



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Desarrollo de materiales nanocompuestos biodegradables con aplicación en envases activos

Tesis presentada para optar al título de:

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Físicas

Lic. Santiago Estevez Areco

Directora de Tesis: Silvia Goyanes

Co-director: Roberto Jorge Candal

Consejera de Estudios: Silvia Ledesma

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos;
Instituto de Física de Buenos Aires (IFIBA), CONICET-UBA.

Buenos Aires, 2021

Desarrollo de materiales nanocompuestos biodegradables con aplicación en envases activos

Santiago Estevez Areco

Resumen

La utilización de envases plásticos para alimentos ha crecido de manera exponencial en las últimas décadas, y con ello también se ha incrementado la acumulación de basura plástica y el perjuicio sobre los ecosistemas. En este contexto, el desarrollo de materiales amigables con el medio ambiente representa una alternativa para disminuir la acumulación de residuos y reducir el impacto ambiental. Empleando conceptos de nanotecnología, pueden obtenerse materiales con morfologías novedosas y con propiedades específicas que contribuyan, por ejemplo, a la preservación de los alimentos a través del desarrollo de *envases activos*. Estos últimos constituyen sistemas que aíslan al producto de su exterior a la vez que interactúan con él de alguna forma que permite extender su vida útil.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue el desarrollo de materiales nanocompuestos basados en polímeros biodegradables con capacidad de formar envases activos. En particular, se estudiaron diferentes posibilidades para obtenerlos, la fisicoquímica de los materiales y procesos involucrados y la influencia de la morfología del material del envase sobre las propiedades de transporte. Los materiales desarrollados incorporan compuestos antimicrobianos y/o antioxidantes y fueron obtenidos mediante técnicas escalables (extrusión y electrohilado). En particular, se estudiaron mallados constituidos por nanofibras de poli(alcohol vinílico) (PVA), películas nanocompuestas de almidón termoplástico y un sistema bicapa formado por una película nanocompuesta de almidón y un mallado de PVA.

Los mallados de PVA fueron fabricados por electrohilado e incorporaron ácido cítrico para esterificar/entrecruzar las cadenas poliméricas y volver insoluble al material en agua. En primer lugar, se buscó encapsular un principio activo natural y volátil (d-limoneno) con conocidas propiedades antimicrobianas. Se estudiaron sistemas donde se incorporó al d-limoneno directamente en el material o previamente encapsulado en β -ciclodextrina, como forma de incrementar su estabilidad térmica. En segundo lugar, se incorporó un extracto natural rico en polifenoles (extracto de romero) como agente antioxidante. Se estudiaron las características fisicoquímicas de los mallados obtenidos, los efectos de la incorporación de cada principio activo y la capacidad de los mallados de incorporar y estabilizar térmicamente dichos compuestos. Adicionalmente, para el sistema conteniendo extracto de romero, se estudió la cinética de liberación de polifenoles hacia diferentes medios simulantes de alimentos.

Se desarrollaron películas de almidón por extrusión y posterior calandrado/termoprensado que incorporaron un extracto de romero, capaz de formar nanopartículas, como compuesto antioxidante o nanobarras de ZnO como compuesto antimicrobiano. Se estudiaron las propiedades físico-químicas de los materiales resultantes, con especial interés en la dispersión de las nanopartículas/nanobarras dentro de la matriz polimérica, las interacciones resultantes entre ambas fases, el desempeño mecánico de los materiales, los cambios en la susceptibilidad al agua y las propiedades activas de cada material.

Finalmente, se desarrolló un sistema bicapa consistente en una película de almidón conteniendo nanobarras de ZnO y un mallado de PVA conteniendo extracto de romero. En este nuevo sistema, cada capa contiene un principio activo distinto con el propósito de obtener diferente actividad de cada lado. Se caracterizó al nuevo sistema considerando las interacciones entre las capas, la adhesión entre ellas y la posible migración de compuestos entre ambas. Además se estudiaron las propiedades mecánicas, de barrera al vapor de agua y tanto la actividad antimicrobiana sobre la superficie externa del bicapa como la actividad antioxidante producto de la liberación de polifenoles desde la capa interna hacia un simulante de alimentos.

Los materiales desarrollados a lo largo de esta tesis presentan características adecuadas para su aplicación en envases biodegradables activos. Asimismo, los conceptos y fenómenos estudiados contribuyen al conocimiento científico de nuevos materiales poliméricos nanocompuestos y nanoestructurados.

PALABRAS CLAVE: Envase activo; polímero biodegradable; nanocompuesto; poli(alcohol vinílico); almidón termoplástico; electrohilado; extrusión.

Development of biodegradable nanocomposite materials for active packaging applications

Santiago Estevez Areco

Abstract

The demand of plastic packaging has grown exponentially in the last decades, which has led to an unprecedented accumulation of plastic waste with several harmful effects on ecosystems. In this context, the development of ecofriendly materials constitutes an unpostponable task to diminish waste accumulation and to decrease the related environmental impact. Nanotechnology offers several opportunities for the development of biodegradable materials with novel morphologies and specific properties which could contribute, for example, to the preservation of food products through the development of *active packagings*. These systems are specially designed to isolate the product from the outside interacting with it at the same time, in such a way that extends its shelf life.

The aim of this thesis was the development and study of nanocomposite materials based on biodegradable polymers with the potentiality to form an active packaging. Particularly, different manufacturing possibilities were studied, as well as the physicochemistry of materials and processes, and the influence of packaging morphology on transport properties. Systems incorporating antimicrobial or antioxidants compounds were developed using scalable techniques such as electrospinning and extrusion. Poly (vinyl alcohol) (PVA) mats constituted by nanofibers, starch nanocomposite films, and a bilayer film formed by a PVA mat and a starch based film were developed and studied.

PVA mats were fabricated using electrospinning technique. Citric acid was included in all formulations to sterify/crosslink the polymeric chains in order to turn the materials insoluble in water. Firstly, a volatile natural compound with known antimicrobial properties (d-limonene) was incorporated into PVA electrospun mats. Systems containing free d-limonene or β -cyclodextrin encapsulated d-limonene were developed. Secondly, PVA mats incorporating a polyphenol rich extract (rosemary extract) as antioxidant agent were fabricated. The physicochemical characteristics of the mats, the effect of the incorporation of each active principle and the ability of electrospun nanofibers to incorporate and thermally stabilize such compounds were studied. Additionally, release kinetic of polyphenols to several food simulants was studied in the PVA mats incorporating rosemary extract.

Nanocomposite starch films containing rosemary extract, with the capability to form nanoparticles, as an antioxidant agent or ZnO nanorods as an antimicrobial agent were obtained by

extrusion followed by calendering/thermo-pressing. The physicochemical properties of the materials were studied, with a special focus on the dispersion of nanofillers within the polymeric matrix, interactions between the components, mechanical response, water susceptibility and active properties of each material.

Finally, a bilayer system consisting of a starch film incorporating ZnO nanorods and a PVA electrospun mat incorporating rosemary extract was developed. In this system, each layer of the material aims to have a specific functionality by incorporating different active principles. The bilayer film was studied considering interactions between layers, their adhesion, and the possible migration of the active principles between layers. Moreover, mechanical properties, water vapor barrier, antimicrobial activity over the external surface of the bilayer film, and antioxidant activity associated to the release of polyphenols from the inner layer were studied.

The materials developed in this thesis show suitable characteristics for its implementation in biodegradable active packaging. Likewise, the physicochemical concepts and the phenomena studied throughout the document contribute to the scientific knowledge about novel nanocomposite and nanostructured polymeric materials.

KEYWORDS: active packaging; biodegradable polymer; nanocomposite; poly (vinyl alcohol); thermoplastic starch; electrospinning; extrusion.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad de Buenos Aires y CONICET por permitirme realizar este trabajo, a través de la prestación del lugar de trabajo y del otorgamiento de una beca. Asimismo a UBA, CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por financiar este trabajo a través de diferentes subsidios otorgados.

A mis directores de tesis, Silvia y Roberto, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos. Por haberme guiado durante todo el desarrollo del trabajo y los consejos y enseñanzas que me brindaron.

A mis compañeros del laboratorio de polímeros: Pau, Luc, Oswald, Jony, Lau, Mati, Nico, Fede, Lu, Lu, Ro, Caro, Alex, Ali, Danna, Darío. Por todo el apoyo en el laboratorio y también por todas las charlas, mates, harinas y buena onda compartida en estos años.

A aquellas personas fuera del ámbito académico que me ayudaron a concluir esta etapa. A mi familia por todo su apoyo: Mamá, Pata y Manu. Y a mis amigos de Tandil que estuvieron conmigo a pesar de la distancia, y sin ellos hubiera perdido la cordura (aún más). A Nadu por su cariño inmenso, apoyo incondicional y por haberme acompañado en los meses de escritura (y pandemia)

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas
CD	Ciclodextrina
DMTA	Análisis térmico dinámico-mecánico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
DRX	Difracción de rayos X
DTA	Análisis térmico diferencial
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Energía mecánica específica
F-C	Folin-Ciocalteu
FE-SEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FTIR-ATR	Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier con reflectancia total atenuada
GAE	Equivalente de ácido gálico
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
MC	Contenido de humedad
Mw	Peso molecular
PVA	Poli(alcohol vinílico)
RE	Extracto de romero
RH	Humedad relativa
S	Grado de hinchamiento
TE	Equivalente de Trolox
TGA	Análisis termogravimétrico
TOC	Carbono total orgánico
TPS	Almidón termoplástico
WS	Solubilidad en agua
WVP	Permeabilidad al vapor de agua

INDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONTEXTO Y MOTIVACIÓN	1
1.2. MALLADOS DE ELECTROHILADO PARA ENVASES ACTIVOS	4
1.2.1. Mallados de electrohilado para envases activos	4
1.2.2. Encapsulación de compuestos activos en mallados de PVA	5
1.3. PELÍCULAS ACTIVAS BASADAS EN ALMIDÓN.....	8
1.3.1. Conceptos preliminares	8
1.3.2. Incorporación de componentes activos en películas de almidón	11
1.4. PELÍCULAS BICAPA BIODEGRADABLES Y ACTIVAS	12
1.5. OBJETIVOS	14
1.6. REFERENCIAS	15
 CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA.....	20
2.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES	20
2.2. SÍNTESIS DE NANOBARRAS DE ZnO	21
2.3. FABRICACIÓN DE MALLADOS DE NANOFIBRAS POR ELECTROHILADO	22
2.4. FABRICACIÓN DE PELÍCULAS CONTINUAS POR EXTRUSIÓN Y TERMOPRENSADO	25
2.5. FABRICACIÓN DE PELÍCULAS BICAPA	29
2.6. CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS NATURALES	29
2.6.1. Rendimiento de extracción	29
2.6.2. Determinaciones de compuestos químicos asociados a actividad antioxidante.....	29
2.6.3 .Composición del extracto	31
2.6.4. Morfología de partículas.....	32
2.6.5. Propiedades térmicas	32
2.6.6. Espectroscopía infrarroja.....	33
2.7. CARACTERIZACIÓN DE NANOBARRAS DE ZNO	33
2.7.1. Morfología	33
2.8. CARACTERIZACIÓN DE MALLADOS DE NANOFIBRAS.....	33
2.8.1. Caracterización de las soluciones/dispersiones utilizadas.....	33
2.8.2. Caracterización de los mallados	34
2.8.2.1. Morfología	34
2.8.2.2. Espectroscopía infrarroja y Raman	34
2.8.2.3. Estructura cristalina	34
2.8.2.4. Análisis térmico.....	34
2.8.2.5. Determinación de solubilidad y liberación de d-limoneno y β -ciclodextrina	34
2.8.2.6. Determinación de biodegradabilidad	35
2.8.2.7. Determinación de actividad antimicrobiana	35

2.8.2.8.	Determinación de contenido de polifenoles y actividad antioxidante.....	35
2.8.2.9.	Cinética de liberación de polifenoles	36
2.9.	CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS CONTINUAS	36
2.9.1.	Morfología	36
2.9.2.	Espectroscopía infrarroja	36
2.9.3.	Estructura cristalina.....	36
2.9.4.	Análisis térmico	37
2.9.5.	Susceptibilidad al agua	37
2.9.6.	Ensayos de tracción uniaxial.....	38
2.9.7.	Determinación de actividad antioxidante y cinética de liberación de polifenoles.....	38
2.9.8.	Hinchamiento	38
2.9.9.	Análisis térmico-dinámico mecánico.....	39
2.9.10.	Determinación de actividad antimicrobiana	39
2.10.	CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS BICAPA	39
2.10.1.	Morfología	39
2.10.2.	Espectroscopía infrarroja	40
2.10.3.	Estructura cristalina.....	40
2.10.4.	Análisis térmico	40
2.10.5.	Susceptibilidad al agua	40
2.10.6.	Propiedades mecánicas	40
2.10.7.	Contenido de polifenoles y actividad antioxidante	40
2.10.8.	Actividad antimicrobiana.....	41
2.10.9.	Migración de Zn entre capas	41
2.11.	REFERENCIAS	42
CAPÍTULO 3: ENCAPSULACIÓN DE VOLÁTILES EN MALLADOS ELECTROHILADOS DE PVA.....		45
3.1.	INTRODUCCIÓN	45
3.2.	METODOLOGÍA	47
3.2.1.	Materiales	47
3.2.2.	Fabricación de mallados de electrohilado y caracterización	47
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.3.1.	Propiedades de las soluciones	49
3.3.2.	Mallados de PVA	50
3.3.2.1.	Características fisicoquímicas	50
3.3.3.	Mallados de PVA incorporando β -ciclodextrina	52
3.3.3.1.	Características fisicoquímicas	52
3.3.4.	Mallados de PVA incorporando d-limoneno	56

3.3.4.1.	Características fisicoquímicas	56
3.3.4.2.	Estimación de d-limoneno incorporado, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana.....	59
3.3.5.	Mallados de PVA incorporando d-limoneno encapsulado en β -ciclodextrina.....	62
3.3.5.1.	Características fisicoquímicas	62
3.3.5.2.	Estimación de d-limoneno incorporado, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana.....	66
3.4.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	69
3.5.	REFERENCIAS	69
CAPÍTULO 4: ENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES EN MALLADOS ELECTROHILADOS DE PVA		73
4.1.	INTRODUCCIÓN	73
4.2.	METODOLOGÍA	75
4.2.1.	Materiales utilizados	75
4.2.2.	Preparación del extracto de romero y caracterización.....	75
4.2.3.	Fabricación de los mallados electrohilados y caracterización	76
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	78
4.3.1.	Extracto de romero	78
4.3.1.	Rendimiento de extracción, contenido de polifenoles y actividad antioxidante	78
4.3.1.2.	Caracterización de partículas de romero	79
4.3.1.3.	Componentes mayoritarios	80
4.3.2.	Mallados de PVA conteniendo extracto de romero	81
4.3.2.1.	Características fisicoquímicas	81
4.3.2.2.	Actividad antioxidante y liberación de polifenoles	86
4.3.2.3.	Cinética de liberación de polifenoles.....	88
4.4.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	95
4.5.	REFERENCIAS	95
CAPÍTULO 5: PELÍCULAS NANOCOMPUESTAS DE ALMIDÓN OBTENIDAS POR EXTRUSIÓN Y TERMOPRENSADO		100
5.1.	INTRODUCCIÓN.....	100
5.2.	PARTE A: PELÍCULAS DE ALMIDÓN CONTENIENDO EXTRACTO DE ROMERO	103
5.2.1.	METODOLOGÍA	103
5.2.1.1.	Materiales.....	103
5.2.1.2.	Preparación del extracto de romero y caracterización	103
5.2.1.3.	Fabricación de las películas conteniendo romero y caracterización	103
5.2.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
5.2.2.1.	Caracterización de partículas de romero.....	105

5.2.2.2.	Características fisicoquímicas de las películas de almidón conteniendo romero	106
5.2.2.3.	Actividad antioxidante y liberación de polifenoles	117
5.2.2.4.	Cinética de liberación de polifenoles	118
5.3.	Parte B: Películas de almidón conteniendo nanobarras de ZnO	123
5.3.1	Optimización del material matriz	123
5.3.1.1.	Metodología	123
5.3.1.1.1.	Materiales	123
5.3.1.1.2.	Preparación y caracterización de las películas	123
5.3.1.2.	Resultados y discusión de la optimización del material matriz	124
5.3.1.2.1.	Características fisicoquímicas	124
5.3.2.	Películas nanocompuestas incorporando nanobarras de ZnO	132
5.3.2.1.	Metodología	132
5.3.2.1.1.	Materiales	132
5.3.2.1.2.	Síntesis de nanobarras de ZnO y caracterización	132
5.3.2.1.3.	Preparación de películas conteniendo nanobarras de ZnO y caracterización	133
5.3.2.2.	Resultados y discusión de las películas conteniendo nanobarras de ZnO	134
5.3.2.2.1.	Caracterización de nanobarras de ZnO	134
5.3.2.2.2.	Características fisicoquímicas de películas nanocompuestas	134
5.3.2.2.3.	Actividad antimicrobiana de las películas	139
5.4.	Conclusiones parciales	140
5.5.	Referencias	141
CAPÍTULO 6: FABRICACIÓN DE PELÍCULAS BICAPA ACTIVAS		147
6.1.	INTRODUCCIÓN	147
6.2.	METODOLOGÍA	149
6.2.1.	Materiales	149
6.2.2.	Preparación de películas bicapa y caracterización	149
6.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	150
6.3.1.	Características fisicoquímicas de la película bicapa	150
6.3.2.	Migración de Zn(II), actividad antioxidante y actividad bactericida	157
6.4.	CONCLUSIONES PARCIALES	160
6.5.	REFERENCIAS	161
CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES		163

Introducción

Resumen

En este capítulo se presenta la problemática ambiental que motiva el estudio de nuevos materiales basados en polímeros biodegradables y se introduce el concepto de *envase activo* como tecnología emergente destinada a mejorar la preservación de los alimentos. Luego, se describen los antecedentes más relevantes respecto a los materiales que se utilizarán a lo largo de la tesis: mallados de electrohilado basados en poli(alcohol vinílico) y películas nanocompuestas basadas en almidón. En este punto, se hace énfasis en la literatura científica referida al estudio de sistemas basados en estos materiales con aplicación en envases de alimentos y en matrices que encapsulan compuestos antimicrobianos o antioxidantes. Descriptos estos antecedentes, se introduce el concepto de envase multicapa y los antecedentes referidos a bicapas basados en polímeros biodegradables conteniendo principios activos. Finalmente, se presentan los objetivos específicos de la tesis.

1.1. Contexto y motivación

La producción de plásticos sintéticos ha crecido de forma exponencial desde la década de 1950, alcanzando en la actualidad una producción global de ~393 Mt por año (Lebreton & Andrady, 2019). La tasa de crecimiento en la demanda de plásticos no ha sido observada en ningún otro material, lo cual se justifica en sus excelentes propiedades: bajo costo, durabilidad, ligereza y facilidad para procesarse y moldearse. Por este motivo, han logrado un lugar importante en numerosas áreas, entre las que destacan la industria de la construcción y la de envases de alimentos. Sin embargo, la mala gestión de residuos plásticos, sumado a los elevados costos de reciclaje de muchos de ellos, conduce a la acumulación de basura plástica en el medio ambiente. Por ejemplo, en el año 2010, alrededor de 8 Mt de plásticos terminaron en los océanos. La mayor parte del plástico residual se presenta en forma de microplásticos (partículas inferiores a 5 mm) que no son biodegradables, y se introducen en la cadena

trófica provocando daños irreparables en los diferentes ecosistemas (de Souza Machado, Kloas, Zarfl, Hempel, & Rillig, 2018; Galloway, Cole, & Lewis, 2017). La industria de envases, en particular, genera alrededor del 42% de los plásticos a nivel global y alcanza una producción de alrededor 700 kt anuales en Argentina (Geyer, Jambeck, & Law, 2017; Ministerio de Hacienda, 2019). El uso excesivo e indiscriminado de envases plásticos provoca una generación también excesiva de residuos cuando estos son descartados, lo cual ocurre la mayoría de las veces luego de un solo uso.

La principal función de los envases de alimentos es aislar al producto del exterior para evitar su contaminación y así extender su vida útil. En los últimos años, se estima que alrededor de un tercio de los alimentos producidos anualmente a nivel global (alrededor de 1300 Mt) fue desperdiciado. Este hecho, sumado a los cambios en la logística de transporte propios de la globalización y a la preferencia de los consumidores por alimentos mínimamente procesados, ha conducido al surgimiento de nuevos envases con la capacidad de extender la vida útil de los alimentos de forma de minimizar su desperdicio. En este marco, la legislación y los consumidores están impulsando los denominados envases activos. Un *envase activo* es un sistema que interactúa de alguna manera con el alimento para prolongar su vida útil, asegurar su seguridad y calidad y/o mantener sus propiedades organolépticas. El concepto surge como contraposición a los envases tradicionales (*pasivos*) cuya función primaria es aislar al producto del exterior. Algunas propiedades típicas que se buscan en un envase activo es atrapar etileno u oxígeno, atrapar o liberar dióxido de carbono, adsorber o liberar aromas, regular la humedad del alimento, liberar compuestos antioxidantes y/o proveer compuestos antimicrobianos. Los envases antimicrobianos y antioxidantes contribuyen a prevenir o retardar dos de las mayores causas en la pérdida de calidad y seguridad de los alimentos, y encuentran aplicaciones en una amplia variedad de productos, ya sean carnes, pescados, lácteos, frutas y verduras, entre otros. El desarrollo de envases activos biodegradables constituye una alternativa para disminuir el impacto ambiental y a la vez preservar a los alimentos y extender el tiempo en góndola.

Los polímeros biodegradables pueden clasificarse de acuerdo a si son derivados de la industria petroquímica (por ej.: policaprolactona, poli(alcohol vinílico)), o si son obtenidos de fuentes naturales (por ej.: almidón, celulosa). Al respecto, no debe confundirse el término biobasado con biodegradable, ya que existen varios polímeros biobasados que no son biodegradables, como por ejemplo el bio-PET (polietilentereftalato (PET) preparado a partir de materias primas de origen vegetal). Los residuos generados por envases biodegradables pueden, de acuerdo al polímero, ser tratados en plantas de compostaje municipales, barriales u hogareñas o incluso algunos pueden biodegradarse en suelo o en agua. Esto constituye una ventaja sustancial respecto al tratamiento de residuos plásticos tradicionales. Como contrapartida, los materiales poliméricos biodegradables suelen presentar peores propiedades (por ej.: deformación a rotura, tenacidad, permeabilidad a diferentes gases, etc.) respecto a los plásticos

tradicionales y muchas veces su desempeño resulta insuficiente para la industria de envases de alimentos.

En este contexto, la nanotecnología provee herramientas para el diseño, desarrollo e investigación de nuevos materiales. La nanotecnología constituye el estudio interdisciplinario de sistemas con al menos una dimensión entre 1 y 100 nm. En las estructuras nanométricas se generan propiedades diferentes que pueden ser aprovechadas en los materiales a nivel macroscópico. La nanotecnología es aplicada en envases de alimentos principalmente a través de la generación de *nanocompuestos*. Un nanocompuesto polimérico consiste en una matriz polimérica que incorpora nanopartículas orgánicas o inorgánicas, con el fin de obtener un material con mejores propiedades mecánicas y de barrera respecto a la matriz. Por otro lado, los materiales con morfología de dimensiones nanométricas constituyen una variante para el desarrollo de nuevos envases. Un ejemplo de especial interés lo constituyen aquellos materiales formados por nanofibras. Para la obtención de nanomateriales fibrosos existen diversas metodologías, entre las que destacan el dibujado (*nanofiber drawing*), la síntesis en plantilla, separación de fases, autoensamblado, soplado de fusión, soplado de soluciones y el electrohilado (*electrospinning*). En particular, los materiales fabricados por electrohilado ofrecen bajo peso, elevada porosidad y una relación área/volumen alta (Chronakis, 2005). Además, es una tecnología sumamente interesante para la encapsulación y liberación de compuestos activos en envases (Wen, Wen, Zong, Linhardt, & Wu, 2017). Por último, la nanotecnología también contribuye en la obtención de antimicrobianos y antioxidantes nanométricos, los cuales suelen ser más eficientes al presentar una mayor relación área/volumen que intensifica reacciones superficiales (Mihindukulasuriya & Lim, 2014).

Los requerimientos de los envases de alimentos, en general, no son posibles de alcanzar con un solo material. El diseño de estructuras multicapas permite utilizar distintos materiales para combinar distintas propiedades de cada uno en una estructura única, como puede ser la resistencia mecánica, la barrera a determinados gases o la barrera a la luz ultravioleta. En el caso de envases activos también es posible combinar diferentes tipos de funcionalidad al incorporar distintos componentes en cada capa. En este enfoque, una capa interna podría interactuar de una manera específica con el alimento, mientras que una capa externa podría interactuar de un modo completamente distinto con el exterior. Evidentemente, en estos diseños resulta fundamental evitar la migración de compuestos activos entre capas, ya que podrían disminuirse o inactivarse los efectos buscados.

En función de lo expuesto, la motivación de esta tesis fue desarrollar nuevos materiales basados en polímeros biodegradables a partir de conceptos de nanotecnología, con capacidad de conformar envases activos; en particular para contener alimentos y extender su vida útil. Para ello, resulta fundamental la generación de conocimiento asociado a la fabricación de dichos materiales, a las

características fisicoquímicas resultantes de la incorporación de componentes activos y a la interacción entre distintas capas de un envase multicapa activo.

1.2. *Mallados de electrohilado para envases activos*

1.2.1. Conceptos preliminares

La técnica de electrohilado se utiliza para fabricar estructuras poliméricas porosas conformadas por fibras cilíndricas con diámetros desde ~50 nm hasta algunos micrones, dependiendo del polímero y de las condiciones de fabricación. El procesamiento parte de una solución polimérica, se lleva a cabo a temperatura y presión ambiente, es escalable y pueden emplearse una gran variedad de polímeros, tanto naturales como sintéticos. Además, permite incorporar principios activos o nanopartículas en las fibras, de forma tal de obtener nanomateriales con propiedades específicas. Al no involucrar temperaturas altas, el electrohilado es preferible frente a otras técnicas para incorporar compuestos termosensibles y/o volátiles.

El poli(alcohol vinílico) (PVA) es un polímero sintético soluble en agua, inodoro, no tóxico, biodegradable y cuya aplicación está permitida en materiales de envases en contacto con alimentos por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (DeMerlis & Schoneker, 2003; US Food and Drug Administration, 2017). Entre sus propiedades, se destaca la estabilidad química y térmica, resistencia a aceites y grasas y baja permeabilidad al oxígeno y a los aromas. Si bien no es de origen natural, el PVA es biodegradable y puede ser utilizado para la fabricación de fibras ultrafinas por electrohilado partiendo de una solución acuosa, lo cual lo distingue entre otros polímeros.

El PVA se obtiene a partir de la hidrólisis básica del poli (acetato de vinilo) y, comercialmente, puede ser adquirido con diferentes grados de hidrólisis, en los que varía la cantidad de grupos acetato remanentes. La Figura 1.1 presenta la obtención de PVA a partir de la reacción de hidrólisis del poli (acetato de vinilo). El PVA presenta una estructura mayoritariamente lineal y es semicristalino. La fase cristalina consiste en lamelas de 10-20 nm de espesor rodeadas por cadenas de la fase amorfa. En la fase cristalina del PVA, las cadenas se alinean formando puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos con una ocupación del 50%, de acuerdo al modelo original propuesto por Bunn (1948) que aún está vigente para describir el arreglo cristalino del PVA. La porción de fase cristalina en el PVA depende de la historia termo-mecánica del material y puede incrementarse mediante tratamientos térmicos adecuados.

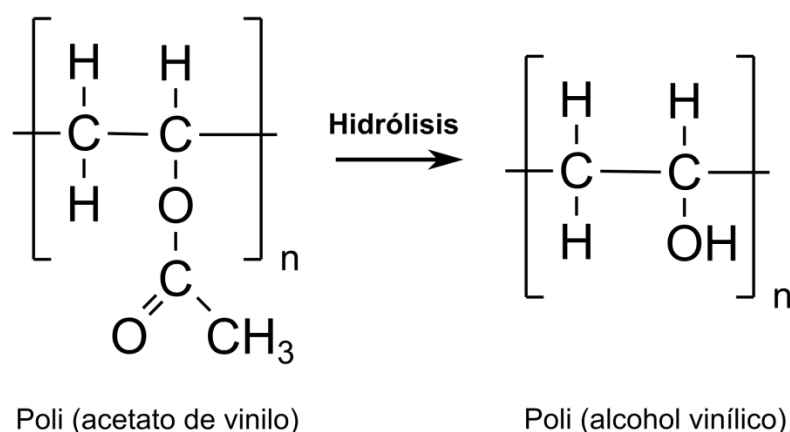


Figura 1.1. Obtención del poli(alcohol vinílico) (PVA) a partir de la hidrólisis del poli (acetato de vinilo).

1.2.2. Encapsulación de compuestos activos en mallados de PVA

En los últimos años, se han desarrollado numerosas investigaciones sobre la incorporación de compuestos activos en mallados de electrohilado. Para obtener mallados antimicrobianos suelen utilizarse nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos (por ej.: plata, óxido de cinc), enzimas (glucosa oxidasa), péptidos (pleurocidina), polisacáridos (quitosano), compuestos bioactivos y aceites esenciales. Para obtener mallados antioxidantes suelen utilizarse captadores de oxígeno (hierro o ácido ascórbico), agentes quelantes (ácido cítrico o gálico), tocoferoles, aceites esenciales y compuestos sintéticos. Los antimicrobianos y antioxidantes de origen botánico (compuestos bioactivos, extractos y aceites esenciales) constituyen una opción sumamente interesante para ser utilizados en mallados activos para envases de alimentos debido a su bajo costo, alta disponibilidad, biodegradabilidad y por ser, en general, seguros como aditivos de alimentos o como componentes de un material destinado a estar en contacto con alimentos.

Arrieta y col. (2018) desarrollaron mallados de electrohilado de PVA conteniendo un extracto antioxidante de algas. Las fibras obtenidas presentaron diámetros de ~240 nm y fueron utilizadas para reforzar una película continua de PLA y otorgarle actividad antioxidante. Shao y col. (2018) incorporaron partículas de permutita¹ y aceite esencial de canela en mallados de PVA. La incorporación de las partículas permitió mejorar las propiedades mecánicas del material, mientras el aceite esencial se utilizó como agente antimicrobiano. El material presentado por estos autores permitió incrementar la vida útil de frutillas almacenadas a 10,5 °C por 7 días. Camerlo y col. (2013) desarrollaron mallados de PVA conteniendo d-limoneno, un compuesto bioactivo volátil. Dada la naturaleza hidrofóbica del compuesto, los autores prepararon emulsiones de PVA/d-limoneno como estrategia para encapsular al compuesto

¹ La permutita es un compuesto sintético similar a la zeolita en composición y propiedades químicas.

en las fibras poliméricas. En el mejor caso lograron retener ~50% del compuesto activo en las fibras, el cual fue liberado al aire de forma paulatina en los primeros 15 días a temperatura ambiente.

Una estrategia usual para compatibilizar compuestos bioactivos hidrofóbicos o aceites esenciales con polímeros hidrofílicos como el PVA consiste en la utilización de ciclodextrinas. Estos compuestos son oligosacáridos cíclicos compuestos por 6-8 unidades de glucosa que presentan una forma de cono truncado. Su exterior es hidrofílico mientras que su interior es hidrofóbico, lo cual le permite encapsular compuestos de dicha naturaleza. Según la cantidad de monómeros las ciclodextrinas se nombran por una letra griega diferente, siendo α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina los compuestos de 6, 7 y 8 unidades, respectivamente. Una de las principales ventajas de utilizar ciclodextrinas como compatibilizantes es que son aptas para el consumo humano, siendo utilizadas frecuentemente en la industria de alimentos. Diversos autores han desarrollado mallados de electrohilado de PVA conteniendo ciclodextrinas y algún compuesto bioactivo hidrofóbico. Kayaci y col. (2012) encapsularon vanilina, un compuesto bioactivo volátil, en γ -ciclodextrina y posteriormente en mallados electrohilados de PVA. Esta estrategia les permitió mejorar la estabilidad del compuesto e incorporarlo en las fibras, ya que, sin la encapsulación previa, el compuesto se perdía durante el proceso de fabricación. En otro trabajo del mismo grupo de investigación, la misma estrategia fue utilizada para obtener mallados de PVA incorporando geraniol encapsulado en γ -ciclodextrina (Kayaci, Sen, Durgun, & Uyar, 2014). En este caso, la encapsulación previa permitió mejorar la estabilidad del geraniol e impidió la evaporación de cantidades significativas de dicho compuesto hasta por 2 años. En los citados trabajos, la formación de complejos de inclusión entre la ciclodextrina y el compuesto activo se realizó previamente al electrohilado, y luego las cápsulas obtenidas se adicionaron a la solución polimérica. Wen y col. (2016) encapsularon aceite esencial de canela con β -ciclodextrina en fibras de PVA. A diferencia de los trabajos citados previamente, Wen y col. propusieron la formación de complejos de inclusión directamente en la solución de electrohilado. Los mallados obtenidos consistieron en fibras homogéneas con diámetros de ~240 nm, y mostraron actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Estos mallados fueron utilizados para envolver frutillas, y se demostró que al ser envueltas por el material desarrollado se preserva su calidad hasta por 18 días a 4 °C. Feng y col. (2017) propusieron la incorporación de dos agentes antimicrobianos (aceite esencial de canela y lisozima de clara de huevo) en simultáneo dentro de mallados de PVA, y demostraron que este enfoque permite incrementar la actividad antimicrobiana contra las bacterias *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Para compatibilizar el aceite esencial con el polímero, los autores añadieron β -ciclodextrina a la formulación.

