen y Evans 2005](#); [Pu Chen y Zhang 2006](#)).

Estructuralmente, la superficie de las galerías de la montmorillonita contiene grupos Si-O-Si y -OH, que son sitios potenciales para la formación de enlaces tipo puente de hidrogeno con moléculas que contengan grupos aceptores de protones, como el enlace peptídico de proteínas ([Pu Chen y Zhang 2006](#)). Por lo tanto, el efecto de estas potenciales interacciones de hidrógeno, debe tenerse en cuenta cuando se analiza la intercalación de proteínas en las galerías cargadas negativamente de la arcilla. Los espectros de FTIR obtenidos para películas de gelatina, compuestos y montmorillonita pura se muestran en la Figura IV. 8.

En la Figura IV.8.a pueden distinguirse las bandas amida I (estiramiento C=O) y amida II (deformación N-H y estiramiento C-N) en 1656 y 1541 cm^{-1} , respectivamente. La banda amida III, en torno a los 1200 cm^{-1} , se halla en una zona compleja donde no solo se observan las absorciones correspondientes a los enlaces amida (estiramiento C-N y deformación en el plano N-H), sino también vibraciones de los grupos CH₂ de la glicina y de las cadenas laterales de prolina ([Sionkowska y col. 2004](#)). Es importante destacar que las bandas amida I y II presentan multiplicidad para contenidos de arcilla entre 1 y 10% p/p, esto indica la formación de enlaces tipo puente de hidrogeno entre los enlaces peptídicos y los grupos de la MMT (Si-O-Si y OH) ([Pu Chen y Zhang 2006](#)). Este efecto desaparece para mayores porcentajes de arcilla, debido a que la superficie de

contacto con la matriz disminuye por pasar de una estructura exfoliada a intercalada. Resultados similares fueron informados por [Pu Chen y Zhang 2006](#) para nanocompuestos de proteína de soja y montmorillonita.

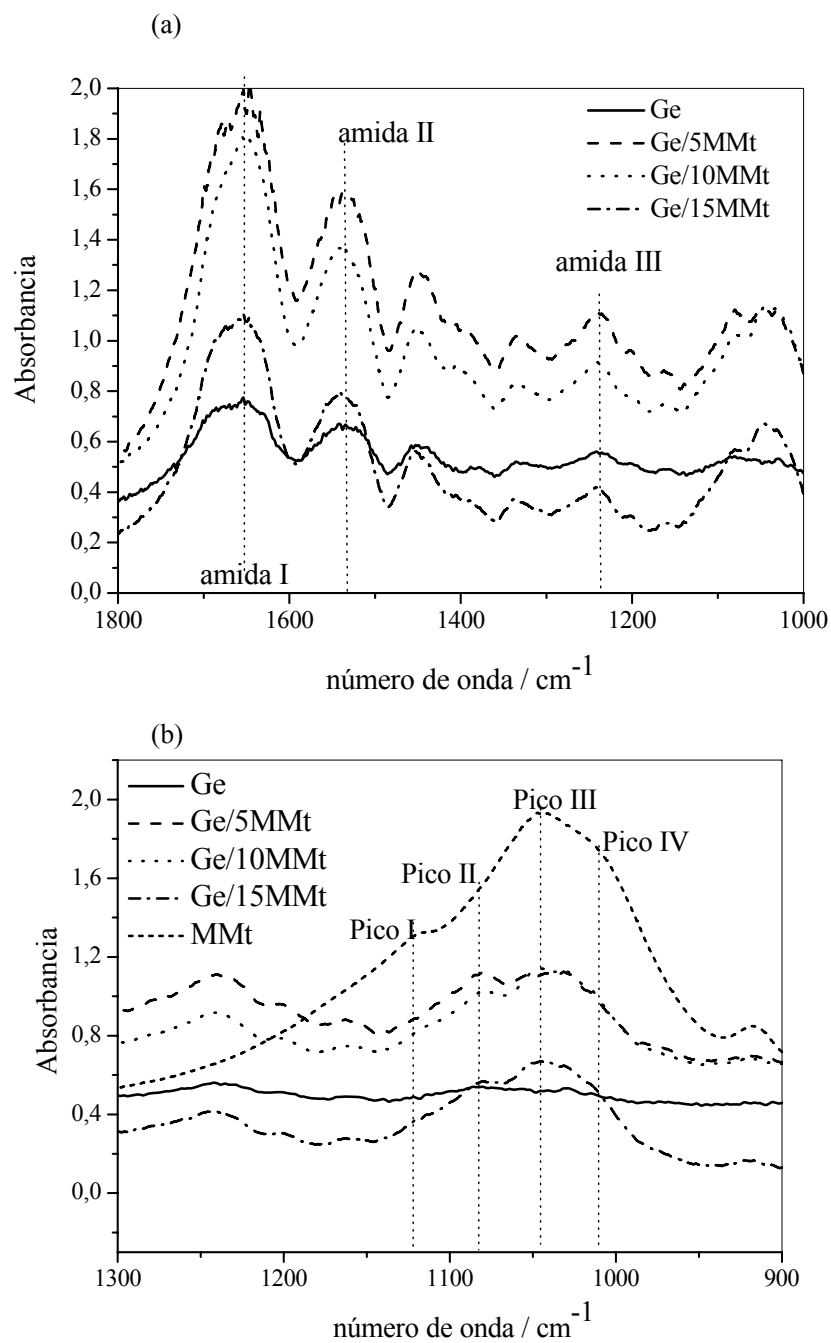


Figura IV. 8. Espectros FTIR de las películas (a) entre 1800-1000 cm^{-1} y (b) entre 1300-900 cm^{-1}

La zona correspondiente a las vibraciones de los grupos Si-O de la arcilla se representa en la Figura IV.8.b, por deconvolución del espectro original pueden definirse 4 picos: 1120 (I), 1081 (II), 1046 (III) y 1002 (IV) cm^{-1} . Los picos I, III y IV se asignan a los estiramientos en el plano del enlace Si-O ([Johnston y Premachandra 2001](#); [Pu Chen y Zhang 2006](#)). Por otra parte el pico II se atribuye a vibraciones fuera de plano, relacionadas a la orientación de las capas de arcilla ([Pu Chen y Zhang 2006](#)); el incremento en la intensidad de esta banda tiene una conexión directa con el desorden de las capas de arcilla ([Chen y Evans 2005](#)). El pico II se halla mas definido en los compuestos (Figura IV.8.b), indicando que la presencia de gelatina interfiere en el ordenamiento de las capas de arcilla. Estos resultados sugieren que la interacción que se genera entre la gelatina y la arcilla favorece la formación del nanocompuesto, llevando a una mayor dispersión de las capas de arcilla entre las que se localiza la matriz polimérica. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por AFM y DRX.

Otra técnica que apoya los resultados observados en FTIR es la determinación de la polaridad de la superficie de las películas. La Tabla IV.2 resume los valores de ángulo de contacto determinados por goniometría. Se observa que a medida que se incrementa la carga, la polaridad de la superficie (X_p) disminuye.

Tabla IV.2. Medida de ángulo de contacto, energía interfacial con sus componentes polares y dispersivos y fracción polar de la superficie de las películas obtenidas.

	$\theta_{\text{diiodometano}}(^{\circ})$	$\theta_{\text{etilenglicol}}(^{\circ})$	X_p (%)
Ge	21.9±1.6	21.4±2.3	11.1
Ge/5MMt	23.2±1.1	25.8±2.1	9.7
Ge/10MMt	22.0±2.0	27.9±2.7	8.3
Ge/15MMt	21.8±1.4	28.0±2.1	8.2

La presencia de interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la gelatina y la arcilla reduce la polaridad neta de la película. Para contenidos de carga superiores al 10% la polaridad superficial ya no se modifica. Este resultado concuerda con las morfologías observadas, donde para contenidos de carga superiores a 10% la carga se encuentra aglomerada en algunas zonas. Sin embargo, como surge de los estudios de opacidad y HT-AFM, estos agregados parecen tener dimensiones nano o micrométricas.

Uno de los principales inconvenientes de las películas basadas en gelatina es su higroscopicidad, por lo tanto, cualquier mejora en la resistencia al agua es de gran importancia para su uso ulterior como material técnico.

El comportamiento del material se evaluó en condiciones de humedad ambiente controlada al 75%. La Figura IV.9 muestra los valores experimentales y el ajuste de los datos a través de la ecuación empírica de Peleg (Capítulo II-2.2.11).

Se observan dos zonas bien definidas en la curvas de absorción: a cortos tiempos donde la absorción es rápida ($t < 200$ min) y a tiempos largos donde la velocidad de absorción decrece a medida que se alcanza el equilibrio.

La ecuación de Peleg ([Peleg 1988](#); [Nashed y col. 2003](#)) se aplica para determinar los valores de K_1 y K_2 , relacionados la velocidad de transferencia de masa y a la capacidad de absorción máxima del material, respectivamente. Los parámetros de ajuste se resumen en la Tabla IV.3. Acorde a lo esperado, se observa un incremento en el valor de K_1 con el contenido de arcilla, asociado a una menor velocidad de absorción inicial.

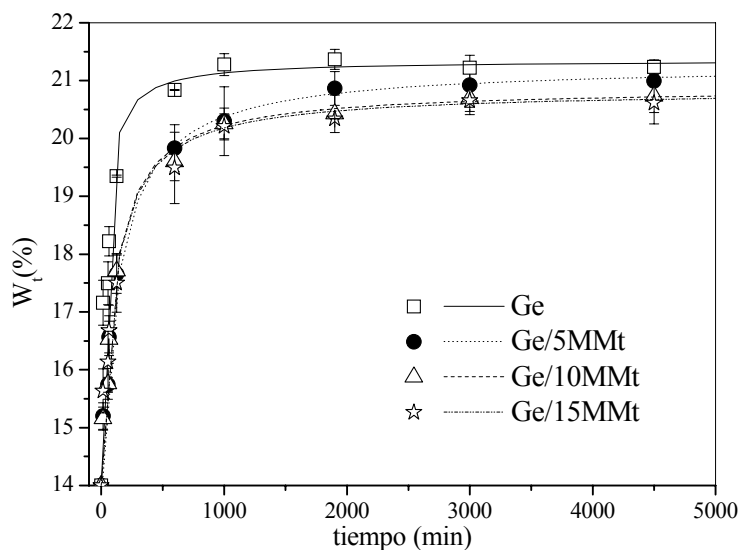


Figura IV.9. Ajuste de los datos experimentales por la ecuación de Peleg.

Esta mejora está directamente relacionada a la dispersión de la arcilla en la matriz, a su estado de agregación (exfoliada y/o intercalada) y a la presencia de interacciones efectivas entre la gelatina y la arcilla que reducen la polaridad neta del material y finalmente, su capacidad de interactuar con el agua. Se observaron resultados similares en nanocompuestos de metilcelulosa y MMt ([Rimduisit y col. 2007](#)); en

nanocompuestos de almidón/quitosano/MMt ([Kampeerappun y col. 2007](#)) y sobre nanocompuestos de polulano–almidón ([Kristo y Biliaderis 2007](#)).

Es importante remarcar que los compuestos con 10 y 15% de MMt exhiben un comportamiento muy similar (Figura IV.9). Esto concuerda con las morfologías observadas por HT-AFM (Figura IV.7 c-d) y con los valores de polaridad superficial obtenidos (Tabla IV.2). Como ya se mencionó, porcentajes de arcilla mayores al 10% resultan difíciles de dispersar en la matriz debido a restricciones geométricas ([Yalcin y Cakmak 2004](#); [Jiang y col. 2005](#)). Por otra parte, estas películas no exhiben una mejora en la capacidad de absorción final asociada a la característica hidrofílica de la arcilla, que solo actúa incrementando el camino tortuoso en el período inicial de absorción.

Tabla IV. 3. Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg a los datos experimentales de absorción de humedad. HRE 75%

HRE: 75%	$K_1(\text{min}/\%)$	$K_2 \cdot 10^2 (\%^{-1})$	r^2	$W_E (\%)$
Ge	4.1 ± 0.7	13.6 ± 0.5	0.97	21.7 ± 0.1
Ge/5MMt	17.7 ± 3.3	13.4 ± 0.6	0.97	21.5 ± 0.3
Ge/10MMt	15.2 ± 1.7	14.5 ± 0.4	0.99	21.0 ± 0.2
Ge/15MMt	15.4 ± 3.3	14.6 ± 0.8	0.97	21.1 ± 0.1

A partir de los datos de absorción pueden extraerse los valores de D_{app} . (Tabla IV.4). Se observa una disminución del coeficiente de difusión con el agregado de arcilla, en correlación con lo observado para absorción de humedad (constante K_1 de la ecuación de Peleg, Tabla IV.3). Para las películas con 5% de arcilla el efecto sobre el coeficiente es más marcado, probablemente debido a que la cantidad de material exfoliado es aún relevante para ese porcentaje.

Debido a la naturaleza hidrofílica de las películas de proteínas estas exhiben muy malas propiedades como barrera al vapor de agua ([Olabarrieta 2005](#)). La presencia de MMt dificulta el paso del agua debido a que ofrece un camino tortuoso para la difusión de la misma (Figura IV.10), lo que se ve reflejado, no solo en valor del coeficiente de difusión del material sino también como una disminución a la permeabilidad del vapor de agua (Tabla IV.4).

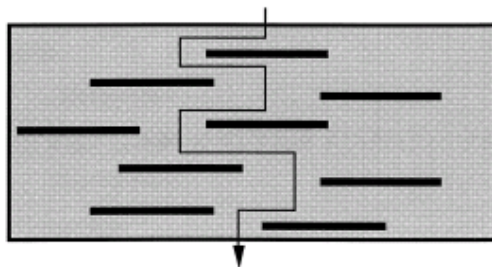


Figura IV.10. Tortuosidad del camino del permeante a través de una película cargada.

[Anglés y Dufresne \(2000\)](#) informan valores de 1.76×10^{-9} cm²/seg para películas de almidón plastificado y de 1.47×10^{-9} cm²/seg para las mismas con 6% de microfibras de celulosa. Ellos asocian este fenómeno a la presencia de una red de fibras de celulosa que estabilizan la matriz por interacciones de tipo puente de hidrógeno.

Tabla IV.4. WVP 65% de HRE. Coeficientes de difusión, 75% de HRE. T: 25°C.

	WVP *10 ¹³ (kg.m/Pa.s.m ²)	Espesor (mm)	D _{app} *10 ⁹ (cm ² /s)
Ge	1.7 ± 0.1	0.19 ± 0.01	21.8 ± 5.6
Ge/5MMt	1.6 ± 0.5	0.22 ± 0.01	4.5 ± 0.8
Ge/10MMt	0.7 ± 0.1	0.22 ± 0.01	7.2 ± 1.5
Ge/15MMt	0.5 ± 0.1	0.22 ± 0.03	5.0 ± 1.1

La obtención de las películas de Ge/MMt para su aplicación en la producción de laminados, requiere del estudio del efecto de la nanoestructura sobre la estabilidad térmica del material. [Zheng y col. \(2002\)](#) y [Li y col. \(2003\)](#) observaron un incremento en la estabilidad térmica de las películas de Ge con el agregado de arcilla para películas plastificadas y entrecruzadas con dextrano dialdehído. Sin embargo la estabilización térmica no solo depende del contenido de arcilla sino también de la morfología final obtenida (exfoliación/delaminación) ([Park y col. 2002](#)) y en el caso particular del trabajo de [Zheng y col. \(2002\)](#), a la competencia entre entrecruzamiento químico y físico, debido a la presencia de nanocarga.

El efecto de la presencia de arcilla sobre la estabilidad térmica de los compuestos fue analizado por análisis termogravimétrico en atmósfera inerte y a una velocidad de 10°C/min. La Figura IV. 11 representa las curvas de pérdida de masa obtenidas.

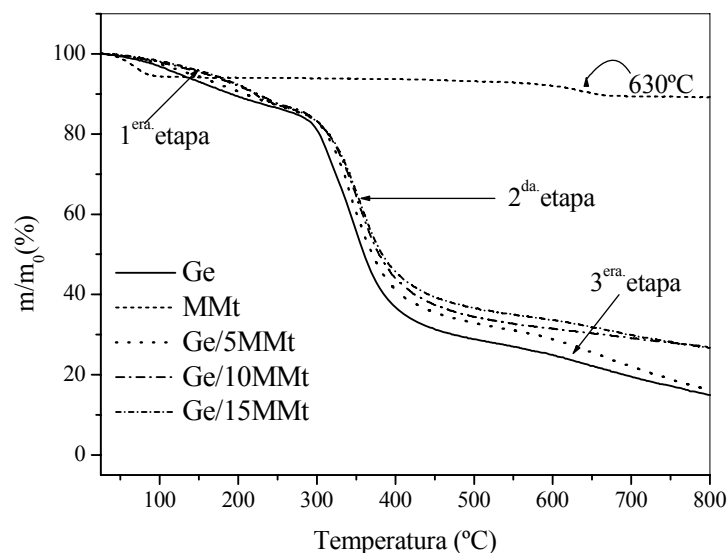


Figura IV. 11. Curvas de TGA normalizadas de los materiales compuestos. Atm: He, v: 10°C/min.

La Na^+ MMt exhibe una gran estabilidad térmica comparada con la gelatina. Como ya se describió en el Capítulo II la degradación térmica de la gelatina es un proceso gradual en tres etapas. La primera en el rango 70-220°C que se asigna a la pérdida de componentes de bajo peso molecular y agua; la segunda que se extiende hasta los 410°C relacionada a la degradación de la proteína ([Kaminska y Sionkowska 1999](#); [Barreto y col. 2003](#)) y la tercera $T > 600^\circ\text{C}$ asociada a la descomposición de estructuras más estables producidas por reacciones de entrecruzamiento durante el calentamiento ([Doyle 1961](#)).

La adición de MMt produce un corrimiento en el inicio de la degradación, siendo este efecto más evidente en la segunda etapa de degradación (220-410°C). En la Tabla IV.5 se exhiben los valores de los parámetros térmicos: temperatura de inicio de la degradación (T_0), velocidad máxima de la degradación ($T_{\text{máx}}$), contenido del residuo final a 800°C y el valor del IPDT (Capítulo II.2.10); cuyos valores expresan la forma de la curva de degradación ([Menon y col. 1996](#); [Sorum y col. 2001](#); [Wua y col. 2002](#)).

El parámetro T_0 es de gran importancia dado que establece la máxima temperatura de procesamiento que puede ser aplicada sin dañar térmicamente el material. Puede observarse en la Tabla IV.5 que los valores de T_0 y $T_{\text{máx}}$ se incrementan con el contenido de arcilla, siendo máximos para Ge/10MMt. Esto se asocia a la morfología exfoliada o parcialmente exfoliada-intercalada, que mejora la estabilidad térmica debido al entrecruzamiento físico que se genera ([Zheng y col. 2002](#)),

donde intervienen interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la arcilla y la gelatina, evidenciadas por FTIR (Figura IV.8). Mayores contenidos de arcilla conllevan a la aglomeración de la carga y la disminución de las interacciones estabilizantes. Estos resultados son similares a los informados en literatura para otros sistemas polímero/MMt, tales como los nanocompuestos basados en EVA ([Lim y col. 2002](#)).

Tabla IV.5. Parámetros de degradación térmica de las películas de Ge/YMMt

Muestra	Segunda etapa (220-410°C)		Residuo a 800°C (%p/p)	IPDT (°C)
	T ₀ (°C)	T _{max} (°C)		
Ge	302	344	14.7	524
Ge/5MMt	310	352	15.6	553
Ge/10MMt	311	358	26.5	855
Ge/15MMt	311	359	26.5	660

En cuanto a los valores de IPDT, éstos dan una idea de la estabilidad relativa de los compuestos considerando toda la curva de degradación ([Menon y col. 1996](#); [Wua y col. 2002](#)). Puede observarse un incremento de este parámetro hasta contenidos de un 10% MMt. Por sobre este porcentaje se observa una marcada disminución, que puede ser atribuida a la distribución heterogénea de las partículas aglomeradas en la matriz de gelatina y a una menor eficiencia en las interacciones de hidrógeno.

Finalmente, se observa que los compuestos presentan un incremento en el residuo final de degradación para concentraciones de hasta 10% de arcilla, lo que implica una menor pérdida de volátiles. Esto puede explicarse porque se produce una disminución en la difusión de los gases por la presencia de láminas dispersas en la matriz que actúan como barrera al calor ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Olabarrieta 2005](#)).

La mejora en la estabilidad térmica no sólo es atribuible a las propiedades de barrera inherentes de la MMt sino también al entrecruzamiento físico generado entre la gelatina y la carga. La presencia de estas interacciones se evaluó mediante una simple regla de mezclas ([Martucci y col. 2007](#)). La Figura IV.12. a-b , representan las curvas experimentales y calculadas por la regla de mezclas para la degradación en Helio y a 10°C/min.

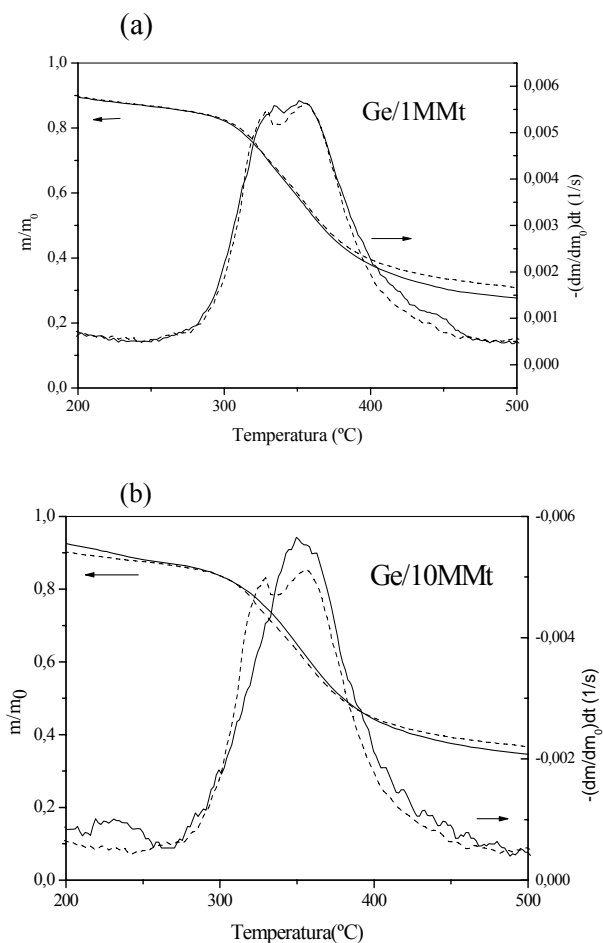


Figura IV.12. Curvas de TG/DTG para mezclas Ge/MMt en atmósfera inerte (He) y a 10°C/min. (—)Resultados experimentales (---) Regla de mezclas.

Para bajos contenidos de arcilla (Figura IV.12. a), las curvas predichas muestran pequeñas discrepancias con las experimentales, pero no presentan cambios ni en la temperatura de inicio (T_0) ni en la máxima velocidad de degradación ($T_{m\acute{a}x}$). A medida que se incrementa la concentración de MMt, aparecen interacciones estabilizantes /desestabilizantes, que producen desviaciones más marcadas de la curva predicha. Para Ge/10MMt, se observan las mayores desviaciones respecto de la curva predicha en todo el rango de temperaturas, siendo estas positivas (Figura IV.12. b). Estos resultados sugieren que la óptima estabilización térmica se obtiene para porcentajes de MMt entre 3-10 %. Valores inferiores a 3%, no presentan diferencias apreciables; y por encima de 10%, se produce un descenso de la estabilidad del compuesto, en concordancia con las morfologías generadas y la menor eficiencia en las interacciones gelatina-arcilla ([Martucci y col. 2007](#)).

Se realizaron ensayos dinámico-mecánicos que permiten observar la respuesta del material cuando éste se somete a una deformación constante como función de la temperatura. Los parámetros analizados fueron el módulo de almacenamiento (G') correspondiente a la respuesta elástica a la deformación aplicada, y $\tan \delta$ (G'/G'' = modulo de pérdida /módulo de almacenamiento) usado para determinar la temperatura de transición vitrea (T_g) del material. La Figura IV.13 exhibe los resultados obtenidos.

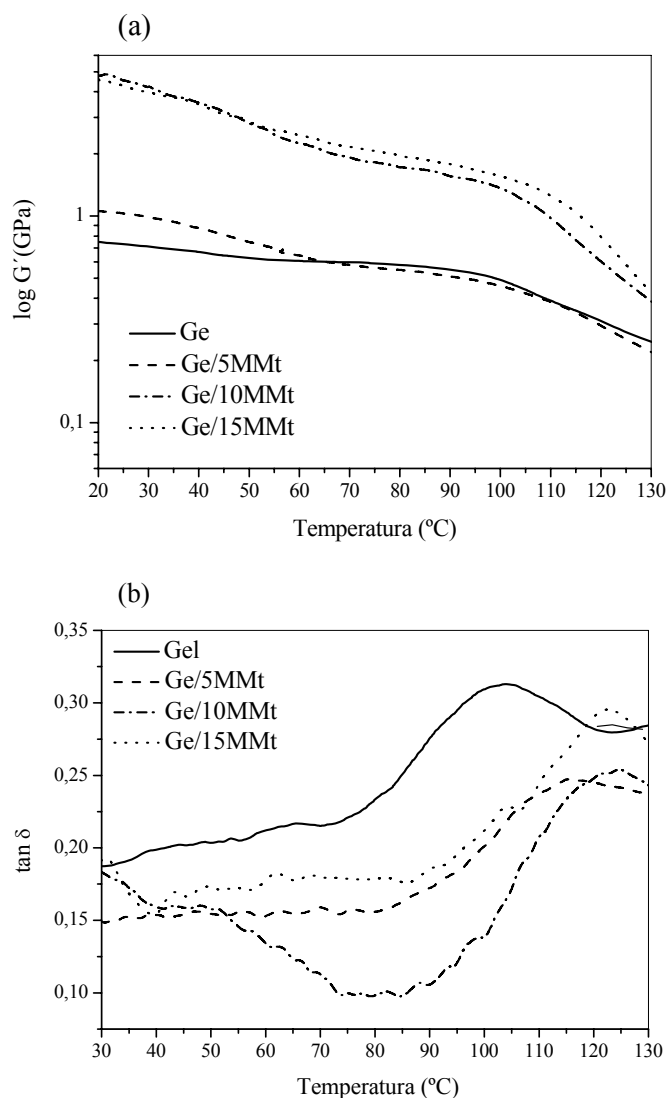


Figura IV.13. Ensayos dinámico-mecánicos, obtenidos a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y en atmósfera de N_2 .

(a) módulo de almacenamiento; (b) $\tan \delta$

Como puede verse, el valor de G' de las películas de Ge/10MMt y Ge/15MMt es superior al obtenido para la película de Ge control ($G'_{\text{Ge/10MMt}} = 4.5 \text{ GPa}$ y $G'_{\text{Ge}} = 0.74$

GPa, temperatura ambiente). Los materiales con contenidos mayores de 5% de MMt muestran un incremento en el valor de G' en todo el rango de análisis, esto indica que la adición de MMt puede incrementar la temperatura de uso de las películas de Ge. Un comportamiento similar se observó para otros sistemas proteína/MMt ([PuChen y Zhang 2006](#); [Tunc y col.2007](#)). Por otra parte, el valor de $\tan \delta$ (Figura IV.13. b) muestra un pico centrado en 104°C asignado a la Tg de los segmentos rígidos de la gelatina ([Fraga y Williams 1985](#)), y se corre levemente a temperaturas mayores con el incremento de MMt. El efecto máximo se observó para un agregado de 10% de arcilla, con un incremento de alrededor de 21°C en el valor de Tg, este resultado puede asociarse a que la MMt impone restricciones en el movimiento molecular de la matriz de gelatina, actuando como puntos de entrecruzamiento físico ([Sionkowska y col. 2004](#); [Hedenqvist y col. 2006](#)). El incremento en el módulo de almacenamiento y el desplazamiento del pico de $\tan \delta$ hacia mayores temperaturas indican una buena interacción entre la matriz y el refuerzo.

Es importante comentar, que los valores de módulo obtenidos por DMA solo pueden utilizarse como medidas cualitativas y no pueden ser relacionados a las medidas en tracción. Esto se debe a que el DMA presenta una dificultad en la obtención de curvas de G' repetitivas y los resultados indicados son un promedio de las tres curvas más similares obtenidas sobre un total de seis muestras analizadas. Sin embargo, los valores de las transiciones térmicas se presentaron en forma repetitiva en todas las muestras analizadas.