Los trabajos mencionados demuestran la versatilidad de los mallados electrohilados de PVA para encapsular diferentes tipos de compuestos bioactivos y lograr materiales para envases de alimentos activos. Tal como fue presentado, el PVA es un polímero soluble en agua y su procesamiento por

electrohilado se lleva a cabo en solución acuosa. Del mismo modo, los mallados obtenidos de PVA también son solubles en agua, y en general logran disolverse completamente en pocos segundos (Ribba, 2017). Esta característica limita la aplicación de este tipo de mallados como recubrimientos activos de alimentos húmedos, ya que el material se disolvería con el contacto. La incorporación de ácido cítrico en bajos porcentajes y la realización de un tratamiento térmico adecuado permite reducir la solubilidad de mallados de PVA hasta valores menores al ~2% (López-Córdoba, Castro, & Goyanes, 2016). Este fenómeno se fundamenta en la formación de enlaces éster entre los grupos hidroxilos del polímero y el ácido cítrico, lo cual puede conducir al entrecruzamiento de las cadenas de PVA, o simplemente a la esterificación de los grupos reduciendo así la solubilidad. En la Figura 1.2 se presenta la reacción de esterificación y entrecruzamiento propuesta para el sistema PVA con ácido cítrico. Al respecto, debe mencionarse que la esterificación puede ocurrir sin que haya entrecruzamiento de cadenas, por ejemplo, al formarse enlaces entre el ácido cítrico y una sola cadena polimérica. Además, en los casos en que no se incorpore ácido cítrico, la cristalinidad del PVA se incrementa por tratamientos térmicos, lo cual también puede llegar a insolubilizar el mallado (Ribba, 2017).

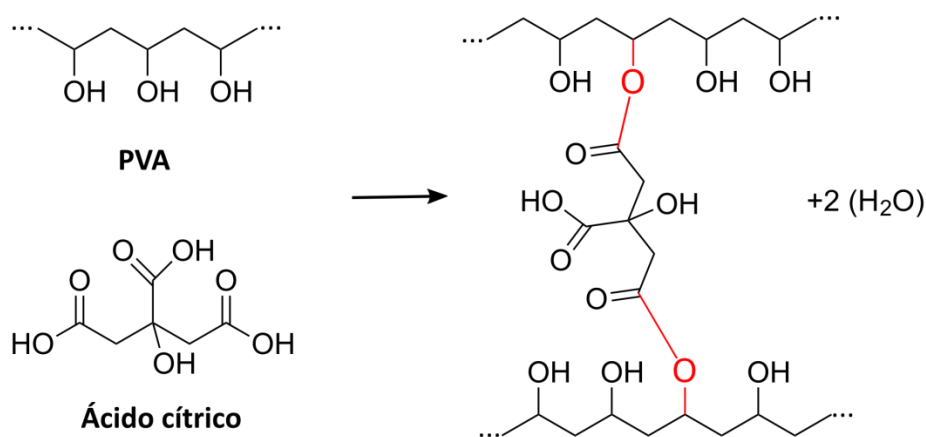


Figura 1.2. Reacción de entrecruzamiento de cadenas de PVA con ácido cítrico. Las líneas de color rojo resaltan los enlaces éster formados.

Se han publicado numerosas investigaciones sobre nanofibras de PVA electrohilado conteniendo compuestos bioactivos. Sin embargo, los antecedentes sobre incorporación de compuestos en nanofibras reticuladas de PVA son escasos. El entrecruzamiento de cadenas se presenta como una diferencia sustancial puesto que modifica la solubilidad del material y por ello también la liberación de los componentes activos. El desarrollo y estudio de mallados insolubles de PVA con propiedades antimicrobianas o antioxidantes resulta de interés para la obtención de envases de alimentos activos. Particularmente, los mallados compuestos por nanofibras de PVA insolubles en agua pueden estar en

contacto con alimentos húmedos y proveerles compuestos bioactivos para incrementar su vida útil. Finalmente, este tipo de sistemas podría aplicarse para el desarrollo de envases activos multicapas, donde la nanoestructura presentará características particulares para la liberación de compuestos activos.

1.3. Películas activas basadas en almidón

1.3.1. Conceptos preliminares

El almidón constituye una alternativa sumamente interesante para el desarrollo de envases por ser de bajo costo, alta disponibilidad y por ser biodegradable en diferentes ambientes, e incluso compostable. El almidón es producido de manera natural por diversas plantas, pudiéndose encontrar en tallos, semillas, granos y tubérculos. Industrialmente, se presenta como un polvo blanco, inodoro e insípido constituido por gránulos microscópicos con tamaños entre los 2 μm y los 100 μm , dependiendo de la fuente botánica (Jane, Kasemsuwan, Leas, Zobel, & Robyt, 1994). El gránulo de almidón presenta una estructura multi-escala que consiste en una serie de anillos concéntricos compuestos por bloques formados por lamelas amorfas y cristalinas que contienen las cadenas poliméricas. La Figura 1.3 presenta micrografías electrónicas de gránulos de almidón típicos (a) y un esquema de su estructura multi-escala (b). En general, el almidón presenta entre un 15% y 45% de material cristalino, dependiendo dicho porcentaje tanto de la fuente botánica como del nivel de hidratación de los gránulos (Buléon, Véronèse, & Putaux, 2007; Lopez-Rubio, Flanagan, Gilbert, & Gidley, 2008).

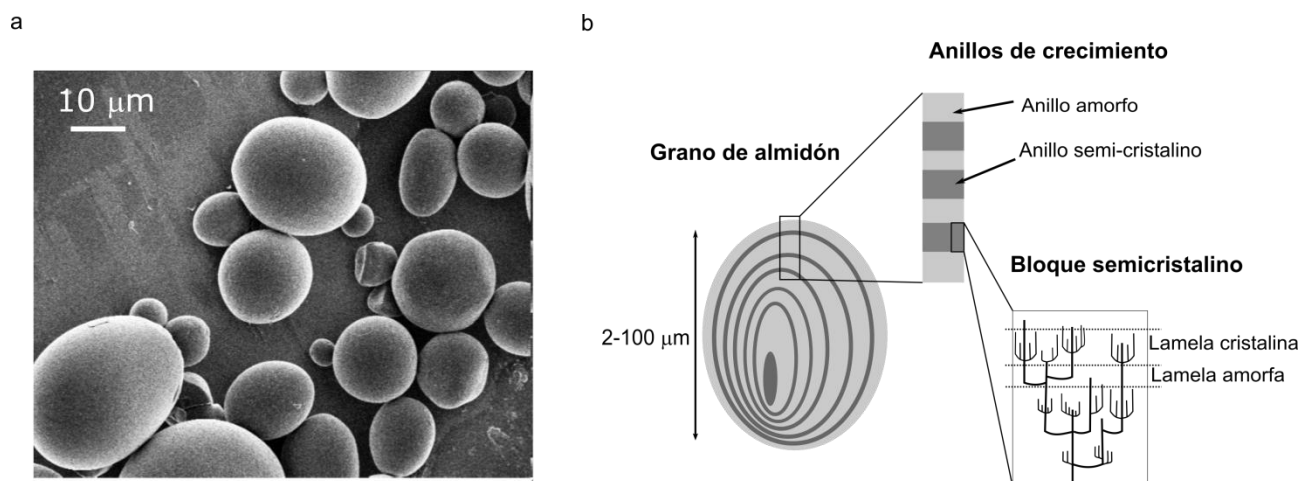


Figura 1.3. Micrografía SEM de granos de almidón típicos (a) y estructura multi-escala del grano de almidón (b).

Desde el punto de vista químico, el almidón consiste en dos polímeros llamados amilosa y amilopectina. Ambos polímeros se constituyen por la unión de moléculas D-glucosa a través de enlaces

glucosídicos. En particular, la amilosa es una macromolécula lineal donde las unidades se unen a partir de enlaces glucosídicos α -1,4, mientras que la amilopectina es una macromolécula ramificada y de mayor peso molecular, donde los segmentos de glucosa unidos con enlaces α -1,4 se conectan entre sí por enlaces glicosídicos α -1,6, los cuales ocurren cada 20-30 unidades de glucosa aproximadamente (Best, Jackson, & Naidoo, 2002). La Figura 1.4 presenta la estructura química de la amilosa (a) y de la amilopectina (b). Ambas moléculas difieren ampliamente en su peso molecular, siendo este del orden de 10^5 - 10^6 g/mol para la amilosa y del orden de 10^7 - 10^9 g/mol para la amilopectina (Hoover, 2001). Las diferentes características de estas dos moléculas les conceden diferentes propiedades. El mayor peso molecular, junto con la estructura ramificada, de la amilopectina reduce la movilidad de cadenas e inhibe su orientación y la formación de cantidades significativas de puentes de hidrógeno entre ellas. Por ello, la proporción entre amilosa y amilopectina es una característica fundamental del almidón, que varía de acuerdo a la fuente botánica y afecta la estructura del gránulo, transiciones de fase, cristalinidad, retrogradación y las propiedades reológicas de geles de almidón (H. Liu, Yu, Xie, & Chen, 2006). Los almidones de mandioca suelen tener un contenido de amilosa de ~17%, los de arroz de ~19%, los de papá de ~20%, y los de trigo de ~25% (González-Seligra, 2019). En el caso del maíz, se encuentran de forma natural variedades con diferentes proporciones de amilosa/amilopectina: los almidones de maíz regular suelen tener 20-30% de amilosa; los almidones de maíz ceroso (*waxy*) presentan <2% de amilosa; y los almidones de alta amilosa suelen presentar >40% de dicha macromolécula (Schirmer, Höchstätter, Jekle, Arendt, & Becker, 2013). En la actualidad, se utilizan diferentes tecnologías para obtener gránulos de almidón con contenido de amilosa y amilopectina deseados, lo cual incluye modificaciones genéticas y manipulación de la expresión de genes específicos (Morell & Myers, 2005).

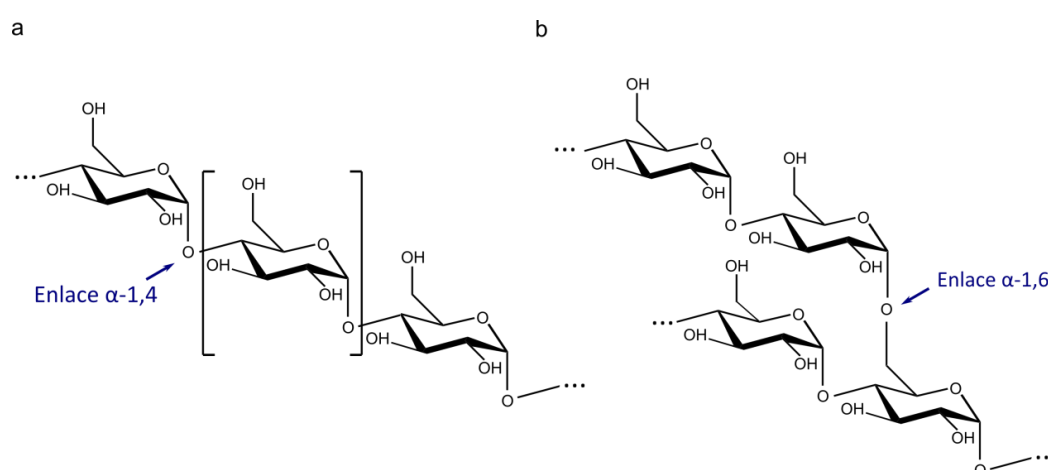


Figura 1.4. Estructura química de la amilosa (a) y de la amilopectina (b).

Una de las características del almidón es su capacidad para formar películas termoplásticas continuas, haciendo uso de plastificantes. Para ello, la estructura del gránulo debe ser transformada completamente. La *gelatinización* del almidón es una transición de fase en que la estructura granular del almidón es destruida y ocurre al calentar los gránulos de almidón en presencia de agua. Durante la gelatinización, los gránulos de almidón absorben agua y se hinchan, los cristalitos se funden y la estructura granular colapsa. Este proceso es irreversible y conduce a sistemas con estructuras diferentes a la de partida. En general, posterior a la gelatinización, las cadenas de amilosa y amilopectina se reorganizan y son capaces de formar estructuras cristalinas diferentes. Este último proceso, conocido como *retrogradación*, suele variar dependiendo tanto de las condiciones de procesamiento como de almacenamiento.

Existen dos metodologías típicas para obtener películas de almidón termoplástico (TPS): el método de evaporación de solvente y la extrusión, la cual suele complementarse con un posterior proceso de calandrado o termoprensado para formar las películas. A grandes rasgos, el primer método consiste en calentar una suspensión de gránulos de almidón en agua hasta alcanzar la temperatura de gelatinización, la cual que depende de la variedad botánica. Por ejemplo, para el almidón de mandioca es de aproximadamente 70 °C. Una vez obtenida la solución gelatinizada, esta se seca en estufa hasta obtener una película sólida. Esta metodología se caracteriza por ser simple y no requerir equipamientos sofisticados. Como contrapartida, los tiempos para producir películas son relativamente grandes, el proceso no es escalable y, además, se emplea una cantidad importante de agua como solvente. Sobre este último punto, suelen utilizarse suspensiones de 2-5% p/p de almidón en agua, con posibilidad de utilizar hasta 20% p/p. Por otra parte, la extrusión es un procesamiento que permite transformar los gránulos de almidón mediante una combinación de esfuerzos de corte, presión y temperatura. Las principales ventajas de la extrusión es que la transformación del almidón requiere considerablemente menos cantidad de agua (típicamente 10-20% p/p respecto al almidón), y es una técnica escalable que permite obtener almidón termoplástico de manera continua a nivel semi-industrial e industrial.

Como se ha expuesto, el almidón se distingue entre los polímeros biodegradables y biobasados por presentar de manera simultánea gran disponibilidad, bajo costo, capacidad para formar películas termoplásticas continuas con la adición de plastificantes, posibilidad de ser procesado por métodos industriales y por ser rápidamente biodegradable en compost. Sin embargo, las películas de almidón presentan desventajas que limitan su aplicación en el sector de envases. El mayor inconveniente es su carácter hidrofílico e higroscópico, lo cual hace que el material sea sensible al contacto con el agua y que sus propiedades varíen en función de la humedad ambiente. Además, las propiedades mecánicas suelen ser deficientes para dicha aplicación. Diferentes estrategias han sido propuestas en numerosas investigaciones destinadas a mejorar las propiedades de las películas de almidón, entre las que se

destacan las modificaciones químicas, la adición y mezcla de plastificantes, esterificantes, eterificantes, aceites, la mezcla con otros polímeros y la incorporación de micro- y nanopartículas (Jiang, Duan, Zhu, Liu, & Yu, 2020).

1.3.2. Incorporación de componentes activos en películas de almidón

Diversas investigaciones de los últimos años se han enfocado en estudiar los efectos de la incorporación de nanopartículas metálicas o de óxidos metálicos en películas de almidón. Generalmente, estas estrategias consiguen mejorar las propiedades mecánicas y de susceptibilidad al agua del sistema y, si las nanopartículas presentan actividad antimicrobiana, el material compuesto suele adquirir dicha propiedad. Por ejemplo, Abreu y col. (2015) incorporaron nanopartículas de plata en películas de almidón de trigo fabricadas por evaporación de solvente. Los materiales obtenidos presentaron menor hidrofiliidad y actividad bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Por su parte, Ortega y col. (2017) demostraron que la incorporación de nanopartículas de plata en películas de almidón de maíz disminuye la solubilidad del material y mejora las propiedades mecánicas al incrementar los valores de módulo de Young y tensión de rotura sin disminuir la deformación a rotura del material. Efectos similares han sido reportados por Malathi y col. (2019) al incorporar nanopartículas de TiO_2 en películas de almidón de arroz. En este caso, el material obtenido que incorpora nanopartículas presenta mejor barrera al vapor de agua, mejores propiedades mecánicas (tensión de rotura y deformación a rotura) y actividad bacteriostática contra *Escherichia coli*. La incorporación de nanopartículas de ZnO también resulta ser una estrategia interesante para mejorar las propiedades y añadirles actividad bactericida a las películas de almidón. Al respecto, Mirjalili y col. (2017) desarrollaron películas basadas en almidón que contienen nanopartículas de ZnO y que presentan mejores propiedades mecánicas y además actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, Nafchi y col. (2012; 2013) demostraron que la incorporación de nanobarras de ZnO permite disminuir la hidrofiliidad, mejorar las propiedades mecánicas y otorgar actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* a películas de almidón de sago. Guz y col. (2017) estudiaron cómo las propiedades de películas de almidón conteniendo nanobarras de ZnO pueden variar de acuerdo al tamaño de las nanobarras incorporadas.

Para la obtención de películas basadas en almidón con actividad antioxidante, diversos autores han propuesto la incorporación de extractos naturales, aceites esenciales o compuestos bioactivos. Este enfoque permite lograr materiales antioxidantes y a la vez modificar ciertas propiedades, siendo usual la disminución en la susceptibilidad al agua de las películas de almidón o cambios en la respuesta mecánica del material. Por ejemplo, Perazzo y col. (2014) desarrollaron películas de almidón de mandioca conteniendo extracto de té y aceite de palma, las cuales permitieron disminuir la oxidación en mantecas. Adicionalmente, estos materiales presentaron menor tensión de rotura y menor

permeabilidad al vapor de agua respecto al material control. De Araújo y col. (2015) incorporaron un extracto etanólico de propóleo en películas de almidón de mandioca, obteniendo un material con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. El extracto de propóleo actuó como plastificante de la matriz de almidón, disminuyendo el módulo de Young del material. Piñeros-Hernandez y col. (2017) incorporaron un extracto acuoso de romero en películas de almidón de mandioca. El material obtenido presentó propiedades antioxidantes, no se vio afectada su biodegradabilidad por la presencia del extracto y las propiedades mecánicas resultaron diferentes (mayor módulo de Young y menor deformación a rotura). Por su parte, Talón y col. (2019) incorporaron cápsulas de eugenol y proteína de suero de leche en películas de almidón de maíz y obtuvieron un material antioxidante, con mejores propiedades mecánicas (mayor módulo de Young, tensión de rotura y deformación a rotura), mayor barrera al oxígeno y menor afinidad al agua.

La citada bibliografía representa solo algunos ejemplos de la vasta bibliografía sobre los efectos de la incorporación de nanopartículas y de compuestos naturales en películas de almidón termoplástico. En general, ambas estrategias consiguen otorgarle actividad específica al material (antioxidante y/o antimicrobiana) y mejorar propiedades del material que son de interés para el desarrollo de envases alimenticios (propiedades mecánicas, barrera, susceptibilidad al agua). Si bien se han estudiado numerosos sistemas de estas características, la literatura disponible se refiere mayoritariamente a materiales fabricados con la metodología de evaporación de solvente, la cual es de difícil escalado. El desarrollo de materiales nanocompuestos biodegradables mediante tecnologías escalables es una necesidad para la implementación en escala industrial de dichos sistemas. En este contexto, la extrusión permite transformar al almidón, mezclarlo con diversos componentes y formar películas termoplásticas en un proceso continuo y escalable. Las películas de almidón obtenidas por extrusión en general difieren en sus propiedades de aquellas obtenidas por la técnica de evaporación de solvente. Además, para el desarrollo de películas conteniendo nanopartículas o moléculas bioactivas se requiere estudiar los efectos de la extrusión sobre dichos aditivos. Al respecto, es menester analizar el mezclado de los componentes dentro de la matriz, las interacciones resultantes y sus consecuencias, y la posible degradación de los aditivos durante el proceso de fabricación.

1.4. Películas bicapa biodegradables y activas

La formación de sistemas multicapas permite combinar propiedades de diferentes materiales con el objetivo de alcanzar los requerimientos de un envase de alimentos. Estos requerimientos incluyen, en primer lugar, la capacidad del envase de contener al producto y aislarlo del entorno y, en segundo lugar, la capacidad de producir dichos envases a gran escala y a bajo costo, puesto que los alimentos se producen y se empaquetan en máquinas automatizadas de gran velocidad. La tecnología de extrusión del

almidón permite obtener películas termoplásticas biodegradables en un proceso escalable industrialmente. Por otro lado, la tecnología de electrohilado también es escalable a nivel industrial y constituye una alternativa para la generación de sistemas multicapas activos y biodegradables.

Algunos autores han propuesto sistemas multicapas activos basados en polímeros biodegradables. Fabra y col. (2016) propusieron realizar el proceso de electrohilado directamente sobre una película biodegradable, de forma de obtener estructuras bicapa. En este caso, utilizaron películas continuas de gluten de trigo y les añadieron por electrohilado fibras de zeína incorporando α -tocoferol con actividad antioxidante. La película bicapa que obtuvieron presentó mejor barrera al vapor de agua respecto a la película de una capa y la encapsulación del antioxidante le permitió estabilizarlo y preservarlo durante un proceso de esterilización industrial. Castro Mayorga y col. (2018) desarrollaron estructuras bicapa consistentes en una película continua de PHBV² y un mallado electrohilado de PHBV¹⁸ conteniendo nanopartículas de óxido de cobre. En primer lugar, los autores reportan una pérdida de transparencia de la película al incorporarle las fibras de electrohilado sobre su superficie. Además, la estructura de nanofibras permitió incrementar la actividad bacteriostática de las nanopartículas de CuO como consecuencia de su mejor dispersión. Bharathi y col. (2020) estudiaron un sistema bicapa compuesto por una película continua de quitosano y nanofibras electrohiladas de zeína. En este caso, las nanofibras de zeína presentaron mayor actividad antioxidante respecto a películas continuas del mismo polímero, lo cual permitió al sistema bicapa prevenir la oxidación de rodajas de manzana. Arrieta y col. (2019) desarrollaron un material bicapa basado en una película continua de PHBV y fibras electrohiladas de una mezcla de PHB y PLA³ conteniendo catequina. Los autores demostraron que, en esta estructura, la capa continua provee resistencia mecánica mientras que la capa de nanofibras provee actividad antioxidante a alimentos grasos. Quiles-Carrillo y col. (2019) estudiaron sistemas multicapa basados en películas continuas de PLA obtenidas por extrusión y mallados de electrohilado de PLA conteniendo ácido gálico. En este caso, las fibras de electrohilado fueron dispuestas entre dos películas continuas, lo cual permitió que la liberación del principio activo sea sostenida en el tiempo cuando el sistema multicapas fue inmerso en un medio salino.

De acuerdo a la literatura disponible, la formación de sistemas bicapa o multicapa conteniendo fibras electrohiladas permite mejorar diversas propiedades de los materiales y obtener características distintivas. Sin embargo, no hay antecedentes de la formación de sistemas bicapa partiendo de almidón termoplástico obtenido por una metodología escalable, como lo es la extrusión. Además, tampoco hay antecedentes de sistemas bicapa donde cada capa contenga un agente activo específico y, por lo tanto, otorgue una funcionalidad distintiva. El desarrollo de sistemas bicapa biodegradables y con propiedades

² PHBVX: poli (3-hidroxibutirato-co-X% mol- 3-hidroxivalerato)

³ Poliláctico

activas se presenta como una opción prometedora para desarrollar materiales de envases de alimentos. De esta forma, surge el interés en generar conocimiento que permita comprender tanto las características fisicoquímicas de cada capa por separado como el funcionamiento del sistema multicapa, considerando las interacciones entre las partes y la posible migración cruzada de compuestos activos.

1.5. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de tesis es la producción de nuevos conocimientos respecto a materiales poliméricos biodegradables con propiedades activas y fabricados por tecnologías escalables. En particular, se desarrollarán y estudiarán sistemas de nanofibras de PVA reticuladas con ácido cítrico obtenidas por electrohilado, películas nanocompuestas de base almidón obtenidas por extrusión seguida de calandrado o termoprensado y un sistema bicapa partiendo de una película nanocompuesta de almidón y un mallado de PVA.

Los objetivos específicos del trabajo de tesis son:

1. Desarrollar mallados por electrohilado de PVA entrecruzado conteniendo principios activos antimicrobianos o antioxidantes, empleando como modelos un compuesto bioactivo antimicrobiano (d-limoneno) y un extracto antioxidante rico en polifenoles (extracto de romero). Se pretende comprender las características fisicoquímicas resultantes y el efecto de la incorporación de cada componente en el material. Asimismo, se busca determinar la eficiencia de la encapsulación de los compuestos activos y la actividad específica de cada material con vistas a una posible aplicación como recubrimientos de alimentos.
2. Obtención por extrusión seguida de calandrado y/o termoprensado de películas nanocompuestas base almidón conteniendo principios activos, empleando como modelos un extracto bifásico (solución conteniendo nanopartículas) rico en polifenoles (agente antioxidante) y nanobarras de óxido de cinc (agente antimicrobiano). Se buscará comprender el efecto de cada uno de los nanocomponentes sobre las propiedades fisicoquímicas de los materiales obtenidos. Se evaluará la posible degradación de los nanocomponentes luego del proceso de extrusión y su actividad específica en los nanocompuestos obtenidos.
3. Obtención de sistemas bicapa con propiedades específicas en cada capa y basados en los materiales desarrollados previamente. Se empleará como modelo un sistema consistente en una capa continua de nanocompuesto antimicrobiano de almidón y una capa antioxidante de nanofibras basadas en PVA. Se pretende determinar las propiedades del sistema bicapa, las interacciones entre las partes y la posible migración entre capas de los compuestos activos.

1.6. Referencias

- Abreu, A. S., Oliveira, M., de Sá, A., Rodrigues, R. M., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., & Machado, A. V. (2015). Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. *Carbohydrate Polymers*, 129, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.021>.
- Arrieta, M P, de Dicastillo, C. L., Garrido, L., Roa, K., & Galotto, M. J. (2018). Electrospun PVA fibers loaded with antioxidant fillers extracted from *Durvillaea antarctica* algae and their effect on plasticized PLA bionanocomposites. *European Polymer Journal*, 103, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.04.012>.
- Arrieta, Marina P, Díez García, A., López, D., Fiori, S., & Peponi, L. (2019). Antioxidant Bilayers Based on PHBV and Plasticized Electrospun PLA-PHB Fibers Encapsulating Catechin. *Nanomaterials*, 9(3), 346. <https://doi.org/10.3390/nano9030346>.
- Best, R. B., Jackson, G. E., & Naidoo, K. J. (2002). Modeling the α (1 \rightarrow 6) branch point of amylopectin in solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(19), 5091–5098. <https://doi.org/10.1021/jp013753w>.
- Bharathi, S. K. V, Leena, M. M., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Nanofibre-based bilayer biopolymer films: enhancement of antioxidant activity and potential for food packaging application. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(4), 1477–1484. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14492>.
- Buléon, A., Véronèse, G., & Putaux, J.-L. (2007). Self-association and crystallization of amylose. *Australian Journal of Chemistry*, 60(10), 706–718. <https://doi.org/10.1071/CH07168>.
- Bunn, C. W. (1948). Crystal structure of polyvinyl alcohol. *Nature*, 161(4102), 929–930. <https://doi.org/10.1038/161929a0>.
- Camerlo, A., Vebert-Nardin, C., Rossi, R. M., & Popa, A.-M. (2013). Fragrance encapsulation in polymeric matrices by emulsion electrospinning. *European Polymer Journal*, 49(12), 3806–3813. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.08.028>.
- Castro Mayorga, J. L., Fabra Rovira, M. J., Cabedo Mas, L., Sánchez Moragas, G., & Lagaron Cabello, J. M. (2018). Antimicrobial nanocomposites and electrospun coatings based on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and copper oxide nanoparticles for active packaging and coating applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(2), 45673. <https://doi.org/10.1002/app.45673>.
- de Araújo, G. K. P., de Souza, S. J., da Silva, M. V, Yamashita, F., Gonçalves, O. H., Leimann, F. V, & Shirai, M. A. (2015). Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2080–2087. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12869>.

- DeMerlis, C. C., & Schoneker, D. R. (2003). Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, 41(3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00258-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00258-2).
- de Souza Machado, A. A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., & Rillig, M. C. (2018). Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global Change Biology*, 24(4), 1405–1416. <https://doi.org/10.1111/gcb.14020>.
- Dixon, J. (2011). *Packaging materials: Multilayer packaging for food and beverages*. Bruselas, Bélgica: ILSI Europe.
- Fabra, M. J., López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2016). Use of the electrohydrodynamic process to develop active/bioactive bilayer films for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 55, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.10.026>.
- Feng, K., Wen, P., Yang, H., Li, N., Lou, W. Y., Zong, M. H., & Wu, H. (2017). Enhancement of the antimicrobial activity of cinnamon essential oil-loaded electrospun nanofilm by the incorporation of lysozyme. *RSC Advances*, 7(3), 1572–1580. <https://doi.org/10.1039/C6RA25977D>.
- Galloway, T. S., Cole, M., & Lewis, C. (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution*, 1(5), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116>.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- González-Seligra, P. (2019). *Nanocompuestos de base almidón con aplicaciones en envases biodegradables*. Universidad de Buenos Aires.
- Guz, L., Famá, L., Candal, R., & Goyanes, S. (2017). Size effect of ZnO nanorods on physicochemical properties of plasticized starch composites. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1611–1619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.041>.
- Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, 45(3), 253–267. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00260-5).
- Jane, J., Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H., & Robyt, J. F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch-Stärke*, 46(4), 121–129. <https://doi.org/10.1002/star.19940460402>.
- Jiang, T., Duan, Q., Zhu, J., Liu, H., & Yu, L. (2020). Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.003>.

-
- Kayaci, F., Sen, H. S., Durgun, E., & Uyar, T. (2014). Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol–cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol. *Food Research International*, 62, 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.033>.
 - Kayaci, F., & Uyar, T. (2012). Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanoweb: prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chemistry*, 133(3), 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.040>.
 - Lebreton, L., & Andrady, A. (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Communications*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0212-7>.
 - Liu, H., Yu, L., Xie, F., & Chen, L. (2006). Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.026>.
 - López-Córdoba, A., Castro, G. R., & Goyanes, S. (2016). A simple green route to obtain poly (vinyl alcohol) electrospun mats with improved water stability for use as potential carriers of drugs. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 726–732. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.058>.
 - Lopez-Rubio, A., Flanagan, B. M., Gilbert, E. P., & Gidley, M. J. (2008). A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 89(9), 761–768. <https://doi.org/10.1002/bip.21005>.
 - Malathi, A. N., & Singh, A. K. (2019). Antimicrobial activity of rice starch based film reinforced with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Agricultural research journal*, 56(1), 111–117. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2019.00017.6>.
 - Mihindukulasuriya, S. D. F., & Lim, L.-T. (2014). Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 40(2), 149–167. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.009>.
 - Ministerio de Hacienda. (2019). Informes de cadenas de valor: Petroquímica-plástica. In Ministerio de Hacienda, Presidencia de la Nación Argentina. Retrieved from https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_petroquimica_plastica_1.pdf
 - Mirjalili, F., & Yassini Ardekani, A. (2017). Preparation and characterization of starch film accompanied with ZnO nanoparticles. *Journal of Food Process Engineering*, 40(6), e12561. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12561>.
 - Morell, M. K., & Myers, A. M. (2005). Towards the rational design of cereal starches. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.009>.

- Nafchi, A. M., Mahmud, S., & Robal, M. (2012). Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.017>.
- Nafchi, A. M., Nassiri, R., Sheibani, S., Ariffin, F., & Karim, A. A. (2013). Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.055>.
- Ortega, F., Giannuzzi, L., Arce, V. B., & García, M. A. (2017). Active composite starch films containing green synthesized silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 70, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.036>.
- Perazzo, K. K. N. C. L., de Vasconcelos Conceição, A. C., dos Santos, J. C. P., de Jesus Assis, D., Souza, C. O., & Druzian, J. I. (2014). Properties and antioxidant action of actives cassava starch films incorporated with green tea and palm oil extracts. *PLoS One*, 9(9), e105199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105199>.
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., & Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>.
- Quiles-Carrillo, L., Montanes, N., Lagaron, J. M., Balart, R., & Torres-Giner, S. (2019). Bioactive multilayer polylactide films with controlled release capacity of gallic acid accomplished by incorporating electrospun nanostructured coatings and interlayers. *Applied Sciences*, 9(3), 533. <https://doi.org/10.3390/app9030533>.
- Ribba, L. (2017). *Nanoestructuras biodegradables obtenidas mediante técnicas de electroestirado*. Universidad de Buenos Aires.
- Schirmer, M., Höchstötter, A., Jekle, M., Arendt, E., & Becker, T. (2013). Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.032>.
- Shao, P., Yan, Z., Chen, H., & Xiao, J. (2018). Electrospun poly (vinyl alcohol)/permutite fibrous film loaded with cinnamaldehyde for active food packaging. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(16), 46117. <https://doi.org/10.1002/app.46117>.
- Talón, E., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2019). Antioxidant starch-based films with encapsulated eugenol. Application to sunflower oil preservation. *Lwt*, 113, 108290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108290>.
- US Food and Drug Administration. (2017). FDA cite: 21CFR176.170.

- Wen, P., Zhu, D.-H., Wu, H., Zong, M.-H., Jing, Y.-R., & Han, S.-Y. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*, 59, 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.005>.
- Wen, P., Wen, Y., Zong, M.-H., Linhardt, R. J., & Wu, H. (2017). Encapsulation of bioactive compound in electrospun fibers and its potential application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(42), 9161–9179. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02956>.

Metodología

Resumen

En primer lugar, se presentan las metodologías utilizadas para la preparación de un extracto antioxidante de romero y para la síntesis de nanobarras de ZnO. Luego, se describe la técnica de electrohilado, la cual fue utilizada para obtener mallados de nanofibras de PVA conteniendo dos tipos de principio activo diferente (d-limoneno o extracto de romero), y la técnica de extrusión, utilizada para obtener películas continuas de almidón incorporando extracto de romero o nanobarras de ZnO. Por último, se especifican los equipos y protocolos utilizados para estudiar las características de los principios activos y de los materiales desarrollados. Con el fin de facilitar la lectura, aquí se presentan las metodologías generales, y se reservan los detalles particulares de los procesos aplicados para cada material para cada uno de los capítulos correspondientes.

2.1. Preparación de extractos naturales

Los extractos obtenidos de hierbas y especias constituyen fuentes importantes de compuestos antioxidantes y suelen ser seguros para el consumo humano y, por ello, constituyen una alternativa interesante para aplicación en envases activos. En particular, los extractos naturales ricos en polifenoles pueden ser utilizados en el desarrollo de envases antioxidantes, debido a que los grupos fenoles son capaces de captar radicales libres o de prevenir su generación a partir de hidroperóxidos.

La extracción de compuestos activos a partir de partes de plantas puede realizarse por diferentes técnicas, entre las que se destacan la extracción con solvente, destilación, prensado, extracción asistida por ultrasonido y extracción con fluidos supercríticos. La extracción con solvente es una metodología simple y que requiere poco equipamiento, siendo así una de las más extendidas (Zhang, Lin, & Ye, 2018). Este proceso consiste en sumergir las hierbas o especias en un determinado solvente y filtrar la mezcla luego de cierto tiempo para obtener el extracto líquido. El mecanismo de extracción se fundamenta en los siguientes pasos: i) el solvente penetra en el producto sólido; ii) los componentes afines (solutos) son

disueltos en el solvente; iii) los solutos difunden fuera de la matriz sólida; iv) luego del filtrado, los compuestos extraídos permanecen en la solución. En una extracción con solvente, los factores que modifican la solubilidad o la difusión de los compuestos afectan la eficiencia de la extracción. Por ello, los parámetros más relevantes a considerar son el solvente utilizado, el tamaño de las hojas o tallos, la temperatura, el tiempo y la relación entre sólidos y solvente.

Las nanopartículas derivadas a partir de extractos naturales constituyen una herramienta de interés para la conformación de envases activos, puesto que añaden funcionalidad al material a la vez que lo refuerzan. La metodología de desplazamiento de solvente consiste en incorporar la solución con los solutos (extracto) en un solvente diferente donde dichos solutos son menos solubles (anti-solvente). De esta forma, se induce una sobresaturación que deriva en la nucleación y posterior crecimiento de partículas. Las condiciones de sobresaturación influyen en el tamaño, cristalinidad y la morfología de las partículas obtenidas, siendo relevante la concentración de solutos y la relación entre solvente y anti-solvente, así como también la velocidad en que se produce la mezcla (Joye & McClements, 2013).

Durante la tesis, se preparó un extracto antioxidante a partir de hojas de romero. Para ello, se empleó un proceso de extracción con solvente utilizando una solución hidroalcohólica y hojas de romero molidas en mortero. Posteriormente, dicho extracto se incorporó en la solución polimérica (acuosa) utilizada para fabricar mallados de nanofibras de PVA (Capítulo 4), lo cual condujo a la formación de partículas por el fenómeno de desplazamiento de solvente. Por otra parte, el extracto fue secado y se incorporó en la solución de plastificantes utilizada para fabricar películas continuas basadas en almidón (Capítulo 5). En este segundo caso también se produjeron nanopartículas de romero. Los detalles experimentales de la preparación del extracto se presentan en los capítulos correspondientes.

2.2. Síntesis de nanobarras de ZnO

El óxido de cinc (ZnO) es un material semiconductor con propiedades antimicrobianas y constituye una alternativa apropiada para ser utilizada como componente activo en envases antimicrobianos por ser considerado seguro para dicha aplicación (límite de migración específico de 25 mg Zn/kg de alimento). Permite ser sintetizado en diferentes formas de tamaños nanométricos, tales como partículas, platos, cintas, flores o barras (Djurišić & Leung, 2006). Entre las diferentes estructuras, las nanobarras de ZnO se destacan como refuerzo de materiales para envases activos debido a su excelente desempeño mecánico y a su acentuada actividad antimicrobiana (Nafchi et al., 2013).

Las nanobarras de ZnO pueden prepararse por diferentes métodos, pudiendo ser basados en transporte de fase gaseosa o basados en reacciones químicas en solución (Yi, Wang, & Park, 2005). En general, los procesos llevados a cabo en solución presentan ventajas respecto a los métodos gaseosos en cuanto a costos, simplicidad, eficiencia y a consumo energético (Yi et al., 2005). Además, bajo las

condiciones adecuadas, es posible conseguir una buena homogeneidad y una tasa de crecimiento cristalino alta, lo cual facilitaría su producción a gran escala.

El crecimiento hidrotermal en solución acuosa constituye una metodología ampliamente utilizada en la literatura para la obtención de nanobarras de ZnO. Este método utiliza una solución acuosa de nitrato de cinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) conteniendo hexametilentetramina (HMTA). Durante la síntesis, el HMTA se hidroliza en agua y produce gradualmente HCHO y NH_3 . La hidrólisis lenta del HMTA es un aspecto fundamental de la síntesis. Si la hidrólisis fuera rápida, se produciría un cambio brusco del pH que conllevaría la precipitación de iones Zn^{2+} y un consumo rápido de Zn(II), lo cual inhibiría el crecimiento orientado de cristales. Por su parte, la presencia de NH_3 produce un ambiente básico necesario para la formación de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ y estabiliza el Zn^{2+} (Sánchez Rodas, 2015).

Finalmente, para el crecimiento hidrotermal de nanobarras de ZnO es usual incorporar semillas de ZnO en la solución con el objetivo de mejorar la morfología y la orientación de las barras (Greene et al., 2005). Dichas semillas se sintetizan a través de un proceso sol-gel en solución no acuosa. El proceso sol-gel es un método simple, de bajo costo y buena reproducibilidad (Vafaei & Ghamsari, 2007). A grandes rasgos, consiste en la conversión de una solución precursora en una suspensión coloidal por medio de reacciones químicas en fase homogénea. La síntesis de semillas de ZnO por sol-gel se realiza partiendo de una solución no acuosa de acetato de cinc como precursor. Al calentar dicha solución en presencia del agua de hidratación de la sal, el acetato de cinc se hidroliza y forma iones acetato e iones cinc. Posteriormente, los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) presentes en la solución se unen a los iones Zn(II) y forman el óxido de cinc (Hasnidawani et al., 2016). La concentración de grupos hidroxilo en solución determina el tamaño de las nanopartículas obtenidas y, en general, se ajusta incorporando una base en solución (típicamente NaOH o KOH) (Dejene et al., 2011).

En el desarrollo de la tesis se prepararon nanobarras de ZnO por el método de crecimiento hidrotermal partiendo de semillas (nanopartículas) obtenidas por sol-gel. Para la síntesis de las semillas se utilizó una solución de acetato de cinc en metanol, mientras que para el crecimiento de las nanobarras se incorporaron dichas semillas a una solución acuosa de nitrato de cinc y hexametilentetramina. Las nanobarras obtenidas fueron posteriormente incorporadas a películas continuas de almidón (Capítulo 5). Los detalles experimentales sobre la síntesis de nanopartículas y nanobarras se presentan en el capítulo correspondiente.

2.3. Fabricación de mallados de nanofibras por electrohilado

La técnica de electrohilado (*electrospinning*) permite fabricar fibras continuas con diámetros nano- o micro-métricos a partir de una solución polimérica o de un polímero fundido. Esta metodología fue patentada por primera vez por Anton Formhals en Estados Unidos en el año 1934 (Anton, 1934). Sin

embargo, recién a partir de la década de 1990 con los trabajos de Darrell Reneker comienza a adquirir interés académico y tecnológico (Reneker & Chun, 1996). Es una técnica sumamente versátil que puede emplearse para diferentes polímeros naturales o sintéticos y materiales compuestos, con componentes orgánicos e inorgánicos. El electrohilado permite manipular la morfología y diámetro de las fibras de manera sencilla y eficiente, y es utilizado para desarrollo de materiales en una amplia cantidad de áreas, desde biotecnología, bioingeniería, sensores, filtros, saneamiento ambiental, entre otras (Huang, Zhang, Kotaki, & Ramakrishna, 2003). Además, la técnica es escalable y, en la actualidad, se encuentran disponibles equipos comerciales de distintas empresas.

El proceso de electrohilado presenta tres elementos básicos: una aguja por la cual se expulsa la solución polimérica, un colector separado por una cierta distancia de la aguja y un campo eléctrico generado a partir de una diferencia de potencial entre la aguja y el colector. La Figura 2.1a presenta un esquema del proceso de electrohilado. A medida que se expulsa la solución polimérica, se forma una gota en la punta de la aguja y se inducen cargas eléctricas sobre ella. Si el campo eléctrico es lo suficientemente intenso, la gota se deforma en dirección del campo y adquiere la forma de un cono, denominado *cono de Taylor*. Para un valor crítico de potencial, desde la punta del cono nace un *jet* con dirección al colector, el cual inicialmente se estira y disminuye su diámetro a medida que se aleja de la punta de la aguja (flujo Ohmico). En una segunda etapa, el solvente comienza a evaporar y el *jet* sufre una serie de inestabilidades que conducen a que se doble y comience a formar anillos de radio creciente (flujo convectivo) (Shin, Hohman, Brenner, & Rutledge, 2001). Durante este proceso, el diámetro del *jet* se reduce drásticamente. Como resultado del proceso de electrohilado, las fibras son depositadas unas sobre otras en el colector, formando un material poroso denominado mallado (o estera) electrohilado. La Figura 2.1b presenta una fotografía de microscopía electrónica de barrido de un mallado típico de PVA obtenido por electrohilado.

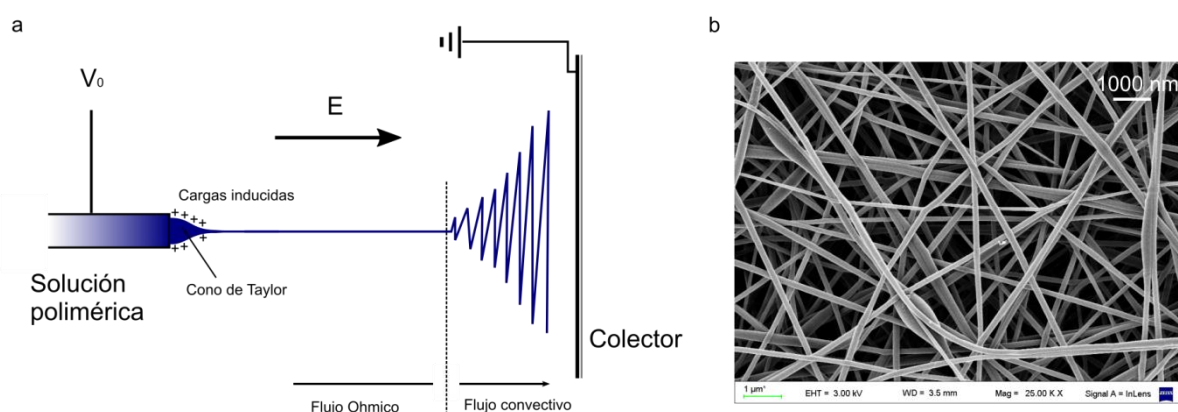


Figura 2.1. (a) Esquema general del proceso de electrohilado y (b) micrografía electrónica de barrido de un mallado electrohilado típico de PVA.

La morfología del material obtenido depende tanto de los parámetros del proceso como de los parámetros de la solución polimérica. Dentro de los parámetros del proceso se encuentran el potencial aplicado, las condiciones ambientales y la distancia aguja-colector. Estos afectan la intensidad del campo eléctrico y el proceso de evaporación del solvente. Del otro lado, los parámetros de la solución, como la concentración de polímero y su peso molecular, modifican las fuerzas electrostática (al modificar la conductividad de la solución) y de cohesión molecular (Huang et al., 2003).

La Figura 2.2 presenta una fotografía del equipo de electrohilado utilizado (a) y el detalle del interior de la caja aislante (b). El equipo consta de un inyector múltiple con 6 agujas (diámetro interno de 0,8 mm) enfrenteado a un colector cilíndrico rotante de 6 cm de diámetro y 20 cm de longitud. El inyector se encuentra sobre un soporte móvil y en contacto con una varilla metálica conectada a una fuente de alto voltaje (voltaje máximo de 50 kV). El colector se conecta a tierra a través de la fuente. El sistema agujas-colector se encuentra aislado por una caja acrílica transparente. La velocidad de rotación del colector y la velocidad de traslación del soporte de las agujas se regulan por controladores ubicados fuera de la caja. El inyector múltiple es alimentado mediante una manguera de poliamida conectada a una jeringa plástica en el exterior que contiene la solución polimérica. La velocidad de alimentación es controlada colocando la jeringa en una bomba de inyección (Apema PC11U). El equipo de electrohilado fue previamente desarrollado en el Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos (Ribba, 2017).

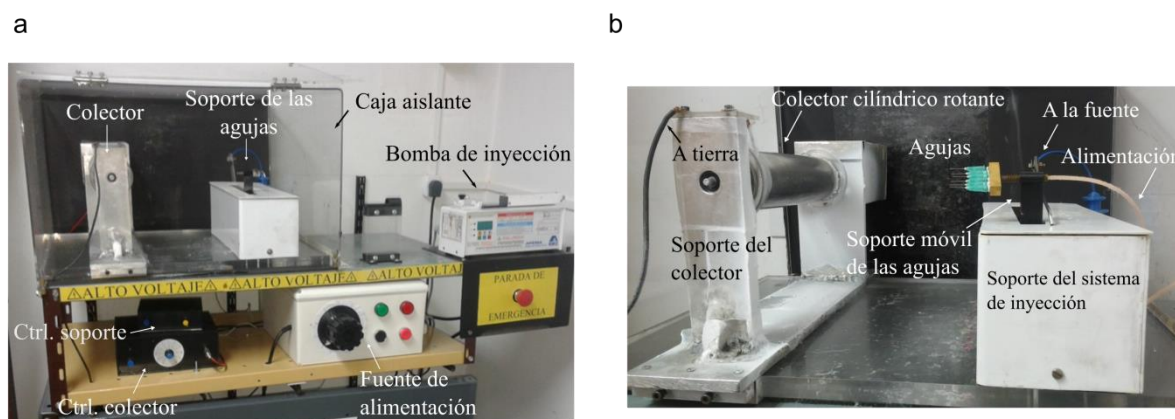


Figura 2.2. (a) Fotografía del equipo de electrohilado utilizado a lo largo de esta tesis y (b) detalle del interior de la caja aislante.

Para la fabricación de todos los mallados de electrohilado se utilizó poli(alcohol vinílico) Mowiol 10-98 (Mw = 61000 g/mol, Sigma Aldrich, Alemania), ácido cítrico anhidro (Stanton, Argentina) como

agente entrecruzante y agua destilada como solvente. Los detalles de los principios activos utilizados para cada material se incluyen en cada capítulo.

Los parámetros del proceso de electrohilado se mantuvieron constantes en todos los experimentos. La velocidad de alimentación fue 2,2 mL/h, la distancia colector-agujas fue 20 cm, el voltaje aplicado fue 30 kV y la velocidad del colector fue ~400 rpm. Estos parámetros fueron determinados en trabajos previos de otros integrantes del Laboratorio para optimizar la obtención de fibras de PVA partiendo de una solución 12% (p/p) en agua destilada e incorporando 5% (p/p, respecto al PVA) de ácido cítrico (Ribba, 2017). Se utilizó la misma solución de partida como control, y para obtener los mallados electrohilados activos se incorporaron los distintos compuestos sin modificar la proporción entre PVA y agua. En primer lugar, se fabricaron mallados de electrohilado de PVA conteniendo d-limoneno y/o β -ciclodextrina, ambos compuestos adquiridos comercialmente (Capítulo 3). En segundo lugar, se fabricaron mallados de PVA conteniendo un extracto de romero preparado a partir de hojas de romero (Capítulo 4). Los detalles de preparación de cada solución/dispersión de electrohilado se especifican en los capítulos correspondientes.

2.4. Fabricación de películas continuas por extrusión y termoprensado

La técnica de extrusión comprende la operación de fundir, formar y moldear un material. Para ello, el material es arrastrado por un tornillo dentro de una cavidad calefaccionada y forzado a atravesar una boquilla con una forma determinada. La tecnología de extrusión constituye un proceso simple, escalable y sustentable utilizado en diferentes aplicaciones, que incluyen procesamiento de materiales termoplásticos, producción y texturización de alimentos, compresión de materiales particulados, mezclado de fluidos viscosos, reacciones químicas (extrusión reactiva), entre otros (Bouvier & Campanella, 2014).

La Figura 2.3 presenta un esquema de una extrusora típica, como la utilizada a lo largo de esta tesis. El proceso de extrusión se inicia con la alimentación mediante una tolva. El material que ingresa es transportado por un tornillo a lo largo de una cavidad delimitada por una camisa. La camisa es calefaccionada por varios calentadores con controladores de temperatura independientes, logrando un perfil de temperaturas determinado. Tanto el perfil de temperaturas como la velocidad de rotación del tornillo son parámetros que se mantienen constantes durante el proceso. Al ser arrastrado por la extrusora, el material se mezcla y se comprime, a la vez que absorbe energía térmica desde la camisa y es sometido a esfuerzos de corte por el filete del tornillo. Finalmente, el material es eyectado por una boquilla, que sirve de molde y le otorga la forma final al material extrudido.

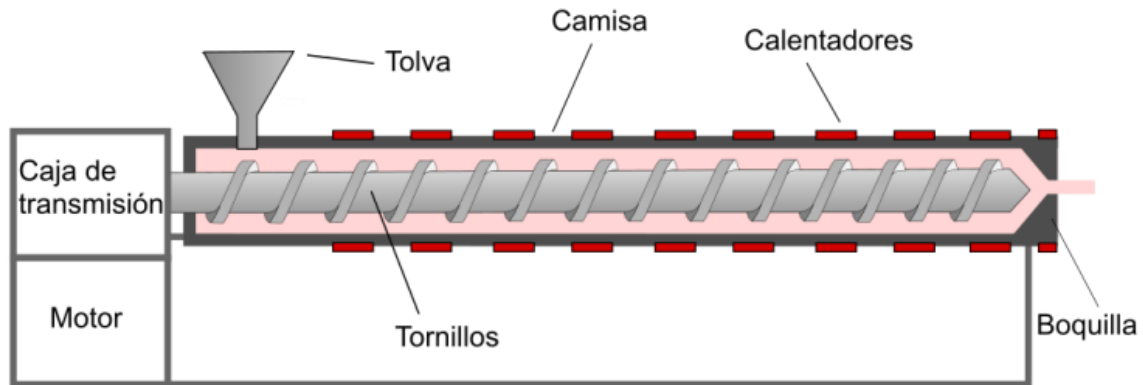


Figura 2.3. Esquema un equipo de extrusión típico.

Una de las piezas centrales de una extrusora es el tornillo. Su geometría influye en el flujo del material, su mezclado, y en la transferencia de energía mecánica. La Figura 2.4a presenta un esquema de una sección de un tornillo de extrusión y sus parámetros relevantes. Las distancias A , B y C determinan el diámetro del filete del tornillo, y el espaciado hasta la camisa. Los valores de ϕ , e y D corresponden al ancho del filete, su ángulo de inclinación y a la distancia entre dos filetes consecutivos, respectivamente. Estos tres parámetros determinan el tamaño del canal por el cual será arrastrado el material. Generalmente, un tornillo está conformado por elementos de diferente geometría puestos en serie de forma modular. Esta característica, junto al perfil de temperatura, otorga mayor versatilidad al equipo, permitiendo dividir el procesamiento en etapas de alimentación, mezclado, fundido y compresión.

Los equipos de extrusión pueden clasificarse en dos grupos: extrusoras de un solo tornillo o extrusoras de doble tornillo. Las primeras suelen ser más económicas y consumen menos energía respecto a las segundas. Por su parte, las extrusoras de doble tornillo son más versátiles, transmiten mayor energía mecánica al material y permiten obtener productos más homogéneos como consecuencia de un mejor mezclado. Dentro de las extrusoras de doble tornillo se presentan diferentes variantes: los tornillos pueden girar en el mismo sentido (co-rotante) o en sentido opuesto (contra-rotante), y estos pueden tener distintos niveles de solapamiento. La Figura 2.4b presenta esquemáticamente la vista frontal de una extrusora co-rotante y una extrusora contra-rotante, ambas con el mismo nivel de solapamiento de los tornillos.

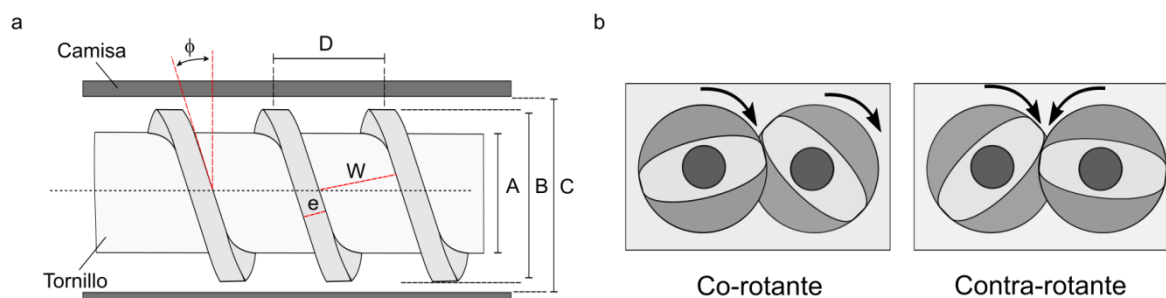


Figura 2.4. Geometría de un tornillo de una extrusora (a) y tipos de disposición de los tornillos en extrusoras doble tornillo (b).

Durante la extrusión, el material procesado absorbe energía térmica, dada por el perfil de temperatura y el tiempo de residencia en cada zona, y energía mecánica. La *energía mecánica específica* (EMS) es una medida del trabajo realizado por el tornillo por unidad de masa del material que puede calcularse utilizando la ecuación 2.1:

$$EMS = \frac{P \cdot \tau_{rel} (rpm_0 / rpm_{max})}{m}, \quad (2.1)$$

Donde P es la potencia del motor (kW), τ_{rel} es el torque relativo (entre el torque medido durante el proceso y el torque medido con la extrusora vacía), rpm_0 es la velocidad del tornillo durante el proceso, rpm_{max} es la velocidad máxima del tornillo permitida y m es el caudal.

A lo largo de la tesis, se fabricaron películas de base almidón utilizando la técnica de extrusión y posterior calandrado y/o termoprensado. Se prepararon mezclas conteniendo almidón, plastificantes y diferentes compuestos activos (extracto de romero o nanobarras de ZnO). Además, se estudió el efecto de incorporar ácido cítrico a la mezcla de plastificantes. La composición de las diferentes mezclas, así como la metodología para su preparación, se presenta en los capítulos correspondientes. Para todos los materiales se utilizó almidón de mandioca nativo (18% de amilosa de $\sim 1,5 \times 10^5$ g/mol, 82% amilopectina de $\sim 10^8$ g/mol) donado por la Cooperativa Agrícola e Industrial San Alberto Limitada (CAISA, Misiones, Argentina).

El proceso de extrusión se llevó a cabo utilizando una extrusora doble tornillo co-rotante (Nanjing Kerke Extrusion equipment Co., China) con tornillos de diámetro de 16 mm y longitud de 640 mm. La Figura 2.5 presenta una fotografía de la extrusora utilizada. La velocidad de los tornillos fue 80 rpm, y el perfil de temperaturas utilizado fue: 90-100-110-120-120-130-130-140-130-120 °C, desde el alimentador hasta la boquilla. La velocidad de alimentación fue de 12 g/min y la presión en la boquilla osciló entre 3,5 y 7 mPa.



Figura 2.5. Fotografía de la extrusora utilizada a lo largo de la tesis.

Las condiciones de extrusión se adoptaron de un trabajo previo desarrollado en el Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos. Dichas condiciones permiten que los gránulos de almidón sean procesados completamente durante la extrusión y se obtenga materiales sin presencia de gránulos o fragmentos de ellos (González-Seligra, Guz, Ochoa-Yepes, Goyanes, & Famá, 2017).

A la salida de la extrusora, se utilizó una boquilla circular de 4 mm de diámetro (Sección 5.2) o una boquilla plana de 32 mm x 1,5 mm (Sección 5.3 y 6.2). En el primer caso, los cordones obtenidos fueron termoprensados para obtener películas delgadas, siguiendo la metodología desarrollada previamente en el laboratorio. En el caso de la boquilla plana, se acopló una calandra de fabricación propia a 120 °C a la salida de la extrusora para obtener directamente las películas. Luego, las películas fueron termoprensadas con el objetivo de homogeneizar el espesor de las muestras. El protocolo de prensado consistió en colocar una muestra del material (~4 g) entre dos hojas de Teflon® en la prensa, mantener sin presión a 130 °C por 15 min y luego incrementar la presión hasta 45 kPa, manteniendo este estado por otros 15 min. Finalmente, se enfría la prensa hasta temperatura ambiente manteniendo constante la presión (González-Seligra et al., 2017).

Todas las películas desarrolladas fueron almacenadas durante 4 semanas a humedad relativa 56% y temperatura ambiente, e inmediatamente después se estudiaron.

2.5. Fabricación de películas bicapa

Una práctica usual en la industria de envases de alimentos consiste en diseñar estructuras multicapas con el objetivo de combinar propiedades de diferentes materiales y así alcanzar los requerimientos de un envase para preservar al producto (Dixon, 2011). Este enfoque aplicado en envases activos permitiría confinar diferentes principios activos en diferentes materiales para obtener una estructura multicapa con propiedades diferentes en cada una de esas capas.

Partiendo de los materiales desarrollados por electrohilado y extrusión, se prepararon sistemas bicapa conteniendo diferentes principios activos en cada capa. Se utilizaron películas de almidón conteniendo ZnO (antimicrobiano) obtenidas por extrusión y se les incorporó un mallado de PVA conteniendo extracto de romero (antioxidante) obtenido por electrohilado. El diseño propuesto plantea que la capa conteniendo el antioxidante sea la interna del envase (capa en contacto con el alimento), de tal forma de proveer antioxidante al producto envasado. La adhesión entre las capas fue mejorada mediante un proceso de termoprensado sin la presencia de adhesivos adicionales. Los detalles de la fabricación del sistema bicapa se describen en el Capítulo 6.

2.6. Caracterización de extractos naturales

2.6.1. Rendimiento de extracción

El rendimiento de la extracción se determinó gravimétricamente. Para ello se colocaron 5 mL de extracto en placas de Petri y se secaron a 50 °C por 24 h. Se determinó la masa resultante utilizando una balanza de 0,1 mg de precisión. La determinación se realizó por triplicado. El resultado se expresa como masa de sólidos respecto a volumen de extracto (g/L).

2.6.2. Determinaciones de compuestos químicos asociados a actividad antioxidante

La actividad antioxidante en extractos naturales se debe, principalmente, a la presencia de polifenoles. Si bien los compuestos polifenólicos son un grupo numeroso y heterogéneo, su contenido total en una solución y su capacidad antioxidante pueden medirse utilizando reactivos colorimétricos. Si bien estas técnicas no discriminan entre las diferentes especies de compuestos, sí permiten una medida cuantitativa útil para comparar muestras diferentes o seguir la variación de la actividad a lo largo de un proceso.

El método de Folin-Ciocalteu (F-C) es un ensayo estandarizado para control de calidad y medición de antioxidantes en productos alimentarios y suplementos dietarios (Ainsworth & Gillespie, 2007). En general, se utiliza para determinar la concentración de polifenoles en una muestra líquida. El método consiste en la transferencia de electrones desde los polifenoles hacia complejos de ácidos fosfomolibdicos-fosfotungsticos (reactivo de F-C). Esta reacción se lleva a cabo en un medio alcalino y

como resultado se obtiene la formación de un complejo de color azul, cuya concentración se determina espectroscópicamente (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999).

El contenido de polifenoles del extracto de romero se determinó por el método de F-C. Para ello, se mezclaron 400 μL de solución con 2 mL del reactivo F-C (Anedra, Argentina) diluido 1:10 en agua destilada y 1,6 mL de una solución de carbonato de sodio (7% p/v). Luego de 30 min de reacción en oscuridad, se midió la absorbancia a 760 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800, Japón). Los resultados de absorbancia se compararon con una curva de calibración realizada con ácido gálico (anhidro p.a., Biopack, Argentina) y se expresaron como equivalente de ácido gálico (GAE) por unidad de volumen (mg GAE/mL). La Figura 2.6 presenta la curva de calibración (0-150 mg GAE/L).

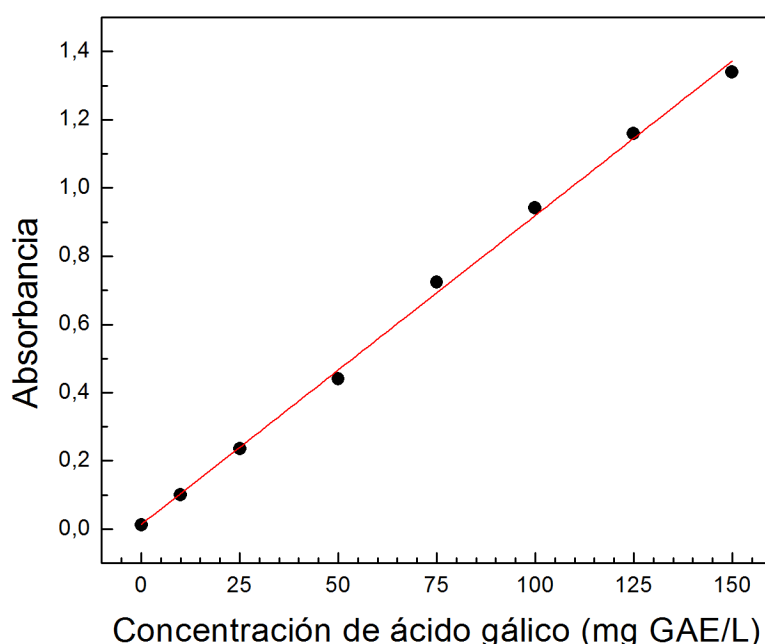


Figura 2.6. Curva de calibración para la técnica de F-C y ajuste lineal realizado por cuadrados mínimos ($y = a \cdot x + b$; $a = (0,009 \pm 0,001)$, $b = (0,01 \pm 0,01)$, $R^2 = 0,998$).

La actividad antioxidante de compuestos en solución o extractos líquidos puede medirse por el método basado en el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•; $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$), el cual se denomina método DPPH. Con esta técnica se determina la capacidad de los compuestos para neutralizar radicales libres, y se basa en la reacción entre el radical DPPH• y un antioxidante. Durante la reacción, el radical DPPH• se reduce por la transferencia de un átomo de hidrógeno desde el antioxidante. Como resultado, el color violeta característico de la solución DPPH• disminuye, y dicha disminución se cuantifica mediante un espectrofotómetro (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

La actividad antioxidante del extracto de romero se estudió utilizando el método DPPH. Se mezclaron 100 μL de extracto con 3,9 mL de una solución DPPH• (Sigma-Aldrich, Alemania) 25 mg/L en metanol absoluto p.a. (99,8% v/v, Cicarelli, Argentina). La absorbancia se midió a 516 nm luego de 30 min de reacción en oscuridad, y se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la ecuación 2.2:

$$\text{Inhibición DPPH}(\%) = 100 \frac{A_b - A_m}{A_b}, \quad (2.2)$$

Donde A_b es la absorbancia del blanco y A_m es la absorbancia de la muestra. Los resultados fueron comparados con una curva de calibración realizada con Trolox y se expresaron como equivalentes de Trolox (TE) por unidad de volumen (mg TE/mL). La Figura 2.7 muestra la curva de calibración utilizada (45,0–269,8 mg TE/L).

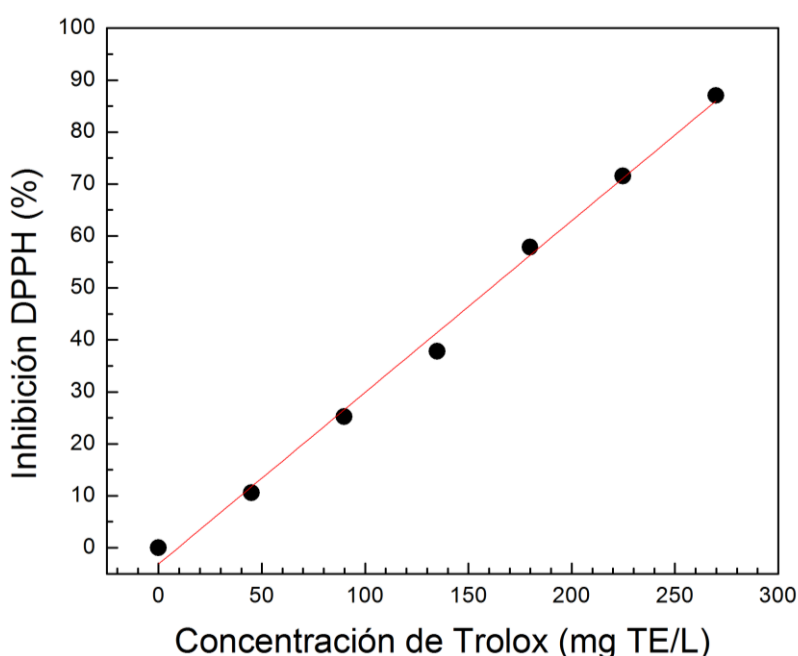


Figura 2.7. Concentración de Trolox equivalente a la inhibición de radicales DPPH y ajuste lineal realizado por cuadrados mínimos ($y = a \cdot x + b$; $a = (0,33 \pm 0,01)$ $b = (-3,1 \pm 1,6)$, $R^2 = 0,996$).

Para obtener ambas curvas de calibración (F-C y DPPH) se midió un único punto para cada concentración de reactivo como consecuencia de la escasez de los mismos.

2.6.3. Composición del extracto

La presencia de compuestos activos se estudió por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) utilizando un cromatógrafo Dionex UltiMate 3000

(Thermo Scientific, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ XL (Thermo Scientific, EEUU) por medio de una interfase de ionización por electrospray. En primer lugar se estudió la composición del extracto de romero; luego, al producir nanopartículas por el método de desplazamiento de solvente, se estudió la composición de cada una de las fases en la suspensión de nanopartículas. Para esto último, la suspensión de nanopartículas fue centrifugada (10^4 rpm, 15 min), se recuperó el sobrenadante (fase soluble) y luego los precipitados (fase no soluble) se disolvieron en etanol (99.8 %) y se recuperaron.

El método utilizado fue adaptado del trabajo de Herrero *et al.* (2010). El extracto de romero fue diluido en alcohol etílico (1:100) previo al ensayo. Se utilizó una columna Hypersil Gold (50 mm x 2,1 mm, d.p. 1.9 m, Thermo Scientific) y las fases móviles fueron ACN (0,1% v/v ácido fórmico, A) y agua (0,1% ácido fórmico, B). El gradiente utilizado fue: 0 min: 95% B; 0,52 min: 95% B; 5,25 min: 40% B; 9,30 min: 5% B; 9,75 min: 5% B; 10,5 min: 95% B; 13,5 min, 95% B. El flujo fue 0.3 mL/min y se inyectó un volumen total de muestra de 5 μ L.