Al igual que las propiedades previamente analizadas, las propiedades mecánicas de estos materiales se hallan fuertemente relacionadas a la microestructura de los compuestos, es decir al grado de exfoliación de la arcilla en la matriz polimérica ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Ray y Okamoto 2003](#); [Zheng y col. 2003](#)). En general las películas formadas a partir de matrices proteicas, incluyendo las de Ge, exhiben una elevada fragilidad asociada a las interacciones entre sus cadenas ([Sothornvit y Krotcha 2001](#)). La Tabla IV.6 resume los valores de las propiedades mecánicas obtenidos para las películas de Ge/MMt. Como puede observarse las películas de Ge exhiben un elevado módulo de Young y una reducida elongación a la rotura, del orden de un 6%, debido a las restricciones impuestas por las atracciones entre los grupos polares. Por lo cual, estos materiales requieren de la adición de plastificantes para ser utilizados como materiales para aplicaciones técnicas ([Sothornvit y Krotcha 2001](#)).

En la Tabla IV.6 puede verse que los nanocompuestos de Ge/5MMt y Ge/10MMt (intercalados y exfoliados) presentan en general una significativa mejora en el módulo en tracción. El módulo de Young aumenta desde un valor de 5.2GPa para las películas de Ge a 6.6GPa para contenidos de MMt de 5% y luego se mantiene prácticamente constante. Este comportamiento indica que la capacidad de los silicatos para actuar como refuerzo se relaciona a su dispersión en la matriz y a la relación de aspecto de las partículas dispersas. El módulo mejora debido a la existencia de laminas de arcilla exfoliadas en la matriz polimérica para contenidos de hasta 10%p/p, como fue observado por HT-AFM (Figura IV.7).

Cabe destacar que un 1%p/p de MMt es suficiente para incrementar el módulo en un 10% sin reducción en la elongación a la rotura. En cambio, para contenidos mayores al 1%, la mejora en el modulo se acompaña con una marcada disminución de la elongación y en la tensión de rotura, indicando una disminución en la ductilidad del material (Tabla IV.6). La reducción en la tensión de rotura a elevados contenidos de arcilla, se asocia a una pobre distribución del relleno en la matriz (acorde a lo observado por HT-AFM en la Figura IV.7.d), que reduce las interacciones entre la arcilla y la Ge.

Tabla IV.6. Parámetros mecánicos de las películas de Ge/MMt (secas, Tamb.)

	E (GPa)	Elongación a la rotura (%)	Tensión de rotura (MPa)
Ge	5.2 ± 0.5	6.0 ± 2.4	128.1 ± 15.2
Ge/1MMt	5.7 ± 0.6	6.1 ± 1.9	122.9 ± 25.1
Ge/5MMt	6.6 ± 0.7	4.6 ± 0.8	111.6 ± 20.9
Ge/10MMt	6.6 ± 1.1	2.6 ± 0.3	79.0 ± 29.8
Ge/15MMt	6.7 ± 0.8	2.3 ± 0.7	96.6 ± 42.5

Velocidad de transmisión de oxígeno

Debido a la elevada fragilidad de las películas los ensayos de transmisión de oxígeno no pudieron ser efectuados; dado que el equipo requiere tamaños de muestras de 15 cm de diámetro.

IV.4. Conclusiones parciales

Se desarrollaron nanocompuestos basados en gelatina y montmorillonita para un amplio rango de concentraciones de arcilla sin modificar y en ausencia de plastificantes y agentes de entrecruzamiento químico. Se fijaron las condiciones de procesamiento de estos materiales. Esto condujo a la obtención de nanocompuestos con morfologías exfoliadas y exfoliadas/intercaladas indicando que la matriz presenta interacciones eficientes con la carga, como fue confirmado por FTIR.

La presencia de interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la gelatina y la arcilla reduce la polaridad neta de la película. Para contenidos de carga superiores al 10% la polaridad superficial ya no se modifica. Este resultado concuerda con las morfologías observadas, donde para contenidos de carga superiores a 10% la carga se encuentra aglomerada en algunas zonas. Las imágenes de AFM confirmaron la presencia de una distribución homogénea de las capas de silicatos en la matriz para contenidos de arcilla $\leq 10\%$, aunque no completamente exfoliada. Mayores cantidades de arcilla conllevan a la obtención de compuestos convencionales con partículas de tamaño microscópico dispersas en la matriz.

Se observó que las propiedades de los nanocompuestos se hallan íntimamente relacionadas con el contenido de arcilla y su distribución en la matriz. La presencia de hasta un 10% de arcilla reduce la afinidad de los compuestos por el agua, por efecto de las interacciones entre la Ge y la arcilla, que dejan menos grupos polares disponibles en la matriz disminuyendo la permeabilidad al vapor de agua de los nanocompuestos.

En cuanto a la respuesta mecánica de las películas, se observó un incremento en el módulo elástico (de hasta un 27%) y una disminución en la elongación a la rotura (de hasta el 24%) con el incremento del contenido de arcilla hasta un 5%, probablemente debido a que la cantidad de material exfoliado es aún relevante para ese porcentaje. Cantidades superiores de arcilla no producen un efecto significativo sobre el módulo, pero disminuyen la elongación y la tensión de rotura.

El análisis global de los resultados indica que la película de Ge/5MMt es la que presenta el mejor conjunto de propiedades. Sin embargo, la elevada fragilidad no hizo posible el análisis de las propiedades de barrera a oxígeno. Por tal motivo, a fin de obtener materiales técnicos, se considera necesario el agregado de plastificantes que mejoren la elongación a la rotura con mínimo impacto en el módulo elástico y en la resistencia a la humedad.

IV.5. Referencias

- Achet D.**, He X.W. Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer* 36 (1995) 787-790
- Alexandre M.**, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mat. Sci. Eng.* 28 (2000) 1-63
- Angles M.N.**, Dufresne A. Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Analysis. *Macromolecules* 33 (2000) 8344-8353
- Apostolov A.A.**, Fakirov S. Evstatiev M., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable Laminates Based on Gelatin, 1. Preparation and Mechanical Properties. *Macromol.Mater.Eng.* 287 (2002) 693-697
- Barreto P.M.L.**, Pires A.T.N., Soldi V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym. Degrad. Stabil.* 79 (2003) 147-152
- Becker O.**, Varley R., Simon G. Morphology, thermal relaxations and mechanical properties of layered silicate nanocomposites based upon high-functionality epoxy resins. *Polymer* 43 (2002) 4365-4373
- Bigi A.**, Borghi M., Cojazzi G., Fichera A.M., Panzavolta S., Roveri N. Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *J. Therm. Anal. Cal.* 61 (2000) 451-459
- 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 (2001) 763-768
- Chen B.**, Evans J.R.G. Thermoplastic starch-clay nanocomposites and their characteristics. *Carbohyd. Polym.* 61 (2005) 455-463
- Cao N.**, Fu Y., He J. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloid.* 21 (2007) 575-584
- Chaudhari A.**, Thota J., Kumar C.V. Binding and cleavage studies of two proteins intercalated at the galleries of α -zirconium phosphate. *Microporous Mesoporous Materials* 2 (2004) 281-291
- Darder M.**, Colilla M., Ruiz-Hitzky E. Biopolymer-Clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chem. Mater.* 15 (2003) 3774-3780
- de Carvalho R.A.**, Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloid.* 18(2004) 717-726
- De Cristofaro A.**, Violante A. Effect of hydroxy-aluminium species on the sorption and interlayering of albumin onto montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 19 (2001) 59-65
- Doyle C.D.** Estimating thermal stability of experimental polymers by empirical thermogravimetric analysis. *Anal. Chem.* 33 (1961) 77-79
- Fraga A.N.**, Willimas R.J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer* 26 (1985) 113-118
- Hedenqvist M.S.**, Backman A., Gallstedt M., Boyd R.H., Gedde U.W. Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 66 (2006) 2350-2359
- Huang M-F.**, Yu J-G., Ma X-F. Studies on the properties of montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites. *Polymer* 45 (2004) 7017-7023
- Informe técnico de Rousselot** (Argentina).www.rousselot.com

- Johnston C.T.**, Premachandra G.S. Polarized ATR –FTIR study of smectite in aqueous suspension. *Langmuir* 17 (2001) 3712-3718
- Kaminska A.**, Sionkowska A.. The effect of UV radiation on the values of thermal parameters of collagen containing β -carotene. *Polym. Degrad. Stabil.* 65 (1999) 87-90
- Kampeerappun P.**, Aht-Ong D., Pentrakoon D., Srikulkit K. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydr Polym* 67 (2007) 155–163.
- Kozlov P.V.** The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* 24 (1983) 651-666
- Kristo E.**, Biliaderis C. G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydr Polym* 68 (2007) 146–158
- Le Baron P.C.**, Wang Z., Pinnavaia T.J. Polymer-layered silicate nanocomposites: an overview. *Appl. Clay Sci.* 15 (1999) 11–29
- Li P.**, Zheng J.P., Ma Y.L., Yao K.D. Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. II. Swelling behaviour. *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 322-328
- Lim L-T.**, Mine Y., Britt I.J. Tung M.A. “Formation and properties of egg white films and coatings” en Protein-based films and coatings. 1era. Edición. Editado por A. Gennadios; Ed. CRC Press; 2002; 233-250
- Liu Y.**, Hsu C., Wei W., Jeng R. Preparation and characterization of nylon 11/organoclay nanocomposites. *Polymer* 44 (2003) 5159-5167
- 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 *Carbohydr. Polym.* 56 (2004) 129-135
- Martucci J.F.**, Vazquez A., Ruseckaite R.A. Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite. Morphological and thermal studies. *J. Therm. Anal. Cal.* 89 (2007) 117-122
- Matsumura H.**, Glasser W.G. Cellulosic nanocomposites. II. Studies by Atomic Force Microscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 78 (2000) 2254-2261
- Menon A.R.R.**, Pillai C.K.S., Nando G.B. Thermal degradation characteristics of natural rubber vulcanizates modified with phosphorylated cashew nut shell liquid. *Polym. Degrad. Stabil.* 52 (1996) 265-271
- Nashed G.**, Rutgers R. P. G., Sopade P. A. The plasticisation effect of glycerol and water on the gelatinisation of wheat starch. *Starch/Stärke* 55 (2003) 131–137
- 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.
- Park H-M.**, Li X., Jin C, Park C., Cho W., Ha C. Preparation and properties of Biodegradables Thermoplastic Starch/Clay Hybrids. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 553-558
- Park H-M.**, Mohanty A.K., Drzal L.T., Lee E., Mielewski D.F., Misra M. Effect of sequential mixing and compounding conditions on cellulose acetate/layered silicate nanocomposites. *J. Polym. Environ.* 14 (2006) 27-35
- Paul M-A.**, Alexandre M., Degée P., Henrist C., Rulmont A., Dubois P. A new nanocomposite materials based on plasticized poly(L-lactide) and organo-modified montmorillonites: thermal and morphological study. *Polymer* 44 (2003) 443-450
- Peleg M.** An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.* 53 (1988) 1216-1219
- Pereira de Abreu D.A.**, Paseiro Losada P., Angulo I., Cruz J.M.. Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. *Eur Polym J* 43 (2007) 2229-2243

- Pu Chen**, Zhang L. Interaction and properties of highly exfoliated soy protein/ Montmorillonite nanocomposites. *Biomacromolecules* 7 (2006) 1700 -1706
- Ray S.S.**, Okamoto M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1539-1641
- Ray S.S.**, Bousmina M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Prog. Mater. Sci.* 50 (2005) 962–1079
- Rimdisit S.**, Jingjid S., Damrongsakkul S., Tiptipakorn S., Takeichi T.. Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydr. Polym.* xxx (2007) xxx–xxx
- Ryu J.G.**, Park S.W., Kim H., Lee J.W. Power ultrasound effects for in situ compatibilization of polymer-clay nanocomposites. *Mat. Sci. Eng. C* 24 (2004) 285-288
- Saito H.**, Taguchi T., Kobayashi H., Kataoka K., Tanaka J., Murabayashi S., Mitamura Y.. Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. *Mat. Sci. Eng. C* 24 (2004) 781–785
- Sionkowska A.**, Wisniewski M., Skopinska J., Kennedy C.J., Wess T.J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials* 25 (2004) 795–801
- Sorum L.**, Gronli M.G., Hustad J.E. Pyrolysis characteristics and kinetics of municipal solid wastes. *Fuel* 80 (2001) 1217-1227
- Sthornvit R.**, Krotcha J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* 50(2001) 149-155
- Tao Jiang**, Yu-hua Wang, Jen-taot Yeh, Zhi-qiang Fan. Study on solvent permeation resistance properties of nylon6/clay nanocomposite. *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 459–460
- Tunc S.**, Angellier H., Cahyana Y., Chalier P., Gontard N., Gastaldi E. Funtional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *J. Membrane Sci.* 289 (2007) 159-168
- Viville P.**, Lazzaroni R., Mollet E., Alexandre M., Dubois Ph., Borcia G., Pireaux J-J. Surface characterization of poly (e-caprolactone)-based nanocomposites. *Langmuir* 19 (2003) 9425-9433
- Wu C.S.**, Liu Y-L., Chiu Y-C., Chiu Y-S. Thermal stability of epoxy resins containing flame retardant components: an evaluation with thermogravimetric analysis. *Polym. Degrad. Stabil.* 78 (2002) 41–48
- Yalcin B.**, Cakmak M. The role of plasticizer on the exfoliation and dispersion and fracture behaviour of clay particles in PVC matrix: a comprehensive morphological study. *Polymer* 45 (2004) 6623-6638
- Zheng J.P.**, Li P., Ma Y.L., DeYao K. Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposiote. I.Preparation and Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189-1194
- Zheng J.P.**, Xi L.F., Zhang H.L., De Yao K. Correlation between reaction environment and intercalation effect in the synthesis of gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. *J. Mater. Sci. Lett.* 22 (2003) 1179-1181

Capítulo V

Refuerzo con cargas inorgánicas en presencia de plastificantes

Capítulo V

Refuerzo con cargas inorgánicas en presencia de plastificantes

En este capítulo se sintetizarán películas de gelatina reforzadas con montmorillonita (Ge/5MMt) con adición de plastificantes, con el objetivo de modular sus propiedades mecánicas, incrementando la maleabilidad, flexibilidad y extensibilidad de las películas y sin detrimento de sus propiedades de barrera.

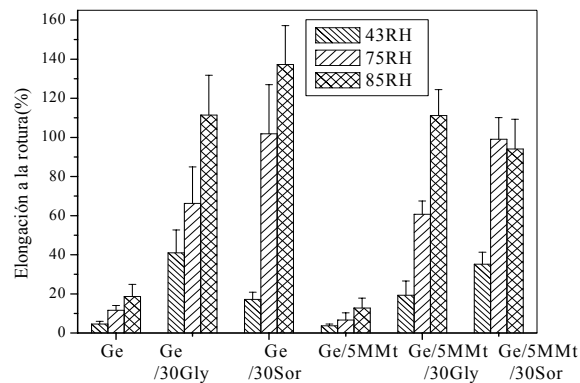


Figura V.1. Variación de la elongación a la rotura de las películas acondicionadas a diferentes HRE.

V.1. Introducción

En el capítulo anterior se desarrolló la obtención y caracterización de nanocompuestos basados en gelatina y un amplio rango de concentraciones de arcilla sin modificar, en ausencia de plastificantes y agentes de entrecruzamiento químico. Las mejores propiedades térmicas y de resistencia a la humedad se obtuvieron para Ge/5MMt y Ge/10MMt, de acuerdo con la morfología exfoliada-intercalada observada para éstas películas. Sin embargo las propiedades mecánicas resultaron poco adecuadas para películas destinadas a envases, ya que se presentaron muy frágiles y con una reducida elongación. Esto impulsó el desarrollo de películas de Ge/MMt plastificadas sin detrimento de la resistencia a la humedad. A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo IV, se seleccionó el sistema reforzado con 5% MMt.

Es conocido el hecho de que la generación de las distintas morfologías en nanocompuestos dependerá de varios parámetros que definirán el grado de difusión del polímero en las galerías de la arcilla, tales como tipo de arcilla, tipo de interacciones arcilla - polímero, concentración del refuerzo, masa molar del polímero y presencia de plastificantes ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Pandey y Singh 2005](#)). Dependiendo del método de procesamiento y orden de agregado de los reactivos, la presencia de plastificantes puede favorecer la intercalación del polímero. [Paul y col. \(2003\)](#) realizaron estudios sobre películas basadas en PLA con diversas arcillas y con polietilenglicol (PEG) como plastificante. Los autores observaron que en ausencia de plastificantes (cualquiera sea este), no se producía ni exfoliación ni intercalación. Sin embargo su agregado favoreció la intercalación del polímero, conduciendo a diferentes morfologías. En particular, para las películas realizadas con Na⁺MMt se observó que la intercalación es esencialmente provocada por la migración del plastificante (de menor tamaño) entre las láminas de arcilla, debido a la diferencia de polaridad entre la arcilla y el PLA. [Pandey y Singh \(2005\)](#) analizaron el efecto del orden de adición de reactivos en las estructuras finales de nanocompuestos de almidón plastificado/montmorillonita. Los autores concluyen que las fuerzas de atracción entre los componentes resultan factores decisivos en la dispersión eficaz de la carga en la matriz. [Park y col. \(2002, 2003\)](#) utilizaron el método de mezclado en *batch* en dos etapas con altos porcentajes de plastificantes para producir muestras de almidón y montmorillonita intercaladas con mejora notable en las propiedades mecánicas. [Chen y Evans \(2005\)](#), analizaron

nanocompuestos basados en almidón plastificado y arcilla obtenidos por extrusión. Los autores determinaron experimentalmente que el glicerol se intercala en las galerías de la arcilla produciendo una estructura más ordenada. Sin embargo las mezclas de almidón plastificado con agua/ hectorita (sin plastificante) no presentan pico de difracción en d_{001} , lo que indica que la arcilla se encuentra exfoliada. Al parecer, la adición de glicerol inhibe la exfoliación de la arcilla, debido a la generación de interacciones de hidrógeno entre glicerol y almidón durante el mezclado previo a la incorporación de la arcilla. Por su parte, [Fisher y Fisher \(2001\)](#), prepararon una serie de nanocompuestos basados en almidón y arcillas via extrusión y *casting*. Los autores demostraron que con altos porcentajes de plastificante se favorece la formación de estructuras exfoliadas, de acuerdo con los resultados de DRX y TEM.

Es evidente que, además de la optimización de los parámetros que definen la estructura de un nanocompuesto, la secuencia de agregado de reactivos y el tipo de mezclado afectan las morfologías generadas, al menos en compuestos basados en biopolímeros y plastificantes capaces de competir por el espacio entre las galerías de la arcilla.

Respecto de proteínas plastificadas y reforzadas con arcillas, existen pocos estudios en la literatura sobre el efecto del plastificante en la distribución de la nanocarga ([Xu y col. 2006](#)). En el caso del sistema gelatina/ plastificante/ montmorillonita es posible que tanto la gelatina como el plastificante (en general polioles) tengan tendencia a migrar dentro de las galerías de la arcilla, debido a la posibilidad de generar interacciones de hidrógeno o electrostáticas con los grupos oxhidrilo presentes en las galerías de las arcilla. En este trabajo se seleccionaron el sorbitol (Sor) y el glicerol (Gly) como plastificantes del sistema, debido a su compatibilidad en el rango de composiciones utilizado (0-40%).

V.2. Preparación y caracterización de las películas

Las películas de Ge/5MMt/plastificante se prepararon por el método de intercalación en solución ([Le Baron y col. 1999](#); [Zheng y col. 2002](#)). Las películas plastificadas se obtuvieron en las mismas condiciones establecidas previamente para Ge/MMt en ausencia de plastificantes (Capítulo IV). Con el objetivo de evaluar la

tendencia y preferencia de la gelatina y el plastificante por difundir entre las galerías de la arcilla, se utilizaron dos estrategias de mezclado de los componentes.

Estrategia A: el polvo de Ge se hidrató con agua destilada para obtener una concentración e 10g/100mL, a 50°C, pH 7 y bajo agitación constante hasta su completa disolución. En este punto se adicionó la cantidad deseada de plastificante (Sor o Gly) de modo de obtener películas con contenido de plastificante en el rango de 0-40% en peso. En paralelo, la MMt (5% respecto de masa seca de Ge) se dispersó por ultrasonido en agua destilada a 50°C durante 20 minutos. Finalmente, la solución de Ge y la suspensión de MMt se mezclaron y se sometieron a agitación constante durante 15 minutos a 50°C.

Estrategia B: la gelatina se dispersó en agua igual que en el primer método. En paralelo, la MMt (5% respecto de masa seca de Ge) se dispersó por ultrasonido en agua destilada a 50°C durante 20 minutos, se adicionó el plastificante a esta suspensión y se continuó la agitación por unos minutos. Esta suspensión de MMt y plastificante se mezcló con la disolución de gelatina durante 15 minutos a 50°C.

Las suspensiones resultantes a partir de ambos tratamientos se vertieron en moldes circulares cubiertos por material antiadherente y la evaporación del solvente se realizó en estufa a 35°C durante 15 horas. El control sobre el volumen final permite controlar el espesor final de las películas. Los materiales obtenidos se denominarán **Ge/YMMt/X**, donde Y corresponde al porcentaje en masa del arcilla incorporado y X al de plastificante.

La Figura V.2 representa los resultados de DRX de los productos obtenidos según los dos procedimientos anteriores.

Se observa que cuando se adiciona el plastificante sobre la arcilla, estrategia B (Figura V.2., curva Ge/5MMt a), el pico original de la Cloisita ($2\theta = 7.3$) no se desplaza sino que simplemente se ensancha, lo que es indicativo de que no se ha producido un grado considerable de intercalación ([Alexandre y Dubois 2000](#)) y por lo tanto, el material obtenido resulta ser un microcompuesto. Este comportamiento podría explicarse de la siguiente forma:

- Es probable que la adición del plastificante sobre la arcilla restrinja las interacciones Ge-MMt ([Martucci y col. 2007](#)) responsables de la dispersión de la carga inorgánica en la matriz.
- Otra posibilidad es que el glicerol migre más fácilmente entre las galerías debido a su carácter hidrofílico y menor tamaño y actúe como surfactante ([Pandley y Singh](#)

2005). Esto incrementaría la tendencia de la gelatina a migrar debido a dos tipos de atracciones favorables: una con la arcilla (como ya se indicó en el estudio realizado por FTIR en el Capítulo IV) y otra con el plastificante que se encuentra dentro de la misma. La entrada de gelatina en presencia de glicerol generaría un empaquetamiento compacto entre los tres componentes (Ge/Glicerol/Montmorillonita) que restringe la difusión de otras cadenas de gelatina, resultando en microcompuestos. Pandley y Singh (2005) propusieron un modelo semejante para compuestos de almidón/ MMt/Gly preparados en forma similar.

Por el contrario, cuando el plastificante se adiciona sobre la solución de gelatina (Figura V.2. Ge/5MMt b), se observa que el pico original de la Cloisita casi desaparece en el compuesto. Como ya se indicó anteriormente (Capítulo IV) la ausencia de un pico en DRX sugiere un amplio rango de espaciados entre las placas de silicato generando morfologías de tipo exfoliadas/intercaladas. La dificultad para obtener estructuras altamente exfoliadas o intercaladas sugiere que el plastificante se acomoda entre las cadenas de gelatina, generando una estructura de mayor tamaño lo que restringe su movilidad entre los tactoides de la arcilla, comparado con el mismo sistema en ausencia de plastificantes.

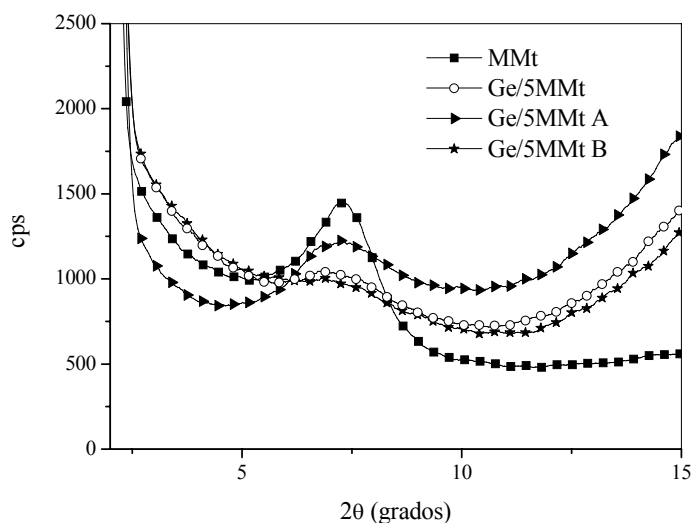


Figura V.2. DRX de películas Ge/5MMt/30Sor. Ge/5MMt a: plastificante adicionado sobre la suspensión de MMt; Ge/5MMt b: plastificante adicionado sobre la solución de Ge.

Como conclusión, para obtener nanocompuestos Ge/5MMt/plastificante homogéneos, se fijaron las siguientes condiciones experimentales: se utilizará la estrategia A, es decir, la gelatina se mezcla con el plastificante y luego se adiciona a la

suspensión de MMt; la concentración de gelatina se mantiene en 10g/100mL, porcentaje de plastificantes (0-40%), temperatura de mezcla 50°C, pH 7, 20 minutos de ultrasonido y temperatura de secado: 35°C.

La Figura V.3 muestra el aspecto macroscópico de las películas Ge/5MMt plastificadas con 30% en masa.



Figura V.3. Aspecto macroscópico de películas de Ge/ 5MMt/plastificante obtenidas por *casting*.

Como ya se indicó en el capítulo anterior, las películas de Ge/5MMt no presentan diferencias de transparencia con las de Ge, debido al alto grado de exfoliación de la carga de dimensiones nanométricas ([Matsumura y Glasser 2000](#); [Liu y col. 2003](#)). Esos resultados concuerdan con los observados por [Gennadios \(2002\)](#) y [Vanin y col. \(2005\)](#) para películas basadas en proteínas y diversos plastificantes (glicerol, polietilenglicol, sorbitol). Sin embargo, la adición de plastificante produce una disminución en la transparencia de las películas con MMt (Tabla V.1). Este comportamiento puede relacionarse con el hecho de que la presencia de plastificante dificulta la dispersión de la nanocarga, como ya se explicó más arriba en el texto. Este efecto se manifiesta en forma más marcada para el sorbitol. Posiblemente debido a que el sorbitol puede cristalizar, como ya fuera observado en otros sistemas ([Krogars y col. 2003](#); [Vanin y col. 2005](#)).

Tabla V.1. Opacidad de las películas con adición de plastificantes.

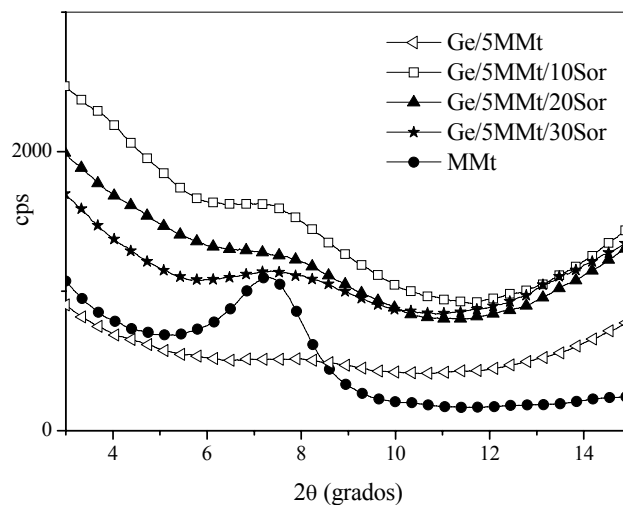
	Espesor (mm)	Opacidad (UA.nm)
Ge	0.14 ± 0.05	25.9 ± 3.2
Ge/30Sor	0.13 ± 0.01	32.0 ± 4.4
Ge/30Gly	0.21 ± 0.04	33.0 ± 2.0
Ge/5MMt	0.18 ± 0.03	28.8 ± 3.7
Ge/5MMt/30Sor	0.21 ± 0.04	66.2 ± 16.0
Ge/5MMt/30Gly	0.15 ± 0.02	49.0 ± 3.0

V.3. Resultados y discusión

Es sabido que la adición de plastificante modifica las interacciones entre la matriz y la carga inorgánica y existe una dependencia con el tipo y cantidad adicionada ([Paul y col. 2003](#); [Yalcin y Cakmak 2004](#); [Chen y Evans 2005](#); [Pandley y Singh 2005](#)). Tanto la gelatina como los plastificantes (sorbitol y glicerol) tienden a migrar hacia las galerías de la arcilla ya que ambos pueden generar interacciones polares que serían la fuerza impulsora para la difusión hacia el interior de la arcilla. Por lo tanto, se realizaron estudios de DRX con el objetivo de evaluar la dispersión de la carga en la matriz polimérica. La Figura V.4 muestra los patrones de DRX obtenidos para las películas con plastificantes.