2.6.4. Morfología de partículas

Se estudió el tamaño y la morfología mediante un analizador de tamaño de partículas por dispersión laser SALD-3101 (Shimadzu, Japón) y mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) utilizando un microscopio Zeiss SUPRA 40 (Alemania). La descripción del experimento de formación de partículas en la solución de electrohilado (Capítulo 4) y en la solución de los plastificantes de almidón (Capítulo 5) se presenta en los capítulos correspondientes. Para el análisis por microscopio, se colocó una gota (50 μ L) de la suspensión de partículas sobre una placa de silicio y se secó en estufa de vacío (50 °C, 6 h). Las muestras fueron recubiertas por una fina capa de platino mediante pulverizado (0,08 mbar de argón, 30 mA, 20 s) y observadas en el microscopio. El tamaño de partículas se analizó midiendo el diámetro aparente a partir de las micrografías utilizando el software libre ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). Para ello se midieron por lo menos 100 partículas observadas en 8-10 micrografías. Se analizó la distribución de diámetros (histograma), el valor medio y el desvío estándar.

2.6.5. Propiedades térmicas

El extracto fue estudiado por análisis termogravimétrico (TGA) utilizando un equipo TGA Shimadzu DTG-60 (Japón). Para estudiar el extracto, primero se secó a 50 °C hasta obtener un polvo de extracto en vez del líquido. Esto permite aumentar la resolución al quitar la masa de solvente. Para el ensayo se colocaron aproximadamente 4 mg de muestra en una cápsula de aluminio, la cual se ubicó dentro de la balanza del equipo. El ensayo fue realizado bajo atmósfera de nitrógeno (30 mL/min) a una velocidad de 10 °C/min y en un rango entre 35 °C y 550 °C. Para el análisis se normalizó a la masa inicial

(35°C) y además se calculó la derivada de la masa respecto a la temperatura (dm/dT). Ambas curvas se suavizaron realizando un promedio móvil ponderado de cada punto con sus 24 adyacentes.

2.6.6. Espectroscopía infrarroja

El extracto fue caracterizado por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier empleando un accesorio de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), utilizando un espectrofotómetro Jasco FT-IR 4100 (Japón). Para este ensayo también se utilizó el extracto en polvo. El módulo ATR utilizado contiene un cristal de seleniuro de cinc (ZnSe) y el espectro se obtuvo en un rango de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} como un promedio de 64 mediciones con una resolución de 2 cm^{-1} .

2.7. Caracterización de nanobarras de ZnO

2.7.1. Morfología

Las nanobarras de ZnO se dispersaron en agua destilada mediante ultrasonido (0,02 g en 50 mL, sonificado por 15 min), se colocó una gota de la dispersión sobre una placa de silicio y se secó en estufa de vacío (50 °C, 6 h) para su observación. El tamaño de las barras (largo, ancho) se analizó a partir de las micrografías utilizando el software libre ImageJ (Schneider et al., 2012). Para ello se midieron por lo menos 100 barras observadas en 8-10 micrografías. Se analizó la distribución de cada magnitud (histograma), el valor medio y el desvío estándar.

2.8. Caracterización de mallados de nanofibras

Las características de los mallados de electrohilado dependen de dos tipos de parámetros: las propiedades de la solución a electrohilar y los parámetros del proceso. Por este motivo, previo a la fabricación de los mallados se realizó la caracterización de las soluciones/dispersiones a utilizar.

2.8.1. Caracterización de las soluciones/dispersiones utilizadas

Se caracterizaron las soluciones utilizadas midiendo su conductividad eléctrica y su viscosidad. Para medir la conductividad, se prepararon 50 mL de solución de electrohilado en un vaso de precipitado de 100 mL, y se midió dicha propiedad por medio de un conductímetro Orion Versastar (Thermo scientific, EEUU). Posteriormente, se determinó la viscosidad utilizando un viscosímetro Brookfield LV DV-E (Canadá). Para ello, la misma solución se volcó en el accesorio para muestras pequeñas del equipo (15 mL) y se utilizó la punta SC4-29 operada a una velocidad de 15 rpm. Ambas determinaciones se realizaron por triplicado y se presenta el valor medio y el desvío estándar.

Las dispersiones obtenidas por la incorporación de principios activos en la solución de PVA fueron observadas hasta 4 h (tiempo de fabricación) para corroborar que la fase dispersa no precipite.

2.8.2. Caracterización de los mallados

2.8.2.1. Morfología

La morfología de los mallados se estudió mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) utilizando un microscopio Zeiss SUPRA 40 (Alemania). Previo a la observación, las muestras fueron recubiertas por una fina capa de platino mediante pulverizado (0,08 mbar de argón, 30 mA, 20 s). El tamaño de las fibras (diámetro) se analizó a partir de las micrografías utilizando el software libre ImageJ (Schneider et al., 2012). Se midieron 100 fibras de electrohilado de cada sistema a partir de 8-10 micrografías, y se tuvo en cuenta solo las fibras en el plano superior de la fotografía (plano en foco). Se analizó la distribución (histograma), el valor medio y el desvío estándar.

2.8.2.2. Espectroscopía infrarroja y Raman

Todos los mallados de electrohilado fueron estudiados por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier empleando reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), según los detalles experimentales descritos anteriormente en la Sección 2.6.5.

Además, las mallas de PVA conteniendo d-limoneno se estudiaron por espectroscopía Raman. Los espectros Raman se obtuvieron en el rango $1400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ utilizando la línea de 532 nm de un láser de Nd:YVO4 (25 mW) con un objetivo de 20x.

2.8.2.3. Estructura cristalina

Se midieron patrones de difracción de rayos X mediante un difractómetro Malvern PANalytical Empyrean (Reino Unido) utilizando radiación de Cu (K- α , $\lambda=1,54056$). Los ensayos se realizaron en un rango de 2θ entre 5° y 40° con un paso igual a $0,026^\circ$.

2.8.2.4. Análisis térmico

Se realizaron análisis térmogravimétricos (TGA) de los mallados utilizando un equipo TGA Shimadzu DTG-60 (Japón). Para los ensayos, se cortaron muestras con un sacabocados ($\phi=5\text{ mm}$) y se colocaron dentro de cápsulas de aluminio. Se apilaron 4-6 discos hasta alcanzar una masa de $\sim 4\text{ mg}$. Las cápsulas se ubicaron dentro de la balanza del equipo y se realizaron los ensayos con las mismas condiciones descritas anteriormente (Sección 2.6.5).

2.8.2.5. Determinación de solubilidad y liberación de d-limoneno y β -ciclodextrina

Se determinó la solubilidad de los mallados PVA en agua y la cantidad liberada de d-limoneno y β -ciclodextrina de manera indirecta. Para ello se midió el carbono orgánico total disuelto en agua luego de 24 h de inmersión de los mallados. Se cortaron muestras de 1 cm^2 de los diferentes materiales, se pesaron y se sumergieron en 10 mL de agua destilada en vasos de precipitado de 50 mL de volumen.

Luego de 24 h, se retiraron las muestras de los vasos y se midió el carbono orgánico total presente en el agua utilizando un Analizador de Carbono Total Orgánico (TOC-L Shimadzu, Japón). Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como masa de carbono liberada por masa de material.

2.8.2.6. Determinación de biodegradabilidad

Se estudió la respiración bacteriana de *E. coli* en la presencia de los mallados de electrohilado conteniendo d-limoneno. En estos experimentos, los mallados constituyen la única fuente de carbono y se mide la producción de CO₂ por los microorganismos. Se cortaron muestras de cada material (2 cm x 2 cm) y se sumergieron en solución PBS (20 mL) colocada en cámaras de reacción de 100 mL. La solución fue inoculada con *Escherichia coli* (*E. coli*, DH5α) para alcanzar una concentración de bacterias de 10⁸ CFU/mL. Las muestras se colocaron en un baño termostatzado a 37 °C y las cámaras con las muestras se conectaron a un respirómetro Micro-Oxymax (Columbus Instruments, EEUU) equipado con una interfase de expansión. La producción de CO₂ de fondo (respiración bacteriana en ausencia de material) se midió para todos los experimentos y se restó a los resultados. Los experimentos fueron realizados por triplicado, y se midió la producción de CO₂ por 20 h consecutivas.

2.8.2.7. Determinación de actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los mallados conteniendo d-limoneno mediante el método de difusión en agar. Este ensayo consiste en colocar una muestra de material en un recipiente conteniendo el agar con las bacterias, e incubar el sistema para promover el crecimiento de las bacterias. La presencia de un compuesto antimicrobiano que migre al agar se evidencia por un halo alrededor de la muestra donde no crecen las bacterias. El tamaño de dicho halo de inhibición constituye una medida de la actividad bactericida de un material antibacteriano migratorio (Abreu et al., 2015). Para realizar el ensayo de difusión en agar, se cultivaron colonias de *E. coli* (DH5α) por 24 h en un medio Luria-Bertani⁴ (medio LB). Luego, fueron diluidas en solución buffer fosfato salino (PBS) hasta llegar a una concentración final de 10⁸ CFU/mL. La suspensión de bacterias (200 µL) fue esparcida en placas de Petri (90 mm de diámetro) conteniendo agar Muller-Hinton. Se colocaron discos de cada material (30 mm de diámetro) en el agar y las placas fueron incubadas por 24 h a 37 °C. Se tomaron fotografías de las placas luego del período de incubación.

2.8.2.8. Determinación de contenido de polifenoles y actividad antioxidante

Las técnicas de F-C y DPPH permiten evaluar el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de muestras líquidas. Para evaluar dichas propiedades en los mallados de PVA conteniendo

⁴ La composición del medio Luria-Bertani utilizado fue: triptona (10 g), extracto de levadura (5 g) y cloruro de sodio (10 g).

extracto de romero, se realizó una extracción hacia un medio líquido y se evaluó el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de dicho medio. Se escogió una solución hidroalcohólica idéntica a la utilizada para preparar el extracto de romero, lo cual asegura afinidad entre el solvente y los polifenoles encapsulados. Los detalles experimentales de la extracción se presentan directamente en el Capítulo 4. Los protocolos para los ensayos de F-C y DPPH fueron descritos previamente (Sección 2.6.2). Los resultados fueron normalizados a la masa de material y se presentan como ácido gálico equivalente por unidad de masa (mg GAE/g, contenido de polifenoles) y como equivalentes Trolox por unidad de masa (mg TE/g, actividad antioxidante).

2.8.2.9. Cinética de liberación de polifenoles

Se estudió la cinética de liberación de polifenoles desde los mallados de electrohilado conteniendo extracto de romero hacia diferentes medios líquidos que actúan como simulantes de alimentos de acuerdo a la norma europea (European Commission, 2011). Se colocaron muestras en vasos de precipitado conteniendo los simulantes y se estudió el contenido de polifenoles en solución a distintos tiempos mediante el método de F-C, descrito en la Sección 2.6.2. Los resultados se normalizaron respecto al contenido total de polifenoles y se presentan como porcentaje de liberación en función del tiempo. Los detalles experimentales de los experimentos de liberación y su análisis mediante modelos físicos y empíricos se presentan directamente en el Capítulo 4.

2.9. Caracterización de películas continuas

2.9.1. Morfología

La morfología de las películas continuas se estudió mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) utilizando un microscopio Zeiss SUPRA 40 (Alemania). Para ello se evaluó su superficie de fractura criogénica. Previo a la observación, las muestras fueron recubiertas por una fina capa de platino mediante pulverizado (0,08 mbar de argón, 30 mA, 20 s).

2.9.2. Espectroscopía infrarroja

Se determinó el espectro infrarrojo con transformada de Fourier utilizando un espectrofotómetro Jasco FT-IR 4100 (Japón) empleando un accesorio de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR). Las condiciones del ensayo son las mismas que las descritas en la Sección 2.6.5.

2.9.3. Estructura cristalina

Se midieron patrones de difracción de rayos X utilizando un difractómetro Malvern PANalytical Empyrean (Reino Unido) bajo las condiciones descritas en la Sección 2.8.4.

2.9.4. Análisis térmico

Se realizaron análisis térmogravimétricos (TGA) de las películas utilizando un equipo TGA Shimadzu DTG-60 (Japón). Se utilizaron las mismas condiciones descritas en la Sección 2.8.5, con la diferencia que el rango estudiado fue 35-400 °C. La temperatura final del ensayo se escogió considerando la temperatura de degradación del almidón. Para los experimentos destinados a mejorar la matriz de almidón, adicionalmente se midieron en simultáneo y con el mismo equipo curvas de análisis térmico diferencial (DTA).

2.9.5. Susceptibilidad al agua

La susceptibilidad al agua de los materiales basados en almidón se estudió midiendo el contenido de humedad, la solubilidad en agua, y la permeabilidad al vapor de agua.

El contenido de humedad (MC) de las muestras se determinó siguiendo el método estandarizado de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC; Cuniff & Jee, 1995). Se cortaron muestras de cada sistema, se pesaron ($m_h \approx 0,5 \text{ g}$) y se secaron en una estufa a 105 °C por 24 h. Se pesaron las muestras nuevamente (m_s) y se calculó el contenido de humedad de acuerdo a la ecuación 2.3:

$$MC(\%) = 100 \frac{m_h - m_s}{m_h} . \quad (2.3)$$

Para medir la solubilidad en agua (WS), se cortaron muestras, se pesaron ($m_i \approx 0,5 \text{ g}$) y se sumergieron en 50 mL de agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente y con agitación constante. El remanente de película se recuperó mediante filtración, se secó en una estufa a 100 °C por 24 h y se pesó (m_{sf}). La masa inicial se obtuvo restando el contenido de humedad del sistema en cuestión ($m_{si} = m_i - m_i \cdot MC$). La solubilidad se calculó de acuerdo a la ecuación 2.4:

$$WS(\%) = 100 \frac{m_{si} - m_{sf}}{m_{si}} . \quad (2.4)$$

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se midió utilizando el método ASTM E96-00 con algunas modificaciones (L. Famá, Rojo, Bernal, & Goyanes, 2012). Se cortaron muestras circulares, se midió su espesor con un micrómetro digital, y se colocaron en la boca de celdas acrílicas conteniendo cloruro de calcio (CaCl_2 , ~15 g). Las celdas fueron almacenadas en desecadores con una humedad relativa (RH) de 70%, obtenida utilizando una solución sobresaturada de cloruro de sodio (NaCl). Se pesaron las celdas durante 10 días consecutivos, y el transporte de vapor de agua (TA) se determinó como la pendiente de la curva de masa en función del tiempo dividido la superficie de la película ($S=3,8 \text{ cm}^2$). La permeabilidad al vapor de agua se calculó luego utilizando la ecuación 2.5:

$$WVP(\%) = 100 \frac{TA}{P_0 HR} e , \quad (2.5)$$

donde e es el espesor de la película y P_0 es la presión de saturación del vapor de agua. Todas las determinaciones se hicieron por lo menos en triplicado.

2.9.6. Ensayos de tracción uniaxial

Las propiedades mecánicas se estudiaron mediante ensayos de tracción uniaxial utilizando un texturómetro Brookfield Texture Analyzer (CT3-100) y siguiendo la norma ASTM-D882-02 (Standard, 2004). Se cortaron probetas con forma de hueso de 35 mm x 6 mm (largo x ancho), según la Figura 2.8, y se midió su espesor con un micrómetro digital. Luego se colocaron en el equipo y se traccionaron a una tasa unitaria de deformación de 10^{-3} s^{-1} . De las curvas se calculó el módulo de Young, la tensión de rotura, la elongación de rotura (porcentual) y la tenacidad a la tracción. Se realizaron al menos 10 ensayos por cada material.

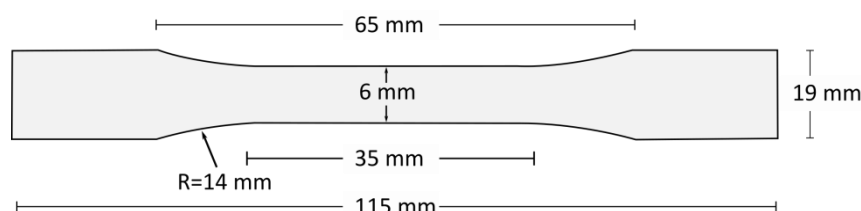


Figura 2.8. Esquema de la probeta usada para los ensayos mecánicos de tracción uniaxial. La letra R indica el radio del filete.

2.9.7. Determinación de actividad antioxidante y cinética de liberación de polifenoles

Para las películas conteniendo extracto de romero, se realizaron experimentos de liberación hacia distintos simulantes de alimentos. Estos ensayos fueron realizados de forma similar a lo descrito en la Sección 2.8.2.9 para los mallados de electrohilado conteniendo extracto de romero. El contenido de polifenoles para cada tiempo se evaluó por el método de F-C (Sección 2.6.2). Los resultados se normalizaron respecto al contenido teórico de polifenoles, y se presentan como porcentaje de polifenoles liberados en función del tiempo. Se determinó la actividad antioxidante de los polifenoles liberados luego de 24 h de liberación para cada medio. Los detalles específicos de este experimento, así como los modelos físicos y empíricos utilizados para su análisis, se presentan en el Capítulo 5.

2.9.8. Hinchamiento

Con el objetivo de estudiar los mecanismos involucrados en la liberación de polifenoles desde las películas continuas conteniendo extracto de romero, se midió el grado de hinchamiento (*swelling*) en los diferentes medios simulantes de alimentos. Se utilizó la metodología propuesta por Liu *et al.* (2017).

Para ello, se cortaron discos de 16 mm de diámetro y se sumergieron en el medio (30 mL) por 120 min. Luego, las muestras fueron recuperadas y se eliminó el excedente de líquido apoyando la muestra de cada lado sobre un papel secante por 5 s. El grado de hinchamiento (S) se calculó de acuerdo a la ecuación 2.6:

$$S(\%) = 100 \frac{m_f}{m_0}, \quad (2.5)$$

donde m_0 es la masa inicial y m_f es la masa de la muestra hinchada. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

2.9.9. Análisis térmico-dinámico mecánico

Se realizaron ensayos térmico-dinámicos (DMTA) de las películas conteniendo extracto de romero utilizando un equipo DMTA IV (Rheometric Scientific, EEUU). Para ello se cortaron muestras de 10 mm × 5 mm (largo x ancho) y se midió su espesor. Los ensayos se llevaron a cabo a una frecuencia de 1 Hz, con una amplitud de deformación de 0,1% y a una velocidad de calentamiento de 2 °C/min desde -80 °C hasta 40 °C.

2.9.10. Determinación de actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de las películas de almidón conteniendo ZnO se evaluó, en primer lugar, mediante el ensayo de difusión en agar descrito previamente (Sección 2.8.2.7). Adicionalmente, para este material se evaluó la actividad antibacteriana por el ensayo normado JIS Z2801, el cual es un método para medir la actividad sobre la superficie del material (sistemas no migratorios). Para ello, primero se cultivaron colonias de *E. coli* (DH5α) y se diluyeron hasta lograr una concentración de 10^5 CFU/mL. Luego, se inocularon 400 μL de dicha suspensión sobre la superficie de muestras de cada material (cuadrados de ~4 cm de lado). Las muestras fueron incubadas por 24 h a 37 °C en una atmósfera a 90 % de humedad relativa. Finalmente, las muestras fueron sumergidas en solución PBS (20 mL) y agitadas en un mezclador de vórtice para separar las bacterias de las películas. La concentración de bacterias en la suspensión final fue determinada realizando diluciones seriadas contando las colonias resultantes en una placa de agar de cuenta. Los resultados se expresan como concentración (CFU/mL) luego del crecimiento a 24 h.

2.10. Caracterización de películas bicapa

2.10.1. Morfología

La morfología de las películas bicapa fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM) utilizando un microscopio Zeiss SUPRA 40 (Alemania). Se observó la superficie de las películas del lado del mallado de electrohilado antes y después de termoprensar ambas

capas. Las fibras de electrohilado obtenidas se estudiaron respecto a su morfología y la distribución de sus diámetros (histograma, valor medio, desviación estándar) de manera similar a la descrita en la Sección 2.8.2.1. Además, se estudió el interior de la película bicapa a través de la evaluación de su superficie de fractura criogénica.

2.10.2. Espectroscopía infrarroja

Se determinó el espectro infrarrojo con transformada de Fourier mediante un espectrofotómetro Jasco FT-IR 4100 (Japón) empleando un accesorio de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR). Siendo una técnica que evalúa la superficie de la muestra, se midió el espectro de ambas caras del material bicapa. Las condiciones del ensayo son las mismas que las descritas en la Sección 2.6.6.

2.10.3. Estructura cristalina

Se midió el patrón de difracción de rayos X del material bicapa utilizando un difractómetro Malvern PANalytical Empyrean (Reino Unido) bajo las condiciones descritas en la Sección 2.8.2.3. Se consideró que el haz incida primero sobre la capa del mallado de electrohilado, y el resultado se comparó con los correspondientes a los materiales de una capa.

2.10.4. Análisis térmico

Se realizaron análisis térmogravimétricos de las películas utilizando un equipo TGA Shimadzu DTG-60 (Japón), y bajo las mismas condiciones descritas en la Sección 2.6.5.

2.10.5. Susceptibilidad al agua

La susceptibilidad al agua de los materiales basados en almidón se estudió midiendo el contenido de humedad, la solubilidad en agua, y la permeabilidad al vapor de agua. Dichos parámetros fueron determinados siguiendo el protocolo descrito en la Sección 2.9.5.

2.10.6. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se estudiaron mediante ensayos de tracción uniaxial de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.9.6.

2.10.7. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante

En primer lugar, se determinó el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de la capa conteniendo el extracto de romero en ausencia de la otra capa. Para ello, se realizó una extracción colocando un mallado (200 mg) en etanol (50 mL, 70% v/v) a 50 °C bajo reflujo. Se tomó una muestra a las 2 h y se midió la cantidad de polifenoles y la actividad antioxidante por los métodos de F-C y DPPH, respectivamente (Sección 2.6.2).

En segundo lugar, se evaluó la actividad antioxidante del material bicapa en distintos simulantes de alimentos, mediante un arreglo experimental que simula una aplicación real. Se utilizaron los simulantes alimenticios lipofílicos D1 (etanol 50% v/v) y D2 (aceite vegetal). Se tomaron muestras del material bicapa ($\phi=1,5$ cm) y se pusieron en contacto del lado PVA-RE con un filtro de Nylon ($\phi=2,5$ cm) conteniendo 100 μL del simulante. La cantidad de simulante fue contenida completamente en el filtro. Este arreglo experimental fue escogido con el objetivo de que solo el lado conteniendo los compuestos antioxidantes interactúe con el simulante alimenticio. Los filtros conteniendo los polifenoles liberados fueron recuperados luego de 24 h y luego fueron inmersos en 3,9 mL de una solución DPPH. Se midió la actividad antioxidante de acuerdo al protocolo de la Sección 2.6.2 y se reportó como equivalentes Trolox por unidad de masa (mg TE/g).

2.10.8. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó según la norma JIS Z2801 contra la bacteria *E. coli*, de manera similar a lo detallado en la Sección 2.9.10. En este caso, se evaluó el crecimiento de bacterianos sobre ambas caras.

2.10.9. Migración de Zn entre capas

El sistema bicapa se diseñó de forma tal que el mallado de PVA conteniendo polifenoles sea el interior del envase, mientras que la película de almidón conteniendo nanobarras de ZnO sea la capa externa. Se determinó la migración de Zn(II) desde dicha capa externa, atravesando la capa de fibras de electrohilado, hacia un simulante alimenticio de carácter lipofílico (D1, etanol 50% v/v), y se comparó con la migración desde una película de almidón conteniendo nanobarras de ZnO en contacto directo con dicho simulante.

Para realizar el experimento, el simulante alimenticio (100 μL) fue incorporado a filtros de Nylon ($\phi=2,5$ cm), y luego fueron apoyadas muestras de cada material ($m\sim 0,5$ g, $\phi=1,5$ cm) sobre dichos filtros. Para el material bicapa, la cara conteniendo polifenoles fue la que se apoyó sobre el filtro. Las muestras fueron retiradas luego de 24 h, y tanto las muestras como los filtros fueron secados a 50 °C por 24 h. Las muestras y los filtros recuperados fueron analizados por espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (EDS, FEI Quanta 250 con un detector UltraDry EDS, Thermo Scientific, EEUU) con el objetivo de determinar la presencia de Zn(II) en la superficie de los materiales luego del ensayo de migración. Se analizaron las caras del filtro y de la muestra que estuvieron en contacto entre sí. En la Figura 2.9 se presenta un esquema del experimento realizado, el cual se utilizó tanto para medir la migración de Zn(II) a través de las capas como para medir la migración directa de polifenoles desde la cara PVA-RE.

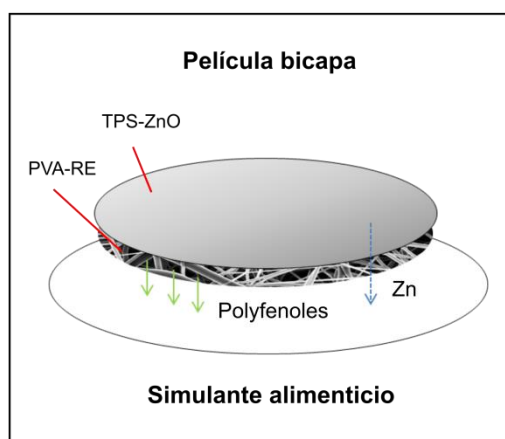


Figura 2.9. Esquema del experimento de migración de Zn(II) a través de las capas y de migración de polifenoles de manera directa para los materiales bicapa. El simulante alimenticio consiste en un filtro de nylon conteniendo un simulante líquido.

2.11. Referencias

- Abreu, A. S., Oliveira, M., de Sá, A., Rodrigues, R. M., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., & Machado, A. V. (2015). Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. *Carbohydrate Polymers*, 129, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.021>.
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.
- ASTM Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting D882/02 (2004).
- Bouvier, J.-M., & Campanella, O. H. (2014). *Extrusion processing technology: food and non-food biomaterials*. John Wiley & Sons.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Dejene, F., Ali, A., Swart, H., Botha, R., Roro, K., Coetsee, L., & Biggs, M. (2011). Optical properties of ZnO nanoparticles synthesized by varying the sodium hydroxide to zinc acetate molar ratios using a Sol-Gel process. *Open Physics*, 9(5), 1321–1326. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0050-3>.
- Djurišić, A. B., & Leung, Y. H. (2006). Optical properties of ZnO nanostructures. *Small*, 2(8-9), 944–961. <https://doi.org/10.1002/sml.200600134>.

-
- European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, Vol. 15, pp. 12–88. <https://doi.org/10.1016/j.nucengdes.2011.01.052>.
 - Famá, L., Rojo, P. G., Bernal, C., & Goyanes, S. (2012). Biodegradable starch based nanocomposites with low water vapor permeability and high storage modulus. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 1989–1993. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.007>.
 - Formhals, A. (1934). U.S. Patent No. 1,975,504. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 - González-Seligra, P., Guz, L., Ochoa-Yepes, O., Goyanes, S., & Famá, L. (2017). Influence of extrusion process conditions on starch film morphology. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.027>.
 - Greene, L. E., Law, M., Tan, D. H., Montano, M., Goldberger, J., Somorjai, G., & Yang, P. (2005). General route to vertical ZnO nanowire arrays using textured ZnO seeds. *Nano Letters*, 5(7), 1231–1236. <https://doi.org/10.1021/nl050788p>.
 - Hasnidawani, J. N., Azlina, H. N., Norita, H., Bonnia, N. N., Ratim, S., & Ali, E. S. (2016). Synthesis of ZnO nanostructures using sol-gel method. *Procedia Chemistry*, 19, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.095>.
 - Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223–2253. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7).
 - Joye, I. J., & McClements, D. J. (2013). Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.002>.
 - Liu, F., Avena-Bustillos, R. J., Chiou, B.-S., Li, Y., Ma, Y., Williams, T. G., Wood, D.F., McHugh, T.H., Zhong, F. (2017). Controlled-release of tea polyphenol from gelatin films incorporated with different ratios of free/nanoencapsulated tea polyphenols into fatty food simulants. *Food Hydrocolloids*, 62, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.004>.
 - Mlalila, N., Hilonga, A., Swai, H., Devlieghere, F., & Ragaert, P. (2018). Antimicrobial packaging based on starch, poly (3-hydroxybutyrate) and poly (lactic-co-glycolide) materials and application challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.015>.
 - Nafchi, A. M., Nassiri, R., Sheibani, S., Ariffin, F., & Karim, A. A. (2013). Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.055>.

- Reneker, D. H., & Chun, I. (1996). Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 7(3), 216. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/7/3/009>.
- Ribba, L. (2017). *Nanoestructuras biodegradables obtenidas mediante técnicas de electroestirado*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Sánchez Rodas, L. A. (2015). *Nanorods de ZnO obtenidos a partir de semillas fabricadas por "Spray Pyrolysis" y "Spray Gel": Influencia de los parámetros de depósito en las propiedades morfológicas, estructurales, ópticas y actividad fotocatalítica*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Ingeniería de Perú, Facultad de Ciencias.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>. Software disponible en: <https://imagej.net>.
- Shin, Y. M., Hohman, M. M., Brenner, M. P., & Rutledge, G. C. (2001). Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer*, 42(25), 9955–9967. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00540-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00540-7).
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).
- Vafaei, M., & Ghamsari, M. S. (2007). Preparation and characterization of ZnO nanoparticles by a novel sol–gel route. *Materials Letters*, 61(14–15), 3265–3268. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.11.089>.
- Yi, G.-C., Wang, C., & Park, W. II. (2005). ZnO nanorods: synthesis, characterization and applications. *Semiconductor Science and Technology*, 20(4), S22. <https://doi.org/10.1088/0268-1242/20/4/003>.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.

Encapsulación de volátiles en mallados electrohilados de PVA

Resumen

El objetivo de este capítulo fue desarrollar mallados de electrohilado de PVA insolubles en agua que incorporen un principio activo volátil con conocida actividad antimicrobiana. En primer lugar, se fabricaron mallados de PVA conteniendo ácido cítrico y se los sometió a un tratamiento térmico con el fin de insolubilizarlos, siguiendo una metodología desarrollada previamente. En segundo lugar, se fabricaron mallados de PVA conteniendo d-limoneno como modelo de principio activo volátil, siguiendo las mismas condiciones de procesamiento que se usaron para el material matriz. Se utilizaron dos enfoques: en primer lugar, el d-limoneno fue incorporado directamente junto con el PVA; en segundo lugar, se adicionó β -ciclodextrina para formar complejos de inclusión y estabilizar al volátil. Como control, también se preparó un mallado de PVA conteniendo β -ciclodextrina. Los materiales fueron caracterizados fisicoquímicamente de acuerdo a su morfología, espectro infrarrojo y Raman, estructura cristalina y propiedades térmicas. Además, se estimó la cantidad de d-limoneno incorporada y determinó la actividad antimicrobiana y la biodegradabilidad de los mallados conteniendo d-limoneno.

3.1. Introducción

El crecimiento de bacterias y microorganismos en los alimentos es una de las principales causas de deterioro y pérdida de sabor, valor nutricional y, en general, de la calidad de los alimentos, pudiendo generar enfermedades de distinta gravedad en los consumidores, o simplemente pérdida económica a los productores. Una estrategia eficiente para disminuir o retardar el crecimiento de bacterias es la utilización de envases antimicrobianos. La incorporación de antimicrobianos volátiles en el material del envase es una estrategia sumamente interesante para el desarrollo de envases activos, puesto que dichas sustancias son capaces de migrar como vapor desde el material hacia el interior del envase, de

forma de sanitizar tanto el producto como su entorno (Shemesh, Krepker, Nitzan, Vaxman, & Segal, 2016). En general, incorporar compuestos bioactivos en el envase resulta más eficiente que añadirlos directamente sobre el producto, ya que el material del envase permite estabilizarlos mientras son liberados paulatinamente (Uyar, Hacaloglu, & Besenbacher, 2009). Sin embargo, la utilización de volátiles en la industria de envases se ve limitada por las altas temperaturas involucradas en los procesos más habituales de dichas industrias. Además, surge un problema adicional cuando dichos compuestos son hidrofóbicos y se los pretende introducir en matrices hidrofílicas, tales como el almidón o el PVA.

Una forma de estabilizar compuestos bioactivos volátiles y protegerlos de factores externos (tales como calor, presión, luz) consiste en su encapsulación. La técnica de electrohilado ha sido ampliamente estudiada para encapsular principios activos volátiles, teniendo como ventaja que se lleva a cabo a temperatura ambiente y sin cambios de presión (Echegoyen, Fabra, Castro-Mayorga, Cherpinski, & Lagaron, 2017). Además, permite obtener un material que puede ser utilizado directamente como parte del envase. El electrohilado de soluciones acuosas es de especial interés en aplicaciones de alimentos puesto que se evita el uso de solventes orgánicos tóxicos. Por otra parte, la utilización de ciclodextrinas constituye una estrategia para compatibilizar compuestos hidrofóbicos e incorporarlos en mallados de electrohilado hidrofílicos, tal como lo han demostrado numerosas investigaciones (Kayaci, Ertas, & Uyar, 2013; Kayaci & Uyar, 2012; Topuz & Uyar, 2019). Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos naturales, con una forma de toroide cuyo interior permite albergar moléculas hidrofóbicas y así formar estructuras estables con el principio activo denominadas *complejos de inclusión* (Figueroa-Lopez et al., 2020). Si bien la formación de complejos de inclusión suele realizarse de forma independiente (por ej., mediante un proceso de secado spray o secado en frío), ha sido demostrado que dichos complejos pueden formarse directamente en la solución de electrohilado, sin necesidad de un proceso adicional (Wen et al., 2016).

Una gran variedad de especias y hierbas han sido utilizadas tradicionalmente como conservantes de alimentos y, hoy en día, son reconocidas científicamente como fuentes importantes de compuestos bioactivos con potencialidad como bactericidas (Laokuldilok et al., 2017). El d-limoneno es un terpeno cíclico que se encuentra en diferentes aceites esenciales de cítricos y presenta actividad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante y antiaflatoxigénica (Singh et al., 2010). Es un compuesto hidrofóbico altamente volátil, y se utilizará en este capítulo como modelo para estudiar la formación de mallados electrohilados conteniendo un antimicrobiano natural volátil. Otros autores previamente mostraron que el d-limoneno es capaz de ser incorporado en nanofibras de PVA por electrohilado con una eficiencia de encapsulación de $(60 \pm 11) \%$ para emulsiones de 1:8 (d-limoneno respecto a solución de PVA) (Camerlo et al., 2013). Sin embargo, los resultados presentados en dicho trabajo muestran que el d-limoneno se pierde casi completamente luego de un día de almacenamiento de los mallados a 37 °C, sugiriendo una

pobre encapsulación. Por otra parte, los mallados electrohilados de PVA son materiales completamente solubles en agua de manera casi instantánea, lo cual dificulta su aplicación como parte de un envase activo. Este problema se puede resolver mediante un tratamiento térmico, donde se induce el entrecruzamiento del PVA con ácido cítrico y se incrementa la cristalinidad, dando como resultado una disminución de la solubilidad del material hasta valores menores al 2% (López-Córdoba et al., 2016). Resulta importante destacar que la encapsulación previa del d-limoneno (hidrofóbico) en ciclodextrina podría contribuir a estabilizarlo térmicamente y a mejorar su dispersión en el mallado de PVA (matriz hidrofílica).

En este capítulo se presenta el estudio de mallados electrohilados de PVA entrecruzado con ácido cítrico y que contienen d-limoneno incluido en β -ciclodextrina. Como control, se prepararon muestras de PVA, PVA con d-limoneno y PVA con β -ciclodextrina (todos los materiales conteniendo ácido cítrico). Se determinaron las características fisicoquímicas de cada material y los efectos que tiene la incorporación de cada compuesto por separado en las fibras de PVA, así como también la formación de complejos de inclusión β -ciclodextrina/d-limoneno. En particular, se determinó la actividad antimicrobiana de los materiales y las diferencias en la biodegradabilidad producto de la incorporación de un principio activo antimicrobiano.

3.2. Metodología

3.2.1. Materiales

Se utilizó el PVA y el ácido cítrico descriptos anteriormente (Sección 2.3). Los aditivos utilizados en este capítulo fueron β -ciclodextrina Kleptose (Roquette, Francia) y d-limoneno (Euma, Argentina).

3.2.2. Fabricación de mallados de electrohilado y caracterización

Se prepararon cuatro sistemas: mallados de PVA, mallados de PVA incorporando β -ciclodextrina, mallados de PVA incorporando d-limoneno y mallados de PVA incorporando d-limoneno encapsulado en β -ciclodextrina. Las muestras que no contienen d-limoneno (PVA y PVA + β -ciclodextrina) se estudiaron con fines comparativos (muestras control). Todas las muestras contienen ácido cítrico como agente esterificante/reticulante. La metodología de fabricación utilizada (concentración del polímero en solución, concentración de ácido cítrico y parámetros del equipo de electrohilado) para el mallado PVA fue desarrollada previamente en el lugar de trabajo por otros integrantes del laboratorio (Ribba, 2017).

En primer lugar, se obtuvo una solución al 12% (p/p) de PVA con 5% de ácido cítrico (p/p respecto al polímero). Para ello, se colocaron 12 g de PVA y 0,6 g de ácido cítrico en un vaso de precipitado, y se incorporaron 88 g de agua destilada. La mezcla se disolvió a 80 °C durante 1 h con agitación magnética constante, y luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

Luego, se preparó una solución al 12% (p/p) de PVA incorporando 5% de ácido cítrico (p/p respecto al polímero) y 30% de β -ciclodextrina (p/p respecto al polímero). Se colocaron 3,6 g de β -ciclodextrina y 88 g de agua destilada en un vaso de precipitado, y se llevó a 60 °C con agitación magnética constante hasta disolución total (~10 min). Se incorporaron 12 g de PVA y 0,6 g de ácido cítrico, y el baño se llevó a 80 °C por 1 h, manteniendo la agitación magnética. Finalmente, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Este protocolo fue escogido porque la β -ciclodextrina no es soluble en agua a temperatura ambiente (Challa, Ahuja, Ali, & Khar, 2005). La solución obtenida fue completamente transparente y no se observó que precipite la β -ciclodextrina.

Después, se preparó una solución 12% (p/p) de PVA incorporando 5% (p/p respecto al polímero) de ácido cítrico y 2,6% (p/p respecto al polímero) de d-limoneno. Se obtuvo una solución de PVA con ácido cítrico de la misma forma que se describió anteriormente, y se dejó enfriar (12 g de PVA y 0,6 g de ácido cítrico en 88 g de agua). Se incorporaron 0,31 g de d-limoneno gota a gota a la solución bajo agitación magnética a máxima velocidad de d-limoneno.

Finalmente, se preparó una solución al 12% (p/p) de PVA incorporando 5% (p/p respecto al polímero) de ácido cítrico, 30% (p/p respecto al polímero) de β -ciclodextrina y 2,6% (p/p respecto al polímero) de d-limoneno. Se preparó una solución de PVA con β -ciclodextrina igual a como fue descrito anteriormente (12 g de PVA, 0,6 g de ácido cítrico y 3,6 g de β -ciclodextrina en 88 g de agua). Una vez obtenida dicha solución, se incorporaron 0,31 g de d-limoneno gota a gota y bajo agitación magnética a máxima velocidad por 20 min.

Cada solución fue cargada y procesada en el equipo de electrohilado manteniendo constantes los parámetros del equipo, de acuerdo a la Sección 2.3. Los materiales obtenidos fueron sometidos a un tratamiento térmico en una estufa a 190 °C por 10 min, con el objetivo de insolubilizar a los materiales (López-Córdoba et al., 2016). Las muestras de PVA, PVA con β -ciclodextrina, PVA con d-limoneno y PVA con d-limoneno encapsulado en β -ciclodextrina se las denominará “PVA”, “PVA-CD”, “PVA-lim” y “PVA-CD/lim”, respectivamente.

Las cantidades de β -ciclodextrina y d-limoneno utilizadas son tales que los sistemas PVA-CD y PVA-lim incorporan la misma cantidad de moles de d-limoneno que de β -ciclodextrina, respectivamente. De esta forma, en el sistema PVA-CD/lim se obtiene una relación molar 1:1 entre ambos compuestos, lo cual optimizaría la eficiencia de encapsulación de acuerdo a la bibliografía consultada (Decock, Landy, Surpateanu, & Fourmentin, 2008).

Las soluciones de electrohilado fueron caracterizadas de acuerdo a su conductividad eléctrica, su viscosidad y a su aspecto visual. Todos los mallados obtenidos fueron caracterizados por microscopía FE-SEM, espectroscopía FTIR, difracción de rayos X y análisis termogravimétrico. Se estimó la solubilidad

en agua del mallado PVA y la cantidad de d-limoneno y β -ciclodextrina liberados en agua mediante experimentos de carbono total orgánico. Para los mallados conteniendo d-limoneno, se evaluó la biodegradabilidad mediante experimentos de respirometría y la actividad antimicrobiana mediante experimentos de difusión en agar. Los detalles experimentales fueron descriptos en la Sección 2.8.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Propiedades de las soluciones

La Tabla 3.1 resume las composiciones de las soluciones de electrohilado y presenta sus propiedades. La solución de PVA resultó completamente transparente y presentó una conductividad de $(868 \pm 10) \mu\text{S/cm}$ y una viscosidad de $(285 \pm 3) \text{ cP}$. La solución PVA-CD también fue transparente, indicando que la β -ciclodextrina permanece disuelta, y presentó una conductividad de $(791 \pm 10) \mu\text{S/cm}$ y una viscosidad de $(402 \pm 4) \text{ cP}$. Al respecto, se observa una conductividad levemente menor ($\sim 8\%$) respecto a la solución sin ciclodextrina, y una viscosidad considerablemente mayor ($\sim 41\%$).

La solución PVA-lim resultó ligeramente turbia, sugiriendo una separación de fases entre el compuesto hidrofóbico y la solución polimérica acuosa. Presentó una conductividad de $(870 \pm 10) \mu\text{S/cm}$ y una viscosidad de $(287 \pm 3) \text{ cP}$. Tanto la conductividad como la viscosidad no presentaron diferencias significativas respecto a los valores obtenidos en la solución PVA. La solución PVA-CD/lim no fue transparente como en los casos anteriores, sino de color blanco y opaca. Este cambio en la coloración indica la formación de una segunda fase que permanece en suspensión y consigue dispersar la luz visible. Aquí se evidencia la formación de complejos de inclusión β -ciclodextrina/d-limoneno en el seno de la solución. La conductividad resultó $(802 \pm 10) \mu\text{S/cm}$ y la viscosidad $(292 \pm 3) \text{ cP}$. La conductividad resultó levemente menor respecto a la solución PVA ($\sim 8\%$ menor) y no mostró diferencias significativas respecto a la solución de PVA incorporando β -ciclodextrina. Por su parte, la viscosidad fue similar a la obtenida en la solución PVA.

Tabla 3.1: Composición y propiedades de las soluciones. AC: ácido cítrico; β -CD: β -ciclodextrina; Lim: d-limoneno.

Sistema	Agua (g)	PVA (g)	AC (g)	β -CD (g)	Lim (g)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	Viscosidad (cP)	Aspecto
PVA	88	12	0,6	-	-	868 ± 10	285 ± 3	Transparente
PVA-CD	88	12	0,6	3,6	-	791 ± 10	402 ± 4	Transparente
PVA-lim	88	12	0,6	-	0,31	870 ± 10	287 ± 3	Turbia
PVA-CD/lim	88	12	0,6	3,6	0,31	802 ± 10	292 ± 3	Blanco (opaco)

En general, los parámetros de una solución de electrohilado condicionan la morfología y tamaño de las fibras que se obtienen (Haider, Haider, & Kang, 2018). Para el caso particular del PVA empleado en esta tesis, se ha reportado que cambios en la conductividad y viscosidad del orden de magnitud de los observados no modifican de manera significativa la morfología del material obtenido (Cimadoro, 2020). Teniendo en consideración los estudios presentados en la tesis doctoral de Cimadoro (2020), se utilizaron los mismos parámetros en el proceso de fabricación de los mallados, siendo esperable que no haya cambios significativos en la morfología de los materiales.

3.3.2. Mallados de PVA

3.3.2.1. Características fisicoquímicas

La Figura 3.1 presenta una micrografía SEM típica de las fibras obtenidas y el histograma correspondientes al diámetro de fibra. Las fibras de PVA presentaron una morfología cilíndrica y no se observaron defectos (comúnmente llamados *beads*) ni acumulación de material. Además, la orientación resultó aleatoria. La distribución de diámetros de fibra de PVA resultó angosta y simétrica, mostrando un diámetro medio, coincidente con el más probable, de (120 ± 20) nm.

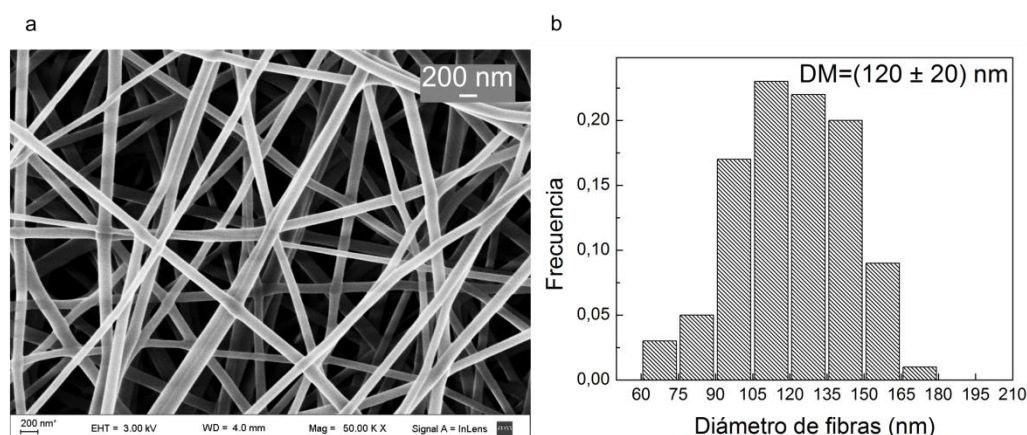


Figura 3.1. Micrografías SEM representativas de los mallados PVA (a) e histogramas correspondientes al diámetro de fibras (b). Se reporta el diámetro medio (DM).

La Figura 3.2 presenta el espectro FTIR (a) y el patrón de difracción de rayos X del mallado PVA (b). Respecto al espectro infrarrojo, se observan las bandas características asociadas a las vibraciones de los grupos funcionales del polímero: estiramiento del enlace O-H (3300 cm^{-1}), estiramiento de los enlaces alquilo C-H (2854 cm^{-1} y 2940 cm^{-1}), estiramiento del enlace C-O (1093 cm^{-1}) y flexión del grupo C-H₂ (1426 cm^{-1}). El entrecruzamiento del PVA con ácido cítrico puede evidenciarse por la aparición de la banda a 1721 cm^{-1} (López-Córdoba et al., 2016). Por otra parte, se obtuvo un patrón de difracción característico de un polímero semicristalino (Figura 3.2b). Allí se presenta un halo amorfo entre $\sim 14^\circ$ y

$\sim 30^\circ$ sobre el cual aparecen montados diferentes picos asociados a una fase cristalina. Los picos centrados en $11,4^\circ$, $19,4^\circ$, $19,8^\circ$ y $22,7^\circ$ se asocian a los planos (100), (101-), (101) y (200), respectivamente (Liu, Chen, Liu, Tian, & Liu, 2019). En el PVA, esta estructura semicristalina consiste en zonas amorfas de polímero intercaladas con regiones cristalinas, las cuales se forman por un ordenamiento de cadenas que surge de interacciones puente de hidrógeno entre las mismas (Ohsaku, Hatamoto, Murata, & Imamura, 1982).

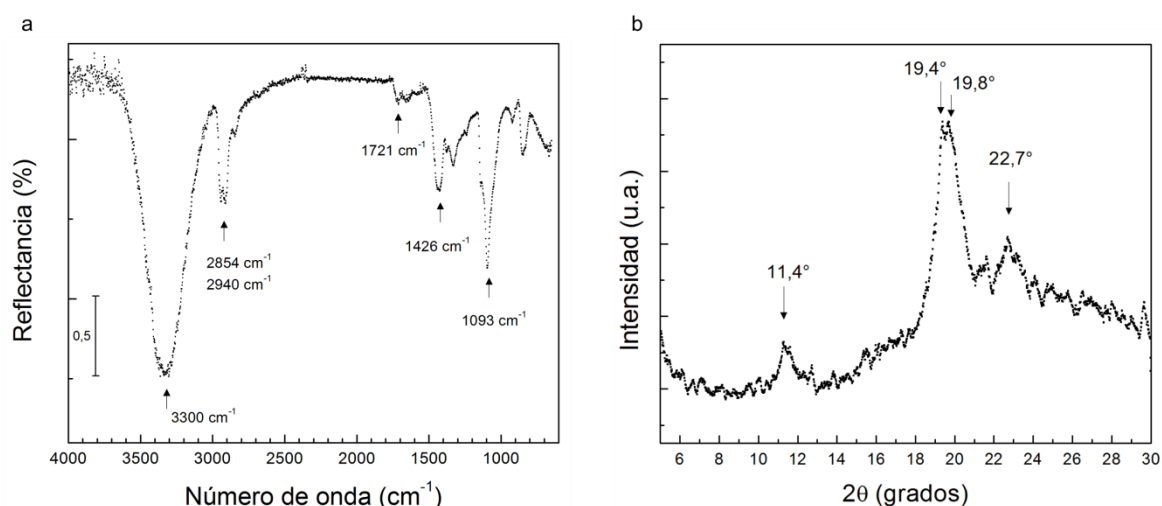


Figura 3.2. (a) Espectro FTIR de un mallado de PVA luego del tratamiento térmico y (b) patrón de difracción de rayos X del mallado.

En la Figura 3.3 se presenta la curva de degradación térmica del mallado PVA y su derivada respecto a la temperatura. La degradación del mallado PVA se produce en cuatro etapas, evidenciadas por el mismo número de escalones en la curva. El primero ocurre desde temperatura ambiente hasta $\sim 100^\circ\text{C}$, donde se pierde el $\sim 2\%$ de la masa, y corresponde a la pérdida de volátiles tales como agua absorbida y ácido cítrico no reaccionante. El segundo escalón de pérdida de masa se encuentra en el rango $210\text{--}250^\circ\text{C}$, donde se pierde aproximadamente 2% de la masa y corresponde a la degradación de grupos laterales del polímero (recuadro en la Figura 3.2). Luego, en el tercer escalón ($270\text{--}370^\circ\text{C}$), se observa la mayor pérdida de masa, la cual está asociada a la degradación de la cadena principal del polímero. Finalmente, el cuarto escalón ($370\text{--}470^\circ\text{C}$) corresponde a la descomposición de los subproductos obtenidos (Ribba, 2017).

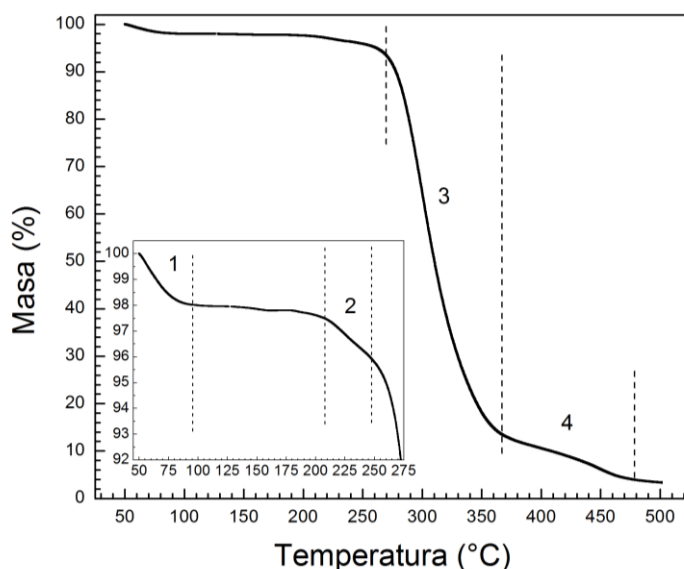


Figura 3.3. Curva de degradación térmica del mallado de PVA. Las líneas puntuadas señalan los cuatro pasos de la degradación. En el recuadro se observa una ampliación del rango 50-275 °C.

3.3.3. Mallados de PVA incorporando β -ciclodextrina

3.3.3.1. Características fisicoquímicas

La Figura 3.4 presenta micrografías SEM de las fibras obtenidas del sistema PVA-CD, y el histograma correspondiente al diámetro de dichas fibras. La morfología fue similar respecto al mallado PVA, es decir, se obtuvieron fibras cilíndricas sin defectos y la orientación fue aleatoria, lo cual evidencia que la presencia de β -ciclodextrina no interfirió con la continuidad del jet durante el proceso de fabricación. El diámetro medio resultó (130 ± 30) nm y coincidió con el más ocurrente. Este parámetro no presentó diferencias significativas respecto al correspondiente a las fibras PVA. Por un lado, esto confirma que las diferencias observadas en las propiedades de las soluciones de partida (Tabla 3.1) no afectan de forma significativa la morfología del material. Este análisis concuerda con lo reportado por Cengiz y col. (2010), quienes concluyeron que la distribución de diámetros de fibras electrohiladas de PVA no varía significativamente incluso con un aumento considerable de la viscosidad ($\sim 128\%$) y una disminución significativa de la conductividad ($\sim 15\%$) de las soluciones. Por otro lado, la ausencia de defectos muestra que la β -ciclodextrina no se aglomeró en tamaños superiores al diámetro de fibra. Considerando que las ciclodextrinas forman agregados cristalinos, la ausencia de estos en tamaños menores al de fibra se confirmará por difracción de rayos X.

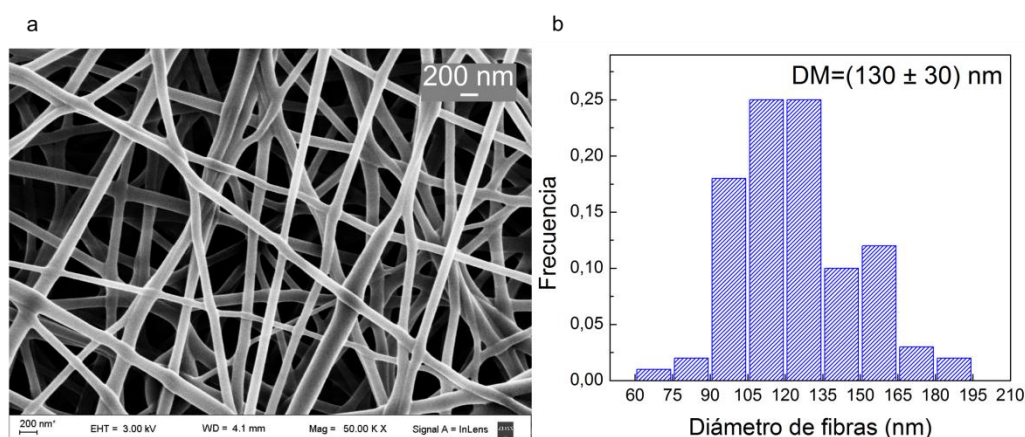


Figura 3.4. (a) Micrografía SEM representativa del mallado PVA-CD, e histograma correspondiente al diámetro de fibras (b). Se reporta el diámetro medio (DM).

La Figura 3.5 presenta el espectro FTIR del PVA-CD y de la β -ciclodextrina. Con fines comparativos, también se incluye el espectro del mallado PVA. El espectro de la β -ciclodextrina presentó las bandas típicas de los grupos funcionales presentes: estiramiento del enlace O-H (3300 cm^{-1}), estiramiento del grupo alquilo C-H (2923 cm^{-1}), flexión del enlace O-H (1649 cm^{-1}), estiramiento asimétrico del enlace C-O-C en el enlace glucosídico (1160 cm^{-1}), estiramiento de enlaces C-C (1027 cm^{-1}) y estiramiento de enlaces C-O (1080 cm^{-1}). Por su parte, el espectro del mallado PVA-CD resultó similar al del mallado PVA con algunas diferencias puntuales. Se observa la presencia de dos picos de similar intensidad centrados en 1082 cm^{-1} y 1034 cm^{-1} (Figura 3.2b). Ambas bandas surgen de la superposición de los espectros del PVA y de la β -ciclodextrina: vibración C-O en el PVA (1093 cm^{-1}) superpuesta con las vibraciones del enlace C-O (1080 cm^{-1}) y C-C (1027 cm^{-1}) de la β -ciclodextrina. Por otro lado, al comparar el espectro del PVA con el del PVA-CD, se observa una diferencia en la intensidad relativa de las bandas correspondientes a las vibraciones C-H (2854 cm^{-1} y 2940 cm^{-1}), la cual también puede asociarse a la superposición de los espectros del PVA y de la β -ciclodextrina. Otros autores han estudiado la formación de puentes de hidrógeno entre el PVA y β -ciclodextrina en mallados de electrohilado (Wen et al., 2016). Sin embargo, aquí no se observaron corrimientos ni asimetrías en la banda asociada a los grupos O-H en el sistema PVA-CD, por lo que no es posible obtener conclusiones respecto a posibles interacciones. Al respecto, los cambios observados en las intensidades relativas se explican como la superposición de los espectros de las moléculas involucradas.

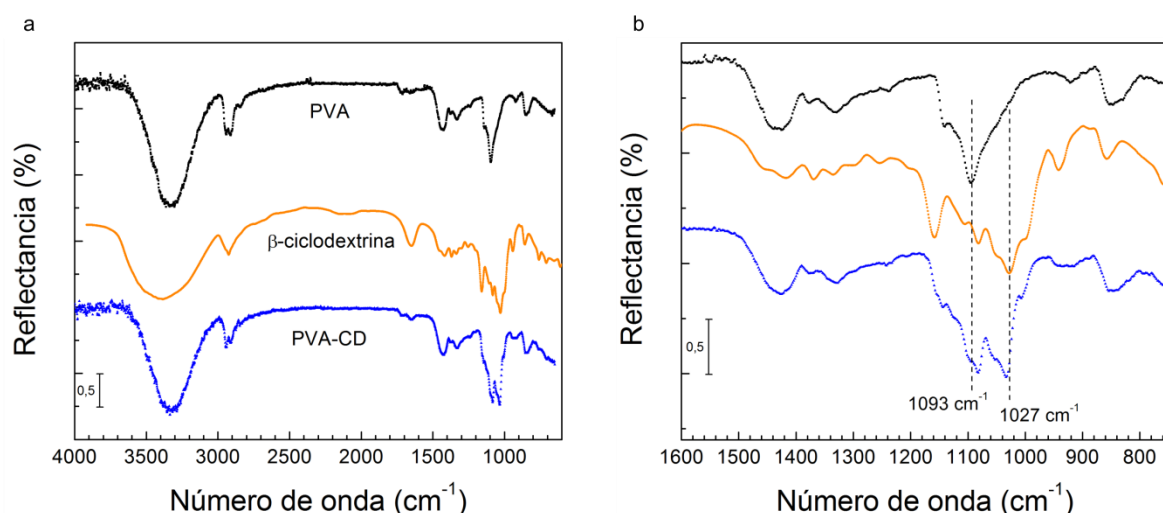


Figura 3.5. (a) Espectros FTIR de los mallados PVA y PVA-CD y de β -ciclodextrina pura y (b) detalles de las diferencias en la región 1600-750 cm^{-1} .

La Figura 3.6 presenta el patrón de difracción de rayos X del mallado PVA-CD. A fines comparativos, se incluye el patrón de difracción del sistema PVA. El patrón de difracción de PVA-CD resultó semicristalino, con picos cristalinos en posiciones similares al patrón de difracción del mallado PVA. La ausencia de nuevos picos indica que la estructura cristalina presente es la misma que en el caso del mallado PVA. Cuando las moléculas de ciclodextrina se aglomeran forman cristalitas con estructuras específicas, que dependen de la especie de ciclodextrina y si se encuentran complejadas o no con otras moléculas (Papadopoulos, Karayianni, Tsakiridis, Perraki, & Hristoforou, 2010). Considerando el porcentaje relativamente alto de β -ciclodextrina incorporada al mallado, la ausencia de una nueva fase cristalina evidencia que la β -ciclodextrina se distribuye dentro del polímero sin agregarse.

Por otro lado, se observan algunas diferencias entre el patrón asociado al PVA y el del PVA-CD. En este último, los picos centrados a 11,4°, 19,8° y 22,7° presentan menor intensidad relativa y son más anchos respecto a los observados en el espectro de PVA. Esta diferencia indica una disminución en la cristalinidad del polímero ya que la relación entre el área bajo los picos cristalinos y el área del halo amorfo es menor. Este resultado sugiere que la presencia de las moléculas de β -ciclodextrina dificulta la alineación las cadenas poliméricas y cristalización del PVA. Otros autores también han reportado una disminución en la intensidad del pico cristalino del PVA en mallados de electrohilado que incorporan ciclodextrina en la formulación, aunque ninguno de los trabajos refiere a β -ciclodextrina incorporado sin formar complejo con otra molécula (Aytac, Dogan, Tekinay, & Uyar, 2014; Kayaci et al., 2013; Kayaci & Uyar, 2012).

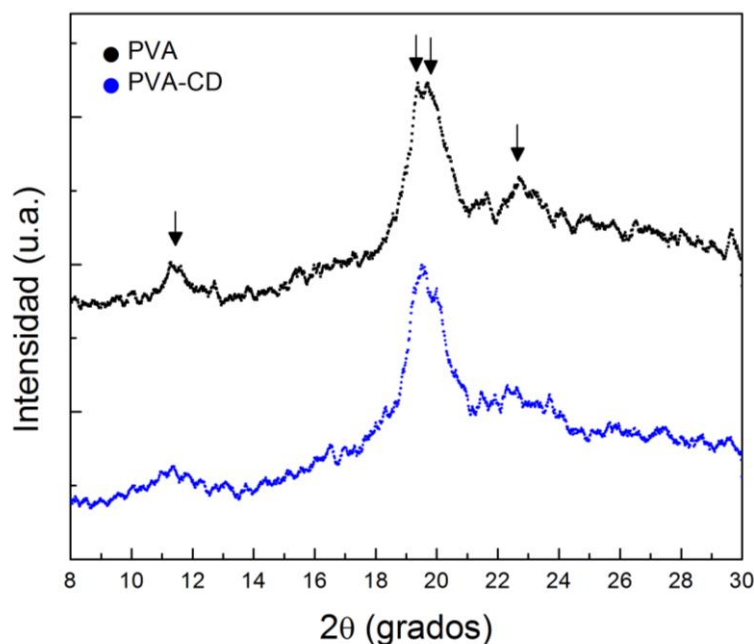


Figura 3.6. Patrón de difracción de rayos X de los mallados PVA y PVA-CD. Las flechas señalan los picos cristalinos asociados al PVA.

En la Figura 3.7 se presenta la curva de degradación térmica y su derivada para los mallados PVA y PVA-CD y para la β -ciclodextrina pura. La curva de degradación térmica del mallado PVA fue descrita anteriormente (Sección 3.2.2). La degradación térmica de la β -ciclodextrina ocurre en dos etapas. El primer escalón de pérdida de masa se asocia a la evaporación de agua absorbida por el polvo de β -ciclodextrina. Ocurre desde temperatura ambiente hasta $\sim 115^\circ\text{C}$ y se pierde $\sim 12\%$ de la masa. El segundo escalón, donde se observa la mayor pérdida de masa, ocurre entre 295°C y 360°C y corresponde a la descomposición de la molécula de ciclodextrina. Al finalizar dicho proceso se observa una pérdida de masa constante y de baja pendiente, asociada a la degradación de los subproductos.

El mallado PVA-CD presentó una curva de degradación similar a la del mallado PVA, pero el escalón de pérdida de masa asociado a la descomposición de la cadena principal del polímero muestra un corrimiento hacia mayores temperaturas y la pendiente de dicho escalón es significativamente menor en la degradación de PVA-CD. Además, al finalizar dicho escalón el remanente de masa de PVA es mayor. En principio, esta diferencia respecto al mallado PVA podría justificarse en la superposición de los procesos de degradación correspondientes al PVA y a la β -ciclodextrina y/o a interacciones que ocurran entre ambas moléculas. Al analizar la curva derivada respecto a la temperatura (Figura 3.7b), se observan los máximos de los picos principales de degradación en 300°C y en 323°C para el PVA y la β -ciclodextrina, respectivamente. Por su parte, el pico asociado a la degradación más importante en el mallado PVA-CD ocurre a 346°C y presenta un hombro a menores temperaturas. La presencia del

hombro indica que efectivamente el pico surge de la suma de dos procesos que ocurren de forma simultánea. Por otra parte, la temperatura máxima de degradación resultó superior a la correspondiente a cada una de las partes por separado, lo cual indica que efectivamente ocurren interacciones químicas entre ambas moléculas, lo que permite estabilizarlas térmicamente.

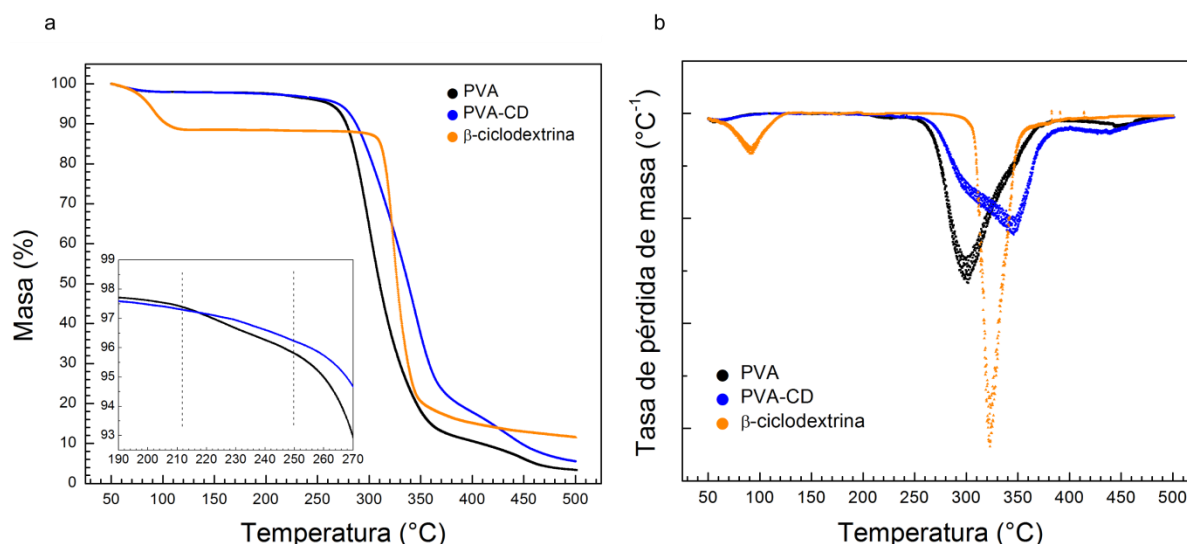


Figura 3.7. Curva de análisis termo-gravimétrico para los mallados PVA y PVA-CD y para la β-ciclodextrina pura (a), y derivada de la curva respecto a la temperatura (b). En el recuadro de (a) se muestra ampliado el rango 190-270 °C.