Puede observarse que en el caso del sorbitol (Figura V.4.a), las películas con distintos porcentajes muestran el pico correspondiente a la arcilla, lo que indica que el plastificante interfiere en el proceso de intercalación impidiendo una dispersión efectiva de la carga. Para las películas plastificadas con glicerol (Figura V.4.b), bajos contenidos de plastificante siguen el mismo comportamiento que para el sorbitol, pero para concentraciones mayores los patrones son similares al de Ge/5MMt. A bajas concentraciones el plastificante estaría interactuando con la matriz, impidiendo la generación de interacciones efectivas Ge-MMt ([Wu y Zhang 2001](#); [Orliac y col. 2002](#); [Martucci y col. 2007](#)). A concentraciones mayores, además de intercalarse entre las cadenas de gelatina, el glicerol en exceso puede migrar hacia el interior de las galerías debido a que por su pequeño tamaño puede acomodarse en los espacios libres entre capas de silicato e incrementar el espaciado en las galerías.

(a)



(b)

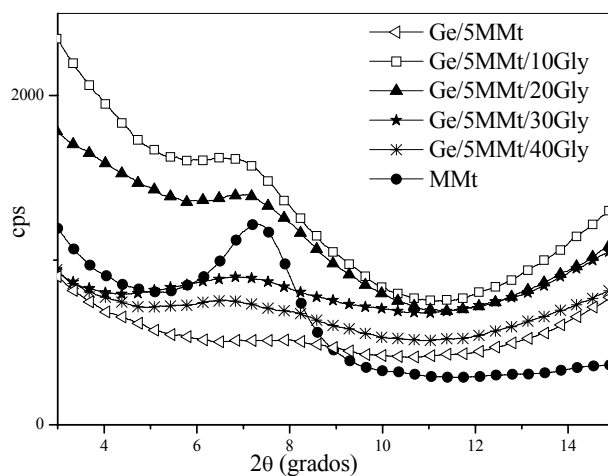


Figura V.4. Espectros de DRX para películas con 5%p/p de MMt y diversos contenidos de plastificante. (a) sorbitol, (b) glicerol.

De los resultados observados por DRX se seleccionó una concentración del 30% de plastificante para adicionar sobre las películas. En ambos casos esta concentración exhibe una disminución marcada del pico correspondiente a la arcilla que podría indicar una buena dispersión del refuerzo en la matriz (el efecto es más marcado para el glicerol).

A fin de confirmar el tipo de morfologías obtenidas en presencia de plastificantes se recurrió a la microscopía de fuerza atómica. La Figura V.5 muestra las imágenes de HT-AFM (fase) para Ge/5MMt plastificado.

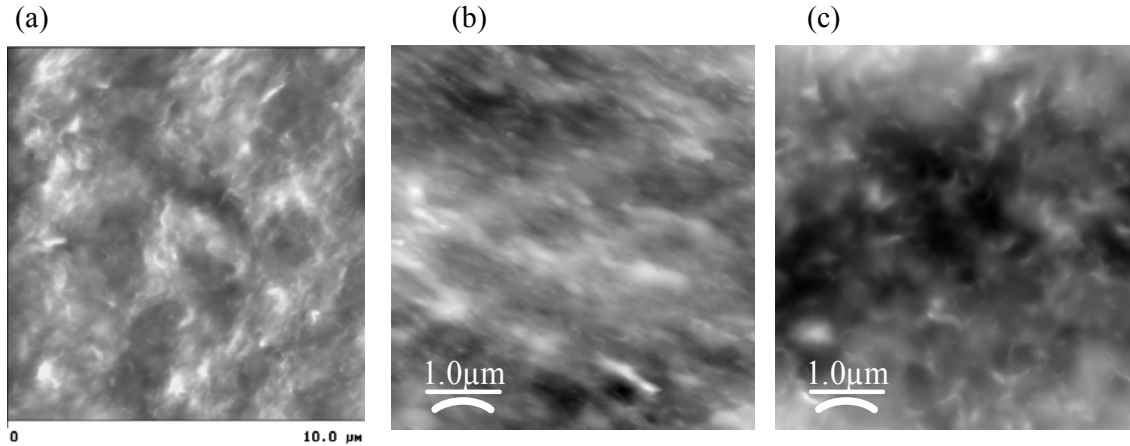


Figura V.5. Imágenes de AFM (a) Ge/5MMt (b)Ge/5MMt/30Sor (c)Ge/5MMt/30Gly

Se observa que para el sistema sin plastificar las láminas de silicato se encuentran dispersas en forma homogénea en la matriz (líneas blancas brillantes). El agregado de sorbitol (Figura V.5.b), parece favorecer la intercalación en lugar de la exfoliación, donde la distribución de las capas de arcillas no es homogénea y se producen pequeños aglomerados. Sin embargo, en presencia de glicerol se generan morfologías similares a las observadas para el sistema en ausencia de plastificantes, esto es, mayormente exfoliadas. Estos resultados concuerdan con los observados por DRX.

La interacciones entre Ge, MMt y plastificante afectan la polaridad superficial de las películas. Los valores de polaridad superficial de las películas se resumen en la Tabla V.2.

Tabla V.2. Medida de ángulo de contacto, y fracción polar de la superficie de las películas obtenidas.

Angulo de contacto (°)	Ge			Ge/5MMt		
	$\theta_{\text{diiodometano}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{etilenglicol}} (^{\circ})$	X_P (%)	$\theta_{\text{diiodometano}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{etilenglicol}} (^{\circ})$	X_P (%)
Sin plastif.	21.9 ± 1.6	21.4 ± 2.3	11.1	23.2 ± 1.1	25.8 ± 2.1	9.7
/30Sor	20.1 ± 0.9	34.8 ± 0.9	4.7	20.2 ± 1.8	34.1 ± 1.8	5.0
/30Gly	18.7 ± 1.4	37.7 ± 1.2	3.3	19.4 ± 1.4	34.3 ± 2.0	4.7

Se observa que la polaridad superficial disminuye con la adición de plastificantes, tanto para las películas de Ge como para las de Ge/5MMt. En el caso de las películas de gelatina control, este comportamiento puede asociarse con las interacciones de tipo puente de hidrógeno plastificante - matriz, que limitan la

exposición de los grupos polares hacia la superficie. En el caso de Ge/5MMt, la presencia de interacciones de tipo puente de hidrogeno entre la gelatina, la arcilla y el plastificante reducen la polaridad neta de la película. En cuanto al efecto de la naturaleza del plastificante, se observa que el glicerol afecta más fuertemente la polaridad de las películas de gelatina. Esto se asocia al menor tamaño de la molécula de glicerol respecto de la de sorbitol (Sloan 1976; Leung 1986), que le permite interactuar en forma mas eficiente con la gelatina, incrementando su eficiencia como plastificante para películas proteicas (Gontard y col. 1992, Arvanitoyannis y col. 1998a-b, Sthornvit y Krotcha 2001).

Al igual que en el Capítulo IV, con el objetivo de analizar las presencia de interacciones específicas entre la arcilla y la gelatina en los nanocompuestos se utilizó la técnica de FTIR. Estructuralmente, la superficie de las galerías de la montmorillonita contiene grupos Si-O-Si y -OH, que son sitios potenciales para la formación de enlaces tipo puente de hidrógeno con moléculas que contengan grupos aceptores de protones, como el enlace peptídico de proteínas (Pu Chen y Zhang 2006). La zona correspondiente a las vibraciones de los grupos Si-O de la arcilla se representa en la Figura V.6.

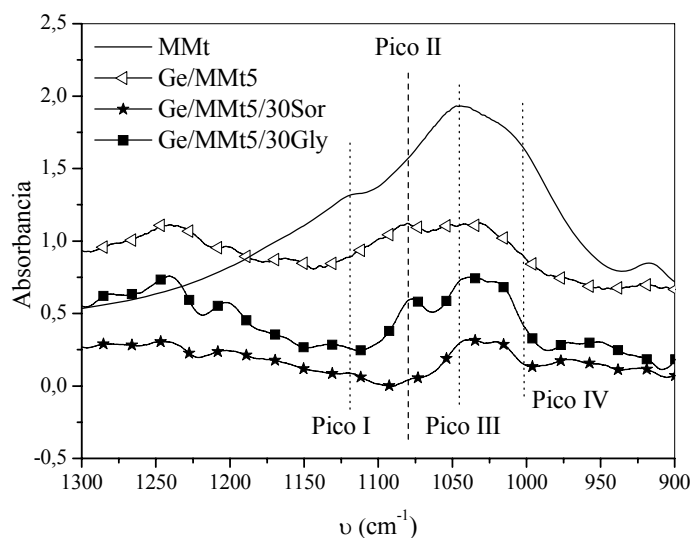


Figura V.6. Espectro FTIR de las películas entre 900-1300 cm⁻¹

Por deconvolución del espectro original pueden definirse 4 picos: 1120 (I), 1081 (II), 1046 (III) y 1002 (IV) cm⁻¹. El pico II se atribuye a vibraciones fuera de plano, relacionadas a la orientación de las capas de arcilla (Pu Chen y Zhang 2006); el

incremento en la intensidad de esta banda tiene una conexión directa con el desorden de las capas de arcilla ([Chen y Evans 2005](#)). El pico II se halla más definido en los materiales plastificados, indicando que la presencia de plastificante interfiere en el ordenamiento de las capas de arcilla. Siendo el efecto más marcado para el glicerol, estos resultados concuerdan con los obtenidos por AFM y DRX.

Uno de los principales motivos para adicionar plastificantes a las películas de Ge y Ge/MMt es la de mejorar sus propiedades mecánicas, dado que presentan extrema fragilidad y son de difícil manejo. Con el fin de minimizar el efecto plastificante del agua, las películas se acondicionaron en estufa de vacío hasta peso constante. El contenido final de agua fue del orden del 14%.

En la Tabla V.3 se muestra los valores de las propiedades mecánicas obtenidas en modo tracción de las películas acondicionadas.

Tabla V.3. Propiedades mecánicas de las películas con plastificante. Secas en estufa de vacío a peso cte.

	E (GPa)	Elongación a la rotura (%)	Tensión de rotura (MPa)
Ge/5MMt	6.6 ± 0.7	4.6 ± 0.8	111.5 ± 20.9
Ge/5MMt/30Sor	1.7 ± 0.3	24.2 ± 0.0	46.9 ± 6.0
Ge/5MMt/30Gly	0.4 ± 0.1	65.2 ± 0.1	32.7 ± 0.8

Las películas que contienen glicerol sufren los mayores cambios en sus propiedades mecánicas, indicando que el glicerol es más eficiente como plastificante de las películas proteicas ([Mali y col. 2005](#)).

La adición de plastificantes puede afectar la resistencia a la humedad de las películas obtenidas. Se observa que la adición de MMt a las películas de gelatina produce una leve disminución en la permeabilidad al vapor de agua (WVP) que se hace más marcada con la adición de plastificantes (Tabla V.4). Esta mejora se asocia a que las láminas de arcilla dispersas en la matriz incrementan el camino tortuoso del permeante a través del compuesto ([Kojima y col. 1993](#); [Gilman 1999](#)). Se observó una disminución de la permeabilidad con el agregado de plastificante, siendo ese efecto más marcado para el sorbitol, lo que puede ser asociado a la posibilidad de cristalización en la estructura. Los cristales actuarían junto con la MMt, incrementando el camino tortuoso al paso del permeante ([Vanin y col. 2005](#)). Estos resultados concuerdan con la menor higroscopicidad de las películas plastificadas con sorbitol (Tabla V.2).

En cuanto a los valores obtenidos, estos son comparables a los informados en la literatura por [Vanin y col. \(2005\)](#) para películas de Ge/30Gly ($1.65 \cdot 10^{-13}$ Kg.m/Pa.s.m²) mientras que para películas de caseinato, [Chen \(1995\)](#) informa un valor de $4.261 \cdot 10^{-13}$ Kg.m/Pa.s.m².

Tabla V.4. Permeabilidad al vapor de agua y flujo de transferencia de oxígeno de películas de Ge y Ge/MMt5 con y sin plastificante.

	WVP*10 ¹⁴ (Kg.m/Pa.s.m ²)	Q (cm ³ .mm/m ² .día)
Ge	17.3±0.6	15.3±2.8
Ge/30Sor	8.8 ±0.3	16.5±2.5
Ge/30Gly	16.5±2.1	16.8±3.9
Ge/5MMt	16.0±5.0	10.7±1.0
Ge/5MMt/30Sor	7.7 ± 2.2	11.2±1.4
Ge/5MMt/30Gly	13.8 ± 1.3	10.9± 2.0

WVP: T: 23±2°C . HRE fuera:dentro del recipiente 65:0%
Q: Tamb. 50%HRE

Debido a su naturaleza hidrofílica las películas proteicas se presentan como excelentes barreras a sustancias no polares, tales como el oxígeno ([Olabarrieta 2005](#), [Gennadios 2002a](#)). Sin embargo, la hidrofílicidad de las películas, hace que sus propiedades de barrera sean fuertemente dependientes de las condiciones de humedad. Esto hace que la adición de plastificantes incremente la permeabilidad de las películas debido a la higroscopicidad de estos aditivos ([Olabarrieta 2005](#); [Gennadios 2002a](#)). Así, para producir una película con buenas propiedades de barrera al oxígeno comparables a los de PVdC o EVOH, debe realizarse una buena selección del plastificante utilizado y de las modificaciones introducidas sobre la matriz polimérica ([Miller y Krochta 1997](#); [Gennadios 2002a](#); [Olabarrieta 2005](#)).

Se analizó el flujo de transmisión de oxígeno (OT) a través de las películas. Utilizando el valor de OT en estado estacionario y conociendo el espesor de las películas puede calcularse el valor de Q, que es proporcional a la permeabilidad al oxígeno (Capítulo II.2.15) Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.4. Los valores de Q obtenidos no pueden ser comparados con la mayoría de los datos informados en literatura, dado que el equipo utilizado solo permite medir el flujo de transmisión de oxígeno a través de la película y no la permeabilidad al oxígeno (PO). Con el objetivo de comparar los resultados con películas tradicionales se analizó una película patrón de PET, obteniéndose un resultado de 2.5 ± 0.1 cm³.mm/m².día.

Utilizando el mismo equipo, [Valente y col. 2007](#) informan valores de Q del orden de $43.6 \pm 0.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{día}$ para películas basadas en acetato de celulosa. Es importante notar que la adición de plastificantes incrementa el valor de Q (Tabla V.4). Esto puede deberse a dos factores; por un lado a la disminución de la polaridad de la película por las interacciones de tipo puente de hidrógeno que se generan entre la matriz y el plastificante (Tabla V.2) y por otra parte, al incremento en la capacidad de absorción de agua que producen estos aditivos. Puede observarse que la adición de MMt sobre la película de Ge produce una disminución del valor de Q de un 30%. [Pereira de Abreu y col \(2007\)](#) observaron una disminución de la PO sobre películas de PP de un 22% y de un 12% sobre películas de LDPE por la adición de 5% de MMt. La adición de MMt produce una disminución del Q, asociado a un incremento en el camino tortuoso del permeante ([Ray y Okamoto 2003](#); [Olabarrieta 2005](#)), ya que la adición de plastificantes no produce cambios significativos en esta propiedad para las películas reforzadas.

El efecto de los plastificantes sobre la absorción de agua se presenta en la Figura V.7. Se observa que el contenido de plastificante afecta la humedad final de las películas luego del acondicionamiento ([Vanin y col. 2005](#)), siendo más importante el efecto sobre las películas que contienen glicerol. Esto se relaciona con la mayor higroscopicidad del glicerol ([Gennadios 2002](#); [Shaw y col. 2002](#)). El comportamiento general es análogo para las películas de Ge y Ge/5MMt. Se observa dos zonas bien definidas en la curvas de absorción: a cortos tiempos donde la absorción es rápida ($t < 200$ minutos) y a tiempos largos donde la velocidad de absorción decrece a medida que se alcanza el equilibrio.

Las curvas de absorción se ajustaron por la ecuación de Peleg ([Peleg 1988](#)) y se determinaron las constantes K_1 y K_2 , que se exhiben en la Tabla V.5. Puede observarse que la adición de plastificante en todos los casos produce una disminución de la constante K_2 , lo que indica un incremento de la capacidad de absorción máxima. Tanto en la película de Ge como en la de Ge/5MMt, el glicerol es el plastificante que exhibe la máxima capacidad de absorción de equilibrio, lo que concuerda con su mayor capacidad de plastificación ([Gennadios 2002](#); [Shaw y col. 2002](#)).

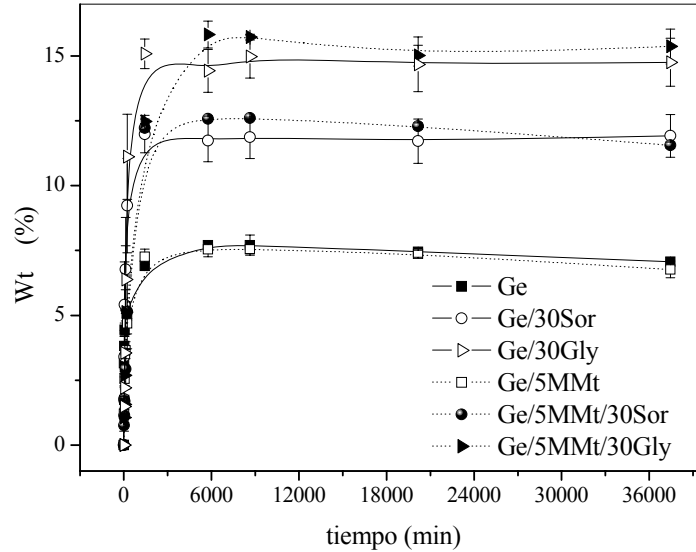


Figura V.7. Curva de absorción a 75% HRE de películas de Ge y Ge/5MMt con y sin plastificantes.

Por otra parte el valor de K_1 se incrementa con la adición de plastificante, lo que indica una menor velocidad de absorción inicial. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que los plastificantes, pueden interactuar con las cadenas proteicas y disminuir su capacidad de ligar agua. Existe una competencia entre las moléculas de agua y el plastificante por los grupos polares de la proteína. El agua rompe las interacciones proteína-plastificante lo que provoca un incremento en el número de grupos hidrofílicos disponibles y así, de la capacidad máxima de absorción del material.

Tabla V.5. Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg a los datos experimentales de absorción de humedad. HRE 75%

HRE: 75%	$K_1(\text{min}/\%)$	$K_2 \cdot 10^2 (\%^{-1})$	r^2	$W_E (\%)$
Ge	4.1±0.7	13.6±0.5	0.97	21.7±0.1
Ge/30Sor	6.6±0.4	8.3±0.1	0.99	25.7±0.8
Ge/30Gly	9.4±1.0	6.7±0.15	0.99	28.7±1.0
Ge/5MMt	17.7±3.3	13.4±0.6	0.97	21.5±0.3
Ge/5MMt/30Sor	27.2±2.2	7.6±0.1	0.99	26.6±0.1
Ge/5MMt/30Gly	15.6±1.3	6.4±0.1	0.99	29.4±0.1

Acorde a lo descrito por [Sothornvit y Krochta \(2001\)](#), las diferencias moleculares entre el sorbitol y el glicerol son las responsables de la diferencia en la velocidad de absorción de las películas plastificadas. La molécula de glicerol presenta un menor tamaño (Masa molar 92 g/mol) y posee tres grupos oxhidrilos, mientras que la de sorbitol (Masa molar 182 g/mol) posee seis grupos oxhidrilos. Sin embargo, a pesar

de que el sorbitol presenta mayor cantidad de grupos oxhidrilos que pueden interactuar con el agua por puentes de hidrógeno, el glicerol posee mayor afinidad por el agua según lo informado por [Leung \(1986\)](#). [García y col. \(2000\)](#), observan el mismo comportamiento sobre películas de almidón. El sorbitol presenta mayores fuerzas intermoleculares con el carbohidrato y menor capacidad para interactuar con el agua.

Los valores obtenidos para las constantes de Peleg son similares a los informados en literatura para almidón de trigo plastificado con 30% de glicerol ([Nashed y col. 2003](#)), y siguen la misma tendencia que para proteínas de soja plastificadas con sorbitol y glicerol ([Cho y Rhee 2002](#)).

Tabla V.6. Coeficiente de difusión en 75% de HRE. T: 25°C.

	Espesor (mm)	D_{app}*10⁹ (cm²/s)
Ge	0.19 ± 0.01	21.8 ± 5.6
Ge/30Sor	0.22 ± 0.04	12.4 ± 0.9
Ge/30Gly	0.18 ± 0.03	6.8 ± 1.2
Ge/5MMt	0.22 ± 0.01	4.5 ± 0.8
Ge/5MMt/30Sor	0.21 ± 0.04	3.4 ± 0.6
Ge/5MMt/30Gly	0.22 ± 0.03	2.9 ± 0.5

Los valores de D_{app} indican que el agregado de plastificante disminuye el coeficiente de difusión de las películas (Tabla V.6). Este comportamiento no sólo puede asociarse al incremento en la tortuosidad debido a la presencia de la nanocarga, sino también a la presencia de interacciones entre el plastificante, la matriz y la carga inorgánica que disminuyen la afinidad con el agua.

Tanto las moléculas de plastificantes como las de agua contienen grupos oxhidrilos (OH) que interactúan con las proteínas. De este modo, el contenido de humedad de las películas afectará las propiedades mecánicas por el efecto de plastificación del agua (Capítulo IV).

En la Tabla V.7 se muestra el efecto de la humedad relativa sobre las propiedades mecánicas de los materiales. Se observa que un incremento en la humedad relativa (HRE) causa una disminución del modulo elástico y en la tensión de rotura. Acorde a lo esperado en películas plastificadas, la elevación de la HRE causa un incremento en el valor de la elongación a la rotura para todas las muestras.

De acuerdo con los resultados de absorción de humedad (Figura V.7), las películas plastificadas adsorben más humedad debido a la hidrofiliidad de los

plastificantes. Esto conduce a una mayor plastificación de la matriz lo que se ve reflejado en los parámetros mecánicos determinados (Tabla V.7).

Tabla V.7. Variación de las propiedades mecánicas de las películas acondicionadas a diferentes HRE.

	HRE	Ge/5MMt	Ge/5MMt/30Gly	Ge/5MMt/30Sor
E (MPa)	75%	3235 ± 636	38.5 ± 10.9	64.8 ± 10.7
	84%	1418 ± 229	22.6 ± 1.5	32.1 ± 9.6
Tensión de rotura (MPa)	75%	55.1 ± 12.2	12.1 ± 1.7	9.8 ± 2.9
	84%	40.6 ± 5.8	10.7 ± 1.7	6.9 ± 1.2
Elongación a la rotura (%)	75%	6.7 ± 3.6	99.1 ± 11.1	60.7 ± 6.8
	84%	12.8 ± 5.1	111.1 ± 13.3	94.1 ± 15.2

A fin de analizar la fragilidad de las películas en condiciones severas de uso y manejo del material se evaluó la respuesta al impacto de las películas. Si bien es conocido que estas condiciones severas existen, es poco probable que esto ocurra en materiales destinados a envases, aunque no nula (Mali y col. 2004). La Figura V.8 representa un fractograma típico para los materiales analizados acondicionados a 75%HRE. Los valores obtenidos de resistencia al impacto (E_i) y de la carga que soporta el material para el inicio de la fractura (σ_d) se resumen en la Tabla V.8.

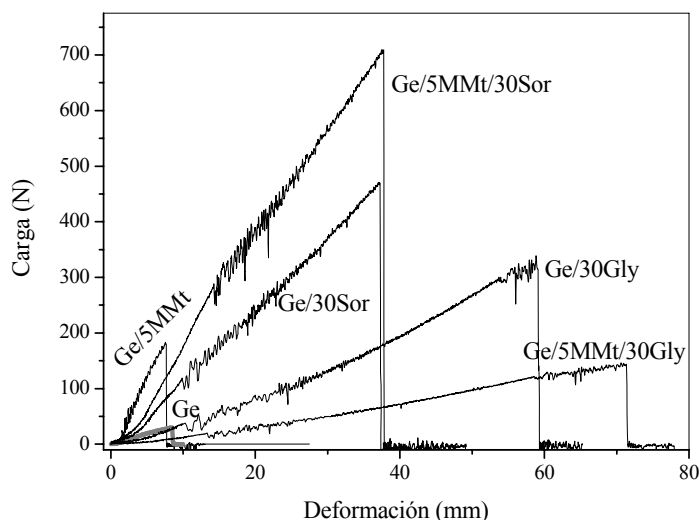


Figura V.8. Fractogramas de películas de Ge y Ge/5MMt con y sin plastificante

Del análisis de la Tabla V.8 (muestras 1 y 4) se deduce que el agregado de MMt a películas de gelatina sin plastificar, produce un incremento en σ_d y E_i . Considerando que la propagación de la fisura tiene lugar a través de los puntos de menor resistencia de

la película ([Olabarrieta 2005](#)), es de esperar que el agregado de carga genere un camino más tortuoso para la propagación de las fisuras, produciendo un mayor consumo de energía ([Alexandre y Dubois 2000](#); [Olabarrieta 2005](#)). En bibliografía se informa un valor de σ_d de 13.4GPa y E_i : $3,1 \times 10^{-3}$ J/mm para películas de caseinato plastificadas con Gly ([Pereda y col. 2007](#)).

Tabla V.8. Parámetros mecánicos y de impacto de las películas acondicionadas a 75%HRE

Propiedades en impacto				Propiedades en tracción		
		σ_d (GPa)	$E_i * 10^3$ (J/mm)	E (MPa)	σ (MPa)	ϵ (%)
Ge	1	3.4 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1984 ± 232	47.0 ± 9.7	11.7 ± 2.4
Ge/30Sor	2	30.6 ± 0.9	43.5 ± 5.5	63.5 ± 21.3	2.1 ± 0.8	101.9 ± 25.1
Ge/30Gly	3	25.3 ± 4.2	44.4 ± 5.1	87.3 ± 25.5	3.2 ± 0.9	66.3 ± 18.7
Ge/5MMt	4	31.9 ± 3.0	5.4 ± 1.5	3235 ± 636	58.7 ± 15.9	6.7 ± 3.6
Ge/5MMt/30Sor	5	34.6 ± 4.9	51.4 ± 10.2	64.8 ± 10.7	1.8 ± 0.4	60.7 ± 6.8
Ge/5MMt/30Gly	6	6.6 ± 0.9	19.5 ± 4.3	38.5 ± 10.9	1.1 ± 0.3	99.1 ± 11.1

Como se esperaba, el agregado de plastificante incrementa 40 veces la resistencia al impacto de películas de gelatina (muestras 1,2,3, Tabla V.8), cualquiera sea el plastificante considerado. Los plastificantes actúan en este caso como absorbedores de la energía de impacto, incrementando la ductilidad del material. En cambio para las películas plastificadas y reforzadas con 5%MMt (muestras 4,5,6, Tabla V.8), la energía de impacto resulta dependiente de la naturaleza del plastificante. Las películas con glicerol exhiben un valor de resistencia mucho menor que el sorbitol (aunque mayor que el de Ge/5MMt) debido a que este parámetro resulta de la relación de dos magnitudes, la carga que soporta y la deformación (ver Figura V.8). Se observa que el glicerol presenta una deformación mayor que el sorbitol, mientras que éste soporta una carga mucho mayor. Esto puede atribuirse a la posibilidad de cristalización de éste plastificante informado para otros sistemas ([Vanin y col. 2005](#)).

V.4. Conclusiones parciales

Se obtuvieron materiales compuestos de Ge/5MMt/plastificante. Se evaluó la concentración de plastificante a adicionar de manera de obtener materiales con una morfología exfoliada/intercalada. Se seleccionó un contenido de plastificante de 30% en masa.

Se fijaron las condiciones de procesamiento de estos materiales, evaluando el efecto de la adición del plastificante. Se observó que el agregado de sorbitol, parece favorecer la intercalación en lugar de la exfoliación, donde la distribución de las capas de arcillas no es homogénea y se producen pequeños aglomerados. En cambio, en presencia de glicerol se generaron morfologías similares a las observadas para el sistema en ausencia de plastificantes, esto es, mayormente exfoliadas. Estos resultados concuerdan con los observados por DRX.