3.3.4. Mallados de PVA incorporando d-limoneno

3.3.4.1. Características fisicoquímicas

La Figura 3.8 presenta una micrografía SEM típica del material obtenido, y el correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra. Las fibras del mallado PVA-lim presentaron un aspecto cilíndrico sin presencia de defectos ni acumulación de material, con una superficie lisa y su orientación fue aleatoria. La distribución de diámetros de fibra resultó angosta y aproximadamente simétrica. Se obtuvo un diámetro medio de fibra de (140 ± 30) nm. Tanto la morfología como el tamaño de las fibras de PVA-lim no presentaron diferencias significativas respecto al mallado PVA (Sección 3.3.2). Una morfología similar indica que el d-limoneno se distribuye en las fibras sin formar gotas o aglomerados. El tamaño y la morfología de las fibras resultó diferente respecto a lo reportado por Camerlo et al. (2013), quienes produjeron fibras de PVA conteniendo d-limoneno por electrohilado de una emulsión (11,1% d-limoneno respecto a solución de PVA). En dicho trabajo, el diámetro medio de fibras reportado fue (790 ± 230) nm y se observaron deformaciones de las fibras asociadas a la separación de fases. La diferencia en la morfología se justifica en que en el presente trabajo el porcentaje de d-limoneno

utilizado es considerablemente menor, lo cual podría haber evitado que se formen gotas de mayor tamaño que las fibras. En la literatura se ha reportado que la incorporación de componentes hidrofóbicos no afecta al diámetro de fibras electrohiladas de PVA si la concentración del compuesto es relativamente baja⁵. Se ha reportado que el diámetro medio de fibras se mantiene constante al incorporar 5% de vainillina (p/p respecto al polímero) o 5% de eugenol (p/p respecto al polímero) (Kayaci et al., 2013; Kayaci & Uyar, 2012).

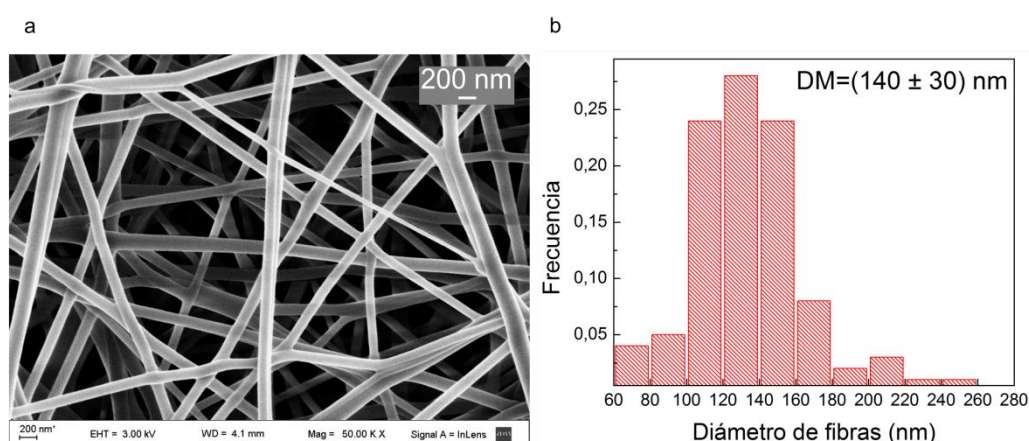


Figura 3.8. Micrografía SEM representativa del mallado PVA-lim (a) e histograma correspondiente al diámetro de fibras (b). Se reporta el diámetro medio (DM) obtenido.

La Figura 3.9a presenta el espectro FTIR del mallado electrohilados PVA-lim y del d-limoneno. Por fines comparativos, se incluye el espectro del mallado PVA. El espectro del d-limoneno presenta bandas asociadas a estiramientos de los enlaces alquilo (diversas bandas de baja intensidad en $3315\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$), estiramiento del enlace $\text{C}=\text{C}$ (1645 cm^{-1}), flexiones de los grupos C-H_2 y C-H_3 (1439 cm^{-1} y 1377 cm^{-1}), flexión $\text{C}=\text{C}$ (886 cm^{-1}). Por su parte, el mallado PVA-lim presentó las bandas características asociadas a los grupos funcionales del polímero: estiramiento del enlace O-H (3300 cm^{-1}), estiramiento de los enlaces alquilo C-H (2854 cm^{-1} y 2940 cm^{-1}), estiramiento del enlace C-O (1093 cm^{-1}) y flexión del grupo C-H_2 (1426 cm^{-1}). El espectro FTIR del mallado PVA-lim no mostró diferencias respecto al espectro del mallado PVA. Es decir, no se detectaron bandas características del d-limoneno, lo cual puede deberse al bajo porcentaje en masa incorporado. Adicionalmente, durante el proceso de fabricación se pudieron perder cantidades significativas de d-limoneno, lo cual disminuiría la relación en masa entre éste y el polímero. Por otro lado, la mayoría de las bandas del d-limoneno se encuentran en las mismas regiones que las bandas del PVA, lo cual dificulta su detección en el espectro de PVA-lim.

⁵ En trabajos en que se incorpora una cantidad relativamente alta del compuesto hidrofóbico se suelen observar esferas (*beads*) insertas en las fibras, las cuales corresponden a gotas del compuesto recubiertas por el polímero (Camerlo et al., 2013).

Con el objetivo de detectar la presencia del d-limoneno en los mallados PVA-lim, se analizaron muestras por espectroscopía Raman. La espectroscopía Raman detecta cambios en la polarización de los enlaces presentes en el compuesto que es irradiado, permitiendo identificar algunos enlaces que no son visibles por espectroscopía FTIR, la cual detecta cambios del momento dipolar de los enlaces. Al respecto, otros autores se valieron de espectroscopía Raman para detectar aceites esenciales en mallados de electrohilado de celulosa (Liakos et al., 2015). La Figura 3.9b presenta los espectros Raman de los mallados PVA y PVA-lim y del d-limoneno puro en la región $1400\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$. El d-limoneno presenta dos bandas angostas e intensas centradas en 1639 cm^{-1} y 1671 cm^{-1} que corresponden a vibraciones del grupo vinilideno y del enlace alqueno del anillo (tri-sustituido), respectivamente (Miller, 2004). Las bandas asociadas a estos grupos son relativamente intensas y no se superponen en el espectro Raman con bandas de PVA, constituyendo una herramienta adecuada para detectar d-limoneno. Efectivamente, en el espectro del mallado PVA-lim fueron observadas ambas bandas con menor intensidad relativa, confirmando la presencia del d-limoneno en el material.

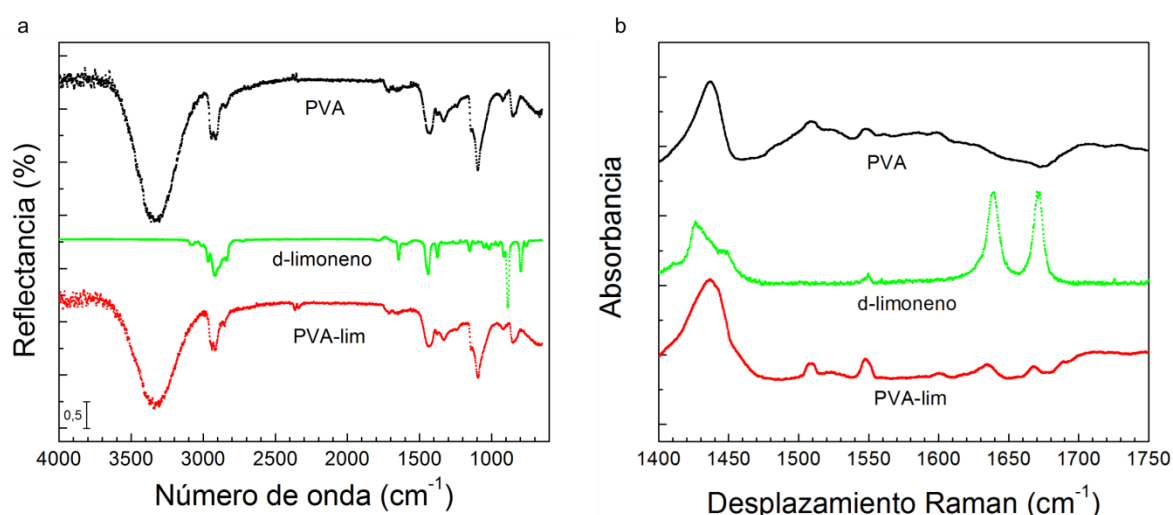


Figura 3.9. (a) Espectros FTIR de los mallados PVA y PVA-lim y de d-limoneno y (b) espectros Raman de los mismos en la región $1400\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$.

La Figura 3.10 presenta el patrón de difracción de rayos X de los mallados PVA y PVA-lim y las curvas de análisis termogravimétrico de los mallados PVA y PVA-lim y del d-limoneno puro. El patrón de difracción del mallado PVA-lim resultó similar al correspondiente al PVA, presentando los picos correspondientes a la fase cristalina del PVA (centrados en $11,4^\circ$, $19,4^\circ$, $19,8^\circ$ y $22,7^\circ$). No se observaron cambios significativos en el ancho o intensidad de los picos cristalinos. Ambas descripciones indican que el d-limoneno incorporado no altera la estructura semi-cristalina del PVA. Respecto a la degradación térmica, el d-limoneno puro se evapora completamente en el rango $50\text{-}100^\circ\text{C}$, lo cual es característico de los compuestos volátiles. Por su parte, la degradación térmica del mallado PVA-lim no presentó

diferencias significativas respecto a la curva correspondiente al PVA. La evaporación o degradación del d-limoneno incorporado a las fibras podría estar enmascarada dentro de la degradación del PVA. Esta hipótesis se fundamenta en la amplia diferencia de masa entre el PVA y el d-limoneno en la composición de la solución de electrohilado (d-limoneno constituye el 2,6% p/p respecto al polímero). Además, parte del d-limoneno podría haber sido evaporado durante el proceso de electrohilado o del tratamiento térmico, lo cual conduciría a una diferencia de masa aún mayor respecto al polímero.

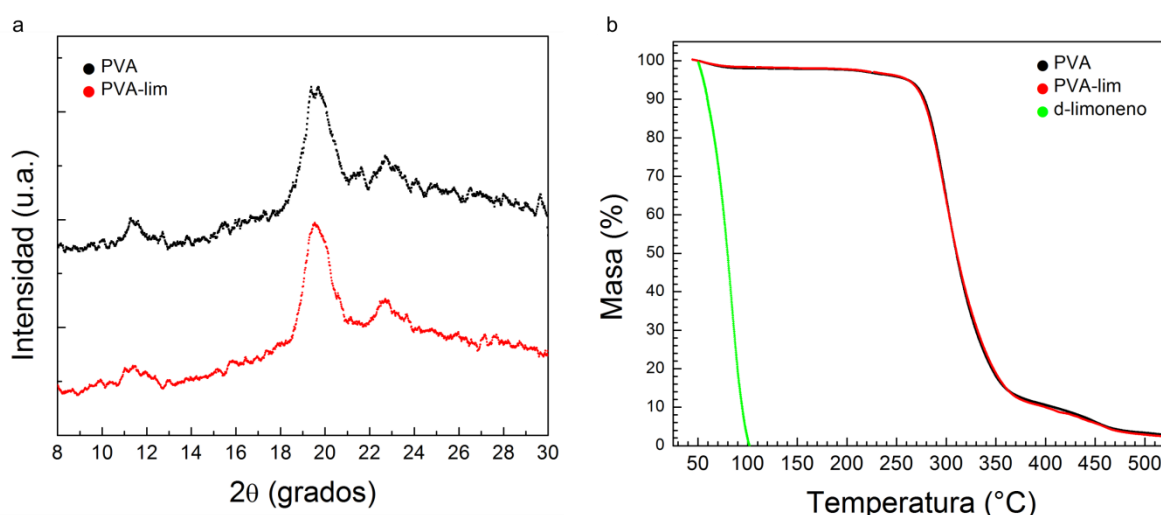


Figura 3.10. (a) Patrón de difracción de rayos X de los mallados PVA y PVA-lim y (b) curvas de análisis térmogravimétricos para los mallados correspondientes y el d-limoneno puro.

3.3.4.2. Estimación de d-limoneno incorporado, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana

Se determinó la cantidad de d-limoneno liberado en agua de manera indirecta siguiendo una metodología desarrollada por otros autores (Kfoury, Auezova, Greige-Gerges, & Fourmentin, 2016). Esta metodología consiste en medir el carbono total orgánico disuelto en agua y, a partir del valor obtenido, calcular la cantidad de compuesto mediante la relación entre el peso de carbono de la molécula y el peso molecular total. Para el sistema PVA, se obtuvo una cantidad de $(9,8 \pm 0,8)$ mg C/g de muestra. Esta cantidad de carbono fue asociada a la parte soluble del polímero. Al aplicar la relación entre el peso de los carbonos del PVA y su peso molecular total, se obtuvo que un $(1,8 \pm 0,2)$ % del PVA fue disuelto luego de 24 h. Este valor de solubilidad es similar al reportado previamente para mallados de PVA entrecruzados con ácido cítrico y fabricados bajo las mismas condiciones (López-Córdoba et al., 2016), lo cual demuestra la utilidad de esta técnica para determinar dicho parámetro. Para el mallado PVA-lim, se midió una cantidad de $(14,17 \pm 0,09)$ mg C/g de muestra. Este valor es superior en $(4,4 \pm 0,9)$ mg C/g de muestra respecto al sistema control. Asumiendo que el d-limoneno no afectó la insolubilización del

material en el tratamiento térmico, el excedente medido de carbono fue asociado al d-limoneno disuelto. Bajo esta hipótesis, se calculó que fueron liberados (5 ± 1) mg d-limoneno/g de muestra. Este valor corresponde al (21 ± 4) % del valor teórico de d-limoneno en el material (Tabla 3.1).

Se realizaron experimentos de respirometría en suspensión acuosa de bacterias. Allí se midió el dióxido de carbono producido durante la biodegradación de muestras por colonias de *E. coli*. Considerando a los mallados como la única fuente de carbono disponible, se normalizó respecto a la masa de la muestra para obtener el porcentaje de pérdida de masa en función del tiempo. La Figura 3.11 presenta los resultados obtenidos. Para el mallado PVA (muestra control), se observan dos etapas de biodegradación. En la primera, que abarca desde el inicio del ensayo hasta los ~ 700 min, la curva presenta una forma convexa. Luego, entre 700 min y 1200 min, la misma sigue una tendencia lineal. La tasa de pérdida de masa para la segunda parte de la curva, determinada por ajuste lineal por cuadrados mínimos, resultó $(0,511 \pm 0,003)$ %/h. Para la muestra PVA-lim, se observa una biodegradación significativamente menor en el rango estudiado. En este caso, la curva muestra una tendencia lineal en todo el ensayo. El ajuste lineal arrojó una tasa de biodegradación de $(0,0834 \pm 0,0004)$ %/h. Esta tasa de biodegradación es aproximadamente 6 veces más baja que la del material control, y en 20 h se logró una pérdida de masa de $\sim 1,7\%$ en el mallado PVA-lim frente a $\sim 10,2\%$ en el mallado control. Los resultados aquí expuestos evidencian que la incorporación del d-limoneno en el mallado de PVA previene la biodegradación del material por parte de *E. coli*. Este fenómeno se asocia a que parte del d-limoneno permanece en el mallado de PVA y no migra hacia el agua. Este análisis concuerda con lo discutido en el párrafo anterior, donde se indicó que solo el $\sim 21\%$ del contenido teórico de d-limoneno fue liberado en agua luego de 24 h.

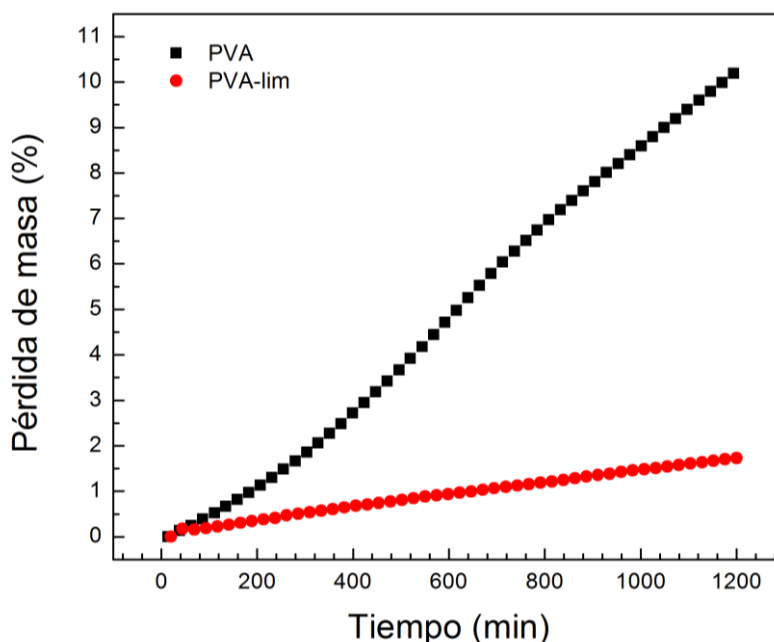


Figura 3.11. Pérdida porcentual de masa en función del tiempo para muestras de PVA y PVA-lim inmersas en suspensión de *E. coli*. Se realizaron ajustes por cuadrados mínimos a cada curva ($y=a.x+b$).

Parámetros obtenidos para PVA: $a = (0,00851 \pm 0,00005) \text{ \%/min}$, $b = (0,07 \pm 0,05) \text{ \%}$, $R^2 = 0,999$;
 parámetros obtenidos para PVA-lim: $a = (0,00139 \pm 0,00001) \text{ \%/min}$, $b = (0,090 \pm 0,007) \text{ \%}$, $R^2 = 0,998$.

Finalmente, se determinó la actividad antimicrobiana mediante ensayos de difusión en agar frente a *E. coli*. Al realizar este ensayo, se espera que las bacterias crezcan en el agar salvo en el área circundante al disco del material activo, donde se observa un halo libre de bacterias producto de la migración del principio antimicrobiano. La Figura 3.12 presenta fotografías típicas obtenidas en los ensayos luego de 24 h. No se observó en la muestra PVA ni en la muestra PVA-lim un halo de inhibición que evidencie actividad antimicrobiana. Considerando la demostrada actividad bactericida del d-limoneno frente a *E. coli* (Espina, Gelaw, de Lamo-Castellví, Pagán, & García-Gonzalo, 2013), el resultado obtenido indica que la cantidad de d-limoneno que migra al hidrogel es demasiado baja para evitar el crecimiento bacteriano. Por un lado, el contenido de d-limoneno incorporado en las muestras es bajo (2,6% p/p) y además pudieron haber pérdidas importantes durante el proceso de electrohilado y posterior tratamiento térmico. Por otro lado, el carácter hidrofóbico del d-limoneno podría impedir que este migre hacia el hidrogel. Considerando los resultados de respirometría presentados previamente, el principio activo actuaría sobre el material, impidiendo que este sea consumido por las bacterias, pero no sería capaz de migrar para evitar el crecimiento bacteriano fuera del material.

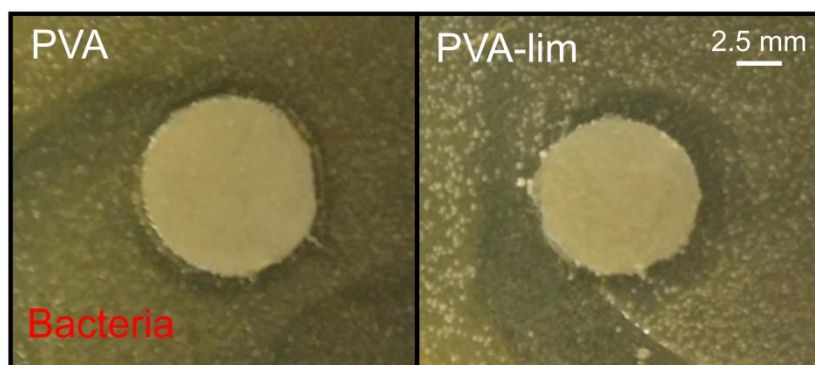


Figura 3.12. Ensayos de difusión en agar contra *E. coli* para las muestras PVA y PVA-lim. No se observó halo de inhibición en ninguno de los mallados.

3.3.5. Mallados de PVA incorporando d-limoneno encapsulado en β -ciclodextrina

3.3.5.1. Características fisicoquímicas

La Figura 3.13 presenta una micrografía SEM típica del material obtenido y el correspondiente histograma de distribución de diámetros de fibra. Las fibras presentaron un aspecto cilíndrico y no se observaron defectos ni acumulación de material. La orientación es aleatoria y se observa que algunas fibras se adhieren de a pares. La distribución de diámetros de fibra resultó angosta y simétrica y se obtuvo un diámetro medio de (280 ± 80) nm. El diámetro de las fibras de este mallado resultó significativamente mayor respecto al mallado control de PVA ($DM = (120 \pm 20)$ nm). El aumento en el diámetro podría estar ocasionado por la presencia de complejos β -ciclodextrina/d-limoneno, los cuales se forman al preparar la solución de electrohilado, como fue evidenciado por el cambio de color de la solución. Dichos complejos de inclusión formarían cristalitos que permanecen en suspensión en la solución polimérica y luego son incorporados dentro de las fibras de electrohilado. Como resultado, las fibras poliméricas aumentan su tamaño al recubrirlos. En trabajos de la literatura se ha reportado la formación de agregados de complejos de inclusión de mayor tamaño que las fibras, por ejemplo para β -ciclodextrina/eugenol, γ -ciclodextrina/geraniol y γ -ciclodextrina/vanilina (Kayaci et al., 2013, 2014; Kayaci & Uyar, 2012). En esta tesis, si bien se observó un incremento en el diámetro de fibras, la metodología desarrollada permitió obtener fibras homogéneas sin defectos ni acumulación de material.

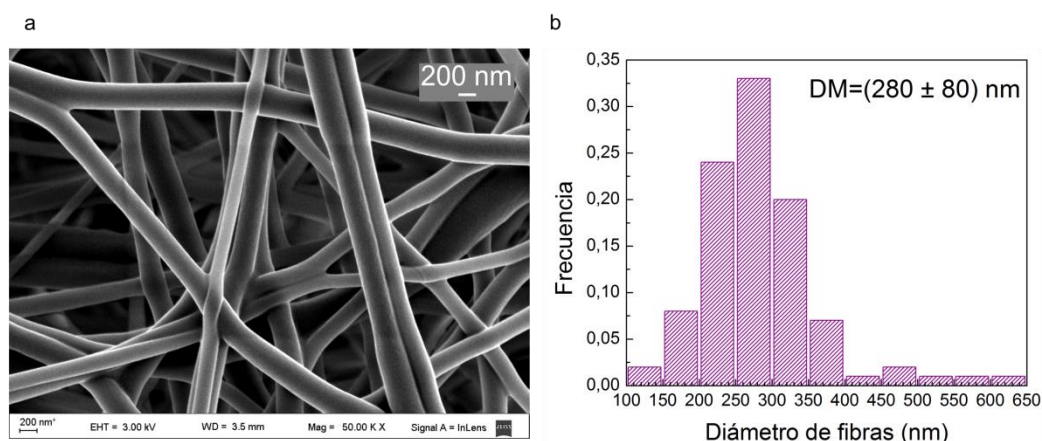


Figura 3.13. Micrografía SEM representativa del mallado PVA-CD/lim (a) e histograma correspondientes al diámetro de fibras (b). Se reporta el diámetro medio (DM) obtenido.

La Figura 3.14 presenta el espectro FTIR (a) y el espectro Raman (b) del mallado electrohilado PVA-CD/lim. Con fines comparativos, se incluyó el espectro FTIR de los mallados PVA y PVA-CD y el espectro Raman de los mallados PVA y PVA-lim. El espectro FTIR del mallado PVA-CD/lim resultó similar al correspondiente al mallado PVA-CD (Figura 3.14a). En particular, se observan las bandas características del PVA, descritas anteriormente, y las dos bandas que resultan de la superposición del espectro del PVA con el espectro de la β -ciclodextrina (Figura 3.14b), lo cual también fue descrito previamente. Nuevamente, la espectrometría FTIR no permitió detectar la presencia del d-limoneno y el espectro tampoco sufrió cambios debido a su incorporación. Luego, se midieron espectros Raman con el objetivo de detectar el d-limoneno incorporado (Figura 3.14c). En el espectro Raman del mallado PVA-CD/lim, se observa la presencia de los dos picos característicos del d-limoneno centrados en 1639 cm^{-1} y 1671 cm^{-1} que corresponden a vibraciones del grupo vinilideno y del enlace alqueno del anillo (tri-sustituido), tal como fue descrito anteriormente. Estas bandas se presentan tanto en el mallado PVA-lim como en el mallado PVA-CD/lim, evidenciando la presencia del compuesto activo dentro de ambos materiales.

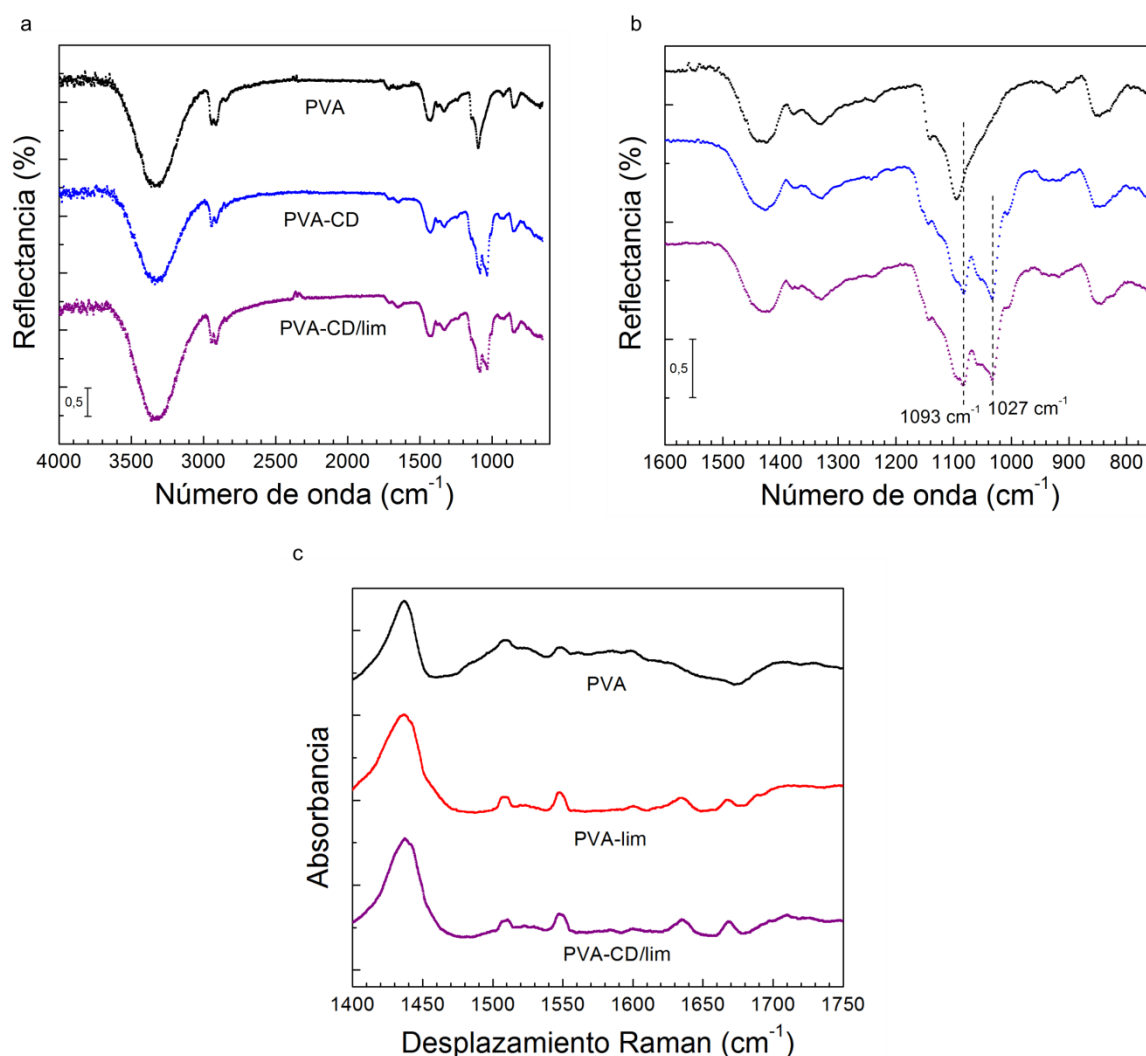


Figura 3.14. (a) Espectros FTIR de los mallados PVA, PVA-CD y PVA-CD/lim y (b) espectros Raman de los mallados PVA, PVA-lim y PVA-CD/lim en la región 1400-1750 cm^{-1} .

La Figura 3.15 presenta el patrón de difracción de los mallados PVA y PVA-CD/lim. El patrón de difracción de PVA-CD/lim resultó semi-cristalino, con un halo amorfo en el rango 14-30° y picos cristalinos en 5,8°, 11,7°, 18,4°, 19,6° y 22,7°. Los picos centrados en 19,6° y 22,7° corresponden a la fase cristalina del PVA, tal como fue discutido previamente. Los picos centrados en 5,8°, 11,7° y 18,4° corresponden a una nueva fase cristalina asociada a los complejos de inclusión β -ciclodextrina/d-limoneno. De acuerdo a la literatura, la estructura cristalina de β -ciclodextrina varía si se forman o no complejos de inclusión con otra molécula. En el primer caso, las moléculas de ciclodextrina suelen formar una estructura tipo canal, en el que las cavidades se alinean y las filas de moléculas se apilan unas sobre las otras (Kayaci & Uyar, 2012). La posición de los picos cristalinos característicos de esta estructura se corresponde a la observada en el presente trabajo (Kayaci et al.,

2014). El pico centrado a $11,7^\circ$ se interpreta como la superposición de un pico cristalino de la fase β -ciclodextrina/d-limoneno con un pico cristalino de la fase cristalina del PVA, de relativa baja intensidad de acuerdo al patrón del mallado PVA. En el mallado PVA-CD/lim, la presencia de una fase cristalina adicional asociada a complejos de inclusión confirma que las moléculas de β -ciclodextrina fueron capaces de encapsular al d-limoneno al preparar la solución de electrohilado. Este fenómeno fue previamente sugerido con el cambio de color de la solución al incorporar el d-limoneno, y con el cambio en la morfología de las fibras respecto al sistema PVA.

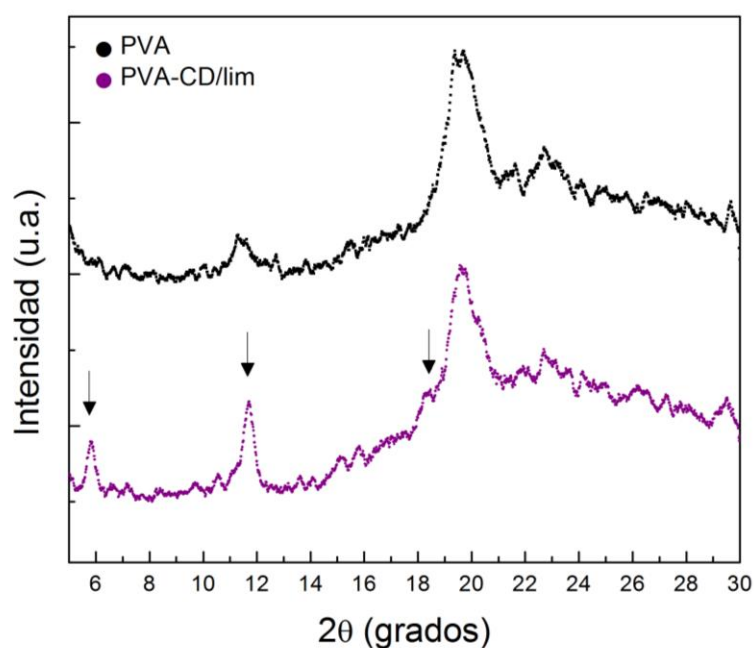


Figura 3.15. Patrón de difracción de rayos X de los mallados PVA y PVA-CD/lim. Las flechas sobre el patrón de PVA-CD/lim señalan la nueva fase cristalina, asociada a complejos de inclusión β -ciclodextrina/d-limoneno.

La Figura 3.16 presenta las curvas de análisis termogravimétrico para los mallados PVA, PVA-CD y PVA-CD/lim. La degradación térmica de PVA-CD/lim ocurre en 4 pasos y de manera similar al mallado PVA-CD. El primer escalón ocurre desde temperatura ambiente hasta $\sim 200^\circ\text{C}$ y está asociado a la pérdida de agua y ácido cítrico no reaccionante. En este escalón, puede observarse una pérdida de masa mayor ($\sim 0,5\%$) respecto al mallado PVA-CD (Figura 3.13b), lo cual podría estar asociado a la pérdida parcial de d-limoneno. El segundo escalón, en el rango $210\text{--}250^\circ\text{C}$ está asociado a la degradación de grupos laterales del PVA. Al finalizar este escalón, puede observarse una diferencia de $\sim 1,2\%$ de masa respecto a la degradación de PVA-CD (Figura 3.13 c), lo cual podría deberse al d-limoneno encapsulado que evapora paulatinamente a medida que aumenta la temperatura del ensayo. El tercer escalón

(270-370 °C) se asocia a la degradación térmica de la cadena principal del polímero. Este proceso resultó similar para los mallados PVA-CD y PVA-CD/lim, presentando un corrimiento hacia mayores temperaturas respecto al proceso análogo en el mallado PVA. Tal como fue analizado previamente, este corrimiento se debe a la superposición de la degradación del PVA y de la β -ciclodextrina y a interacciones entre ambas moléculas. Finalmente, el cuarto escalón (370-470 °C) corresponde a la descomposición de los subproductos obtenidos. En este último paso, se observa una pérdida de masa mayor en el mallado PVA-CD/lim respecto al mallado PVA-CD. En 500 °C, esta diferencia es aproximadamente 1,8% y puede relacionarse al d-limoneno incorporado en este material. Asumiendo que la diferencia solo se debe al d-limoneno, dicha cantidad se corresponde con el 96% del principio activo incorporado en la solución (Tabla 3.1).