Si bien las películas Ge/5MMt/30Sor presentaron una mayor resistencia a la humedad que Ge/5MMt/30Gly (que se ve reflejada en la menor capacidad de absorción de agua y en la menor permeabilidad al vapor de agua) y una mejora en la respuesta al impacto (soportan el quintuple de carga y absorben más del doble de energía), asociado a la posibilidad de cristalización de este plastificante; el Gly es más efectivo como plastificante para películas proteicas, incrementando la elasticidad, flexibilidad y elongación de las películas (40% superior al sistema con Sor).

Por otra parte, y de fundamental importancia para el objetivo con el que se desarrolla el material, el flujo de oxígeno a través de la película plastificada con Gly (Ge/5MMt/30Gly) fue un 35% menor que el de la película control de Ge/30Gly y no presentó cambio considerable respecto al de Ge/5MMt, esto se asocia a la morfología similar observada para ambos sistemas.

V.5. Referencias

- Alexandre M.**, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mater. Sci. Eng. C* 28 (2000) 1-63
- Arvanitoyannis I.**, Nakayama A., Aiba S.I. Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydr.. Polym.* 36 (1998a) 105-119
- Arvanitoyannis I.S.**, Nakayama A., Aiba S. Chitosan and gelatine based edible films; state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr.. Polym.* 37 (1998b) 371-382
- Avella M.**, de Vlieger J.J., Errico M.M., Fischer S., Vacca P., Volpe M.G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chem.* 93 (2005) 467-474
- Chen B.**, Evans J.R.G. Thermoplastic starch-clay nanocomposites and their characteristics. *Carbohydr.. Polym.* 61 (2005) 455-463
- Chen H.** Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 2563-2583
- Cho S.Y.**, Rhee C. Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their Relation to Mechanical Properties *LWT J. Food Sci Tech.* 35 (2002)151-157
- Cuq B.**, Gontard N., Cuq J-L, Guilbert S. Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 622-626
- Fischer H.**, Fischer S.. Patente WO 01/68762 A1, 2001
- García M.A.**, Martino M.N., Zaritzky N.E. Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch/Stärke* 52 (2000) 118-124
- Gennadios A.** “Soft gelatine capsules” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed.. Ed. A. Gennadios, CRC Press, 2002a; 1-41
- Gennadios A.** “Soft gelatine capsules” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed.. Ed. A. Gennadios; CRC Press, 2002b; 393-444
- Gilman J.W.** Flammability and thermal stability studies of polymer layered-silicate (clay) nanocomposites. *Appl. Clay Sci.* 15 (1999) 31-49.
- 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 (1992) 190-199
- Gorrasi G.**, Tortora M, Vittoria V., Pollet E., Lepoittevin B., Alexandre M., Dubois Ph. Vapor barrier properties of polycaprolactone montmorillonite nanocomposites: Effect of clay dispersión. *Polymer* 44 (2003) 2271-2279
- Jerez A.**, Partal P., Martinez I., Gallegos C., Guerrero A. Rheology and processing of gluten based bioplastics. *Biochem. Eng. J.* 26 (2005)131-138
- Kojima Y.**, Usuki A., Kawasumi M., Okada A., Kurauchi T., Kamigaito O. Sorption of water in nylon 6-clay hibrid. *J. Appl. Polym. Sci.* 49 (1993) 1259-1264
- Krogars K.**, Heinämäki J., Karjalainen M., Niskanen A., Leskelä M., Yliruusi J. Enhanced stability of rubbery amylose-rich maize starch films plasticized with a combination of sorbitol and glycerol. *Int. J. Pharm.* 251 (2003) 205- 208
- Larré C.**, Desserme C., Barbot J., Gueguen J. Properties of deaminated gluten films enzymatically cross-linbked. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5444-5449

- LeBaron P.C.**, Wang Z., Pinnavaia T.J. Polymer-layered silicate nanocomposites: an overview. *Appl. Clay Sci.* 15 (1999) 11–29
- Lepoittevin B.**, Pantoustier N., Devalckenaere M., Alexandre M., Kubies D., Calberg C., Jérôme R., Dubois Ph. Poly(ϵ -caprolactone)/clay nanocomposites by in-situ intercalative polymerization catalyzed by dibutyltin dimethoxide. *Macromolecules* 35 (2002) 8385-8390
- Leung H.K.** “Water activity and others colligative properties of food” en *Physical and Chemical properties of food*; M.R. Okos (Ed.). Michigan: American Society of Agricultural Engineers; 1986; 138-185
- 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. *Carbohydr. Polym.* 60 (2005) 283–289
- 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. *Carbohydr. Polym.* 56 (2004) 129-135
- Mangavel C.**, Barbot J., Gueäguen J., Popineau Y. Molecular determinants of the influence of hydrophilic plasticizers on the mechanical properties of cast wheat gluten films. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1447-1452
- Martucci J.F.**, Vazquez A., Ruseckaite R.A. Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite. Morphological and thermal studies. *J. Therm. Anal. Calorim.* 89 (2007) 117-122
- Miller K.S.**, Krochta J.M. Oxygen and Aroma Barrier Properties of Edible Films: A Review. *Trends Food Sci Tech* 8 (1997) 228-237
- Nashed G.**, Rutgers R. P. G., Sopade P. A. The plasticisation effect of glycerol and water on the gelatinisation of wheat starch. *Starch/Stärke* 55 (2003) 131–137
- 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.
- 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 (2002) 5417-5425
- Pandey J.K.**, Singh R.P. Green Nanocomposites from renewable resources: Effect of plasticizer on the structure and material properties of clay-filled starch. *Starch/Stärke* 57 (2005) 8–15
- Park H-M.**, Li X., Jin C, Park C., Cho W., Ha C. Preparation and properties of Biodegradables Thermoplastic Starch/Clay Hybrids. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 553-558
- Park H-M.**, Lee W-K, Park C-Y, Cho W-J, Ha C-S. Environmentally friendly polymer hybrids Part I mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites *J. Mater. Sci.* 38 (2003) 909–915
- Paschoalick T.M.**, García F.T, Sobral P.J.A., Habitante A.M.Q.B. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. *Food Hydrocolloid.* 17 (2003) 419-427
- Paul M-A.**, Alexandre M., Degée P., Henrist C., Rulmont A., Dubois P. New nanocomposite materials based on plasticized poly(L-lactide) and organo-modified montmorillonites : Thermal and morphological Study. *Polymer* 44 (2003) 443-450
- Paul M-A.**, Delcourt C., Alexandre M., Degée Ph., Monteverde F., Dubois Ph. Polylactide/montmorillonite nanocomposites: Study of the hydrolytic degradation. *Polym. Degrad.. Stabil.* 87 (2005) 535-542
- Peleg M.** An empirical model for the description of moisturesorption curves. *J. Food Sci.* 53 (1988) 1216-1219

- Pereda M.**, Marcovick N.E., Aranguren M.I. Characterization of Chitosan/Caseinate films. *J. Appl. Polym. Sci.* xx (2007) xxx-xxx
- Pereira de Abreu D.A.**, Paseiro Losada P., Angulo I., Cruz J.M. Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. *Eur Polym J* 43 (2007) 2229-2243
- Ray S.S.**, Okamoto M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1539-1641
- Shaw N.B.**, Monahan F.J., O’Riordan E.D., O’Sullivan M. Physical properties of WPI films plasticized with glycerol, xylitol or sorbitol. *J. Food Sci.* 67 (2002) 164-167
- Sloan A.E.** Properties and effects of humectants in intermediate moisture foods. Tesis doctoral, Minneapolis: Universidad de Minnesota; 1976
- 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 Hydrocolloid.* 15 (2001) 423-432
- Sthornvit R.**, Krotcha J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* 50 (2001) 149-155
- Tang C-H.**, Jiang Y., Wen Q-B., Yang X-Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *J. Biotech.* 120 (2005) 296-307
- 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 (2005) 899-907
- Wang S.**, Song C., Chen G., Guo T., Liu J., Zhang B., Takeuchi S. Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co- 3-hydroxyvalerate)/organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite. *Polym. Degrad.. Stabil.* 87 (2005) 69-76
- Wu Q.**, Zhang L. Properties and structure of soy protein isolate-ethylene glycol sheets obtained by compression molding. *Ing. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 1879-1883
- Xu S.W.**, Zheng J.P., Tong L., De Yao K. Interaction of Functional Groups of Gelatin and Montmorillonite in Nanocomposite. *J Appl Polym Sci* 101 (2006) 1556–1561
- Yalcin B.**, Cakmak M. The role of plasticizer on the exfoliation and dispersion and fracture behaviour of clay particles in PVC matrix: a comprehensive morphological study. *Polymer* 45 (2004) 6623-6638
- Zheng J.P.**, Li P., Ma Y.L, DeYao K. Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposiote. I.Preparation and Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189-1194

Capítulo VI

Obtención y caracterización de películas multicapa

Capítulo VI

Obtención y caracterización de películas multicapa

En este capítulo se sintetizará una película multicapa (laminado) basada en gelatina. Se analizarán sus propiedades finales, fundamentalmente sus propiedades de barrera y sus propiedades mecánicas en tracción e impacto.

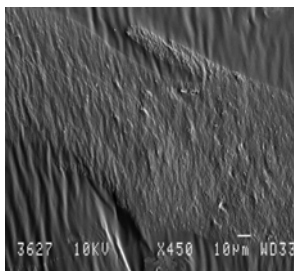


Figura VI.1. Imagen de SEM Ge-SD10||Ge/5MMt||Ge-SD10

VI.1. Introducción

En los capítulos anteriores se desarrolló la obtención y caracterización de películas individuales basadas en gelatina. En este capítulo, se combinarán las películas individuales para la obtención de una película multicapa que reúna las propiedades de sus componentes individuales ([Martin y col. 2001](#); [Avella y col. 2005](#))

La selección de las películas que compondrán el material multicapa se basa fundamentalmente en las propiedades de barrera y mecánicas determinadas para cada una de ellas

Ge-SD10/30Gly: Las películas entrecruzadas con 10% de SD exhibieron una mejora en la estabilidad térmica y en la absorción de humedad, comparada con la película de Ge/30Gly y Ge-GTA1/30Gly. Las propiedades mecánicas resultaron óptimas para concentraciones de 5-10%SD. La película de Ge-SD10/30Gly presenta una disminución del 40% en el módulo y de un 30% en la tensión de rotura, pero se incrementa la elongación a la rotura en un 15%, lo que brinda un material con mayor flexibilidad (Capítulo III. Tabla III.4). La ventaja adicional de este agente químico es que presenta muy baja citotoxicidad comparado con GTA y BDGE ([Wilson 1959](#); [Bigi y col. 2001](#)).

Ge/5MMt/30Gly: como ya se discutió en el Capítulo IV, la presencia de arcilla redujo la afinidad de los compuestos por el agua, debido a las interacciones de tipo de hidrógeno entre la Ge y la arcilla. Los materiales con 3-10% en masa de MMt mostraron una mejora a la absorción de agua y una disminución en la permeabilidad al vapor de agua, además de una leve mejora en la estabilidad térmica. Las propiedades mecánicas resultaron adecuadas para contenidos de 5-10% de arcilla. Se seleccionó un contenido de plastificante de 30% en masa a fin de obtener materiales con morfología exfoliada/intercalada sin detrimento considerable de sus propiedades mecánicas (Capítulo V). Se seleccionó el glicerol como plastificante, debido a su mayor efectividad como plastificante para películas proteicas. Esto se evidenció no solo en las propiedades mecánicas en tracción (mayor flexibilidad), sino también en impacto (mayor deformación). La presencia de este plastificante no perjudica las propiedades de barrera al oxígeno de la película, pero afecta en forma desfavorable la resistencia a la humedad de las películas (Capítulo V. Tabla V.4).

Por lo tanto, se propone el diseño de un laminado donde la película Ge/5MMt/30Gly actúe como barrera interna (barrera a gases y propiedades mecánicas) y las entrecruzadas y plastificadas Ge-SD10/30Gly como capas externas, de mayor resistencia a la humedad y buenas propiedades mecánicas. Es esperable que el laminado obtenido presente una alta afinidad entre capas individuales, debido a que todas están basadas en gelatina y éstas pueden unirse entre sí mediante enlace de hidrógeno ([Apostolov y col. 2002](#); [Rhim y col. 2006](#), [2007](#)).

VI.2. Preparación y caracterización de las películas

Las películas multicapa se procesaron por el método de moldeo por compresión propuesto por [Apostolov y col. \(2002\)](#). La Figura VI.2 esquematiza el procesamiento utilizado. Si bien la coextrusión es la técnica más aplicada para la obtención de laminados (Automated Packaging Systems www.autobag.com; [Thong Guan Industries Berhad](#) www.thongguan.com; FlexTech Packaging Ltd. www.flextechpkg.com; [Wang y col. 2000](#); [Martin y col. 2001](#); [Adhikari y col. 2005](#); [Paradkar y col. 2007](#)), el moldeo por compresión también se utiliza para producir laminados, fundamentalmente los basados en biopolímeros, tales como: almidón plastificado ([Hulleman y col. 1998](#), [1999](#)); policaprolactona y polihidroxibutirato co-valerato (PCL y PHBV) ([Krook y col. 2000](#)); almidón y poliéster ([Martin y col. 2001](#)); quitosano, proteínas del suero y nitrocelulosa ([Gallstedt y col. 2001](#)); almidón y gelatina ([Apostolov y col. 2002](#)), multicapas basados en polivinil alcohol (PVA) ([Corti y col. 2002](#)). También se aplica sobre películas multicapa basadas en polímeros tradicionales como polietileno/polipropileno (PE/PP) ([Moreno y Leever 2004](#)).

La técnica de moldeo por compresión para producir laminados consiste en dos etapas: en primer lugar se obtienen las películas individuales y en una segunda etapa se procede a la preparación del laminado por compresión de las películas individuales.

En este trabajo se recurrió a la técnica de moldeo por compresión para la obtención de una película multicapa basada en Ge. En primera instancia se obtuvieron las láminas individuales de Ge/5MMt/30Gly y Ge-SD10/30Gly con un espesor de aproximadamente 0.22mm. Luego, se colocaron en un marco a fin de ajustar el espesor a 0.6mm. Se aplicó 50 Kg/cm² de presión a 70°C durante un tiempo de 10 minutos y

luego, se liberó la presión y se llevó todo el sistema a temperatura ambiente. Se utilizaron placas de PET como material desmoldante. La película multicapa se denominó **Ge-SD10||Ge/5MMt||Ge-SD10**, donde las barras dobles indican la separación de los componentes individuales del laminado.



Figura VI.2. Esquema del procesamiento de moldeo por compresión para la obtención del multicapa

El laminado obtenido presenta una buena claridad óptica, como queda demostrado en las fotos de la Figura VI.3.

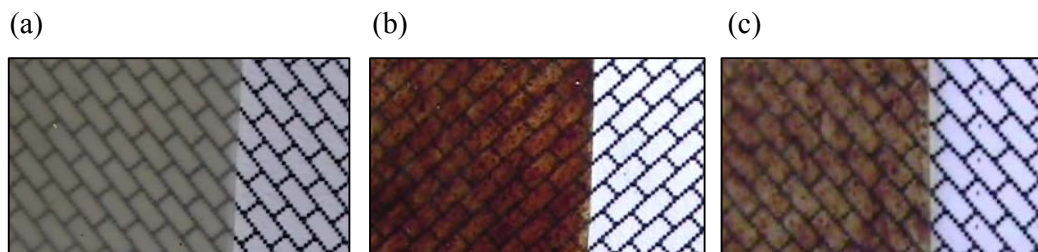


Figura VI.3. Aspecto macroscópico de las películas individuales (a)Ge/5MMt/30Gly (b)Ge-SD10/30Gly y (c)laminado.

Es deseable que el laminado presente una alta afinidad entre capas individuales. Debido a que todas las láminas están basadas en gelatina, éstas pueden interactuar entre sí mediante interacciones de puente de hidrógeno e interdifundir incrementando la compatibilidad ([Apostolov y col. 2002](#); [Rhim y col 2006, 2007](#)). Es importante indicar que la adhesión entre capas resultó tan eficiente que no pudieron ser separadas por "pelado" manual. Por lo tanto si se considera que el mayor inconveniente de los laminados es la delaminación y que ésta se produce fundamentalmente por incompatibilidad entre capas ([Apostolov y col. 2002](#); [Kumar y Varma 2006](#)), este resultado indica que las capas individuales presentan una muy buena adhesión entre si. A fin de analizar esto último con más detalle, se observaron por SEM las superficies de

fractura de los laminados inmediatamente después de ser obtenidos y los resultados se resumen en la Figura VI.4 a y b. A los fines comparativos se analizaron las superficies de fractura de las películas individuales (Figura VI.4 c y d).

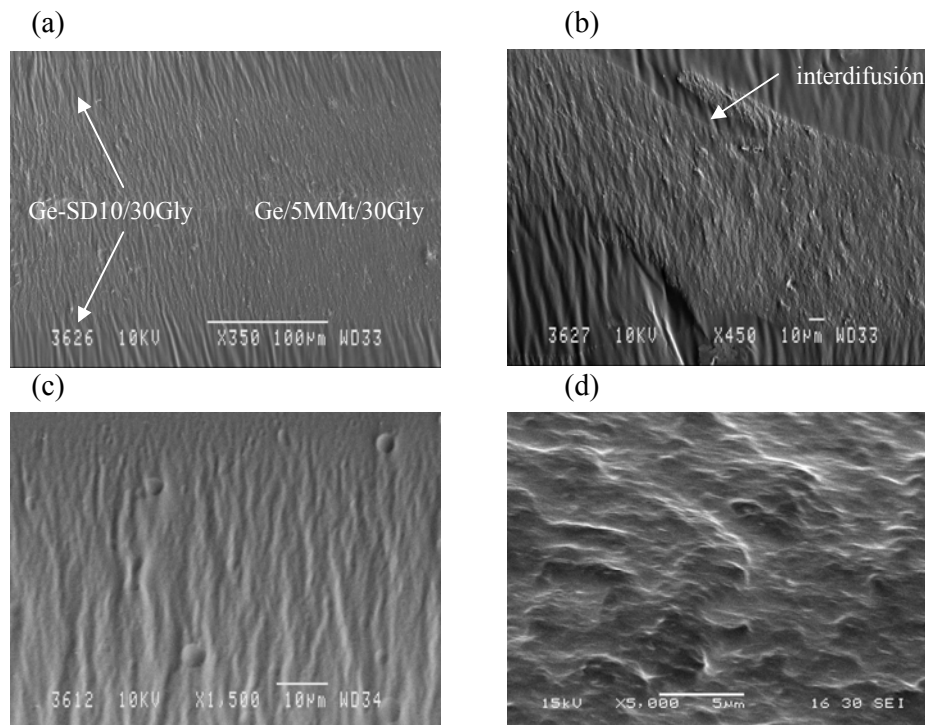


Figura VI. 4. Imágenes de SEM de las superficies de fractura de(a, b) Ge-SD10||Ge/5MMt||Ge-SD10, (c) Ge-SD10/30Gly, (d) Ge/5MMt/30Gly

La morfología de las películas individuales (Figura VI.4 c y d) es claramente distinguible en el laminado (Figura VI.4 a y b). Se observa que no se produce delaminación de las películas. Las capas se encuentran fuertemente unidas por lo que se supone que éstas actúan como adhesivo una de otra. Esto se debe a que ambas películas presentan gran similitud desde el punto de vista químico. Debido a los grupos funcionales presentes en las cadenas de gelatina es posible suponer que las distintas capas se mantienen unidas por interacciones de hidrógeno ([Apostolov y col. 2002](#)). Además durante el procesamiento a temperatura es posible suponer que puede haber algún tipo de reacción de condensación entre las capas como ya ha sido observado para otros sistemas laminados basados en gelatina ([Apostolov y col. 2002, 2003](#)).

Algunas propiedades de los laminados y las películas individuales que le dieron origen se resumen en la Tabla VI.1. El espesor promedio para las películas control y

laminados es de aproximadamente 0.60mm. Es importante tener en cuenta que el espesor determinará algunas propiedades tales como las de barrera a gases.

Los valores de opacidad de los laminados y películas individuales, así como la transmitancia a 660nm (que es una medida de la transparencia de las películas ([Rhim y col. 2006](#))) también se presentan en la Tabla VI.1. En general la claridad óptica se ve afectada por la presencia de aditivos, condiciones de procesamiento ([Cunningham y col. 2000](#)) y por la compatibilidad entre componentes de un laminado ([Wang y col. 2000](#)). La opacidad del laminado resultó ser de 229.9 ± 42.8 UA.nm, y el valor de transmitancia a 660nm de 40.7 ± 10.7 %. La opacidad del material multicapa es significativamente menor que la de la película de Ge-SD10/30Gly y levemente mayor que la de la película Ge/5MMt/30Gly. El aumento de la transmitancia (Figura VI.3) de la película multicapa es una evidencia indirecta de que existe una buena compatibilidad entre las capas individuales ([Rhim y col. 2006](#)).

Tabla VI.1 Espesor promedio, opacidad y transmitancia a 600 nm de las películas individuales y del laminado.

	Espesor (mm)	Opacidad (UA.nm)	T(%)_{660nm}
Ge-SD10/30Gly	0.63 ± 0.04	383.9 ± 32.1	19.9 ± 4.9
Ge/5MMt/30Gly	0.58 ± 0.03	218.3 ± 11.9	31.1 ± 2.8
Multicapa	0.59 ± 0.02	229.9 ± 42.8	40.7 ± 10.7

VI.3. Resultados y discusión

Se analizaron las propiedades del laminado obtenido y se compararon con las de las láminas individuales de igual espesor. El objetivo de obtener un material multicapa es que este reúna las propiedades individuales de cada uno de sus constituyentes. Esto es esperable si existe una buena adhesión entre las películas individuales y si no se producen daños durante el procesamiento.

La absorción de humedad se evaluó colocando las películas en una cámara de humedad controlada (75%HRE) y midiendo la ganancia de peso en función del tiempo. La Figura VI.5 muestra los resultados obtenidos y el ajuste de los datos mediante la ecuación empírica de Peleg ([Peleg 1988](#)). Puede observarse que el material multicapa presenta menor capacidad de absorción que las películas individuales, indicando un

efecto sinérgico entre los componentes. Es de esperar que el comportamiento del laminado se encuentre gobernado principalmente por la capa externa que es la que ofrece un contacto directo con el ambiente húmedo. Sin embargo la difusión del permeante se ve afectada por la capa interna, que ofrece un incremento al camino tortuoso, disminuyendo la capacidad de absorción inicial de la película, como ya se indicó previamente en el estudio de las películas reforzadas con MMt (Capítulo V).

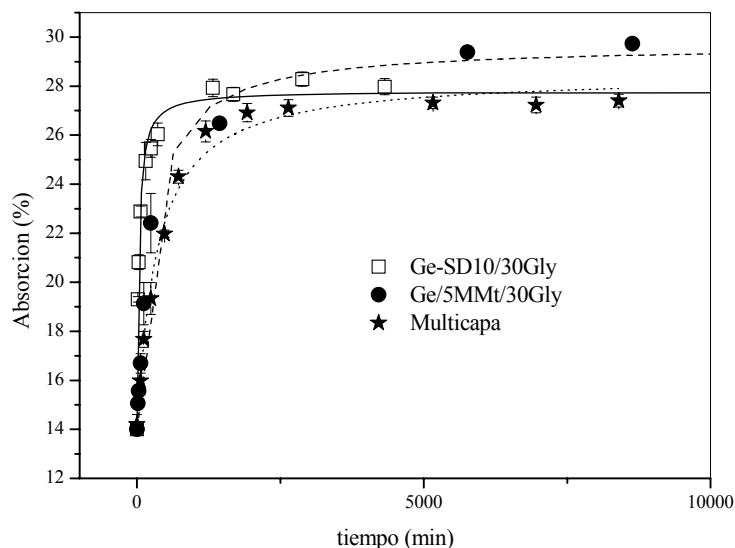


Figura VI. 5. Curvas de absorción de humedad de las películas y ajuste de la ecuación de Peleg

Los parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg se muestran en la Tabla VI.2. El valor de K_1 del material multicapa es mayor que el de los materiales individuales, indicando una menor capacidad de absorción inicial de las películas. Por otra parte el valor de W_E es aproximadamente igual al de la película de Ge-SD10/30Gly, lo que indica que ese material gobierna la capacidad de absorción final del laminado.

Tabla VI.2. Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión aparente. HRE 75%. T: 25°C

	K_1 (min/%)	$K_2 \cdot 10^2$ (% ⁻¹)	r^2	W_E (%)	$D_{app} \cdot 10^9$ (cm ² /seg)
Ge/5MMt/30Gly	15.6 ± 1.3	6.4 ± 0.1	0.99	29.4 ± 0.1	2.9 ± 0.5
Ge-SD10/30Gly	2.3 ± 0.2	7.2 ± 0.1	0.99	27.9 ± 0.3	45.0 ± 6.6
Multicapa	23.6 ± 2.0	6.9 ± 0.1	0.99	27.8 ± 0.1	3.9 ± 0.3

Se calcularon los coeficientes de difusión aparente del material (Tabla VI.2) mediante la ecuación II.15 (Capítulo II.2.12). En concordancia con los resultados anteriores, la película multicapa exhibe un coeficiente de difusión menor al de las capas externas. Esto indica que efectivamente la película interna de Ge/5MMt/30Gly dificulta la difusión del permeante por incremento del camino tortuoso.

Las propiedades de barrera al vapor de agua y a oxígeno del material multicapa obtenido son de fundamental importancia para evaluar su posibilidad de uso como envase comercial. En la Tabla VI.3 se resumen los resultados obtenidos. Se observa que las películas individuales no presentan diferencias apreciables en cuanto a su permeabilidad al vapor de agua. Sin embargo, la combinación de las distintas capas produce una mejora en la WVP. El efecto podría deberse a las interacciones entre las capas individuales de tipo puente de hidrógeno que se generan durante el procesamiento y que limitan la cantidad de grupos polares disponibles para el vapor de agua. Los valores de WVP hallados en bibliografía para películas de uso comercial son 4.9×10^{-16} Kg.m/Pa.s.m² para PP, $1.2-1.5 \times 10^{-15}$ Kg.m/Pa.s.m² para poliéster, $0.5-1.6 \times 10^{-14}$ Kg.m/Pa.s.m² para acetato de celulosa y 4.66×10^{-14} Kg.m/Pa.s.m² para PLA ([Rhim y col. 2006](#)). El valor de WVP obtenido para la película multicapa es de 8.0×10^{-14} Kg.m/Pa.s.m², este resultado indica que la permeabilidad del laminado es comparable a la de películas de acetato de celulosa y PLA. Los resultados obtenidos para WVP se correlacionan con las medidas de ángulo de contacto y polaridad superficial (Tabla VI.3). La película multicapa presenta una disminución en la polaridad superficial respecto la observada para la capa Ge-SD10/30Gly (externa) asociada a la formación de puentes de hidrógeno entre láminas lo que disminuye el número de grupos polares disponibles.

Tabla VI.3. Polaridad superficial y propiedades de barrera de las películas

	Ángulo de contacto (°)		X _P (%)	Propiedades de barrera	
	θ _{diiodometano}	θ _{etilenglicol}		Q (cm ³ .mm/m ² .día)	WVP*10 ¹³ (kg.m/Pa.s.m ²)
Ge/5MMt/ 30Gly	19.4±1.4	34.3±2.0	4.7	10.9±1.9	1.4±0.1
Ge-SD10/ 30Gly	22.1±0.8	33.9±3.9	5.6	12.1±2.6	1.7±0.05
Multicapa	20.7±1.2	35.0±1.5	4.8	10.5±0.4	0.8±0.1

Además de la permeabilidad al vapor de agua se analizó el el valor de Q, obtenido mediante el flujo de oxígeno a través de la película (OT_∞) y proporcional a la

permeabilidad al oxígeno, PO (Capítulo II.2.16). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI.3. Como ya se indicó en el capítulo anterior, los valores de Q obtenidos no tienen una correlación directa con la PO, por lo que no pueden ser comparados con la mayoría de los datos informados en literatura. Utilizando el mismo equipo se obtuvo un valor de Q de $2.5 \pm 0.1 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{día}$ para PET y $43.6 \pm 0.4 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} / \text{m}^2 \cdot \text{día}$ para películas basadas en acetato de celulosa ([Valente y col. 2007](#)). Los resultados indican que las películas basadas en Ge son una buena barrera a oxígeno, como era de esperar dada la naturaleza hidrofílica de las películas ([McHugh y Krotcha 1994](#); [Rhim y col. 2006](#)). Sin embargo, la permeabilidad se ve mejorada por la adición de la carga inorgánica (Capítulo V, Tabla V.4). Puede observarse que la película multicapa presenta un resultado similar a la película interna, indicando que esta capa es la que gobierna la permeabilidad a gases, acorde a lo esperado para materiales multicapa tradicionales. [Rhim y col. \(2006\)](#) obtuvieron resultados similares para películas basadas en PLA/SPI/PLA.

Las propiedades mecánicas de los materiales se analizaron tanto en tracción como en impacto (Tabla VI.4). Puede observarse que la película multicapa presenta valores de módulo y tensión a la rotura comprendidos entre los obtenidos para las láminas individuales. El incremento en el módulo y en la tensión de rotura con respecto a la película utilizada como capa externa, se deben a la incorporación de la capa interna de Ge/5MMt/30Gly. La elongación a la rotura no presenta un cambio significativo.

Las propiedades mecánicas de las películas multicapa son dependientes de la compatibilidad entre los componentes individuales ([Rhim y col. 2006](#)). [Martin y col. \(2001\)](#) analizaron las propiedades mecánicas de películas laminados basados en almidón plastificado y PLA y observaron que películas con baja compatibilidad al ser procesadas como multicapa, presentan una reducción en la elongación a la rotura, mientras que si la compatibilidad es buena, existe un incremento hasta del 50% en la tensión de rotura del laminado. En los laminados obtenidos, donde la película de Ge-SD10/30Gly representa un 66% del laminado, puede observarse que el incremento en el módulo y en la tensión de rotura supera a los valores que se obtendrían por una simple regla de mezclas. Esto, sumado al hecho de que al realizar los ensayos no se observó separación de las capas individuales del laminado, indica una fuerte adhesión y alta compatibilidad entre las láminas de Ge/5MMt/30Gly y Ge-SD10/30Gly.

Los resultados en ensayos de impacto para las películas individuales muestran que la tenacidad de la película Ge/5MMt/30Gly es considerablemente mayor que la determinada para Ge-SD10/30Gly. Esto indica que la presencia de MMt produce un efecto mayor que el entrecruzamiento químico sobre la resistencia del material. La película multicapa presenta un valor aproximado de E_i de $4,01 \times 10^{-3}$ J/mm que resulta similar a la de Ge-SD10/30Gly. Este resultado puede atribuirse al hecho de que el material consiste de un 66% de Ge-SD10/30Gly. El incremento en el valor de σ_d para el laminado respecto del observado para Ge-SD10/30Gly puede atribuirse a la presencia de la capa Ge/5MMt/30Gly.

Tabla VI.4. Propiedades mecánicas en tracción e impacto de las películas.75%HRE

	Propiedades en tracción			Propiedades en impacto	
	E (MPa)	Elongación a la rotura (%)	Tensión de rotura (MPa)	$E_i \cdot 10^3$ (J/mm)	σ_d (GPa)
Ge/5MMt/30Gly	38.5± 10.9	99.1±11.1	12.1±1.7	19.5±4.3	6.6±0.9
Ge-SD10/30Gly	1.9±0.3	111.8±12.1	2.7±0.4	3.6 ±0.8	2.4±0.2
Multicapa	14.7±2.4	110.0±15.1	8.0±1.3	4.0±1.7	4.2±1.5

VI.4. Conclusiones parciales

Se prepararon películas multicapa basada en gelatina mediante la combinación de películas individuales (entrecruzadas y reforzadas con arcillas) y a través de la técnica de moldeo por compresión. No se requirió modificación química superficial ni adición de ningún compatibilizante (adhesivo) debido a la alta compatibilidad de las películas individuales entre sí. Esta afinidad se evidenció por una eficiente adhesión que imposibilitó su separación por “pelado” manual y, por un incremento en la transparencia de la película comparada a las láminas individuales de igual espesor. Las imágenes de SEM confirmaron estos resultados, observándose interdifusión de las capas durante el procesamiento.

Todas las propiedades analizadas para el laminado reflejaron un efecto sinérgico de los componentes individuales en beneficio de la película multicapa. El laminado mostró una mejora en la absorción de agua y en las propiedades de barrera al oxígeno.

La permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno resultaron menores que la de cualquiera de sus componentes individuales. La respuesta del laminado a una sollicitación mecánica en tracción e impacto presentó resultados intermedios entre los de sus componentes individuales; el incremento en el módulo y en la tensión de rotura supera a los valores que se obtendrían por una simple regla de mezclas. Además no se observaron cambios significativos en la elongación a la rotura.

El análisis global de las propiedades indica que el laminado obtenido podría reemplazar en algunas aplicaciones a los comercialmente disponibles, con la ventaja adicional de provenir de un recurso renovable y biodegradable. Por lo tanto, es de fundamental importancia evaluar el comportamiento biodegradativo del material luego de su vida útil. En el capítulo siguiente se analizará la biodegradabilidad en suelo del material multicapa obtenido y de sus películas individuales.

VI.5. Referencias

- Adhikari R.**, Lebek W., Godehardt R., Henning S., Michler G. H., Baer E., Hiltner A. Investigating morphology and deformation behaviour of multilayered PC/PET composites. *Polym. Adv. Technol.* 16 (2005) 95–101
- Apostolov A.A.**, Fakirov S., Evstatiev M., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable Laminates Based on Gelatin, I Preparation and Mechanical Properties. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 693-697
- Apostolov A.A.**, Fakirov S., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable laminates based on gelatin, 2a weathering, sliding wear and abrasion resistance. *Macromol. Mater. Eng.* 288, 3 (2003) 228-234
- 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 (2001) 763-768
- Corti A.**, Cinelil P., D'Antone S., Kenawy E-R., Solaro R. Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) in Soil Environment: Influence of Natural Organic Fillers and Structural Parameters. *Macromol. Chem. Phys* 203 (2002) 1526–1531
- Cunningham P.**, Ogale A.A., Dawson P.L., Acton J.C. Tensile properties of soy protein isolate films produced by thermal compaction technique. *J. Food Sci.* 65, 4 (2000) 668-671
- Gallstedt M.**, Tornqvist J., Hedenqvist M.S. Properties of Nitrocellulose-Coated and Polyethylene-Laminated Chitosan and Whey Films. *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 39 (2001) 985–992
- Hulleman S.H.D.**, Janssen F.H.P., Feil H. The role of water during plasticization of native starches. *Polymer* 39 (1998) 2043–2048.
- Hulleman S.H.D.**, Kalisvaart M.G., Janssen F.H.P., Feil H., Vliegthart J.F.G. Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticized compression-moulded potato starches. *Carbohydr. Polym.* 39 (1999) 351–360.
- Krook M.**, Hedenqvist M.S., Albekisson A-C., Hellman A., Iversen T., Gedde U.W. Barrier and Mechanical Properties of Pulp Fiber/Polymer Laminates and Blends. *Polym. Eng. Sci.* 40,1 (2000) 143-156
- Kumar S.**, Varma I.K. Degradation studies of thermoplastics composites of jute fiber-reinforced LDPE/polycaprolactone blends. *Polymer - Plastics Technology and Engineering* 45, 11 (2006) 1219-1225
- Martin O.**, Schwach E., Avérous L., Couturier Y. Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Plasticized Wheat Starch. *Starch/Stärke* 53 (2001) 372–380
- McHugh T.H.**, Krotcha J.M. Sorbitol vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile properties evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 841-849
- Moreno L.**, Leever P. Impact Fracture Toughness of Polyethylene/Polypropylene Multilayers. *Polym. Eng. Sci.* 44, 9 (2004) 1627-1635
- Paradkar R.P.**, Li J., Bar G., Pham H., Bosnyak C., Weinhold J. Measuring the Relative Interface Thickness of Multilayer Polyolefin Films with Atomic Force Microscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 106 (2007) 1507–1517

Peleg M. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.* 53 (1988) 1216-1219

Rhim J-W., Mohanty K.A., Singh S.P., Ng P.K.W. Preparation and properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Soy Protein Isolate and Poly(lactide). *Ind.Eng.Chem.Res.* 45 (2006) 3059-3066

Rhim J-W., Lee J.H, Ng P.K.W. Mechanical and barrier properties of biodegradable soy protein isolate-based films coated with polylactic acid. *LWT* 40 (2007) 232–238

Schrenk W.J., Alfrey T. Coextruded multilayer films and sheets. *Polymer blends* 2 (1978) 129–165.

Valente A.J.M., Jimenez A., Simoes A.C., Burrows H.D., Polishchuk A.Y., Lobo V.M.M. Transport of solutes through calix[4]pyrrole-containing cellulose acetate films. *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 2433–2442

Wang L., Shogren R. L., Carriere C. Preparation and properties of thermoplastic starch-polyester laminate sheets by coextrusion. *Polym. Eng. Sci.* 40 (2000) 499–506.

Wilson R.H. Utilization and Toxicity of Dialdehyde and Dicarboxyl- Starches. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102 (1959) 735-737

Capítulo VII

Degradación en suelo

Capítulo VII

Degradación en suelo

En este capítulo se analizará la degradación en suelo de la película multicapa (laminado) y de sus componentes individuales, con el objetivo de comprobar si el material, pese a las modificaciones y a las condiciones de procesamiento conserva su biodegradabilidad intrínseca

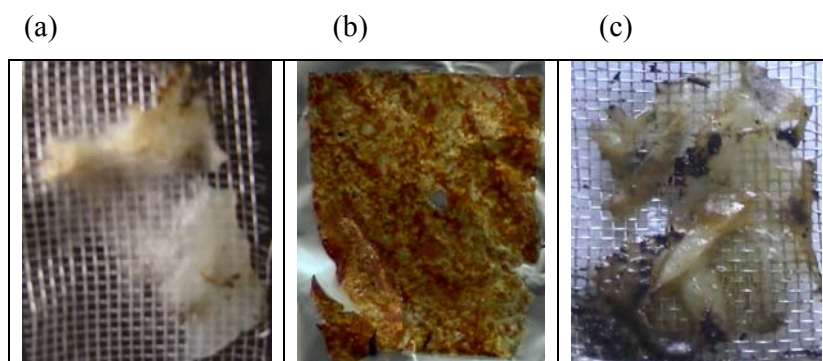


Figura VII.1. Aspecto macroscópico de las películas luego de estar expuestas al suelo durante 7 días (a)Ge/5MMt/30Gly (b) Ge-SD10/30Gly (c) Ge-SD10||Ge/5MMt||Ge-SD10

VII.1. Introducción

El objetivo principal del trabajo de tesis es evaluar el uso potencial de la gelatina en el desarrollo de laminados de bajo impacto ambiental destinados a aplicaciones masivas. Al momento de buscar materiales compatibles con el medioambiente, el análisis de su biodegradabilidad es de fundamental importancia.

Los polímeros tanto naturales como sintéticos son sustratos potenciales para el ataque de microorganismos heterotróficos que incluyen bacterias y hongos. Su degradabilidad es función de la estructura (masa molar promedio, cristalinidad, estereorregularidad, entrecruzamiento, etc.) y de la presencia de una población degradativa y de las condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento microbiano ([Gu 2003](#)). Los oligómeros y aditivos son más fácilmente biodegradados y mineralizados, ya que éstos pueden disolverse o hincharse en agua lo que favorece el ataque microbiano ([Gu 2007](#); [Yu y col. 2007](#)). De esta forma el sustrato es bioasimilado por la membrana celular y luego es degradado por las enzimas celulares ([Gu 2003](#)).

Algunos polímeros como la celulosa, el quitosano, el almidón y el colágeno (precursor de la gelatina) son biológicamente sintetizados y pueden ser degradados completa y rápidamente por microorganismos heterotróficos en diversos ambientes naturales ([Gu 2007](#)).

En el caso de los materiales basados en gelatina, es conocida su susceptibilidad a enzimas proteolíticas (proteasas) ([Dalev y col. 2000](#)) presentes en una variedad de microorganismos. Algunos de los estudios mas detallados han sido realizados sobre películas cinematográficas, donde la gelatina es un componente de la emulsión fotográfica que es sensible a la biodegradación en condiciones ambientales adecuadas ([Pickett y col. 1991](#)). Se observó que la contaminación por bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* induce cambios en la calidad de las películas, en particular sobre la viscosidad y el número de Bloom ([Stickley 1986](#)).

Algunas cepas seleccionadas como *Bacillus subtilis*, producen una proteína alcalina muy activa que puede romper casi todos los enlaces peptídicos en la cadena ya que posee baja especificidad ([Dalev y col. 2000](#)). Asimismo, la gelatina es susceptible al ataque de hongos filamentosos en condiciones adecuadas de humedad. Se ha observado

que aún a 4°C los hongos pueden biodeteriorar el material si son expuestos a condiciones de humedad relativa del orden de 60% ([Abrusci y col. 2006](#)).

En un estudio reciente se analizó la biodegradación de películas cinematográficas expuestas a bacterias y hongos mediante quimioluminiscencia ([Abrusci y col. 2007](#)). Los resultados sugieren que el ataque microbiano produce, no sólo el corte de cadenas peptídicas por efecto enzimático (gelatinasa positivos), sino también la oxidación del material debido a especies oxigenadas reactivas fácilmente detectables por quimioluminiscencia que son generadas durante el metabolismo microbiano.

Debido a que la mayoría de las modificaciones (química, físicas, enzimáticas, mezclas, etc.) no involucran los enlaces peptídicos, es esperable que los materiales modificados puedan degradar frente a enzimas proteolíticas generadas por los microorganismos que existen en medioambientes naturales como el suelo. Sin embargo algunos autores que analizan la biodegradabilidad de películas basadas en gelatina, consideran que estas modificaciones pueden alterar en cierto grado la velocidad y el avance de la biodegradación ([Dalev y col. 2000](#); [Chiellini y col. 2001](#)).

[Dalev y col. \(2000\)](#) analizaron el efecto de la naturaleza y longitud de cadena de distintos agentes entrecruzantes sobre la degradación de películas de gelatina en agua de río y de mar. Los autores indican que la densidad de entrecruzamiento, así como la longitud de cadena del agente químico utilizado, son factores importantes que determinarán la respuesta biodegradativa de las películas de gelatina. La densidad de entrecruzamiento restringe el acceso de agua, y así el hinchamiento de la matriz y el ataque de microorganismos con enzimas proteolíticas. Por lo tanto, el grado de biodegradación resultó dependiente del tipo de agente de entrecruzamiento: las películas entrecruzadas con formaldehído, glioxal o glutaraldehído resultaron más resistentes a la biodegradación (8-10 días) en concordancia con los mayores valores de densidad de entrecruzamiento; por su parte, las películas entrecruzadas con hexametileno diisocianato se degradaron en 3-4 días. Las películas de gelatina control y la entrecruzada con diepóxidos mostraron una respuesta intermedia. [Chiellini y col. \(2001\)](#) analizaron el efecto del entrecruzamiento con GTA sobre la biodegradación de películas basadas en gelatina y observaron una considerable reducción tanto en el porcentaje de biodegradación como en su velocidad para películas con contenidos de GTA entre 1-5%

en masa. Los mismos autores observaron que la adición de alcohol polivinílico (PVA) sobre las películas también redujo la biodegradación en suelo. Esto puede ser atribuido al entrecruzamiento físico que se genera entre el PVA y la proteína que reduce el acceso de las enzimas proteolíticas a las cadenas de gelatina.

Respecto de otras proteínas, [Domenek y col. \(2004\)](#) analizaron la biodegradación de películas de gluten de trigo en suelo de granja y determinaron que las muestras desaparecen en alrededor de 50 días. Asimismo, observaron que los distintos métodos de procesamiento aplicados no alteran la biodegradabilidad de las películas ya que no modifican los enlaces peptídicos que son los susceptibles a la biodegradación.

La presencia de arcillas, ya sea en la forma de montmorillonita modificada o sin modificar, parece alterar la biodegradabilidad de los polímeros biodegradables. [Ray y col. \(2003\)](#) analizaron la biodegradabilidad en *compost* de bionanocompuestos basados en ácido poliláctico (PLA). Los autores observaron un incremento en la mineralización al cabo de 60 días, que atribuyeron a la presencia de grupos oxhidrilos terminales en las capas de silicato. Por su parte, [Wilhelm y col. \(2003\)](#) prepararon compuestos de almidón y arcilla. Los autores suponen que controlando la cantidad de arcilla es posible controlar la biodegradabilidad. Esta suposición se basa en que la hidrólisis del polímero posiblemente depende del transporte de agua desde la superficie hacia el seno del material y esta propiedad puede controlarse con el contenido de refuerzo en el sistema. [Wang y col. \(2005\)](#) analizaron la biodegradabilidad en suelo de nanocompuestos de copolímeros de polihidroxibutirato co-valerato (PHBV) y montmorillonita orgánicamente modificada obtenidos por disolución intercalación. Los autores observan una disminución en la biodegradación con el incremento de carga debido a la presencia de interacciones favorables entre la matriz y el refuerzo que restringe los movimientos de cadenas de PHBV. Además, la cristalinidad de PHBV aumentó con el incremento de refuerzo, lo que contribuye a una menor biodegradabilidad en los compuestos, ya que la biodegradación procede más rápidamente por las zonas amorfas del material. El análisis de la literatura evidencia que la biodegradabilidad de los nanocompuestos es un tema controvertido que merece un estudio más detallado.

Respecto a la biodegradación de películas laminadas existe poca información en la bibliografía. [Boyanova y col. \(2003\)](#) analizaron la degradación enzimática en medio acuoso de laminados de gelatina/almidón-gelatina/fibra de seda obtenidos por moldeo

por compresión. Los laminados degradaron enzimáticamente en forma similar a las películas de gelatina entrecruzadas. Los autores consideran que durante el prensado a temperatura, las láminas de gelatina sufren reacciones de condensación que incrementan la adhesión entre capas y que esto puede afectar la biodegradación de la misma manera que el entrecruzamiento químico o físico.

En este capítulo se analizará la susceptibilidad del material laminado y de las láminas individuales a la degradación mediante los microorganismos presentes en suelo caracterizado según lo descrito en el Capítulo II. 2.19. Se evaluará la pérdida de masa en función del tiempo gravimétricamente (Capítulo II.2.19, Ecuación II.27) y se analizará la absorción de agua (Capítulo II.2.19, Ecuación II.26) de los materiales durante el proceso degradativo. Los cambios morfológicos se analizarán por microscopía electrónica de barrido. Se analizará la variación relativa de la composición de las películas por termogravimetría.

VII.2. Resultados y discusión

Cambio de las propiedades aparentes de las películas con el tiempo de degradación

Se analizaron visualmente las muestras luego de extraerlas a tiempos predeterminados. Previamente se limpiaron a fin de extraer los restos de tierra que quedan adheridos. La Figura VII.2 muestra la apariencia macroscópica de las películas en función del tiempo de exposición al medio degradativo. En términos generales se observa que la película Ge-SD10/30Gly presenta una baja degradación comparada con el importante deterioro observado para las películas Ge/5MMt/30Gly y multicapa (Figura VII.2). En los primeros 5 días de la biodegradación las películas se hinchan considerablemente debido a la absorción de agua. Durante esta primera etapa, las muestras absorben suficiente agua como para asegurar la biodisponibilidad de la misma que favorece el ataque microbiano ([Di Franco y col. 2004](#); [Alvarez y col. 2006](#)). Luego de este primer estadio y durante el tiempo del experimento, las muestras pierden su forma inicial (rectángulos de 2x3cm.). Las películas Ge/5MMt/30Gly y multicapa se degradaron casi completamente al cabo de 14 días, lo que no ocurre en el caso de Ge-SD10/30Gly.

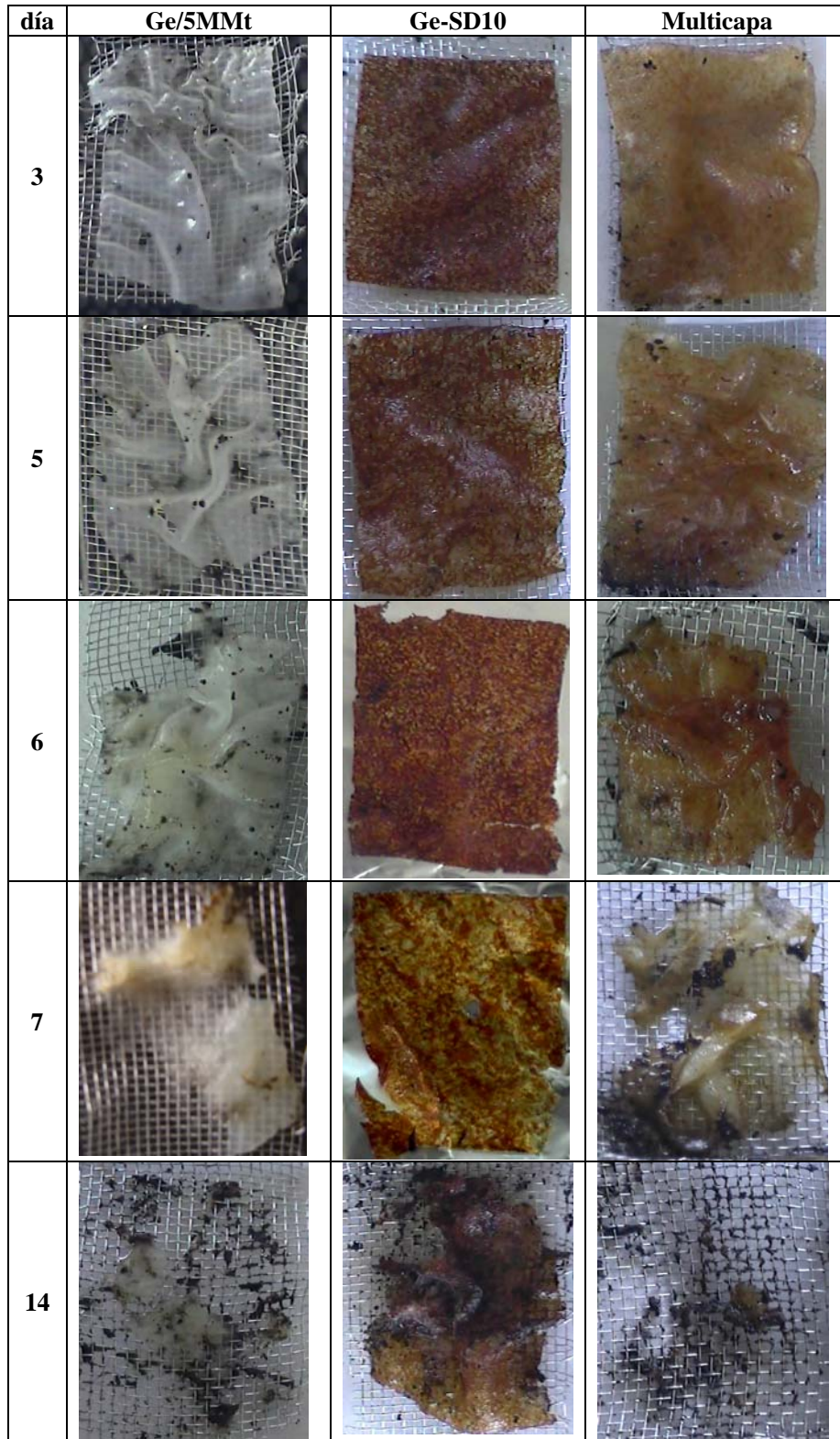


Figura VII. 2. Aspecto macroscópico de las películas con el tiempo de degradación.

Como ya se indicó previamente, el entrecruzamiento con SD reduce la capacidad de absorción de agua de las películas (Capítulo III). Por lo tanto el resultado observado puede relacionarse con el hecho de que las cadenas peptídicas se encuentran menos accesibles para ser atacadas por las enzimas proteolíticas de los microorganismos presentes en el suelo. Resultados similares fueron observados por otros autores sobre películas basadas en Ge ([Dalev y col. 2000](#); [Chiellini y col. 2001](#)) y en metilcelulosa (MC) reforzada con montmorillonita ([Rimdusit y col. 2007](#)). La mayor velocidad de degradación de Ge/5MMt/30Gly y multicapa puede asociarse con la presencia de MMT que sirve como soporte para el ataque de los microorganismos. Estas observaciones están de acuerdo con lo informado para nanocompuestos basados en MC/MMt ([Rimdusit y col. \(2007\)](#)). Los autores indican que las películas reforzadas con MMT presentan una mayor biodegradabilidad que la de sus pares entrecruzadas.

La Figura VII.3 representa la absorción de agua promedio (W_s) calculada aplicando la ecuación II.26 (Capítulo II.2.19) para las distintas películas analizadas y en función del tiempo de exposición.

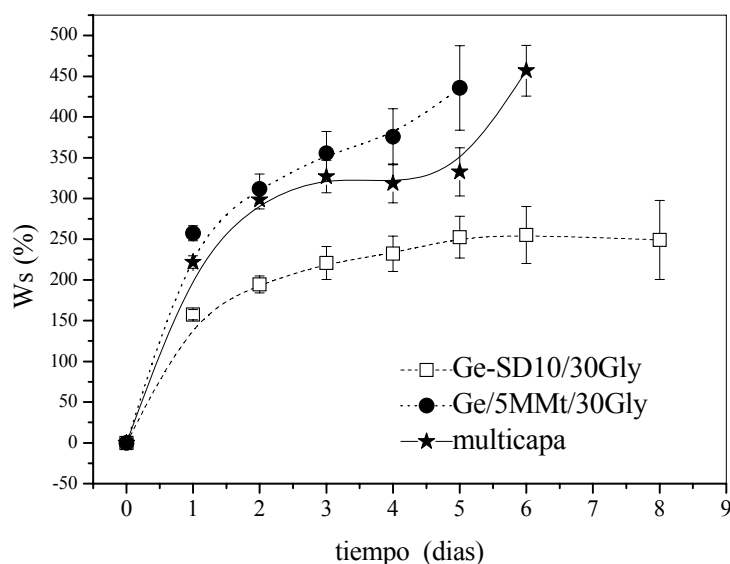


Figura VII.3. Absorción de agua promedio (ec. II.26) de las películas individuales y del laminado

Se observa que la película Ge-SD10/30Gly es la que absorbe menos agua hasta alcanzar un valor casi constante de aproximadamente un 200% alrededor del día 4. Este valor se mantiene hasta el final del experimento (día 8). Por otra parte, la

Ge/5MMt/30Gly es la que absorbe más agua y en forma continua durante todo el tiempo del estudio. La menor afinidad de Ge-SD10/30Gly por el agua es atribuible a la presencia de entrecruzamiento químico que disminuye la disponibilidad de grupos polares afines con el agua ([Dalev y col. 2000](#); [Chiellini y col. 2001](#); [Bigi y col. 2001](#)). En el caso de Ge/5MMt/30Gly, la presencia de interacciones de hidrógeno entre la matriz, el glicerol y la MMT también reducen la polaridad neta de la película (Capítulo V.3, Tabla V.2), pero en menor grado que el entrecruzamiento químico. Por su parte el laminado exhibe un comportamiento intermedio (Figura VII.3). Los resultados concuerdan con la tendencia observada para la polaridad de la superficie de las películas determinada por goniometría. Se observó que para Ge-SD10/30Gly el valor era de 5.6, mientras que para Ge/5MMt/30Gly era de 4.7 y para el laminado resultó 4.8 (Capítulo VI, Tabla VI.3).

Se analizó también la pérdida de masa (WL) de las distintas películas en función del tiempo de exposición al medio degradativo. Las muestras se extrajeron a tiempos predeterminados y se limpiaron cuidadosamente antes de secarlas y pesarlas. Es importante tener en cuenta que el análisis gravimétrico de la pérdida de masa no es el mejor método para evaluar cuantitativamente la degradación en suelo, sobre todo en los últimos estadios del proceso. El estado frágil en que se suelen encontrar las muestras en los últimos estadios hace difícil la remoción de tierra o biomasa ocluida sin dañar el material. Esto puede contribuir a un potencial error en la medida de esta propiedad ([di Franco y col. 2004](#); [Alvarez y col. 2006](#)). Sin embargo, este análisis permitirá evaluar cualitativamente el comportamiento degradativo de los materiales y la influencia de la presencia de nanocargas y de entrecruzamiento químico, así como la respuesta del laminado durante la degradación en suelo.