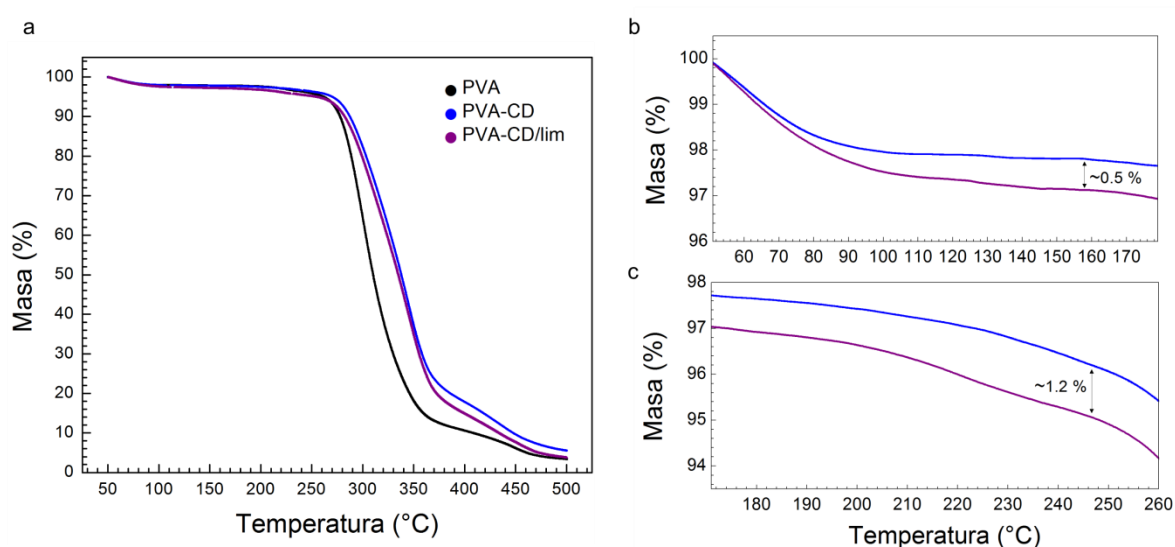


Figura 3.16. Análisis termogravimétrico de los mallados PVA, PVA-CD y PVA-CD/lim. Detalles en los rangos 50-180 °C (b) y 170-260 °C (c).

3.3.5.2. Estimación de d-limoneno incorporado, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana

Se determinó la cantidad de β -ciclodextrina y de complejos de inclusión liberados en agua desde mallados PVA-CD y PVA-CD/lim midiendo el carbono orgánico total de la solución luego de 24 h de inmersión de los materiales. Para el sistema PVA, este experimento había arrojado como resultado $(9,8 \pm 0,8)$ mg C/g de muestra, lo cual se asociaba a fragmentos solubles del polímero. Para el caso del mallado PVA-CD, el resultado fue (90 ± 10) mg C/g de muestra. Asumiendo que la presencia de β -ciclodextrina no afecta la insolubilización del polímero por tratamiento térmico, la cantidad de carbono medido en la muestra PVA-CD se corresponde con el (80 ± 10) % de la β -ciclodextrina

incorporada teóricamente (Tabla 3.1). Por su parte, el carbono liberado en agua desde PVA-CD/lim resultó (52 ± 4) mg/ g de muestra. Este valor resultó significativamente menor respecto al obtenido para el sistema PVA-CD, lo cual se asocia a la menor solubilidad de una estructura cristalina como la formada por los complejos de inclusión. Asumiendo que la presencia de β -ciclodextrina y d-limoneno no afectó la insolubilización del material y que cada molécula de β -ciclodextrina se libera formando un complejo con una molécula de d-limoneno, se determinó que fue liberado el (37 ± 5) % del principio activo. Si bien este valor es superior al determinado para el material PVA-lim $((21 \pm 4) \%)$, debe tenerse en cuenta que el mismo puede estar sobreestimado, ya que no se contempló como hipótesis la liberación de moléculas de β -ciclodextrina que pudieron ser incorporadas sin formar complejos de inclusión.

Se realizaron experimentos de respirometría para medir la biodegradabilidad de los materiales desarrollados. La Figura 3.17 presenta los resultados obtenidos para los materiales PVA-CD y PVA-CD/lim, y se incluye con fines comparativos la curva presentada anteriormente del mallado PVA. Las tres curvas presentan un comportamiento similar: desde el inicio del ensayo hasta ~ 700 min se presenta una curva levemente convexa, y a partir de allí la biodegradación sigue un ritmo lineal. En 700 min, las curvas correspondientes a los materiales conteniendo β -ciclodextrina muestran un valor de degradación de ~ 6.8 %, que es ligeramente superior a la degradación del material PVA ($\sim 6,0$). En el rango 700-1200 min, las tres curvas presentaron una pendiente similar. El ajuste lineal para esta parte de la curva arrojó tasas de biodegradación de $(0,511 \pm 0,003)$ %/h, $(0,498 \pm 0,003)$ %/h y $(0,492 \pm 0,006)$ %/h para los sistemas PVA, PVA-CD y PVA-CD/lim, respectivamente. La tasa de pérdida de masa no presentó diferencias significativas entre los sistemas PVA-CD y PVA-CD/lim, a pesar de la presencia del compuesto antimicrobiano. En los mallados PVA-lim, donde el d-limoneno no estaba complejoado con β -ciclodextrina sí había sido observada una tasa de degradación considerablemente menor, resultado que fue asociado a la presencia de dicho compuesto (Sección 3.3.4). En este caso, es posible que la formación del complejo de inclusión inhiba la acción antimicrobiana del d-limoneno, razón por la cual las bacterias son capaces de degradar el mallado a la misma velocidad que al material control.

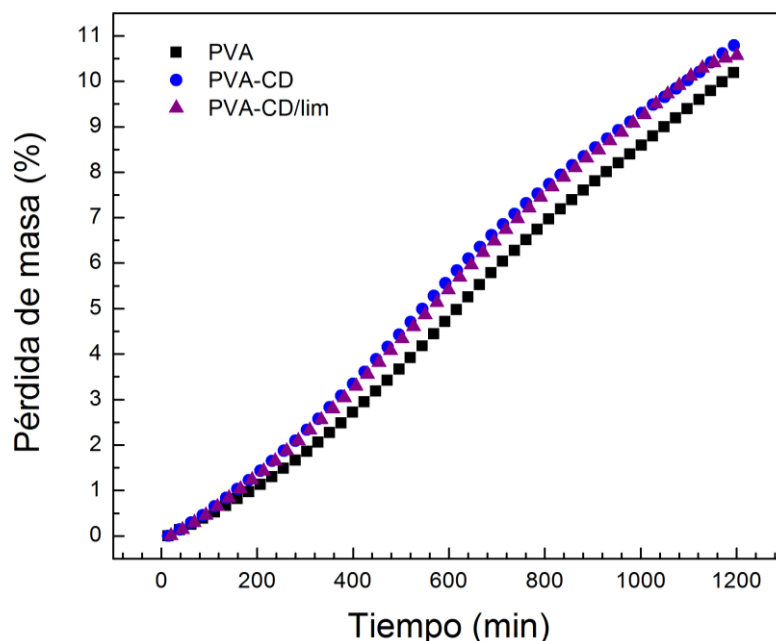


Figura 3.17. Pérdida porcentual de masa en función del tiempo para muestras de PVA, PVA-CD y PVA-CD/lim. Se realizaron ajustes por cuadrados mínimos a cada curva ($y=a.x+b$). Parámetros obtenidos para PVA-CD: $a = (0,00805 \pm 0,00005) \text{ \%/min}$, $b = (1,21 \pm 0,06) \text{ \%}$, $R^2 = 0,999$; parámetros obtenidos para PVA-CD/lim: $a = (0,0082 \pm 0,0001) \text{ \%/min}$, $b = (1,0 \pm 0,1) \text{ \%}$, $R^2 = 0,995$.

La Figura 3.17 presenta los resultados de los ensayos de difusión en agar contra *E. coli* para los mallados PVA-CD y PVA-CD/lim. No se observó halo de inhibición en el material PVA-CD/lim que evidencie actividad antimicrobiana en este material. Al igual que en el caso del mallado PVA-lim, este resultado indica que la cantidad de d-limoneno que migra al hidrogel no es suficiente para evitar el crecimiento de bacterias. Por un lado, la formación de complejos de inclusión permitiría estabilizar al d-limoneno térmicamente y prevenir pérdidas del principio activo durante el proceso de fabricación, en concordancia con los resultados TGA. Por otro lado, el porcentaje de d-limoneno capaz de migrar desde el material sigue siendo bajo de acuerdo a los resultados de carbono orgánico total. Además la formación de los complejos de inclusión podría disminuir la actividad antimicrobiana, de acuerdo a los resultados de biodegradación. La combinación de estos factores podría ser la responsable de que el material desarrollado no presente la actividad antimicrobiana buscada.

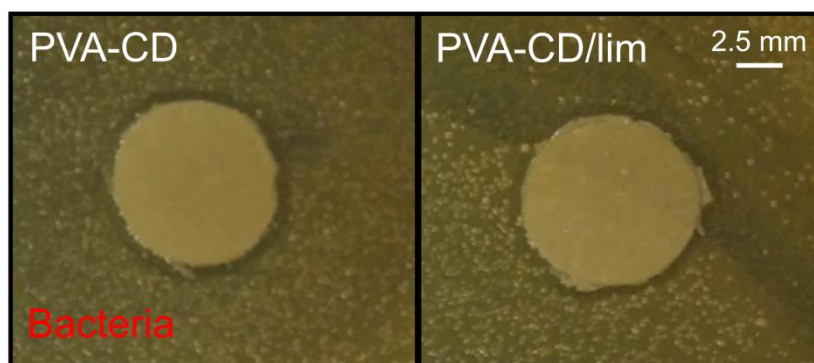


Figura 3.17. Ensayos de difusión en agar contra *E. coli* para las muestras PVA-CD y PVA-CD/lim. No se observó halo de inhibición en ninguno de los mallados.

3.4. Conclusiones parciales

El proceso de electrohilado de PVA, seguido de tratamiento térmico, permitió obtener mallados con fibras de tamaños nanométricos conteniendo d-limoneno, β -ciclodextrina o complejos de inclusión β -ciclodextrina/d-limoneno. La morfología fue similar entre los mallados PVA, PVA-CD y PVA-lim, lo cual muestra que los aditivos no interfieren en el proceso de fabricación si se incorporan en baja concentración o bien disueltos. La solubilidad del mallado de partida resultó menor al 2%, y fue requisito necesario para poder determinar la liberación de d-limoneno en agua por medio de un ensayo simple como lo es la medición de carbono orgánico total. Por otra parte, ninguno de los materiales evidenció actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, aunque el mallado conteniendo d-limoneno (sin β -ciclodextrina) mostró una velocidad de biodegradación sustancialmente menor por la presencia de dicho principio activo. Si bien la formación de complejos de inclusión constituye una estrategia tradicional y ampliamente estudiada para estabilizar térmicamente principios activos, los resultados aquí presentados sugieren que la actividad antimicrobiana de dicho compuesto puede verse limitada por su encapsulación en ciclodextrinas.

3.5. Referencias

- Aytac, Z., Dogan, S. Y., Tekinay, T., & Uyar, T. (2014). Release and antibacterial activity of allyl isothiocyanate/ β -cyclodextrin complex encapsulated in electrospun nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.006>.
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. (2011). Engineering properties of polymeric-based antimicrobial films for food packaging: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 79–93. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>.

- Camerlo, A., Vebert-Nardin, C., Rossi, R. M., & Popa, A.-M. (2013). Fragrance encapsulation in polymeric matrices by emulsion electrospinning. *European Polymer Journal*, 49(12), 3806–3813. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.08.028>.
- Cengiz, F., Dao, T. A., & Jirsak, O. (2010). Influence of solution properties on the roller electrospinning of poly (vinyl alcohol). *Polymer Engineering & Science*, 50(5), 936–943. <https://doi.org/10.1002/pen.21599>.
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., & Khar, R. K. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *Aaps Pharmscitech*, 6(2), E329–E357. <https://doi.org/10.1208/pt060243>.
- Cimadoro, J. (2020). *Desarrollo de membranas nanoestructuradas por la técnica de electroestirado para su aplicación a la remediación del medio ambiente: Influencia de la morfología en el mojado*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Decock, G., Landy, D., Surpateanu, G., & Fourmentin, S. (2008). Study of the retention of aroma components by cyclodextrins by static headspace gas chromatography. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 62(3–4), 297–302. <https://doi.org/10.1007/s10847-008-9471-z>.
- Echegoyen, Y., Fabra, M. J., Castro-Mayorga, J. L., Cherpinski, A., & Lagaron, J. M. (2017). High throughput electro-hydrodynamic processing in food encapsulation and food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.019>.
- Figueroa-Lopez, K. J., Enescu, D., Torres-Giner, S., Cabedo, L., Cerqueira, M. A., Pastrana, L., Fuciños, P., Lagaron, J. M. (2020). Development of electrospun active films of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by the incorporation of cyclodextrin inclusion complexes containing oregano essential oil. *Food Hydrocolloids*, 106013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106013>.
- Haider, A., Haider, S., & Kang, I.-K. (2018). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1165–1188. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>.
- Kayaci, F., Ertas, Y., & Uyar, T. (2013). Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospun polymeric nanofibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8156–8165. <https://doi.org/10.1021/jf402923c>.
- Kayaci, F., Sen, H. S., Durgun, E., & Uyar, T. (2014). Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol–cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol. *Food Research International*, 62, 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.033>.

-
- Kayaci, F., & Uyar, T. (2012). Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanoweb: prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chemistry*, 133(3), 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.040>.
 - Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2016). Development of a Total Organic Carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: Application to essential oils. *Analytica Chimica Acta*, 918, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.013>.
 - Laokuldilok, T., Potivas, T., Kanha, N., Surawang, S., Seesuriyachan, P., Wangtueai, S., Phimolsiripol, Y., Regenstein, J. M. (2017). Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of chitooligosaccharides produced using three different enzyme treatments. *Food Bioscience*, 18, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.03.004>.
 - Lemma, S. M., Scampicchio, M., Mahon, P. J., Sbarski, I., Wang, J., & Kingshott, P. (2015). Controlled release of retinyl acetate from β -cyclodextrin functionalized poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3481–3488. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00103>.
 - Liakos, I., Rizzello, L., Hajiali, H., Brunetti, V., Carzino, R., Pompa, P. P., Athanaasiou, A., Mele, E. (2015). Fibrous wound dressings encapsulating essential oils as natural antimicrobial agents. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(8), 1583–1589. <https://doi.org/10.1039/C4TB01974A>.
 - Liu, P., Chen, W., Liu, C., Tian, M., & Liu, P. (2019). A novel poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) scaffold for tissue engineering with a unique bimodal open-celled structure fabricated using supercritical fluid foaming. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46061-7>.
 - López-Córdoba, A., Castro, G. R., & Goyanes, S. (2016). A simple green route to obtain poly (vinyl alcohol) electrospun mats with improved water stability for use as potential carriers of drugs. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 726–732. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.058>.
 - Miller, F. A. (2004). Characteristic Frequencies of Alkenes (Olefins). In *Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra* (p. 73). <https://doi.org/10.1002/0471690082.ch3>.
 - Ohsaku, M., Hatamoto, T., Murata, H., & Imamura, A. (1982). Stability of the crystal structures of poly (vinyl alcohol)(PVA) by CNDO/2 calculations. *Polymer*, 23(5), 776–778. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(82\)90069-6](https://doi.org/10.1016/0032-3861(82)90069-6).
 - Papadopoulos, N. D., Karayianni, H. S., Tsakiridis, P. E., Perraki, M., & Hristoforou, E. (2010). Cyclodextrin inclusion complexes as novel MOCVD precursors for potential cobalt oxide deposition. *Applied Organometallic Chemistry*, 24(2), 112–121. <https://doi.org/10.1002/aoc.1588>.

- Ribba, L. (2017). *Nanoestructuras biodegradables obtenidas mediante técnicas de electroestirado*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Shemesh, R., Krepker, M., Nitzan, N., Vaxman, A., & Segal, E. (2016). Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. *Postharvest Biology and Technology*, 118, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.009>.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1734–1740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.001>.
- Topuz, F., & Uyar, T. (2019). Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Electrospun Nanofibers for Food Packaging Applications. *Food Research International*, 108927. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108927>.
- US Food and Drug Administration. (2019). FDA cite: 21CFR182.20.
- Uyar, T., Hacaloglu, J., & Besenbacher, F. (2009). Electrospun polystyrene fibers containing high temperature stable volatile fragrance/flavor facilitated by cyclodextrin inclusion complexes. *Reactive and Functional Polymers*, 69(3), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.12.012>.
- Wen, P., Zhu, D.-H., Wu, H., Zong, M.-H., Jing, Y.-R., & Han, S.-Y. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*, 59, 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.005>.
- Zhang, W., Chen, M., & Diao, G. (2011). Electrospinning β -cyclodextrin/poly (vinyl alcohol) nanofibrous membrane for molecular capture. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1410–1416. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.062>.

Encapsulación de polifenoles en mallados electrohilados de PVA

Resumen

En este capítulo se describe el desarrollo y estudio de mallados de electrohilado de PVA insolubles en agua que incorporan un extracto de romero, con propiedades antioxidantes, como principio activo. En primer lugar, se preparó el extracto de romero mediante inmersión de hojas secas en solución hidroalcohólica y posterior filtrado. El extracto fue caracterizado respecto al contenido de polifenoles y actividad antioxidante. Además se evaluó la formación de nanopartículas de romero y la composición del extracto y de las partículas obtenidas. Posteriormente, el extracto de romero se incorporó en la solución de electrohilado y se fabricaron mallados. Como control, se prepararon mallados de PVA partiendo de una solución con el mismo contenido de etanol que la anterior. Los materiales fueron caracterizados de acuerdo a su morfología, espectro infrarrojo, propiedades térmicas y eficiencia de encapsulación de polifenoles. Se determinó la capacidad antioxidante del material y se estudió la liberación en el tiempo de polifenoles desde los mallados hacia simulantes de alimentos hidrofílicos, lipofílicos o ácidos. La cinética de liberación fue analizada con modelos físicos (ley de difusión de Fick) y empíricos (modelo de potencia y ecuación de Weibull) con el objetivo de dilucidar los mecanismos involucrados.

4.1. Introducción

Las reacciones de oxidación constituyen una causa importante de deterioro y pérdida de alimentos. La oxidación generalmente lleva a una pérdida de color y aroma y a un aumento en la rancidez, lo cual está directamente relacionado con pérdida de calidad y de valor nutricional de los alimentos (Tian, Decker, & Goddard, 2013). La oxidación ocurre tanto en lípidos como en proteínas o carbohidratos, y afecta a la gran mayoría de los alimentos: frescos, refrigerados, congelados, cocidos, liofilizados e irradiados (Pereira de Abreu, Cruz, & Paseiro Losada, 2012). Una estrategia para retardar y

disminuir los procesos de oxidación y así extender la vida útil de los alimentos consiste en incluir compuestos antioxidantes en el material del envase, lo cual lo convierte en un envase (activo) antioxidante. Este enfoque apunta a que los antioxidantes se conserven dentro del material, el cual eventualmente los liberaría hacia el alimento de una manera controlada (Domínguez et al., 2018).

Un antioxidante es una sustancia que, estando presente en bajas concentraciones respecto a cierto sustrato, inhibe o retarda de manera significativa la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes pueden clasificarse según su origen en naturales, sintéticos o sintéticos idénticos a natural. La producción y desarrollo por síntesis o biosíntesis permite obtener antioxidantes optimizados para ciertos usos, como el de la industria alimentaria. Sin embargo, hay una preocupación creciente por posibles efectos adversos del consumo a largo plazo de compuestos sintéticos, lo cual ha llevado a que la mayoría de los consumidores prefieran el uso de sustancias naturales (Manessis et al., 2020; Scott, Rozin, & Small, 2020). Este hecho, sumado al costo monetario y temporal que involucra el desarrollo de nuevas sustancias y su posterior aprobación para consumo humano, ha llevado a que numerosas investigaciones y desarrollos de las últimas décadas se enfoquen en el estudio de antioxidantes de origen natural.

Los extractos de plantas como hierbas y especias, así como sus aceites esenciales, constituyen fuentes naturales de compuestos antioxidantes los cuales son generalmente categorizados como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA (*US Food and Drug Administration*) en Estados Unidos y por la legislación presente en la Unión Europea para materiales en contacto con alimentos (EU N10/2011 Regulation) (Ramos, Jiménez, Peltzer, & Garrigós, 2012). Los extractos naturales ricos en polifenoles constituyen una interesante alternativa para aplicación en alimentos debido a que los grupos fenoles son capaces de captar radicales libres o de prevenir su generación a partir de hidroperóxidos. Además, se ha reportado una actividad antioxidante sinérgica cuando conviven diferentes especies de polifenoles en un extracto (Dai, Chen, & Zhou, 2008; Trifković et al., 2014; Zhou, Wu, Yang, & Liu, 2005; Mozafari et al., 2006). Como contrapartida, la concentración de cada sustancia presente en el extracto depende de las características de la planta, las cuales pueden variar por zonas geográficas o épocas de cosecha. Algunas fuentes naturales ricas en polifenoles lo constituyen el orégano, tomillo, jengibre, salvia, distintas variedades de té, yerba mate y romero, entre otras (Shah, Bosco, & Mir, 2014).

En particular, las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) constituyen una fuente de polifenoles y diterpenos que han sido utilizadas por diversos autores para producir y estudiar extractos y aceites esenciales con diferentes aplicaciones (Ho et al., 1998; Tu, MossPierce, Ford, & Jiang, 2013; Urbančič, Kolar, Dimitrijević, Demšar, & Vidrih, 2014; Yang et al., 2016). La actividad antioxidante del romero se debe principalmente a la presencia de ácido rosmarínico, ácido carnósico y carnosol. La producción de un extracto rico en dichas moléculas fue optimizada recientemente para una metodología de inmersión

en solvente etanol/agua (Oliveira, Oliveira, Conceição, & Leles, 2016). Otro aspecto interesante de los extractos de romero es que recientemente se ha reportado la capacidad para formar partículas de tamaño nanométrico partiendo de un extracto base etanol y por medio de un proceso de desplazamiento de solvente (Joye & McClements, 2013; López-Córdoba, Medina-Jaramillo, Piñeros-Hernandez, & Goyanes, 2017). La incorporación de un extracto hidroalcohólico rico en polifenoles en una solución de electrohilado permitiría formar nanopartículas en dicha solución. El electrohilado de dicha solución se presenta como un problema de especial interés. Por un lado, por el desafío de incorporar una mezcla compleja a un polímero por electrohilado y dilucidar los efectos fisicoquímicos en el material. Por otro lado, por el estudio de la cinética de liberación de polifenoles, los mecanismos involucrados y la posibilidad de liberación diferencial de determinados polifenoles a diferentes medios.

En este capítulo se presenta el desarrollo y estudio de fibras electrohiladas de PVA entrecruzadas con ácido cítrico y conteniendo un extracto de romero capaz de formar nanopartículas. Primero, se preparó un extracto de romero y se caracterizó por composición molecular, contenido de polifenoles y capacidad antioxidante. Luego, se fabricaron los mallados electrohilados de PVA conteniendo dicho extracto y se caracterizaron fisicoquímicamente. En particular, se determinó la capacidad de las fibras de electrohilado de retener polifenoles y la capacidad antioxidante asociada. Finalmente, se estudió cualitativa y cuantitativamente la liberación de polifenoles hacia determinados medios líquidos que simulan diferentes tipos de alimentos.

4.2. Metodología

4.2.1. Materiales utilizados

Se utilizó el mismo PVA y ácido cítrico que el capítulo anterior, descriptos en la Sección 2.3. Para realizar el extracto, se utilizaron hojas de romero secas compradas en una dietética de la ciudad de Buenos Aires, etanol comercial (96% v/v) y agua destilada.

4.2.2. Preparación del extracto de romero y caracterización

El extracto de romero (ER) fue preparado por el método de inmersión (Zhang, Lin, & Ye, 2018). Para ello, se molieron las hojas de romero (10 g) con un mortero y se dispersaron en una solución de alcohol etílico (50 mL, 70% v/v). La dispersión se colocó en un baño termostático a 50 °C durante 55 min con agitación magnética constante. Luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se filtró utilizando filtros de Nylon (tamaño de poro 0,8 µm). El extracto de romero resultó de color marrón verdoso y transparente (no se observaron precipitados). Los parámetros utilizados (solvente, tiempo de inmersión, relación entre masa de romero y volumen de solvente) corresponden al protocolo optimizado para la extracción por inmersión de los principales compuestos activos de romero (Oliveira et al., 2016).

El extracto fue caracterizado de acuerdo al rendimiento de extracción, contenido de polifenoles, actividad antioxidante, espectro FTIR, análisis termogravimétrico y cromatografía HPLC, de acuerdo a los detalles brindados en la Sección 2.6.

4.2.3. Fabricación de los mallados electrohilados y caracterización

Considerando que el extracto de romero se preparó en una solución hidroalcohólica, fue necesario realizar como control un mallado de PVA a partir de solución acuosa y un mallado de PVA a partir de solución hidroalcohólica con la misma relación entre solventes que la del extracto de romero. De esta forma pueden diferenciarse los efectos del etanol de los del romero. En resumen, se prepararon tres soluciones poliméricas para el electrohilado: i) solución de PVA y ácido cítrico en agua destilada (PVA); ii) solución de PVA y ácido cítrico en etanol y agua destilada (PVA-et); iii) solución de PVA y ácido cítrico con extracto de romero (PVA-ER). En la solución PVA-ER se reemplazó una parte del solvente (agua) por extracto de romero (base etanol) respecto a la solución PVA. En la solución PVA-et se reemplazó una parte del solvente por etanol (70% v/v, igual al solvente del extracto) respecto a la solución PVA.

La solución PVA se obtuvo disolviendo 12 g de PVA con 0,6 g de ácido cítrico en 88 mL de agua destilada, a 80 °C por 1 h y con agitación magnética constante. Para el caso de la solución PVA-ER (o PVA-et), se disolvieron 12 g de PVA con 0,6 g de ácido cítrico en 68 mL de agua destilada. Luego, se agregaron gota a gota 20 mL de extracto de romero (o etanol 70% v/v) en la solución a temperatura ambiente y se mezcló con agitación magnética por 30 min. La solución de PVA se volvió turbia luego de la incorporación de ER, lo cual sugiere la formación de partículas en el seno de la solución. Al respecto, tanto el extracto como la solución polimérica eran transparentes antes de ser mezclados. En lo que sigue, a dichas partículas se las llamará *partículas de romero*. La composición de las soluciones (cada 100 g) se resume en la Tabla 4.1. La cantidad de extracto de romero reportado en la Tabla 4.1 corresponde a la cantidad equivalente de sólidos en 20 mL de ER.

Las soluciones fueron caracterizadas midiendo su conductividad y su viscosidad (Sección 2.8.1). El tamaño y morfología de partículas de romero se midió utilizando un analizador de tamaño de partículas por dispersión laser SALD-3101 (Shimadzu, Japón) y mediante microscopía SEM (Sección 2.6.4). Para realizar ambos ensayos, se dispersó ER gota a gota en agua en vez de la solución acuosa conteniendo PVA. Este cambio se realizó porque la presencia del polímero no permite observar claramente las partículas por microscopía SEM, mientras que el equipo de dispersión laser requiere utilizar agua como solvente. Por lo tanto, el tamaño y la morfología observados son aproximaciones respecto a los esperados en el sistema conteniendo PVA y ácido cítrico. Se estudió por HPLC-MS la composición de las nanopartículas y de la fase líquida, según lo descrito en el capítulo 2 (Sección 2.6.3).

Tabla 4.1: Composición y propiedades de las soluciones para electrohilado. *ER (g) corresponde a la cantidad de sólidos.

Solución	Agua (g)	Etanol 70% (g)	PVA (g)	CA (g)	ER (g)*	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Viscosidad (cP)
PVA	88	0	12	0.6	0	810 ± 10	297 ± 5
PVA-et	68	20	12	0.6	0	490 ± 10	400 ± 5
PVA-ER	68	20	12	0.6	1.2	690 ± 10	434 ± 5

Las soluciones fueron electrohiladas de acuerdo a las condiciones reportadas en la Sección 2.3. El proceso se llevó a cabo por 4 h, obteniendo mallados cuadrados de 20 cm de lado y aproximadamente 0,5 g de masa. Los mallados electrohilados obtenidos fueron tratados térmicamente por 190 °C durante 10 min para insolubilizar el material.

Los mallados obtenidos fueron caracterizados por SEM, FTIR y TGA (Secciones 2.8.2, 2.8.3 y 2.8.5). Luego, se determinó la cantidad total de polifenoles encapsulados en las fibras, su actividad antioxidante y la presencia de los componentes mayoritarios. Para ello se realizó una extracción colocando un mallado (366 mg) en etanol (50 mL, 70% v/v) a 50 °C bajo reflujo. En este experimento se utilizó el mismo solvente y misma temperatura que en la preparación del ER a partir de las hojas de romero. Se tomaron muestras de la solución luego de 1, 2 y 3 h, y se midió la cantidad de polifenoles y la actividad antioxidante por los métodos de F-C y DPPH, respectivamente, y la composición por HPLC-MS, siguiendo el protocolo de la Sección 2.6.3.

Por otro lado, se estudió la liberación de polifenoles desde los mallados electrohilados hacia diferentes simulantes alimenticios. Se utilizó el simulante hidrofílico A (etanol 10% v/v en agua destilada), el simulante ácido B (ácido acético 3% p/v) y el simulante lipofílico D1 (etanol 50% v/v en agua destilada), los cuales surgen de la regulación de la Unión Europea para el estudio de migración de plásticos en contacto con alimentos (European Commission, 2011). Se sumergieron muestras (200 mg) del mallado electrohilado PVA-ER en vasos de precipitado conteniendo cada uno de los simulantes alimenticios (20 mL). Los vasos de precipitado se colocaron en un agitador orbital a 125 rpm, se tomaron muestras a diferentes tiempos y de cada muestra se midió la cantidad de polifenoles en solución utilizando el método F-C. Se utilizaron tres muestras independientes para cada tiempo. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a la cantidad total de polifenoles encapsulados y fueron analizados mediante diferentes modelos de liberación. En particular, se utilizó la solución de la segunda ley de Fick para una morfología de cilindros infinitos y dos modelos empíricos que permiten distinguir mecanismos involucrados en la liberación de compuestos (ecuación de potencia y función de Weibull). Para el análisis se realizaron ajustes no lineales por cuadrados mínimos ponderados utilizando la función *optimize.curve_fit* de la librería SciPy (Oliphant, 2007).

Finalmente, se determinaron los compuestos liberados en cada simulante alimenticio, para lo cual se realizó el ensayo de migración por 48 h y la solución obtenida se analizó por HPLC-MS siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Sección 2.6.3).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Extracto de romero

4.3.1.1. Rendimiento de extracción, contenido de polifenoles y actividad antioxidante

El rendimiento de extracción resultó (59 ± 1) g de sólidos/L de ER. El contenido total de polifenoles de ER fue de $(10,6 \pm 0,5)$ mg GAE/mL y la actividad antioxidante obtenida fue (20 ± 1) mg TE/mL. A fin de comparar con los resultados de otros autores, se normalizó la actividad antioxidante respecto a la cantidad de polifenoles, de modo de obtener un valor independiente de la concentración del extracto (influenciada por el método de extracción, por la planta utilizada, y por la relación entre masa de hojas y volumen de solvente, entre otras cosas). El extracto de romero utilizado, normalizado al contenido de polifenoles, presentó una actividad antioxidante de $(1,9 \pm 0,2)$ mg TE/mg GAE. En la Tabla 4.2 se compara la actividad antioxidante de ER con la reportada en trabajos recientes de la bibliografía. La actividad antioxidante obtenida fue más alta respecto a extractos de otras fuentes vegetales, lo cual demuestra la potencial aplicación del romero como compuesto activo para el desarrollo de envases antioxidantes. Además, la actividad antioxidante obtenida fue más alta respecto a otros extractos de romero reportados en la literatura, lo cual se debe a que en esta tesis se utilizó un protocolo optimizado para la extracción de ácido rosmarínico, ácido carnósico y carnosol, que son los compuestos antioxidantes mayoritarios del romero (Oliveira et al., 2016). Si bien la actividad antioxidante resultó mayor respecto a los trabajos informados, debe considerarse que la tabla 4.2 sólo reporta valores de actividad antioxidante medidos por la metodología de DPPH, comparados frente a una curva de calibración con Trolox y que, además, presentan el contenido de polifenoles medido por la metodología de F-C. Ciertos trabajos disponibles en la literatura que utilizan reactivos diferentes para medir la actividad antioxidante y contenido de polifenoles no pudieron ser incluidos en la comparación⁶.

⁶ Algunos autores reportan la actividad antioxidante como el volumen de extracto necesario para reducir el 50% de una solución DPPH. Esta medida depende de la concentración del radical DPPH en cada solución particular, e impide comparar trabajos diferentes. Otros trabajos utilizan otro tipo de radicales libres, por ejemplo ABTS.

Tabla 4.1: Actividad antioxidante de algunos extractos ricos en polifenoles reportados en la literatura.

Fuente del extracto	Método de extracción	Actividad antioxidante (mg TE / mg GAE)	Referencia
Hojas de Romero	Inmersión en etanol 70% v/v	$1,9 \pm 0,2$	Este trabajo
Romero (rico en ácido rosmarínico)	Inmersión en agua destilada	$0,848 \pm 0,002$	Martínez <i>et al.</i> (2019)
Romero	Inmersión en acetona/agua/ácido acético	$1,1 \pm 0,2$	Fernandes <i>et al.</i> (2016)
Orégano	Inmersión en acetona/agua/ácido acético	$1,23 \pm 0,08$	Fernandes <i>et al.</i> (2017)
Ilantén mayor	Doble maceración en metanol (80% v/v)	$0,90 \pm 0,05$	Gonçalves <i>et al.</i> (2019)
Semillas de piña	Inmersión en agua destilada	$0,150 \pm 0,005$	De Freitas <i>et al.</i> (2017)
Yerba mate (usada)	Inmersión en etanol 50% v/v	$1,05 \pm 0,03$	(Gullón <i>et al.</i> , 2018)

4.3.1.2. Caracterización de partículas de romero

La Figura 4.1 muestra la distribución de tamaños de las partículas de romero y la morfología de las mismas, obtenidas al diluir ER en agua destilada. Las partículas obtenidas fueron aproximadamente esféricas. La distribución de tamaños medida por dispersión laser muestra 2 grupos, centrados aproximadamente en 300 nm y en 3 μ m. Por microscopía SEM no se pudieron observar partículas micrométricas aunque se detectaron algunos aglomerados de nanopartículas. Probablemente, la distribución de partículas de mayor tamaño observada en solución corresponde a dichos aglomerados. Considerando solo los datos obtenidos en la distribución de tamaños más pequeños, el diámetro medio de las partículas resultó (310 ± 30) nm.