La Figura VII.4 representa los resultados de pérdida de masa promedio calculados por la ecuación II.27 (Capítulo II.2.19) para los tres materiales. En general la velocidad de degradación de todas las muestras fue rápida (al cabo de 8 días no pudo recuperarse ninguna muestra). Se observa que durante el primer día de exposición, las tres películas pierden aproximadamente la misma masa, lo que puede atribuirse a la pérdida de material de baja masa molar como el plastificante u oligómeros. Esta suposición se basa en que los plastificantes son altamente susceptibles a ser liberados al medio degradativo debido a que no se encuentran covalentemente unidos a la matriz y

que en general, tiene una masa molar pequeña (Gu 2003, 2007). La película Ge-SD10/30Gly sufre la menor pérdida de masa (28%) debido a que la presencia de entrecruzamiento impide el hinchamiento de la matriz y hace menos disponibles las cadenas de gelatina que se encuentran estéricamente impedidas para el ataque de enzimas proteolíticas (Dalev y col 2000). Por su parte, la Ge/5MMt/30Gly exhibe la mayor sensibilidad al medio degradativo como lo indica la mayor pérdida de masa observada al final del estudio (33% de pérdida en el quinto día). En forma análoga a lo observado para compuestos con fibras naturales (di Franco y col. 2004; Alvarez y col. 2006) las partículas de arcilla pueden actuar como soporte para el ataque microbiano y así favorecer indirectamente la biodegradación (Rimdisit y col. 2007).

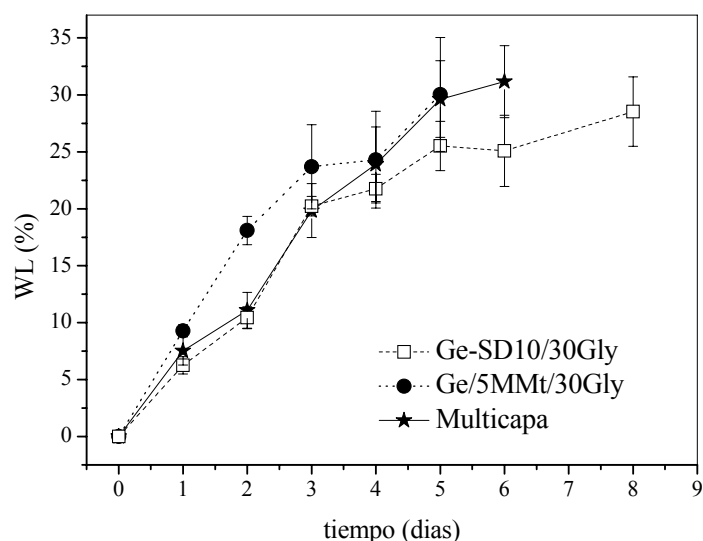


Figura VII.4. Pérdida de masa promedio (ec. II.27) de las películas individuales y del laminado

La película laminada presenta un comportamiento particular. Desde el inicio y hasta el cuarto día la curva de pérdida de masa del laminado se superpone con la de la película Ge-SD10/30Gly (Figura VII. 4). Es posible que durante este primer período las capas externas limiten la absorción global de agua hacia la capa interna retardando el ataque microbiano. Este comportamiento particular de la película multicapa indica que en los primeros estadios el material más biosusceptible está tanto en el multicapa como en Ge-SD10/30Gly, por lo tanto se puede suponer que sea el almidón que forma parte del agente de entrecruzamiento. A partir de este punto y hasta el final del estudio, la

curva de pérdida de masa del laminado se superpone con la de Ge/5MMt/30Gly. Esto puede deberse a tres factores: Primero, la pérdida de material más biosusceptible produce canales que favorecen la entrada de agua y microorganismos presentes en el suelo, y la velocidad de degradación se incrementa. Segundo, la arcilla ofrece una superficie rugosa que actuaría como soporte favoreciendo indirectamente el ataque microbiano, y así la biodegradación. Tercero, la presencia de un consorcio de bacterias y hongos en las últimas etapas de la biodegradación pueden actuar sinérgicamente promoviendo el proceso degradativo. Esto último se corroboró experimentalmente por microscopía electrónica de barrido, como se verá más adelante. Es importante indicar que a pesar de que el experimento se llevó a cabo durante 14 días, las muestras del laminado y de la película reforzada con arcilla ya no pudieron recuperarse debido al avanzado estado de biodegradación (Figura VII. 2). La única muestra que pudo recuperarse fue la Ge-SD10/30Gly, en concordancia con su menor velocidad de degradación relativa.

A fin de evaluar el ataque preferencial sobre algunos de los componentes, se analizaron termogravimétricamente los cambios relativos en la composición de las películas en función del tiempo de degradación. La Figura VII.5.a representa las derivadas de las curvas de pérdida de masa normalizadas para cada película antes de exponerlas al ambiente degradativo. En todas se observa un primer pico centrado alrededor de 120-150°C que corresponde a la pérdida de compuestos de baja masa molar como los plastificantes, en este caso glicerol, y oligómeros. La película Ge/5MMt/30Gly presenta un pico adicional centrado en 332°C que corresponde a la degradación de la cadena principal de gelatina ([Barreto y col. 2003](#)). El pico de MMt no se observa en el rango de temperaturas analizado, ya que aparece alrededor de 634°C (Capítulo II.3.3) ([Pramoda y col. 2003](#)). En la película Ge-SD10/30Gly se observa un segundo pico situado alrededor de 260°C correspondiente al almidón (Capítulo II.3.2) ([Aggarwal y Dollimore 1998](#); [Fringant y col. 1998](#); [di Franco y col. 2004](#); [Alvarez y col. 2006](#)), seguido del correspondiente a la gelatina. En cuanto a la película multicapa, se observan tres picos bien definidos asignados a la degradación de glicerol, almidón y gelatina.

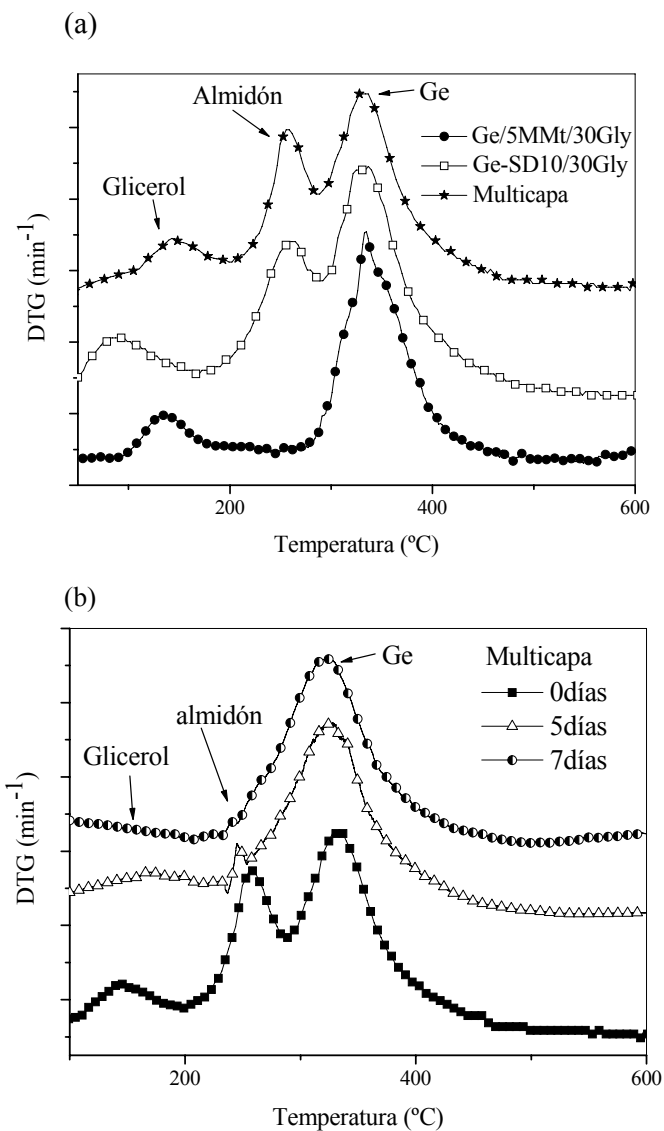


Figura VII.5. Evolución cualitativa de la composición de la película multicapa luego de diferentes tiempos de degradación en suelo, determinadas por DTG (a) Láminas individuales y multicapa previo a la exposición (b) multicapa

La Figura VII.5.b muestra las curvas de DTG obtenidas sobre películas multicapa extraídas a distintos tiempos de degradación. Se observa que luego de 5 días el pico de glicerol ha desaparecido por completo y que se ha producido una disminución en intensidad del pico asignado al almidón acompañado por un ensanchamiento del de gelatina. Este resultado indica que el almidón es el componente más biosusceptible en las primeras etapas del proceso degradativo. Una explicación plausible para el comportamiento degradativo del laminado puede ser la siguiente. Probablemente, el

almidón se encuentre más biodisponible al ataque de amilasas presentes en la microflora del suelo ([di Franco y col. 2004](#); [Alvarez y col. 2006](#)). La hidrólisis del almidón reduce el grado de entrecruzamiento, ya que el almidón forma parte de la cadena del agente de entrecruzamiento polimérico utilizado. De esta forma las cadenas de gelatina se encontrarán menos impedidas para el ataque microbiano, que a su vez se verá promovido por la presencia de arcilla de la capa interna que sirve de soporte para los microorganismos. Esta suposición concuerda con el comportamiento particular de la curva de pérdida de masa del laminado (Figura VII.4) analizado previamente. El ensanchamiento del pico de gelatina puede atribuirse a la presencia de productos de degradación de las cadenas polipeptídicas, pero los fragmentos generados no son suficientemente pequeños como para difundir al medio. Así, el ensanchamiento del pico de gelatina puede entonces relacionarse con un ensanchamiento en la distribución de masas molares de la gelatina. Al cabo de 7 días sólo se observa el pico correspondiente a la gelatina. Tiempos mayores de exposición conducen a materiales con poca estabilidad dimensional (Figura VII.2) y por lo tanto imposibles de manipular para realizar el estudio termogravimétrico. Los resultados indican que tanto el glicerol como el almidón son los materiales más biosusceptibles de la película. Otros autores, observaron idénticos resultados en películas basadas en Mater-Bi y PCL/almidón ([di Franco y col.2004](#); [Alvarez y col.2006](#)).

Por SEM se analizaron las superficies antes y después del ensayo de degradación. La Figura VII.6 muestra las superficies de muestras antes del ensayo de degradación en suelo.

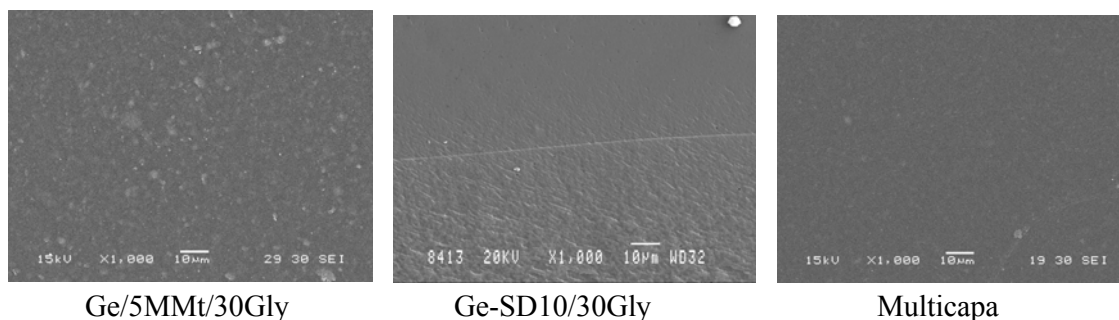


Figura VII. 6. Microscopía SEM de la superficie de las películas individuales y del laminado

Se observa que tanto las películas individuales como la multicapa poseen una superficie suave. Sólo se observan algunos defectos asociados al procesamiento.

Las Figuras VII.7-9 muestran las superficies de muestras extraídas a distintos tiempos de degradación en las que sólo se ha eliminado cuidadosamente los restos de suelo. Se observa que luego de 3 días, las películas de Ge/5MMt/30Gly presentan un gran crecimiento microbiano, con colonización de la superficie por microorganismos filamentosos como hongos y actinomicetes (Figura VII.7).

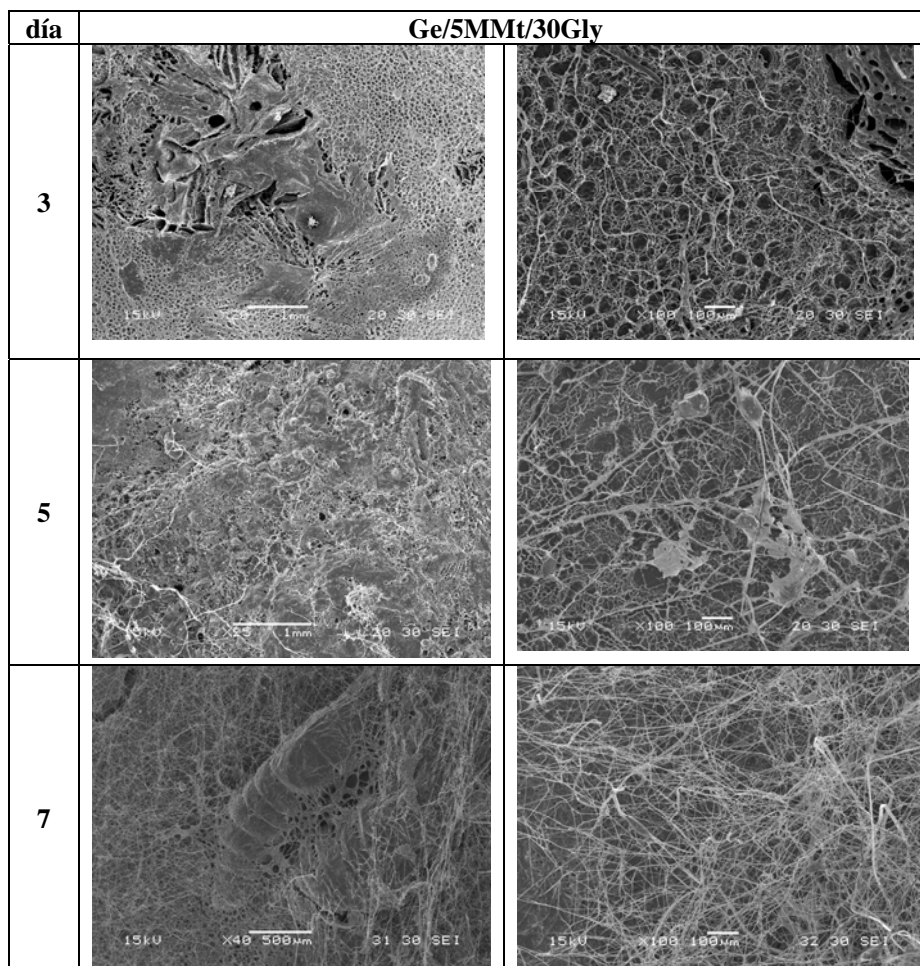


Figura VII.7. Microscopía SEM de la superficie de Ge/5MMt/30Gly con el tiempo de exposición al medio degradativo.

La matriz exhibe huecos probablemente debido a la pérdida de glicerol, como se evidenció por termogravimetría. La forma al azar de los huecos es característica de materiales poliméricos degradados en suelo ([Ikada 1999](#)). Se observa además la

presencia de ácaros y larvas, lo que revela que el material modificado por la adición de nanocargas continua siendo asimilable tanto por la microflora presente en el suelo como por invertebrados. La aparición de estos macroorganismos en esta etapa no es casual, ya que el ataque microbiano puede servir de prerrequisito para la entrada de macroorganismos (Gu 2003; Yu y col. 2007). Al cabo de 5 días se observa la esporulación de la estructura fungiforme. Luego de 7 días, las muestras se presentan altamente degradadas, en acuerdo con los resultados de pérdida de masa observados. Siguen observándose larvas, lo que indica que los productos de degradación no resultan tóxicos.

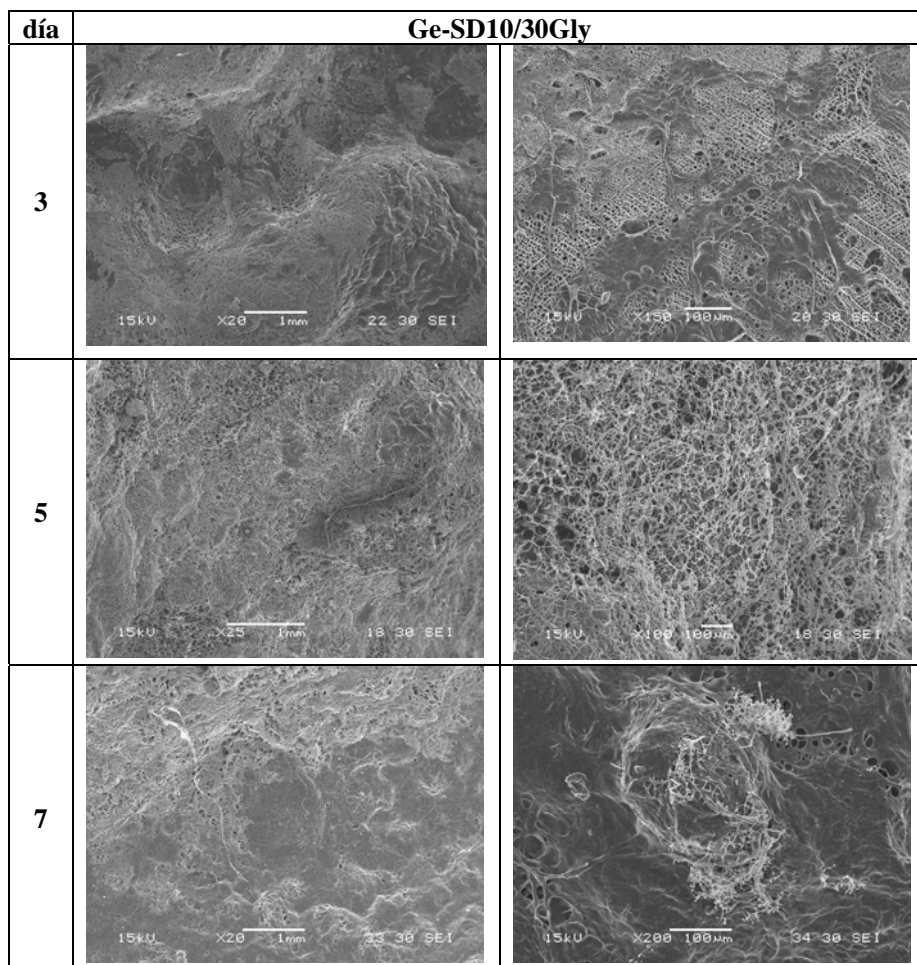


Figura VII.8. Microscopía SEM de la superficie de Ge-SD10/30Gly con el tiempo de exposición al medio degradativo.

Por su parte, las películas de Ge-SD10/30Gly (Figura VII.8), sólo exhiben huecos con diversas formas luego de 3 días de exposición lo que nuevamente puede relacionarse con la remoción preferencial de glicerol y la hidrólisis del almidón ([Ikadda 1999](#); [Alvarez y col 2006](#)).

Luego de 5 días se observa la colonización de la superficie por microorganismos filamentosos y al cabo de 7 días se observa la formación de esporas. En estos materiales no se observan larvas, lo que evidencia que el entrecruzamiento químico disminuye la posibilidad de bioasimilación de la gelatina tanto por la microflora del suelo como por macroorganismos (larvas). Por otra parte comparando las fotos para 7 días se observa que las películas Ge-SD10/30Gly se encuentran menos colonizadas que las de Ge/5MMt/30Gly lo que confirma que la presencia de MMT promueve indirectamente la biodegradación actuando como soporte.

La Figura VII.9 muestra las fotomicrografías de SEM de la superficie de las películas multicapa. Se observa que al cabo de 3 días se generan huecos en la superficie y comienza un leve crecimiento microbiano. Este comportamiento es similar al de la película Ge-SD10/30Gly (Figura VII.8). Luego de 5 días, el crecimiento se intensifica con esporulación y presencia ácaros y gusanos, similar a lo observado para la película Ge/5MMt/30Gly (Figura VII.7). Estas observaciones están de acuerdo y confirman la suposición de un ataque por un consorcio de hongos y bacterias en los últimos estadios de la degradación. Es importante destacar que los hongos pueden crecer con diferentes niveles de humedad ([Klamer y col. 2004](#); [Abrusci y col. 2006](#)), lo que explica su presencia en todas las muestras. Sin embargo los demás microorganismos requieren humedad relativa superior al 60%, esto podría explicar la inexistencia de ácaros en las películas entrecruzadas.

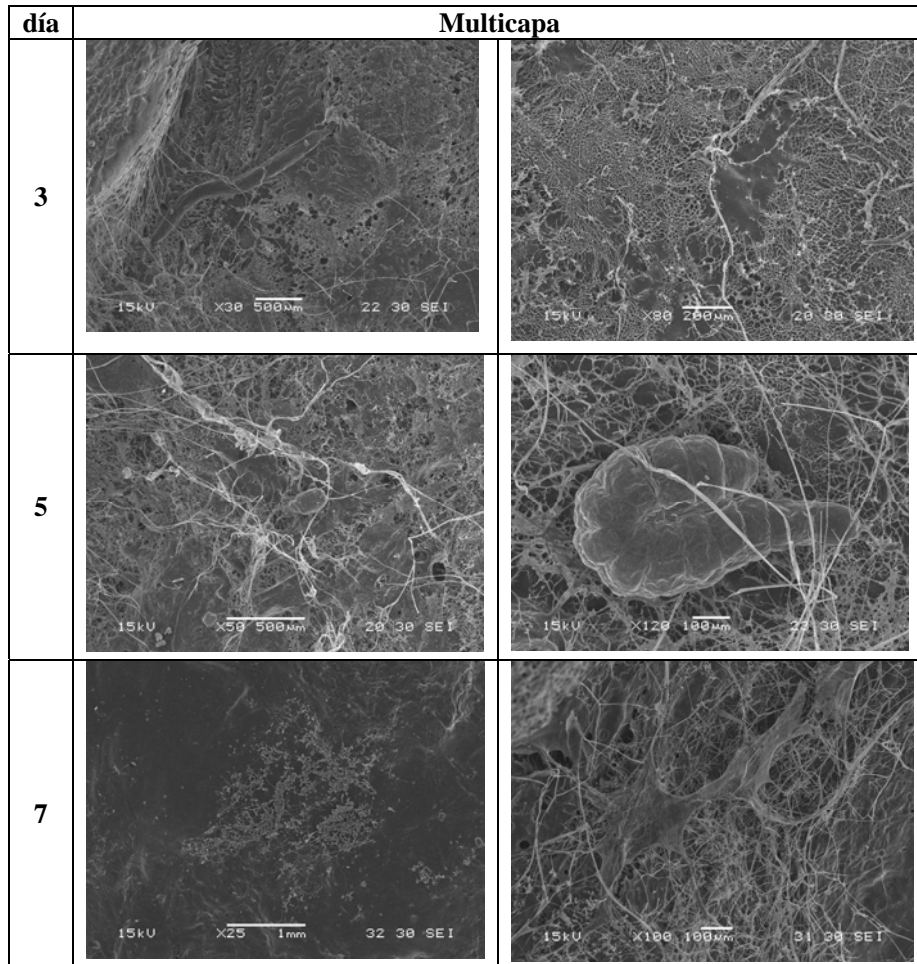


Figura VII.9. Microscopía SEM de la superficie de la película multicapa con el tiempo de exposición al medio degradativo.

VII.3. Conclusiones preliminares

Se analizó la biodegradación de la película multicapa y de sus componentes individuales. En términos generales se observó que la película Ge-SD10/30Gly presentó una baja degradación comparada con el importante deterioro observado para las películas Ge/5MMt/30Gly y multicapa en el transcurso del ensayo.

El material multicapa presentó un comportamiento particular. Desde el inicio y hasta el cuarto día se comportó similar a la película de Ge-SD10/30Gly (tanto en la pérdida de masa como en la absorción de agua). A partir de este punto y hasta el final del estudio, el comportamiento fue similar al de Ge/5MMt/30Gly.

Una explicación plausible para el comportamiento degradativo del laminado puede ser la siguiente. Durante el primer período, las capas externas limitaron la absorción global de agua hacia la capa interna retardando el ataque microbiano. Esto indicó que en los primeros estadios el material más biosusceptible del laminado fue el almidón, resultado que se confirmó por TGA. La hidrólisis del almidón redujo el grado de entrecruzamiento, y las cadenas de gelatina se encontraron menos impedidas para el ataque microbiano, que a su vez se vió promovido por la presencia de arcilla de la capa interna que sirve de soporte para los microorganismos. Las imágenes de SEM de las películas confirmaron esta hipótesis.

En el presente estudio se observó que las películas Ge/5MMt/30Gly y multicapa se degradaron casi completamente al cabo de 14 días, lo que no ocurrió en el caso de Ge-SD10/30Gly. En los procesos degradativos en los que no existen interacciones entre los componentes, la contribución de cada uno a la degradación total conduce a un comportamiento aditivo. Cualquier desviación esta indicando la existencia de efectos sinérgicos y/o antagónicos ([Corti y col. 2002](#)). Por lo tanto podría suponerse que existe un comportamiento sinérgico de los componentes individuales en el multicapa, reduciendo el tiempo de biodegradación del material.

VII.4.Referencias

- Abrusci C.**, Marquina D., Del Amo A., Corrales T., Catalina F. A viscometric study of the biodegradation of photographic gelatin by fungi isolated from cinematographic films. *Int. Biodet. Biodegrad.* 58, 3-4 (2006) 142-149
- Abrusci C.**, Marquina D., Santos A., Del Amo A., Corrales T., Catalina F. A Chemiluminescence study on degradation of gelatine. Biodegradation by bacteria and fungi isolated from cinematographic films. *J Photochem. Photobiol. A.* 185 (2007) 188-197
- Aggarwal P.**, Dollimore D. The effect of chemical modification on starch studied using thermal analysis. *Thermochimica Acta* 324 (1998) 1-8
- Alvarez V.A.**, Ruiseckaite R.A., Vazquez A. Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. *Polym. Deg. Stabil.* 91 (2006) 3156-3162
- 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. Stab.* 79 (2003) 147-152
- 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 (2001) 763-768
- Boyanova M.**, Stambolieva N., Apostolov A.A., Fakirov S. Dissolution and enzymatic degradation studies before and after artificial ageing of silk- or linen-reinforced gelatin laminates, 2: Enzymatic degradation. *Macromolr Mat Engin* 288, 5 (2003) 407-411
- Chiellini E.**, Cinelli P., Corti A., Kenawy E-R. Composite films based on waste gelatin: thermal-mechanical properties and biodegradation testing. *Polym. Degrad. Stabil.* 73 (2001) 549-555
- Corti A.**, Cinelil P., D'Antone S., Kenawy E-R., Solaro R. Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) in Soil Environment: Influence of Natural Organic Fillers and Structural Parameters. *Macromol. Chem. Phys* 203 (2002) 1526-1531
- Dalev P.G.**, Patil R.D., Mark J.E., Vassileva E., Fakirov S. Biodegradation of Chemically Modified Gelatin Films in Soil. *J. Appl. Polym. Sci.* 78 (2000) 1341-1347
- 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. Deg. Stabil.* 86 (2004) 95-103
- Domenek S.**, Feuilloley P., Gratraud J., Morel M.H., Guilbert S. Biodegradability of wheat gluten based bioplastics. *Chemosphere* 54 (2004) 551-559
- Gu J-D.** Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research. *Int. Biodeter. Biodegr.* 52 (2003) 69-91
- Gu J-D.** Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59 (2007) 170-179
- Ikada E.** Electrón microscope observation of biodegradation of polymers. *J. Polym. Environ.* 7, 4 (1999) 197-201
- Klamer M.**, Morsing E., Husemoen T. Fungal growth on different insulation materials exposed to different moisture regimes. *Int. Biodegr. Biodeter.* 54 (2004) 277-282
- Pickett M.J.**, Greenwood J.R., Harvey S.M. Test for detecting degradation of gelatine: comparison of five methods. *J. Clinical Microbiol* 29 (1991) 2322-2325.

Ray S.S., Yamada K., Okamoto M., Ueda K. Biodegradable polylactide/montmorillonite nanocomposites. *J. Nanosci. Nanotech* 3, 6 (2003) 503-510

Rimduisit S., Jingjid S., Damrongsakkul S., Tiptipakorn S., Takeichi T.. Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydr. Polym.* xxx (2007) xxx-xxx

Stickley A. The biodegradation of gelatin and its problems in the photographic industry. *J. Photogr. Sci.* 34 (1986) 111-112

Wang S., Song C., Chen G., Guo T., Liu J., Zhang B., Takeuchi S. Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) /organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite. *Polym. Degrad Stabil* 87 (2005) 69-76

Wilhelm H.M., Sierakowski M.R., Souza G.P., Wypych F. Starch films reinforced with mineral clay *Carbohydr Polym* 52 (2003) 101-110

Yu X., Yan Y., Gu D-J. Attachment of the biofouling bryozoan **Bugula neritina** larvae affected by inorganic and organic chemical cues. *Int. Biodeter. Biodegr.* 60 (2007) 81-89

Capítulo VIII

Conclusiones

VIII. Conclusiones

El desarrollo de la tesis permitió diseñar películas de gelatina con propiedades moduladas y específicas a fin de ser aplicadas en la obtención de una película multicapa.

Se utilizaron distintas estrategias que permitieron superar algunas desventajas que presentan las películas de gelatina como son su baja resistencia a la humedad, sin detrimento de sus buenas propiedades intrínsecas de barrera al oxígeno, y así desarrollar materiales técnicos.

Se analizó el efecto del entrecruzamiento químico sobre las propiedades de las películas de gelatina mediante tres agentes diferentes: glutaraldehído (GTA), butildiglicidil éter (BDGE) y almidón dialdehído polimérico (SD). Se utilizaron las técnicas de *casting* y de moldeo por compresión para la obtención de las películas. De los tres agentes utilizados solo el GTA y el SD permitieron obtener formulaciones que presenten una mejora en la resistencia a la humedad y en su respuesta mecánica. El GTA resultó ser el agente de entrecruzamiento más eficiente, generando una alta densidad de entrecruzamiento que produce la contracción de las películas y que restringe la estabilidad dimensional de las mismas. La adición de 30% de glicerol a Ge-GTA1 permitió obtener una formulación con propiedades mecánicas adecuadas, que presentó un incremento en un 38% del valor del módulo y en un 10% en la elongación a la rotura. Sin embargo, el entrecruzamiento con SD permitió obtener la formulación Ge-SD10/30Gly donde la absorción de agua presentó una reducción en un 50% mayor que la de Ge-GTA1/30Gly y la permeabilidad al vapor de agua resultó 1.5 veces menor. En cuanto a sus propiedades mecánicas el valor del módulo y la tensión de rotura disminuyeron levemente mientras que la ductilidad del material se incrementó en un 15%, en comparación con lo observado para la película Ge/30Gly. A partir del análisis global de los resultados obtenidos se seleccionó la formulación Ge-SD10/30Gly como la que presenta las mejores propiedades generales, sumado a la ventaja adicional de que el SD exhibe baja citotoxicidad.

Como otra alternativa para estabilizar las películas se consideró la adición de refuerzos sobre la matriz proteica. Se evaluó el efecto del agregado de arcillas del tipo Na⁺ MMT (1-20% sobre peso seco de Ge) sobre las morfologías desarrolladas y su

relación con las propiedades finales. Se observó que las propiedades de los nanocompuestos se hallan íntimamente relacionadas con el contenido de arcilla y con su morfología. La presencia de hasta un 10% de arcilla redujo la afinidad de los compuestos por el agua, con una notable disminución de la permeabilidad al vapor de agua (hasta un 60%) y del coeficiente de difusión aparente del material (hasta un 80%). Estos resultados concordaron con las morfologías observadas por AFM, donde para contenidos de arcilla $\leq 10\%$ se observó la presencia de una distribución homogénea de las capas de silicatos en la matriz, aunque no completamente exfoliada. En cuanto a la respuesta mecánica de las películas, se observó un incremento en el módulo elástico (de hasta un 27%) y una disminución en la elongación a la rotura (de hasta el 24%) para un contenido de arcilla de un 5%, cantidades superiores no produjeron efecto sobre el módulo, en detrimento considerable de la elongación y la tensión de rotura, probablemente debido a que en Ge/5MMt la cantidad de material exfoliado es aún relevante. A partir del análisis de estos resultados la película de Ge/5MMt fue la que presentó el mejor conjunto de propiedades. Sin embargo, a fin de obtener materiales técnicos, fue necesario el agregado de plastificantes para mejorar la elongación a la rotura con mínimo impacto en el módulo elástico y en la resistencia a la humedad.

Se evaluó el efecto de la adición de plastificantes (Sorbitol y Glicerol) sobre el sistema Ge/5MMt. Se seleccionó un contenido de plastificante de 30% en masa de manera de obtener materiales con una morfología exfoliada/intercalada. Se observó que el agregado de glicerol generó morfologías similares a las observadas para el sistema en ausencia de plastificantes. Por su parte el sorbitol produjo una distribución inhomogénea de la arcilla con la formación de pequeños aglomerados.

Si bien las películas Ge/5MMt/30Sor presentaron una mayor resistencia a la humedad que Ge/5MMt/30Gly (que se ve reflejada en la menor capacidad de absorción de agua y en la menor permeabilidad al vapor de agua) y una mejora en la respuesta al impacto (soportan el quintuple de carga y absorben más del doble de energía), asociado a la posibilidad de cristalización de este plastificante. El glicerol resultó ser más eficiente como plastificante, esto se evidenció en los resultados de las propiedades mecánicas en tracción (elongación a la rotura 40% mayor que la observada para igual formulación con sorbitol). Además, el flujo de oxígeno a través de la película plastificada con glicerol resultó un 35% menor que para la película control de Ge/30Gly. Este último resultado determinó la selección del glicerol como plastificante de los nanocompuestos.

A partir del análisis de las propiedades de las películas estabilizadas, se seleccionaron las mejores formulaciones para el diseño de la película laminada tricapa, donde la película Ge-SD10/30Gly se colocó como capas externas, de mayor resistencia a la humedad y buenas propiedades mecánicas y la de Ge/5MMt/30Gly, se utilizó como capa interna barrera al oxígeno. Se fijaron las condiciones de procesamiento por moldeo por compresión. La gran afinidad entre las láminas individuales se evidenció por un incremento en la transparencia de la película comparada a las láminas individuales de igual espesor y se confirmó a través de las micrografías donde se observó interdifusión de las películas durante el procesamiento. El laminado mostró una mejora en la absorción de agua y en las propiedades de barrera. La permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno resultaron menores que la de cualquiera de sus componentes individuales (respectivamente, 50% y 5% menor que para la película con propiedades de barrera: Ge/5MMt/30Gly). La respuesta del laminado a una sollicitación mecánica en tracción e impacto presentó resultados intermedios entre los de sus componentes individuales el incremento en el módulo y en la tensión de rotura supera a los valores que se obtendrían por una simple regla de mezclas. Además las películas no pierden flexibilidad por el procesamiento aplicado. Con lo que puede concluirse que todas las propiedades analizadas para el laminado reflejaron un efecto sinérgico de los componentes individuales en beneficio de la película multicapa.

Se estudió la biodegradación en suelo de la película laminada y de sus componentes individuales. Se observó que la presencia de la capa de Ge/5MMt/30Gly favoreció la biodegradación del multicapa, debido a que podría actuar como soporte para el crecimiento microbiano. Por su parte, el entrecruzamiento con SD redujo la biodisponibilidad del material para los microorganismos presentes en el suelo. Se analizó la biosusceptibilidad al medio de los distintos materiales que conforman el laminado y resulta que el almidón (proveniente de la cadena del agente de entrecruzamiento de la capa externa) y el glicerol son los materiales más sensibles al ataque microbiano. En el presente estudio se observó que las películas Ge/5MMt/30Gly y multicapa se degradaron casi completamente al cabo de 14 días, lo que no ocurrió en el caso de Ge-SD10/30Gly. Puede considerarse que la película laminada es un material de degradación rápida ya que a partir del octavo día las muestras no pueden ser recuperadas. Esto indica que pese a las modificaciones químicas, la presencia de refuerzos inorgánicos y a las condiciones de procesamiento aplicadas, el laminado desarrollado es considerado biodegradable.

El desarrollo del trabajo de tesis permitió obtener un material multicapa que presentó una mejora en sus propiedades térmicas, mecánicas, de resistencia al agua y de barrera a gases y al vapor de agua. Los valores de las propiedades obtenidas son comparables a los informados en literatura para materiales multicapa tradicionales, con lo cual, este material podría reemplazar algunas de las formulaciones comerciales existentes. Además presenta la ventaja adicional de que, pese a las modificaciones y las condiciones de procesamiento, mantiene la biodegradabilidad intrínseca de la matriz proteica haciéndolo más atractivo desde el punto de vista medioambiental.

Líneas de investigación futuras

El trabajo realizado en la presente tesis deja abierta la posibilidad de continuar desarrollando algunos de los temas estudiados en mayor profundidad.

En lo que respecta a la modificación química de las películas, una línea para continuar investigando sería el estudio de otros agentes de entrecruzamiento, analizando su efecto sobre las propiedades de las películas de Ge y obteniendo formulaciones competitivas frente a polímeros tradicionales. Otro tema de interés que podría continuar desarrollándose en mayor profundidad es el sistema Ge-BDGEX, donde se podría analizar en mayor profundidad la separación de fases observada.

Sobre las películas multicapa obtenidas, realizar estudios de migración que son fundamentales para la aplicación de las películas en envasado de alimentos; ensayos de envejecimiento y analizar la posibilidad de incorporar algún aditivo con acción bactericida y fungicida, como sorbato de potasio, para limitar la degradación del material durante su vida útil.

Además y dado el creciente interés en la obtención de materiales multicapa, sería muy interesante continuar con la preparación de laminados basados en películas de gelatina modificadas (por entrecruzamiento químico o reforzadas con montmorillonita) y poliésteres biodegradables. Con el objetivo de producir laminados con propiedades competitivas respecto a los tradicionalmente usados en envasado, que presenten la ventaja adicional de ser biodegradables. Introduciendo el moldeo por compresión asistido por vacío para facilitar su procesamiento y que permitirá su implementación a nivel industrial.

Referencias Integradas

Referencias integradas

- Abrusci C.**, Marquina D., Del Amo A., Corrales T., Catalina F. A viscometric study of the biodegradation of photographic gelatin by fungi isolated from cinematographic films. *Int. Biodegrad. Biodegrad.* 58, 3-4 (2006) 142-149
- Abrusci C.**, Marquina D., Santos A., Del Amo A., Corrales T., Catalina F. A Chemiluminescence study on degradation of gelatine. Biodegradation by bacteria and fungi isolated from cinematographic films. *J Photochem. Photobiol. A.* 185 (2007) 188-197
- Achet D.**, He X.W. Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer* 36 (1995) 787-790
- Adhikari R.**, Lebek W., Godehardt R., Henning S., Michler G. H., Baer E., Hiltner A. Investigating morphology and deformation behaviour of multilayered PC/PET composites. *Polym. Adv. Technol.* 16 (2005) 95-101
- Aggarwal P.**, Dollimore D. The effect of chemical modification on starch studied using thermal analysis. *Thermochimica Acta* 324 (1998) 1-8
- Akin H.**, Hasirci N. Preparation and characterization of crosslinked gelatin microspheres. *J. Appl. Polym. Sci.* 58 (1995) 95-100
- Alexandre M.**, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mater. Sci. Eng. C* 28 (2000) 1-63
- Alvarez V.A.**, Ruiseckaite R.A., Vazquez A. Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. *Polym. Deg. Stabil.* 91 (2006) 3156-3162
- Amass W.**, Amass A., Tighe B. A Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradable Studies. *Polym. Int.* 47 (1998) 89-144
- Anglès M.N.**, Dufresne A. Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Analysis. *Macromolecules* 33 (2000) 8344-8353
- Anker M.**, Berntsen J., Hermansson A-M., Stading M. Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3 (2002) 81-92
- Apostolov A.A.**, Boneva D., Vassileva E., Mark J.E., Fakirov S. Mechanical properties of native and crosslinked gelatins in a bending deformation *J. Appl. Polym. Sci.* 76 (2000) 2041-2048
- Apostolov A.A.**, Fakirov S., Evstatiev M., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable Laminates Based on Gelatin, 1. Preparation and Mechanical Properties. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 693-697
- Apostolov A.A.**, Fakirov S., Evstatiev M., Hoffmann J., Friedrich K. Biodegradable Laminates Based on Gelatin, 2a. Weathering, Sliding Wear and Abrasion Resistance. *Macromol. Mater. Eng.* 288 (2003) 228-234
- Arnesen J.A.**, Gildeberg A. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Biores. Technol.* 98 (2007) 53-57
- Arvanitoyannis I.**, Nakayama A., Aiba S.I. Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydr. Polym.* 36 (1998a) 105-119
- Arvanitoyannis I.S.**, Nakayama A., Aiba S. Chitosan and gelatine based edible films; state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr. Polym.* 37 (1998b) 371-382
- Arvanitoyannis I.S.** "Formation and properties of collagen and gelatin films and coatings" en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed., Ed. A. Gennadios; CRC Press, 2002; 275-304
- Audic J-L.**, Chaufer B. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 1934-1942
- Avella M.**, de Vlieger J.J., Errico M.M., Fischer S., Vacca P., Volpe M.G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chem.* 93 (2005) 467-474
- 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. Stab.* 79 (2003) 147-152

- Becker O.**, Varley R., Simon G. Morphology, thermal relaxations and mechanical properties of layered silicate nanocomposites based upon high-functionality epoxy resins. *Polymer* 43 (2002) 4365-4373
- Bigi A.**, Bracci B., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials* 19 (1998) 2335-2340
- Bigi A.**, Borghi M., Cojazzi G., Fichera A.M., Panzavolta S., Roveri N. Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *J. Therm. Anal. Cal.* 61 (2000) 451-459
- 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 (2001) 763-768
- Bigi A.**, Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K. Stabilization of gelatine films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* 23 (2002) 4827-4832
- Bohidar H.B.**, Jena S.S. Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatine. *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 8970-8977
- Boyanova M.**, Stambolieva N., Apostolov A.A., Fakirov S. Dissolution and enzymatic degradation studies before and after artificial ageing of silk- or linen-reinforced gelatin laminates, 2: Enzymatic degradation. *Macromol. Mat. Engin* 288, 5 (2003) 407-411
- Buonocore G.G.**, Del Nobile M.A., Di Marino C., Gambacorta G., La Notte E., Nicolais L. Modeling the water transport properties of casein-based edible coating. *J. Food Eng* 60 (2003) 99-106
- Butler M.F.**, Yiu-Faing, Pudney P. D. A. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 41 (2003) 3941-3953
- Cao N.**, Fu Y., He J. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloid.* 21 (2007) 575-584
- Charulatha V.**, Rajaram A. Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials* 24 (2003) 759-767
- Chatterji P.R.** Gelatin with hydrophilic/hydrophobic graft and glutaraldehyde crosslinks. *J. Appl. Polym. Sci.* 37 (1989) 2203-2212
- Chaudhari A.**, Thota J., Kumar C.V. Binding and cleavage studies of two proteins intercalated at the galleries of α -zirconium phosphate. *Microporous Mesoporous Materials* 2 (2004) 281-291
- Chen B.**, Evans J.R.G. Thermoplastic starch-clay nanocomposites and their characteristics. *Carbohydr. Polym.* 61 (2005) 455-463
- Chen H.** Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *J. Dairy Sci.* 78 (1995) 2563-2583
- Chiellini E.**, Cinelli P., Grillo Fernandes, Kenawy El Refaye S., Lazzeri A. Gelatin-based blends and composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization. *Biomacromolecules* 2 (2001a) 806-811
- Chiellini E.**, Cinelli P., Corti A., Kenawy El Refaye. Composite films based on waste gelatin: Thermal-mechanical properties and biodegradation testing. *Polym. Degrad. Stabil.* 73 (2001b) 549-555
- Cho S.Y.**, Rhee C. Sorption Characteristics of Soy Protein Films and their Relation to Mechanical Properties *LWT J. Food Sci Tech.* 35 (2002) 151-157
- Ciardelli G.**, Chiono V., Vozzi G., Pracella M., Ahluwalia A., Barbani N., Cristalini C., Giusti P. Blends of Poly(ϵ -caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 6 (2005) 1961-1976
- Corti A.**, Cinelli P., D'Antone S., Kenawy E-R., Solaro R. Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) in Soil Environment: Influence of Natural Organic Fillers and Structural Parameters. *Macromol. Chem. Phys* 203 (2002) 1526-1531
- Crescenzi V.**, Francescangeli A., Taglienti A. New Gelatin-Based Hydrogels via Enzymatic Networking. *Biomacromolecules* 3 (2002) 1384-1391
- Cullity B.D.**, Stock S.R. "Geometry of crystals" en *Elements of X-Ray Diffraction*. 3era. Edición. Ed. Prentice Hall; 2001; cap 2: pp.34-87

- Cunningham P.**, Ogale A.A., Dawson P.L., Acton J.C. Tensile properties of soy protein isolate films produced by thermal compaction technique. *J. Food Sci.* 65, 4 (2000) 668-671
- Cuq B**, Gontard N., Cuq J-L, Guilbert S. Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 622-626
- Cyras V.P.** Relación estructura, propiedades y procesamiento del material compuesto biodegradable obtenido a partir de policaprolactona/almidón y fibra sisal. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, 2001
- Dalev P.G.**, Patil R.D., Mark J.E., Vassileva E., Fakirov S. Biodegradation of Chemically Modified Gelatin Films in Soil. *J. Appl. Polym. Sci.* 78 (2000) 1341-1347
- Dangaran K.L.**, Krotcha J.M. Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by plasticiser crystallisation in whey protein films. *Int. J. Food Sci. Technol.* (2007) en prensa
- Darder M.**, Colilla M., Ruiz-Hitzky E. Biopolymer-Clay nanocomposites based on chitosan intercalated in montmorillonite. *Chem. Mater.* 15 (2003) 3774-3780
- Darder M.**, Colilla M., Ruiz-Hitzky E. Chitosan-clay nanocomposites: application as electrochemical sensors. *Appl. Clay Sci.* 28 (2005) 199-208
- Davis G.**, Song J.H. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Ind. Crop. Prod.* 23 (2006) 147-161
- de Carvalho R.A.**, Grosso C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloid.* 18 (2004) 717-726
- De Cristofaro A.**, Violante A. Effect of hydroxy-aluminium species on the sorption and interlayering of albumin onto montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* 19 (2001) 59-65
- di Franco C.R.**, Cyras V.P., Busalmen J.P., Ruseckaite R.A., Va'zquez A. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Polym. Degrad. Stabil.* 86 (2004) 95-103
- Domenek S.**, Feuilloley P., Gratraud J., Morel M.H., Guilbert S. Biodegradability of wheat gluten based bioplastics. *Chemosphere* 54 (2004) 551-559
- Doyle C.D.** Estimating thermal stability of experimental polymers by empirical thermogravimetric analysis. *Anal. Chem.* 33 (1961) 77-79
- Dufresne A.**, Kellerhals M. B., Witholt B. Transcrystallization in Mcl-PHAs/cellulose whiskers composites. *Macromolecules* 32, 22 (1999) 7396-7401
- Dufresne A.**, Vignon M.R. Improvement of starch films performances using cellulose microfibrils. *Macromolecules* 31 (1998) 2693-2696
- Elsabee M.Z.**, Abdou E.S., Nagy K.S.A., Eweis M. Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydr. Polym.* 71, 2 (2008) 187-195
- Fan Q.G.**, Lewis D.M., Tapley K.N. Characterization of cellulose aldehyde using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 8 (2001) 1195-1202
- Fang J.M.**, Fowler P.A., Escrig C., Gonzalez R., Costa J.A., Chamudis L. Development of biodegradable laminate films derived from naturally occurring carbohydrate polymers. *Carbohydr. Polym.* 60 (2005) 39-42
- Filachione E.M.**, Harris M.L., Fern A.H., Korn J.N., Wells P.A. Tanning studies with dialdehyde starch. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* 53 (1958) 77-85
- Fischer H.**, Fischer S. Patente WO 01/68762 A1, 2001
- Flory P.J.**, Rehner J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *J. Chem. Phys.* 11 (1943) 521
- Fraga A.N.**, Williams R.J.J. Thermal properties of gelatin films. *Polymer* 26 (1985) 113-118
- Fraga A.N.**, Williams R.J.J., Galak M, Perera H. Gelatin films derived from fish skin. *J. Polym. Mater.* 5 (1988) 49-55

- Fringant C.**, Rinaudo M., Foray M., Bardet M. Preparation of mixed esters of starch or use of an external plasticizer: Two different ways to change the properties of starch acetate films. *Carbohydr. Polym.* 35 (1998) 97–106
- Galiotta G.**, Di Gioia L., Guilbert S., Cuq B. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *J. Dairy Sci.* 81 (1998) 3123-3130
- Gallstedt M.**, Tornqvist J., Hedenqvist M.S. Properties of Nitrocellulose-Coated and Polyethylene-Laminated Chitosan and Whey Films. *J. Polym.Sci. Part B: Polym.Phys.* 39 (2001) 985–992
- Gällstedt M.**, Hedenqvist M.S. Oxygen and water barrier properties of coated whey protein and chitosan films. *J.Polym. Environm.* 10 (2002) 1-4
- García M.A.**, Martino M.N., Zaritzky N.E. Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch/Stärke* 52 (2000) 118-124
- García M.A.**, Pinotti A., Martino M.N., Zaritzky N.E. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydr. Polym.* 56 (2004) 339-345
- Gennadios A.** “Soft gelatine capsules” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed.. Ed. A. Gennadios, CRC Press, 2002a; 1-41
- Gennadios A.** “Soft gelatine capsules” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed.. Ed. A. Gennadios, CRC Press, 2002b; 393-444
- Gennadios A.**, Handa A., Froning G.M., Weller C.L., Hanna M.A. Physical properties of egg white-dialdehyde starch films. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1297-1302
- Gilman J.W.** Flammability and thermal stability studies of polymer layered-silicate (clay) nanocomposites. *Appl. Clay Sci.* 15 (1999) 31-49.
- Gómez –Guillen M.C.**, Ihl M., Bifani V., Silva A., Montero P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni Molinae Turcz*). *Food Hydrocolloid.* 21,7 (2007) 1133-1143
- 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 (1992) 190-199
- Gorrasi G.**, Tortora M, Vittoria V., Pollet E., Lepoittevin B., Alexandre M., Dubois Ph. Vapor barrier properties of polycaprolactone montmorillonite nanocomposites: Effect of clay dispersión. *Polymer* 44 (2003) 2271-2279
- Grevellec J.I.**, Marquie C., Ferry L., Crespy A., Vialettes V. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomacromolecules* 2 (2001) 1104-1109
- Gu J-D.** Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research. *Int. Biodeter. Biodegr.* 52 (2003) 69 – 91
- Gu J-D.** Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59 (2007) 170-179
- Hedenqvist M.S.**, Backman A., Gallstedt M., Boyd R.H., Gedde U.W. Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 66 (2006) 2350–2359
- 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 (2004) 415-421
- Honda I.**, Arai K., Mitomo H. Characterization of Cross-links introduced in gelatine. *J. Appl. Polym. Sci.* 64 (1997) 1879-1892
- Huang M-F.**, Yu J-G., Ma X-F. Studies on the properties of montmorillonite-reinforced thermoplastic starch composites. *Polymer* 45 (2004) 7017–7023
- Huang X.**, Netravali A. Characterization of Nano-clay reinforced phytigel-modified soy protein concentrate resin. *Biomacromolecules* 7 (2006) 2783-2789
- Huang X.**, Netravali A. Characterization of flax fiber reinforced soy protein resin based green composites modified with nano-clay particles. *Compos. Sci. Technol.* 67 (2007) 2005-2014
- Hulleman S.H.D.**, Janssen F.H.P., Feil H. The role of water during plasticization of native starches. *Polymer* 39 (1998) 2043–2048.

- Hulleman S.H.D.**, Kalisvaart M.G., Janssen F.H.P., Feil H., Vliegthart J.F.G. Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticized compression-moulded potato starches. *Carbohydr. Polym.* 39 (1999) 351–360.
- Ikada E.** Electrón microscope observation of biodegradation of polymers. *J. Polym. Environ.* 7, 4 (1999) 197-201
- Informe técnico de Rousselot** (Argentina).www.rousselot.com
- Jayakrishnan A.**, Jameela S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices. *Biomaterials* 17 (1996) 471-484
- Jerez A.**, Partal P., Martinez I., Gallegos C., Guerrero A. Rheology and processing of gluten based bioplastics. *Biochem. Eng. J.* 26 (2005) 131-138
- Joa C.**, Hojin Kangb, Lee N.Y., Kwon J.H., Byun M.W., Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. *Radiat. Phys. Chem.* 72 (2005) 745–750
- John J.**, Tang J., Bhattacharya M. Processing of biodegradable blends of wheat gluten and modified polycaprolactone. *Polymer* 39 (1998) 2883-2895
- Johnston C.T.**, Premachandra G.S. Polarizad ATR –FTIR study of smectite in aqueous suspension. *Langmuir* 17 (2001) 3712-3718
- Jolley J.E.** The Microstructure of photographic gelatine binders. *Photographic Sci. Eng.* 14 (1970) 169-177
- Kaminska A.**, Sionkowska A. The effect of UV radiation on the values of thermal parameters 9of collagen containing b-carotene. *Polym. Degrad. Stabil.* 65 (1999) 87-90
- Kampeerapappun P.**, Aht-ong D.,Pentrakoon D., Srikulkit K. Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydr. Polym.* 67 (2007) 155-163
- Kim U-J.**, Wada M., Kuga S. Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydr. Polym.* 56 (2004) 7-10
- Klamer M.**, Morsing E., Husemoen T. Fungal growth on different insulation materials exposed to different moisture regimes. *Int. Biodegr. Biodeter.* 54 (2004) 277–282
- Kojima Y.**, Usuki A., Kawasumi M., Okada A., Kurauchi T., Kamigaito O. Sorption of water in nylon 6-clay hibrid. *J. Appl. Polym. Sci.* 49 (1993) 1259–1264.
- Kosmala J.D.**, Henthorn D.B., Brannon-Peppas L. Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials. *Biomaterials* 21 (2000) 2019-2023
- Kozlov P.V.** The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* 24 (1983) 651-666
- Kristo E.**, Biliaderis C.G. Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydr Polym* 68 (2007) 146–158
- Krogars K.**, Heinämäki J., Karjalainen M., Niskanen A., Leskelä M., Yliruusi J. Enhanced stability of rubbery amylose-rich maize starch films plasticized with a combination of sorbitol and glycerol. *Int. J. Pharm.* 251 (2003) 205- 208
- Krook M.**, Hedenqvist M.S., Albekisson A-C, Hellman A., Iversen T., Gedde U.W. Barrier and Mechanical Properties of Pulp Fiber/Polymer Laminates and Blends. *Polym. Eng. Sci.* 40 (2000) 143-156
- Kuijpers A.J.**, Engbers G.H.M., Krijgsveld J., Zaat S.A.J., Dankert J., Feijen J. Croos-linking and characterisation of gelatine matrices for biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 11-3 (2000) 225-243
- Kumar S.**, Varma I.K. Degradation studies of thermoplastics composites of jute fiber-reinforced LDPE/polycaprolactone blends. *Polymer - Plastics Technology and Engineering* 45, 11 (2006) 1219-1225
- Lange J.**, Stenroos E., Johanson M., Malmström E. Barrier coatings for flexible packaging based on hyperbranched resins. *Polymer* 42 (2001) 7403-7410
- Larré C.**, Desserme C., Barbot J., Gueguen J. Properties of deaminated gluten films enzymatically cross-linkbed. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5444–5449

- Le Baron P.C.**, Wang Z., Pinnavaia T.J. Polymer-layered silicate nanocomposites: an overview. *Appl. Clay Sci.* 15 (1999) 11–29
- Lee J.M.**, Pereira C.A., Kan L.W.K. Effect of molecular structure of poly (glycidyl ether) reagents on crosslinking and mechanical properties of bovine pericardial xenograft materials. *J. Biomed. Mat. Res.* 28 (1994) 981-992
- Lepoittevin B.**, Pantoustier N., Devalckenaere M., Alexandre M., Kubies D., Calberg C., Jérôme R., Dubois Ph. Poly(ϵ -caprolactone)/clay nanocomposites by in-situ intercalative polymerization catalyzed by dibutyltin dimethoxide. *Macromolecules* 35 (2002) 8385-8390
- Leung H.K.** “Water activity and others colligative properties of food” en *Physical and Chemical properties of food*; M.R. Okos (Ed.). Michigan: American Society of Agricultural Engineers; 1986; 138-185
- Li P.**, Zheng J.P., Ma Y.L., Yao K.D. Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. II. Swelling behaviour. *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 322-328
- Lim L-T.**, Mine Y., Britt I.J., Tung M.A. “Formation and properties of egg white films and coatings” en Protein-based films and coatings. 1era. Edicion. Editado por A. Gennadios; Ed. CRC Press; 2002; 233-250
- Lin F-H.**, Yao C-H., Sun J-S., Liu H-C., Huang C-W. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin. *Biomaterials* 19 (1998) 905-917
- Lingaih S.**, Shivakumar K.N., Sadler R., Sharpe M. A method of visualization of dispersion of nanoplatelets in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 65 (2005) 2276-2280
- Liu Y.**, Hsu C., Wei W., Jeng R. Preparation and characterization of nylon 11/organoclay nanocomposites. *Polymer* 44 (2003) 5159-5167
- Lu Y.**, Weng L., Zhang L. Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules* 5 (2004) 1046-1051
- Mahmoud R.**, Savello P.A. Mechanical properties of and water vapour transferability through whey protein films. *J. Dairy Sci.* 75 (1992) 942-946
- Mahmoud R.**, Savello P.A. Solubility and hydrolysability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 29-35
- 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 *Carbohyd. Polym.* 56 (2004) 129-135
- 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. *Carbohyd. Polym.* 60 (2005) 283–289
- Mangavel C.**, Barbot J., Gueäguen J., Popineau Y. Molecular determinants of the influence of hydrophilic plasticizers on the mechanical properties of cast wheat gluten films. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1447-1452
- March J.**, Smith M.B. “Aliphatic Substitution: Nucleophilic and Organometallic” en March’s Advanced Organic Chemistry, 6ta. Edicion. Editado John Wiley & Sons, Inc.; 2006, 425-656
- 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 (1997) 922-926
- Marquié C.** Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde, and Glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4676-4681
- Marquié C.**, Guilbert S. “Formation and properties of cottonseed proteins films and coatings” en *Protein-based films and coatings*. 1era. Ed., Ed. A. Gennadios; CRC Press, 2002; 275-304
- Martin O.**, Schwach E., Avérous L., Couturier Y. Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Plasticized Wheat Starch. *Starch/Stärke* 53 (2001) 372–380
- Martucci J.F.**, Vazquez A., Ruseckaite R.A. Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite. Morphological and thermal studies. *J. Therm. Anal. Cal.* 89 (2007) 117-122

- Mathew A.P.**, Dufresne A. Plasticized Waxy Maize Starch: Effect of Polyols And Relative Humidity On Material Properties. *Biomacromolecules* 3 (2002) 1101-1108
- Matsumura H.**, Glasser W.G. Cellulosic nanocomposites. II. Studies by Atomic Force Microscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 78 (2000) 2254-2261
- McHugh T.H.**, Krotcha J.M. Sorbitol vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile properties evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 841-845
- Menon A.R.R.**, Pillai C.K.S., Nando G.B. Thermal degradation characteristics of natural rubber vulcanizates modified with phosphorylated cashew nut shell liquid. *Polym. Degrad. Stabil.* 52 (1996) 265-271
- Menut P.**, Su Y.S., Chinpa W., Pochat-Bohatier C., Deratani A., Wang D.M., Huguet P., Kuo C.Y., Lai J.Y., Dupuy C. A top surface liquid layer during membrane formation using vapor-induced phase separation (VIPS)—Evidence and mechanism of formation. *J. Mem. Sci.* 310, 1-2 (2008) 278-288
- Miller K.S.**, Krochta J.M. Oxygen and Aroma Barrier Properties of Edible Films: A Review. *Trends Food Sci Tech* 8 (1997) 228-237
- Moreno L.**, Leever P. Impact Fracture Toughness of Polyethylene/Polypropylene Multilayers. *Polym. Eng. Sci.* 44, 9 (2004) 1627-1635
- Nabeta M.**, Sano M. Nanotube foam prepared by gelatin gel as a template. *Langmuir* 21 (2005) 1706-1708
- Nashed G.**, Rutgers R. P. G., Sopade P. A. The plasticisation effect of glycerol and water on the gelatinisation of wheat starch. *Starch/Stärke* 55 (2003) 131-137
- 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 (1995) 460-472
- 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 (2002) 5417-5425
- Pandey J.K.**, Singh R.P. Green Nanocomposites from renewable resources: Effect of plasticizer on the structure and material properties of clay-filled starch. *Starch/Stärke* 57 (2005) 8-15
- Paradkar R.P.**, Li J., Bar G., Pham H., Bosnyak C., Weinhold J. Measuring the Relative Interface Thickness of Multilayer Polyolefin Films with Atomic Force Microscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 106 (2007) 1507-1517
- Park H-M.**, Lee W-K, Park C-Y, Cho W-J, Ha C-S. Environmentally friendly polymer hybrids Part I mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. *J. Mater. Sci.* 38 (2003) 909-915
- Park H-M.**, Li X., Jin C, Park C., Cho W., Ha C. Preparation and properties of Biodegradables Thermoplastic Starch/Clay Hybrids. *Macromol. Mater. Eng.* 287 (2002) 553-558
- Park H-M.**, Mohanty A.K., Drzal L.T., Lee E., Mielewski D.F., Misra M. Effect of sequential mixing and compounding conditions on cellulose acetate/layered silicate nanocomposites. *J. Polym. Environ.* 14 (2006) 27-35
- Park J.W.**, Whiteside W.S., Cho S.Y. Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films. *LWT* x (2007) xxx-xxx
- Paschoalick T.M.**, García F.T, Sobral P.J.A., Habitante A.M.Q.B. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. *Food Hydrocolloid.* 17 (2003) 419-427
- Patil R.D.**, Mark J.E., Apostolov A., Vassileva E., Fakirov S. Crystallization of water in some crosslinked gelatins. *Eur. Polym. J.* 36 (2000) 1055-1061

- Paul M-A.**, Alexandre M., Degée P., Henrist C., Rulmont A., Dubois P. A new nanocomposite materials based on plasticized poly(L-lactide) and organo-modified montmorillonites: thermal and morphological study. *Polymer* 44 (2003) 443-450
- Paul M-A.**, Delcourt C., Alexandre M., Degée Ph., Monteverde F., Dubois Ph. Poly(lactide)/montmorillonite nanocomposites: Study of the hydrolytic degradation. *Polym. Degrad. Stabil.* 87 (2005) 535-542
- Peleg M.** An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sci.* 53 (1988) 1216-1219
- Pereda M.**, Marcovick N.E., Aranguren M.I. Characterization of Chitosan/Caseinate films. *J. Appl. Polym. Sci.* x (2007) xx-xx
- Pereira de Abreu D.A.**, Paseiro Losada P., Angulo I., Cruz J.M.. Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. *Eur Polym J* 43 (2007) 2229-2243
- Pickett M.J.**, Greenwood J.R., Harvey S.M. Test for detecting degradation of gelatine: comparison of five methods. *J. Clinical Microbiol* 29 (1991) 2322–2325.
- Pramoda K. P.**, Liu T., Liu Z., He C., Sue H-J. Thermal degradation behavior of polyamide 6/clay nanocomposites. *Polym. Degrad. Stabil.* 81 (2003) 47-56
- Pu Chen**, Zhang L. Interaction and Properties of Highly Exfoliated Soy Protein /Montmorillonite Nanocomposites. *Biomacromolecules* 7 (2006) 1700 -1706
- Ray S.S.**, Okamoto M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1539-1641
- Ray S.S.**, Bousmina M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Prog. Mater. Sci.* 50 (2005) 962–1079
- Reporte Técnico** Southern Clay Products Inc. (Texas, USA)
- Rhim J-W.**, Gennadios A., Weller C.L., Cezeirat C., Hanna M.A. Soy Protein Isolate-Dialdehyde Starch films. *Ind. Crop. Prod.* 8 (1998) 195–203
- Rhim J-W.**, Mohanty K.A. Singh S.P., Ng P.K.W. Preparation and properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Soy Protein Isolate and Poly(lactide). *Ind.Eng.Chem.Res.* 45 (2006) 3059-3066
- Rhim J-W.**, Lee J.H, Ng P.K.W. Mechanical and barrier properties of biodegradable soy protein isolate-based films coated with polylactic acid. *LWT* 40 (2007) 232–238
- Rimdisut S.**, Jingjid S., Damrongsakkul S., Tiptipakorn S., Takeichi T.. Biodegradability and property characterizations of Methyl Cellulose: Effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydr. Polym.* xxx (2007) xxx–xxx
- Robinson I.D.** Rate of crosslinking of gelatine in aqueous solution. *J. Appl. Polym. Sci.* 8 (1964) 1903-1918
- Ryu J.G.**, Park S.W., Kim H., Lee J.W. Power ultrasound effects for in situ compatibilization of polymer-clay nanocomposites. *Mat. Sci. Eng.* 24 (2004) 285-288
- Saito H.**, Taguchi T., Kobayashi H., Kataoka K., Tanaka J., Murabayashi S., Mitamura Y. Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. *Mat. Sci. Eng. -C Bio. S* 24 (2004) 781–785
- Schacht E.**, Bogdanov B., Van Den Bulcke A., De Rooze N. Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde. *React. Funct. Polym.* 33 (1997) 109-116
- Schrenk W.J.**, Alfrey T. Coextruded multilayer films and sheets. *Polymer blends* 2 (1978) 129–165.
- Shaw N.B.**, Monahan F.J., O’Riordan E.D., O’Sullivan M. Physical properties of WPI films plasticized with glycerol, xylitol or sorbitol. *J. Food Sci.* 67 (2002) 164-167
- Shechter L.**, Wynstra J., Kurkcy R.P. Glycidyl ether reactions with amines. *Ind. Eng. Chem.* 48 (1956) 94-97
- Shellhammer T.H.**, Krochta J.M. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *J. Food. Sci.* 62 (1997) 390-394

- Shen S.H.**, Sung H.W., Tu R., Hata C., Lin D., Noishiki Y., Quijano R.G. Characterization of a polyepoxy compound fixed porcine heart valve bioprosthesis. *J. Appl. Biomater* 5 (1994) 159-162
- Shi R.**, Ding T., Liu Q., Han Y., Zhang L., Chen D., Tian W. In vitro degradation and swelling behaviour of rubbery thermoplastic starch in simulated body and simulated saliva fluid and effects of the degradation products on cells. *Polym. Degrad. Stabil.* 91 (2006) 3289-3300
- Shimizu R.N.**, Demarquette N.R. Evaluation of surface energy of solid polymers using different models. *J. Appl. Polym. Sci.* 76 (2000) 1831-1845
- Sionkowska A.** Modification of collagen films by ultraviolet irradiation. *Polym. Deg. Stabil.* 68 (2000) 147-151
- Sloan A.E.** Properties and effects of humectants in intermediate moisture foods. Tesis doctoral, Minneapolis: Universidad de Minnesota; 1976.
- Sobral P.J.A.**, Menegalli F.C., Hubinger M.D., Roques M.A. Mechanical, water barrier thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloid.* 15 (2001) 423-432
- Sorum L.**, Gronli M.G., Hustad J.E. Pyrolysis characteristics and kinetics of municipal solid wastes. *Fuel* 80 (2001) 1217-1227
- Spence K.E.**, Jane J., Pometto A.L. Dialdehyde Starch and zein plastic: Mechanical properties and biodegradability. *J. Environ. Polym. Degrad.* 3 (1995) 69-74
- Starti B.**, Scandola M. Viscoelastic and thermal properties of collagen/poly(vinyl alcohol) blends. *Biomaterials* 16 (1995) 785-792
- Sthornvit R.**, Krotcha J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* 50 (2001) 149-155
- Stickley** The biodegradation of gelatin and its problems in the photographic industry. *J. Photogr. Sci.* 34 (1986) 111-112
- Strauss G.**, Gibson S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloid.* 18 (2004) 81-89
- Strayer L.** *Biochemistry*. 4ta. Edición, W.H. Freeman & Company. New York, USA. 1995; 1064pp.
- Sung H-W.**, Hsu H-L., Shih C-C., Lin D-S. Cross-linking characteristics of biological tissues with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials* 17 (1996) 1405-1410
- Tang C-H.**, Jiang Y., Wen Q-B., Yang X-Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *J. Biotech.* 120 (2005) 296-307
- Tao Jiang**, Yu-hua Wang, Jen-taot Yeh, Zhi-qiang Fan. Study on solvent permeation resistance properties of nylon6/clay nanocomposite. *Eur. Polym. J.* 41 (2005) 459-460
- Tunc S.**, Angellier H., Cahyana Y., Chalier P., Gontard N., Gastaldi E. Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *J. Membrane Sci.* 289 (2007) 159-168
- Valente A.J.M.**, Jimenez A., Simoes A.C., Burrows H.D., Polishchuk A.Ya, Lobo V.M.M. Transport of solutes through calix[4]pyrrole-containing cellulose acetate films. *European Polym J* 43 (2007) 2433-2442
- Vandelli M.A.**, Rivasi F., Guerra P., Forni F., Arletti R. Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 215 (2001) 175-184
- Vanin F.M.**, Sobral P.J.A., Menegalli F.C., Carvalho R.A., Habitate A.M.Q.B. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloid.* 19 (2005) 899-907
- Viville P.**, Lazzaroni R., Mollet E., Alexandre M., Dubois Ph., Borcia G., Pireaux J-J. Surface characterization of poly (epsilon-caprolactone)-based nanocomposites. *Langmuir* 19 (2003) 9425-9433
- Wang L.**, Shogren R. L., Carriere C. Preparation and properties of thermoplastic starch-polyester laminate sheets by coextrusion. *Polym. Eng. Sci.* 40 (2000) 499-506.

- Wang S.**, Song C., Chen G., Guo T., Liu J., Zhang B., Takeuchi S. Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite. *Polym. Degrad. Stab.* 87 (2005) 69-76
- Watanabe K.**, Tezuka Y, Ishii T. Configuration between re formed collagen triple helices and artificially introduced cross-links in gelatin gels. *Macromolecules* 30 (1997) 7910 - 7913
- Weller C.L.**, Gennadios A., Saraiva R.A. Edible bilayer films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 31 (1998) 279-285
- Wilhelm H.M.**, Sierakowski M.R., Souza G.P., Wypych F. Starch films reinforced with mineral clay *Carbohydr Polym* 52 (2003) 101-110
- Wilson R.H.** Utilization and Toxicity of Dialdehyde and Dicarboxyl- Starches. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102 (1959) 735-737
- 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 (1985) 391-401
- Wu C-S.**, Liu Y-L., Chiu Y-C., Chiu Y-S. Thermal stability of epoxy resins containing flame retardant components: an evaluation with thermogravimetric analysis. *Polym. Degrad. Stab.* 78 (2002) 41-48
- Wu J.**, Chiu S-C., Pearce E. M., Kwei T. K. Effects of Phenolic Compounds on Gelation Behavior of Gelatin Gels. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 39 (2001) 224-231
- Wu Q.**, Zhang L. Properties and structure of soy protein isolate-ethylene glycol sheets obtained by compression molding. *Ing. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 1879-1883
- Xi T.**, Liu F. Effect of pretreatment with epoxy compounds on the mechanical properties of bovine pericardial bioprosthetic materials. *J. Biomat. Appl.* 7 (1992) 61-75
- Yalcin B.**, Cakmak M. The role of plasticizer on the exfoliation and dispersion and fracture behaviour of clay particles in PVC matrix: a comprehensive morphological study. *Polymer* 45 (2004) 6623-6638
- Yannas I.V.** Collagen and gelatin in solid state. *J. Macromol. Sci Rev. Macromol. Chem.* 7 (1972) 49-104
- Yao C.**, Liu B., Chang C., Hsu S., Chen Y. Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Mater. Chem. Phys.* 83 (2004) 204-208
- Yu J.G.**, Wang N., Ma X.F. The Effects of Citric Acid on the Properties of Thermoplastic Starch Plasticized by Glycerol. *Starch/Stärke* 57 (2005) 494-504
- Yu L.**, Dean K., Li L. Polymer blends and composites from renewable resources. *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 576-602
- Yu X.**, Yan Y., Gu D-J. Attachment of the biofouling bryozoan **Bugula neritina** larvae affected by inorganic and organic chemical cues. *Int. Biodeter. Biodegr.* 60 (2007) 81-89
- Zeeman R.** Cross-linking of collagen-based materials. Tesis doctoral, Universidad de Twente, 1998.
- Zeeman R.**, Dijkstra P.J., van Wachem P.B., van Luyn M.J.A., Hendriks M., Cahalan P.T., Feijen J. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials* 20 (1999) 921-931
- Zemanová I.**, Turková J., Capka M., Nakhapetyan L.A., Svec F., Kálal J. Effect of the nature of proteins on their coupling to different epoxide-containing supports. *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 229-232
- Zheng J.P.**, Li P., Ma Y.L., De Yao K. Gelatin/Montmorillonite Hybrid Nanocomposite. I. Preparation and Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189-1194
- Zheng J.P.**, Xi L.F., Zhang H.L., De Yao K. Correlation between reaction environment and intercalation effect in the synthesis of gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. *J. Mater. Sci. Lett.* 22 (2003) 1179-1181

Índice de Figuras

Índice de Figuras

FIGURA I.1	1
Esquema de películas multicapa (a) tradicionales(b) biodegradables basados en gelatina	
FIGURA I.2	3
Clasificación de los biopolímeros	
FIGURA I.3	5
Esquema de desnaturalización del colágeno	
FIGURA I.4	5
Composición aminoacídica de la gelatina bovina	
FIGURA I.5	9
Estructura de la montmorillonita (MMt)	
FIGURA I.6	10
Esquema de los tres tipos de nanocompuestos: a) aglomerado, b) intercalado, c) exfoliado	
FIGURA I.7	11
Esquema de una película multicapa	
FIGURA II.1	21
Gelatina comercial	
FIGURA II.2	23
Estructuras químicas de reactivos utilizados	
FIGURA II.3	24
Esquema de la obtención de películas de gelatina	
FIGURA II.4	25
Obtención de las películas por moldeo por compresión	
FIGURA II.5	27
Reacción de los grupos amino terminales con NHN, generando un compuesto coloreado que absorbe en el UV-visible ($\lambda_{\text{máx}}$ 570nm)	
FIGURA II.6	30
Curva de degradación térmica, zonas consideradas para el cálculo del IPDT	
FIGURA II.7	34
Determinación del ángulo de contacto	
FIGURA II.8	36
Cápsulas diseñadas para la determinación de WVP	
FIGURA II.9	43
Película de gelatina obtenida por <i>casting</i> . (a) Aspecto macroscópico (b) Fotomicrografía de SEM (barra = 50 μm)	
FIGURA II.10	43
Espectro de absorción infrarroja de las películas de gelatina	
FIGURA II.11	44
Termogramas de una película de gelatina. ___ primer barrido, --- segundo barrido (5°C/min, N ₂)	
FIGURA II.12	45
DRX de: A) polvo de gelatina, B) película de gelatina	
FIGURA II.13	46
Análisis termogravimétrico (---) polvo (___) película de gelatina	
FIGURA II.14	48
Análisis dinámico-mecánico de la película de gelatina	

FIGURA II.15	49
Espectro de absorción infrarroja del polvo de SD.	
FIGURA II.16	49
Análisis termogravimétrico del polvo de SD	
FIGURA II.17	50
WADX de montomorillonita sódica en polvo	
FIGURA II.18	51
FTIR de MMT Na ⁺ . (a) espectro completo: 400-4000cm ⁻¹	
(b) zona de vibraciones Si-O: 1300-900cm ⁻¹	
FIGURA II.19	52
Curva de pérdida de masa y su correspondiente derivada de Na ⁺ MMT	
 FIGURA III.1	 57
Microscopía electrónica de barrido de películas entrecruzadas (a) Ge-BDGE1	
(b) Ge-GTA1 (c) Ge-BDGE5	
FIGURA III.2	59
Posibles estructuras de GTA en solución acuosa	
FIGURA III.3	60
Reacción de Ge con GTA	
FIGURA III.4	62
Reacción de las proteínas con compuestos epoxidados	
FIGURA III.5	63
Reacción del compuesto diepoxídico con la cadena de gelatina	
FIGURA III.6	65
Consumo de grupos amino en función del tiempo de reacción con BDGE a 70°C	
FIGURA III.7	65
Termogramas para distintos tiempos de reacción: a) 2 h, b) ciclo	
FIGURA III.8	67
Películas de gelatina con distintos agentes de entrecruzamiento	
FIGURA III.9	68
Peso molecular entre puntos de entrecruzamiento (Mc) para distintos porcentajes de agente entrecruzante. (a) GTA, (b) SD, (c) BDGE	
FIGURA III.10	71
Termogramas de las películas de gelatina con los distintos agentes de entrecruzamiento. (a) GTA, (b) BDGE, (c) SD. (1) masa residual % (2) DTGA.	
FIGURA III.11	73
Curvas tensión-deformación de las películas de Ge-GTA	
FIGURA III.12	75
Curvas tensión-deformación de películas entrecruzadas con adición de 30% de Gly. (a) GTA, (b) BDGE	
FIGURA III.13	76
Microfotografía de las superficies de las películas	
FIGURA III.14	77
Curvas tensión-deformación de películas de Ge-SD	
FIGURA III.15	79
Absorción de agua de películas de Ge entrecruzadas y plastificadas	
 FIGURA III.16	 80
Ajuste de los datos experimentales de absorción de agua (HRE75%), por la ecuación de Peleg para diversas películas entrecruzadas. Puntos: datos experimentales, líneas: ajuste del modelo (a) películas plastificadas 30%Gly, (b) sin plastificar.	

FIGURA IV.1	89
Fotografía de HT-AFM de la superficie de fractura de Ge/10MMt	
FIGURA IV.2	91
Método de disolución para la obtención de nanocompuestos	
FIGURA IV.3	92
Técnica para la obtención de películas de Ge/MMt. Evaporación del solvente por <i>casting</i>	
FIGURA IV.4	94
Patrones de difracción de rayos de películas de Ge/MMt	
FIGURA IV.5	95
Aspecto macroscópico de películas de gelatina con MMT obtenidas por <i>casting</i>	
FIGURA IV.6	96
(a) DRX de películas de Ge con carga. (b) normalizado respecto a Ge	
FIGURA IV.7	97
Imágenes de HT-AFM (a) Ge; (b) Ge/5MMt (c) Ge/10MMt (d)Ge/15MMt	
FIGURA IV.8	100
Espectros FTIR de las películas (a) entre 1300-900 cm^{-1} y (b) entre 1800-1000 cm^{-1}	
FIGURA IV.9	102
Ajuste de los datos experimentales por la ecuación de Peleg	
FIGURA IV.10	103
Tortuosidad del camino del permeante a través de una película cargada	
FIGURA IV.11	105
Curvas de TGA normalizadas de los materiales compuestos. Atm: He, v: 10°C/min	
FIGURA IV.12	107
Curvas de TG/DTG para mezclas Ge/MMt en atmósfera inerte (He) y a 10°C/min. (—)Resultados experimentales (---) Regla de mezclas	
FIGURA IV.13	108
Ensayos dinámico-mecánicos, obtenidos a 10°C/min y en atmósfera de N ₂ . (a) módulo de almacenamiento; (b) $\tan \delta$	
FIGURA V.1	115
Variación de la elongación a la rotura de las películas acondicionadas a diferentes HRE	
FIGURA V.2	119
DRX de películas Ge/5MMt/30Sor. Ge/5MMt a: plastificante adicionado sobre la suspensión de MMT; Ge/5MMt b: plastificante adicionado sobre la solución de Ge	
FIGURA V.3	120
Aspecto macroscópico de películas de Ge/ 5MMt/plastificante obtenidas por <i>casting</i>	
FIGURA V.4	122
Espectros de DRX para películas con 5%p/p de MMT y diversos contenidos de plastificante. (a) sorbitol, (b) glicerol	
FIGURA V.5	123
Imágenes de AFM (a) Ge/5MMt (b)Ge/5MMt/30Sor (c)Ge/5MMt/30Gly	
FIGURA V.6	124
Espectro FTIR de las películas entre 900-1300 cm^{-1}	
FIGURA V.7	128
Curva de absorción a 75% HRE de películas de Ge y Ge/5MMt con y sin plastificantes	
FIGURA V.8	130
Fractogramas de películas de Ge y Ge/5MMt con y sin plastificante	

FIGURA VI.1	136
Imagen de SEM Ge-SD10 Ge/5MMt Ge-SD10	
FIGURA VI.2	139
Esquema del procesamiento de moldeo por compresión para la obtención del multicapa	
FIGURA VI.3	139
Aspecto macroscópico de las películas individuales (a)Ge/5MMt/30Gly (b)Ge-SD10/30Gly y (c)laminado	
FIGURA VI.4	140
Imágenes de SEM de las superficies de fractura de(a, b) Ge-SD10 Ge/5MMt Ge-SD10, (c) Ge-SD10/30Gly, (d) Ge/5MMt/30Gly	
FIGURA VI.5	142
Curvas de absorción de humedad de las películas y ajuste de la ecuación de Peleg	
FIGURA VII.1	149
Aspecto macroscópico de las películas luego de estar expuestas al suelo durante 7 días (a)Ge/5MMt/30Gly (b) Ge-SD10/30Gly (c) Ge-SD10 Ge/5MMt Ge-SD10	
FIGURA VII.2	154
Aspecto macroscópico de las películas con el tiempo de degradación	
FIGURA VII.3	155
Absorción de agua promedio (ec. II.26) de las películas individuales y del laminado	
FIGURA VII.4	157
Pérdida de masa promedio (ec. II.27) de las películas individuales y del laminado	
FIGURA VII.5	159
Evolución cualitativa de la composición de la película multicapa luego de diferentes tiempos de degradación en suelo, determinadas por DTG (a) Láminas individuales y multicapa previo a la exposición (b) multicapa	
FIGURA VII.6	160
Microscopía SEM de la superficie de las películas individuales y del laminado	
FIGURA VII.7	161
Microscopía SEM de la superficie de Ge/5MMt/30Gly con el tiempo de exposición al medio degradativo	
FIGURA VII.8	162
Microscopía SEM de la superficie de Ge-SD10/30Gly con el tiempo de exposición al medio degradativo	
FIGURA VII.9	164
Microscopía SEM de la superficie de la película multicapa con el tiempo de exposición al medio degradativo	

Índice de Tablas

Índice de Tablas

TABLA II.1	22
Propiedades de los agentes de entrecruzamiento y plastificantes utilizados	
TABLA II.2	26
Relación entre el número de Bloom y la masa molar	
TABLA II.3	35
Tensión superficial de los líquidos de referencia	
TABLA II.4	41
Recopilación bibliográfica de valores de Tm y Tg, de películas basadas en gelatina.	
TABLA III.1	70
Cálculo de Mc para las películas entrecruzadas	
TABLA III.2	72
Parámetros de degradación térmica de las películas	
TABLA III.3	74
Parámetros mecánicos de películas de Ge-GTA. Secas en estufa de vacío a peso constante	
TABLA III.4	76
Parámetros mecánicos de películas entrecruzadas con 30% masa de Gly. Secas en estufa de vacío a peso constante	
TABLA III.5	77
Parámetros mecánicos de películas de Ge-SD/30Gly	
TABLA III.6	81
Parámetros de ajuste de la ecuación empírica de Peleg a los datos experimentales de absorción de humedad. HRE 75%	
TABLA III.7	82
Coefficientes de difusión en 75% de HRE. T: 25°C	
TABLA IV.1	95
Opacidad de películas de Ge/MMt	
TABLA IV.2	101
Medida de ángulo de contacto, energía interfacial con sus componentes polares y dispersivos y fracción polar de la superficie de las películas obtenidas	
TABLA IV.3	103
Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg a los datos experimentales de absorción de humedad. HRE 75%	
TABLA IV.4	104
WVP 65% de HRE. Coeficientes de difusión, 75% de HRE. T: 25°C	
TABLA IV.5	106
Parámetros de degradación térmica de las películas de Ge/YMMt	
TABLA IV.6	110
Parámetros mecánicos de las películas de Ge/MMt (secas, Tamb.)	
TABLA V.1	121
Opacidad de las películas con adición de plastificantes	
TABLA V.2	123
Medida de ángulo de contacto, y fracción polar de la superficie de las películas obtenidas	

TABLA V.3	125
Propiedades mecánicas de las películas con plastificante. Secas en estufa de vacío a peso cte.	
TABLA V.4	126
Permeabilidad al vapor de agua y flujo de transferencia de oxígeno de películas de Ge y Ge/MMt5 con y sin plastificante	
TABLA V.5	128
Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg a los datos experimentales de absorción de humedad. HRE 75%	
TABLA V.6	129
Coefficiente de difusión en 75% de HRE. T: 25°C	
TABLA V.7	130
Variación de las propiedades mecánicas de las películas acondicionadas a diferentes HRE.	
TABLA V.8	131
Parámetros mecánicos y de impacto de las películas acondicionadas a 75%HRE	
TABLA VI.1	141
Espesor promedio, opacidad y tranmistancia a 600 nm de las películas individuales y del laminado	
TABLA VI.2	142
Parámetros de ajuste de la ecuación de Peleg y coeficientes de difusión aparente. HRE 75%.T: 25°C	
TABLA VI.3	143
Polaridad superficial y propiedades de barrera de las películas	
TABLA VI.4	145
Propiedades mecánicas en tracción e impacto de las películas.75%HRE	