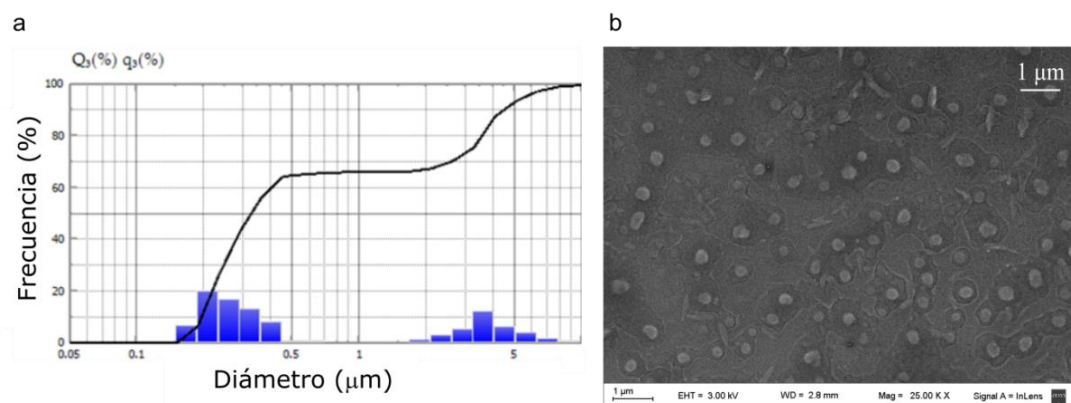


Figura 4.1. Tamaño de partículas de romero medido por dispersión laser (a) y micrografía SEM de las partículas. El tamaño medio de las partículas resultó (310 ± 30) nm.

La formación de nanopartículas ocurre por la precipitación de compuestos que no son solubles en agua, pero sí en la mezcla agua/etanol con la que se realizó ER. El método se conoce como desplazamiento de solvente o co-precipitación, y consiste en reducir la calidad del solvente para inducir la precipitación de compuestos (Joye & McClements, 2013). El tamaño de partículas obtenidas por esta metodología depende del volumen de solvente que se reemplace y de la velocidad con la que se produzca la mezcla. En particular, la formación de nanopartículas de romero fue estudiada previamente por López-Córdoba et al. (2017). En su trabajo, un extracto de romero ligeramente diferente (realizado por inmersión en etanol 96% v/v) fue diluido en agua destilada (1:5) y se obtuvieron partículas con diámetros entre 0,1 μm y 2,0 μm.

No fue posible estudiar la morfología y tamaño de las partículas formadas en la solución de PVA para electrohilado, puesto que el polímero interfiere tanto en la observación por SEM como en la dispersión láser. La distribución de tamaños medido constituye una sobreestimación del tamaño real de las partículas en la solución polimérica. La viscosidad en la solución de PVA es considerablemente mayor a la del agua, lo cual implicaría que la difusión de los compuestos de romero sea más lenta y que el crecimiento sea más controlado. Adicionalmente, es posible que se formen menos aglomerados en estas condiciones.

4.3.1.3. Componentes mayoritarios

La Figura 4.2 presenta los cromatogramas obtenidos de ER, los componentes solubles en agua y los componentes que forman las nanopartículas. Los compuestos antioxidantes más abundantes del romero son el ácido rosmarínico, el ácido carnósico y el carnosol (Herrero et al., 2010). Estos compuestos pudieron ser identificados en los cromatogramas teniendo en cuenta la relación m/z, los fragmentos obtenidos y la información disponible en la bibliografía respecto a los tiempos de detección.

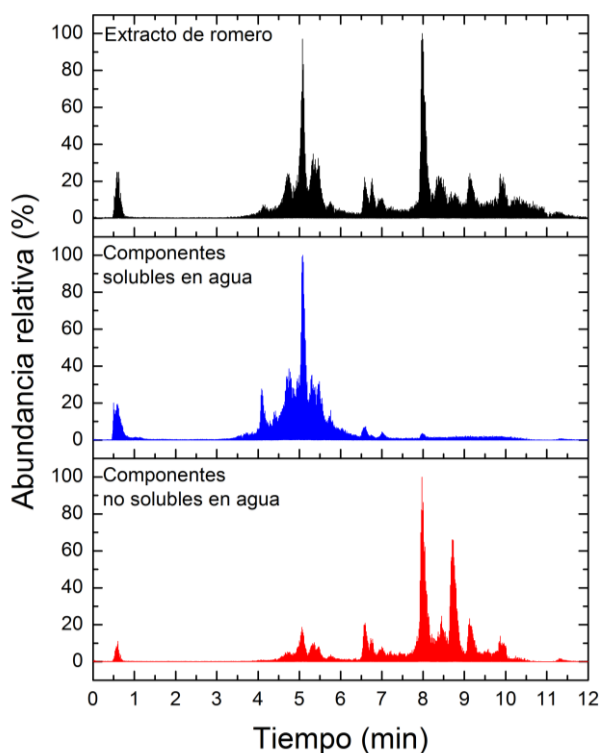


Figura 4.2. Cromatogramas del extracto de romero original y de las fases presentes en la dispersión de nanopartículas obtenida (fases soluble y no soluble en agua).

Los dos picos más intensos corresponden al ácido rosmarínico (~5,0 min) y carnosol (~8,0 min), mientras que el ácido carnósico está asociado a uno de los picos de baja intensidad (~8,7 min). Debido a las características de la columna utilizada en el cromatógrafo, los componentes polares (con mayor solubilidad en agua) se localizan a tiempos cortos, mientras que los componentes no polares (menos solubles en agua) se encuentran en tiempos mayores. Al comparar los diferentes cromatogramas, se deduce que el ácido carnósico y el carnosol son los componentes mayoritarios de las nanopartículas. Por su parte, el ácido rosmarínico se presenta mayoritariamente en la fase líquida. Las nanopartículas también presentan una contribución pequeña de componentes polares.

4.3.2. Mallados de PVA conteniendo extracto de romero

4.3.2.1. Características fisicoquímicas

En la Figura 4.3 se presentan micrografías SEM de los mallados electrohilados obtenidos, junto a los histogramas del diámetro de fibras. De la solución PVA (Fig. 4.3a, d) se obtuvieron fibras homogéneas con un diámetro medio de (120 ± 20) nm, similar a lo reportado en el Capítulo 3 (Sección 3.2.2). Al adicionar etanol a la solución, el diámetro medio de fibras se incrementó a (230 ± 50) nm y se observó un ensanchamiento en su distribución (Fig. 4.3b, e). La incorporación de etanol disminuye la

tensión superficial en la solución de electrohilado y, además, aumenta la velocidad de evaporación de solvente durante el proceso (C. Zhang, Yuan, Wu, Han, & Sheng, 2005). Por otro lado, la solución que incorpora etanol presentó una conductividad $\sim 39\%$ menor respecto a la de la solución de PVA. Durante el proceso de electrohilado, el jet de la solución polimérica se estira debido a la repulsión de las cargas en su superficie, por lo que una menor conductividad implica un menor estiramiento bajo el mismo campo eléctrico (Uyar & Besenbacher, 2008). Estos dos efectos descritos serían responsables del aumento del diámetro de fibras y del ensanchamiento en la distribución.

Las fibras de PVA-ER presentaron un diámetro medio de (220 ± 80) nm y una distribución ligeramente más ancha respecto a PVA-et (Fig. 4.3c, f). De acuerdo a estos resultados, la incorporación de etanol es la principal causa del aumento de diámetro en las fibras PVA-ER respecto a los mallados de PVA. No se observaron deformaciones ni acumulación de material en las fibras de PVA-ER. Al respecto, las partículas de romero formadas en la solución polimérica serían más pequeñas que lo reportado previamente (Sección 4.3.1.2), debido a que dicho estudio se realizó en agua destilada. Esto se debe a que el crecimiento de partículas estaría limitado por la viscosidad de la solución polimérica.

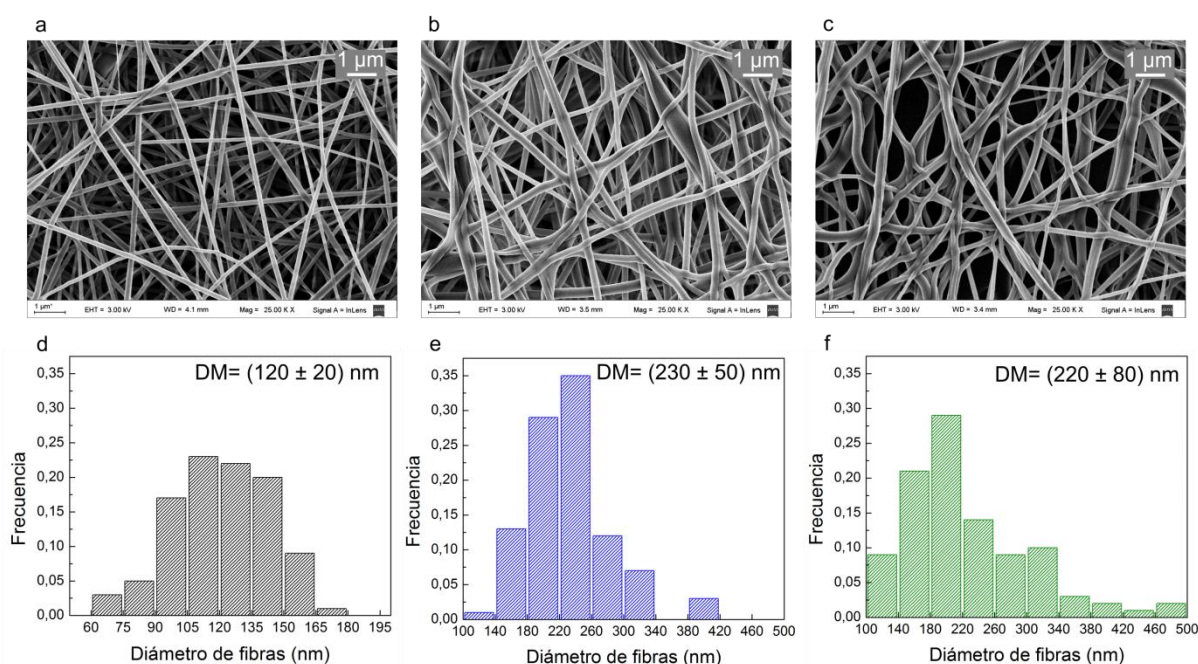


Figura 4.3. Micrografías SEM de los mallados electrohilado de (a) PVA, (b) PVA-et y (c) PVA-ER, y respectivos histogramas de diámetro de fibras (d-f). Se reporta el diámetro medio (DM) para cada caso.

El espectro infrarrojo de ER y de los mallados electrohilado se presenta en la Figura 4.4. El extracto de romero está constituido por una gran variedad de sustancias, por lo cual el espectro infrarrojo revelará principalmente grupos comunes a todas ellas. En particular, los componentes

mayoritarios suelen presentar uno o varios anillos aromáticos y varios grupos fenoles. El espectro FTIR de ER (Fig. 4.4a) presenta bandas correspondientes al estiramiento del enlace O-H del grupo fenol ($3000-3600\text{ cm}^{-1}$), al estiramiento del enlace C-H (2920 cm^{-1}), al estiramiento C=C en los anillos (1597 cm^{-1}), y del enlace C-OH del grupo fenol (1264 cm^{-1} y 1029 cm^{-1}). El mallado electrohilado PVA-et presenta las bandas típicas del PVA: estiramiento del enlace O-H (3300 cm^{-1}), estiramiento de los enlaces C-H de los grupos alquilo (2854 cm^{-1} y 2920 cm^{-1}), estiramiento del enlace C-O (1095 cm^{-1}) y flexión del grupo C-H₂ (1426 cm^{-1}). El entrecruzamiento del PVA con ácido cítrico puede evidenciarse nuevamente por la aparición de la banda a 1721 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento del enlace C=O del grupo éster. El mallado electrohilado PVA-ER presentó un espectro similar al del PVA-et, con algunas notables diferencias debidas a la presencia del extracto. Se observa la banda a 1597 cm^{-1} correspondiente al enlace C=C, que confirma la presencia de compuestos aromáticos. Además, se detectó un ensanchamiento hacia menores números de onda y un pequeño corrimiento ($\sim 2\text{ cm}^{-1}$) en la misma dirección de la banda correspondiente al enlace C-O (1095 cm^{-1} , Fig. 4.4b). Esto probablemente se deba a la superposición de la banda del PVA (estiramiento C-O del grupo alcohol) con la banda del extracto (estiramiento C-O del grupo fenol), lo cual evidencia nuevamente la presencia de compuestos fenólicos. La banda correspondiente al enlace C-H (2920 cm^{-1}) muestra un doble pico en el mallado PVA-ER, lo cual se explica por la presencia de vibraciones de grupos C-H₃ que se encuentran en diversos componentes del extracto (por ejemplo, carnosol o rosmanol). Con la incorporación del extracto de romero, se observa un corrimiento de 14 cm^{-1} hacia menores números de onda de la banda correspondiente al estiramiento O-H (Fig. 4.4c). Este corrimiento sugiere interacciones por puente de hidrógeno entre el PVA y los compuestos fenólicos del romero. La interacción entre los compuestos activos y el polímero podría contribuir en la retención de los mismos dentro de las fibras, a estabilizarlos térmicamente y también a establecer cinéticas de liberación específicas.

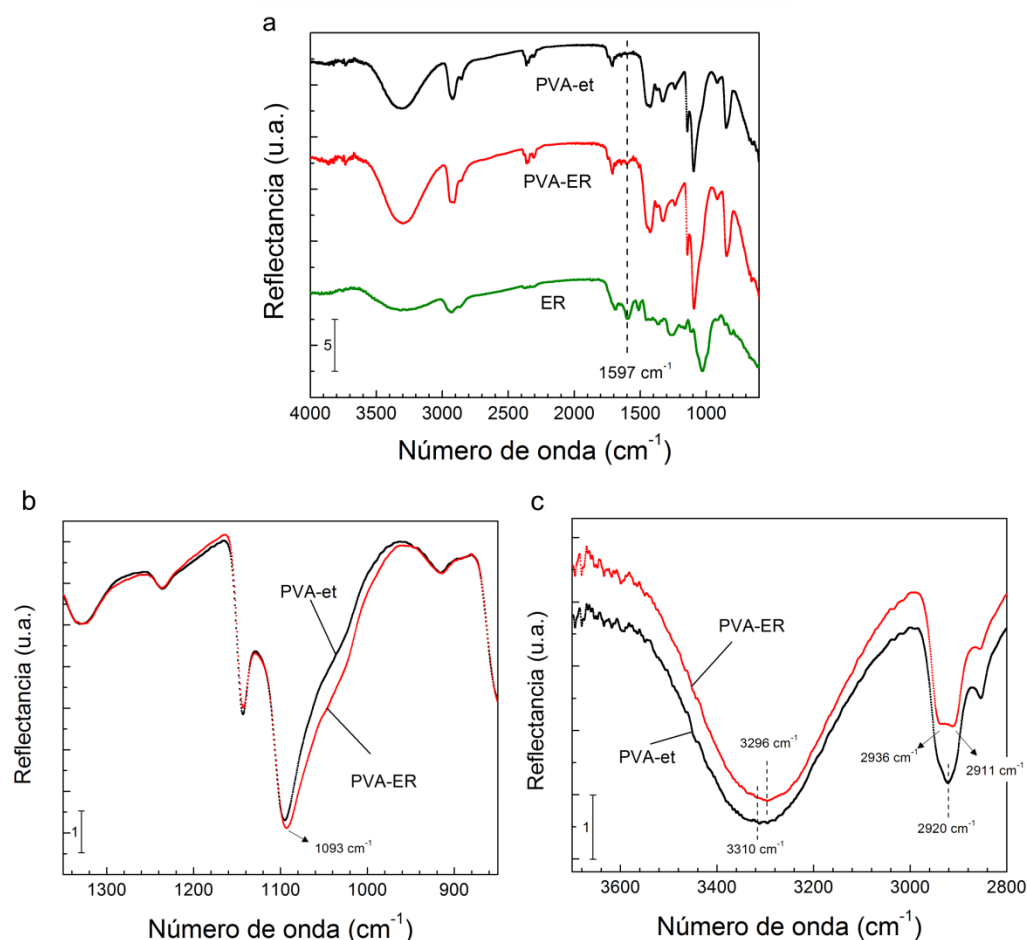


Figura 4.4. (a) Espectros FTIR de PVA-et y PVA-ER y del extracto de romero, (b) ensanchamiento hacia menores números de onda de la banda en 1093 cm^{-1} en PVA-ER, y (c) corrimiento hacia menores números de onda de la banda a 3300 cm^{-1} y doble pico en 2936 cm^{-1} y 2911 cm^{-1} en PVA-ER.

La Figura 4.5 presenta el termograma de ER y de los mallados PVA-et y PVA-ER, y la derivada en función de la temperatura de cada curva. La degradación térmica del extracto (Fig. 4.5a) ocurre en un rango amplio de temperaturas, comenzando alrededor de 170 $^{\circ}\text{C}$ y extendiéndose hasta el final del ensayo a 550 $^{\circ}\text{C}$. A la temperatura final del ensayo se obtuvo un residuo de $\sim 37\%$. La curva derivada permite distinguir 2 procesos principales de degradación térmica del extracto (Fig. 4.5b), centrados en $\sim 205^{\circ}\text{C}$ y en $\sim 300^{\circ}\text{C}$, respectivamente. El primer evento térmico está asociado a la evaporación de agua, etanol y compuestos volátiles, mientras que el segundo evento térmico corresponde a la descomposición de componentes bioactivos (Cordeiro et al., 2013). Se observa que una porción de ER ($\sim 7\%$) es degradada al alcanzar los 190 $^{\circ}\text{C}$, temperatura en la cual se realizó el tratamiento térmico de los mallados electrohilados. Esto sugiere que una porción de los compuestos incorporados a los mallados PVA-ER podrían perderse durante el tratamiento térmico de entrecruzamiento.

La degradación térmica del mallado PVA-et ocurre en 4 pasos, tal como fue descrito en el capítulo anterior (Sección 3.2.2). En el primero (hasta ~ 200 °C) se pierde el $\sim 4\%$ de la masa, y corresponde a la pérdida de volátiles tales como agua absorbida y ácido cítrico sin reaccionar. En el segundo escalón (210-250 °C) se pierde aproximadamente 2% de la masa y corresponde a la degradación de grupos laterales del polímero. Luego, en el tercer escalón (270-370 °C), se observa la mayor pérdida de masa, asociada a la degradación de la cadena principal del polímero. Finalmente, el cuarto escalón (370-470 °C) corresponde a la descomposición de los subproductos obtenidos. El mallado PVA-ER también mostró una degradación térmica en 4 pasos: los primeros 3 escalones resultaron similares al del PVA-et, mientras que el último escalón mostró una pendiente menor (Fig. 4.5a). Este efecto se evidencia en la curva derivada por la reducción del área del segundo pico (Fig. 4.5b). La diferencia entre las curvas de degradación térmica de PVA-et y de PVA-ER resultó $\sim 14\%$ a 450 °C. Este porcentaje es mayor a la masa de ER incorporada (Tabla 4.1), indicando que la incorporación de ER estabiliza térmicamente al PVA. De la misma forma, el extracto de romero mostró una degradación térmica de $\sim 38\%$ entre 170 °C y 310 °C, pero el mallado PVA-ER no mostró pérdidas de masa apreciables en ese rango. De este análisis se concluye que existen interacciones entre ER y las cadenas de PVA que estabilizan térmicamente al polímero y a los compuestos bioactivos de ER. La masa residual al finalizar el ensayo mostró una diferencia de $\sim 11\%$ entre PVA-et y PVA-ER, la cual se corresponde con los compuestos de romero presentes en las fibras.

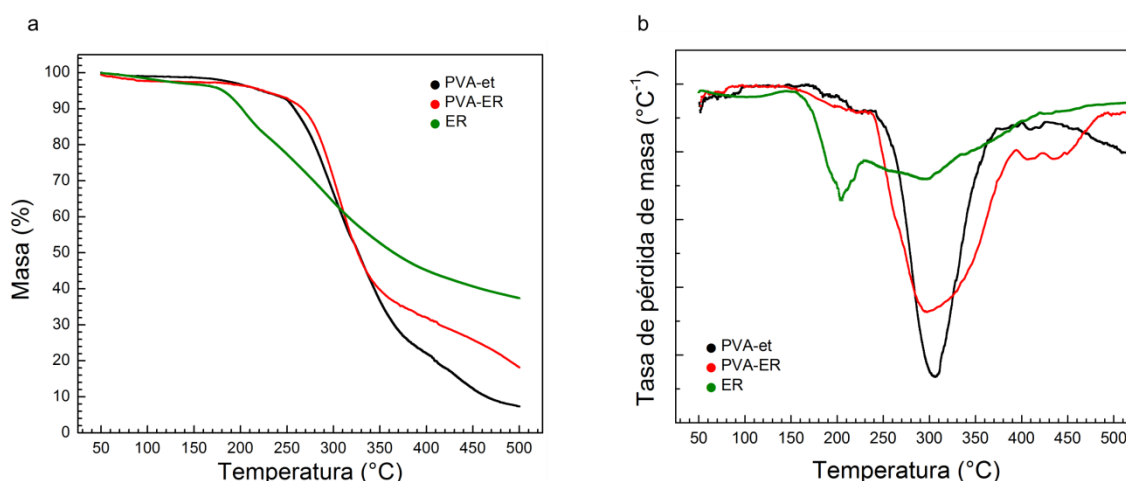


Figura 4.5. (a) Curva de degradación térmica de los mallados electrohilados (PVA-et y PVA-ER) y del extracto de romero (ER), y (b) derivada respecto a la temperatura de las curvas de degradación térmica.

4.3.2.2. Actividad antioxidante y liberación de polifenoles

Considerando el contenido de polifenoles en ER y la relación entre PVA y ER utilizada en la formulación, el contenido teórico de polifenoles en los mallados es $(17,7 \pm 0,8)$ mg GAE/g. Para determinar la eficiencia de encapsulación, se extrajeron los compuestos activos desde los mallados electrohilados PVA-ER, y se midió la cantidad de polifenoles en la solución resultante. Las extracciones realizadas a 1, 2 y 3 h no mostraron diferencias significativas, y se obtuvo un contenido total de polifenoles de $(15,4 \pm 0,5)$ mg GAE/g de mallado. De aquí, la eficiencia de encapsulación resultó $(87 \pm 3) \%$. El porcentaje de eficiencia alcanzado indica que la mayor parte de los compuestos activos permanecen en el mallado. Probablemente, el porcentaje perdido de polifenoles ($\sim 13 \%$) corresponde a aquellos compuestos que fueron degradados durante el tratamiento térmico, en concordancia con los resultados del análisis termo-gravimétrico.

La actividad antioxidante de los mallados resultó (30 ± 2) mg TE/g de mallado. Al normalizar, se obtuvo una actividad antioxidante de los polifenoles encapsulados de $(1,9 \pm 0,2)$ mg TE/mg GAE. Este resultado no presenta diferencias significativas respecto a la actividad antioxidante de los polifenoles en el extracto original ($(1,9 \pm 0,2)$ mg TE/mg GAE), demostrando que los proceso de electrohilado y tratamiento térmico no lograron oxidar ni degradar los compuestos activos. La Tabla 4.3 compara la actividad antioxidante del material obtenido con la actividad reportada por diferentes autores que desarrollaron películas antioxidantes. La eficiencia de encapsulación lograda y la actividad antioxidante propia de ER permitieron obtener un material con una buena actividad antioxidante que es, en general, mayor a la reportada para otros materiales.

Tabla 4.3: Actividad antioxidante de algunos materiales que incorporan extractos naturales reportados en la literatura.

Antioxidante	Cantidad empleada	Material	Método de fabricación	Actividad antioxidante (mg TE / g material)	Referencia
Extracto de romero	1,6 mL/g	PVA	Electrohilado	30 ± 2	Este trabajo
γ -CD + aceite esencial de orégano	0,25 g/g	PHBV	Electrohilado	$0,0570 \pm 0,0003$	Figureoa-Lopez et al. (2020)
Extracto de yerba mate	5,7 g/g	Almidón termoplástico	Evaporación de solvente	$356,7 \pm 0,5$	Hornung et al. (2020)
Extracto de té verde	0,14 g/g	Almidón termoplástico + LLDPE	Extrusión y soplado	$\sim 15,0 \pm 0,5$	Panrong, Karbowiak, & Harnkarnsujarit (2019)

Aceite esencial de orégano	0,4 g/g	Proteína de soja	Evaporación de solvente	$\sim 13,0 \pm 0,3$	Dos Santo Paglione et al. (2019)
α-tocoferol	0,05 g/g	Carboximetil celulosa	Evaporación de solvente	$< 7 \pm 1$	Martelli et al. (2017)
Extracto de tomate	0,05 g/g	Gelatina	Evaporación de solvente	$\sim 6,01 \pm 0,05$	López-Palestina et al. (2019)
Hojas de moringa	0,06 g/g	Papaya/pectina	Evaporación de solvente	$8,0 \pm 0,5$	Rodriguez, Sibaja, Espitia, & Otoni (2020)
Extracto de propóleo	0,01 g/g	Almidón termoplástico	Evaporación de solvente	$\sim 3,3 \pm 0,3$	De Araujo et al. (2015)

En la Figura 4.6 se presentan los cromatogramas de ER, de la máxima extracción de componentes alcanzada y de los experimentos de liberación a distintos medios simulantes de alimentos luego de 2 días de inmersión. El cromatograma obtenido para la máxima extracción mostró una composición similar a la del extracto original, indicando que el proceso de electrohilado fue efectivo para encapsular los diferentes compuestos presentes en ER. Se observan pequeñas diferencias en las intensidades de algunos picos al comparar el cromatograma de ER con el de máxima extracción. En particular, una disminución de ácido rosmarínico ($\sim 5,0$ min). Esta diferencia estaría asociada a la volatilización parcial de dicho compuesto durante el proceso de electrohilado o durante el tratamiento térmico.

Los experimentos de liberación hacia simulantes de alimentos mostraron que los componentes más polares (4-7,5 min) fueron extraídos por todos los medios. Por su lado, los componentes no polares (7,5-10 min) no fueron detectados en el simulante hidrofílico ni en el simulante ácido, y solo una porción se observó en el simulante hidrofóbico. En particular, aparece un pico de baja intensidad asociado al carnosol (~ 8 min). Estos resultados indican una limitada disponibilidad de compuestos no polares, de los cuales solo una porción pudo migrar hacia un medio químicamente afín como lo es el simulante lipofílico D1.

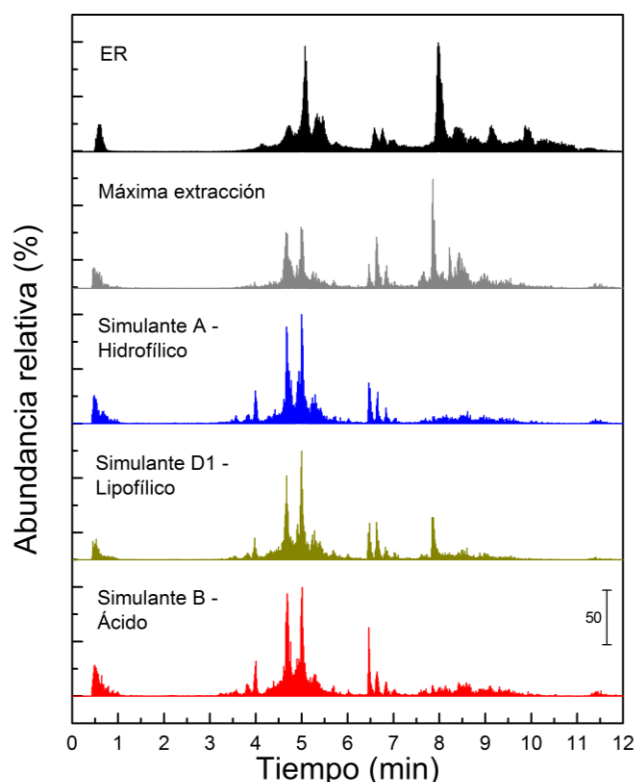


Figura 4.6. Cromatogramas HPLC-MS del extracto de romero (ER), de los compuestos encapsulados en el mallado (máxima extracción) y de los compuestos liberados a diferentes simulantes de alimentos.

4.3.2.3. Cinética de liberación de polifenoles

De acuerdo a los resultados presentados, tanto el simulante hidrofílico como el ácido y el lipofílico lograron extraer una amplia variedad de sustancias presentes en el ER original. Para una efectiva aplicación de los mallados electrohilados como recubrimiento de alimentos, es necesario cuantificar la cantidad de antioxidantes que son liberados. La Figura 4.7 presenta el porcentaje de polifenoles liberados a cada simulante de alimentos en función del tiempo. El porcentaje de polifenoles liberados fue calculado de acuerdo a la Ecuación 4.1:

$$\text{Polifenoles liberados (\%)} = 100 \frac{M_t}{M_0}, \quad (4.1)$$

donde M_t son los polifenoles liberados al tiempo t y M_0 es el contenido de polifenoles de la malla medido experimentalmente ((15.4 ± 0.5) mg GAE/g).

En todos los simulantes de alimentos estudiados se observó una liberación inicial de 5-10 %, la cual se asocia a compuestos de romero adsorbidos sobre la superficie de las fibras. El medio lipofílico logró extraer más rápidamente los polifenoles encapsulados respecto a los otros dos medios, logrando una liberación del (72 ± 6) % en 60 min y alcanzando el máximo de liberación de (94 ± 5) % en 360 min.

Por su parte, los simulantes hidrofílicos y ácidos mostraron una liberación más lenta, alcanzando máximos de liberación de $(77 \pm 4) \%$ y de $(33 \pm 5) \%$, respectivamente, en 300 min. La mayor y más rápida liberación de polifenoles en el simulante lipofílico se debe a la afinidad de los componentes del romero con el simulante lipofílico, en acuerdo con los resultados de HPLC-MS presentados en la sección anterior. Considerando que el PVA es un polímero capaz de absorber líquido, la cinética de liberación podría ser dominada por la afinidad de los compuestos con el medio en que se sumerja. En particular, los compuestos de romero que forman las nanopartículas solo son solubles en el simulante lipofílico. La imposibilidad de los simulantes hidrofílico y ácido de disolver dichos agregados probablemente sea la causa de la liberación más lenta.

Un trabajo reciente mostró el comportamiento opuesto al sumergir películas de almidón termoplástico conteniendo extracto de romero en simulantes de alimentos hidrofílico y lipofílico (López-Córdoba et al., 2017). La diferencia puede explicarse por la diferente solubilidad del almidón termoplástico y del PVA en los medios simulantes. El almidón termoplástico es parcialmente soluble en agua, lo cual facilita la liberación de polifenoles en el medio hidrofílico, pero no es soluble en etanol. Por su parte, los mallados electrohilados PVA-ER no son solubles en ninguno de los dos medios debido al proceso de entrecruzamiento. En este caso, la disponibilidad de los compuestos encapsulados está asegurada por la mayor área superficial obtenida por la estructura de fibras y, tal como se discutió previamente, la liberación depende de la afinidad entre los componentes encapsulados y el medio de aplicación.

Se observó además un porcentaje de liberación significativamente menor en el simulante ácido, lo cual se relaciona con la menor afinidad de los compuestos de romero con medios de menor pH. Resultados similares fueron reportados por otros autores, al estudiar la cinética de liberación de polifenoles de tomillo encapsulados en películas de almidón-quitosano (Talón, Trifkovic, Vargas, Chiralt, & González-Martínez, 2017) y al estudiar la liberación de ácido rosmarínico desde mallados electrohilados de poli(óxido de etileno)-proteína de suero leche (Colín-Orozco, Zapata-Torres, Rodríguez-Gattorno, & Pedroza-Islas, 2015).

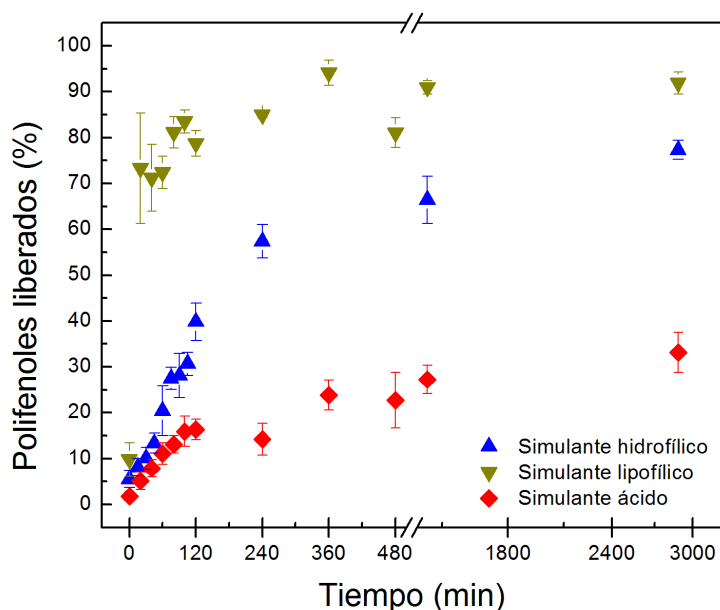


Figura 4.7. Liberación de polifenoles a diferentes simulantes de alimentos en función del tiempo.

En general, la liberación de principios activos desde un material polimérico hacia el medio en que se encuentra inmerso puede deberse a diferentes procesos, siendo los más importantes la difusión, el hinchamiento del material y la relajación de cadenas de polímero (Dash, Murthy, Nath, & Chowdhury, 2010). La segunda ley de Fick permite describir procesos de difusión con un gradiente variable de concentración. Un mallado electrohilado puede modelarse como un conjunto de cilindros infinitos a partir de los cuales migra una sustancia hacia el exterior. Considerando la geometría del problema y las condiciones de contorno impuestos, la solución de la segunda ley de Fick viene dada por la Ecuación 4.2 (Crank, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{4}{r^2 \alpha_i^2} \exp[-D \alpha_i^2 t] , \quad (4.2)$$

donde M_∞ es la concentración de equilibrio de polifenoles, r es el radio de los cilindros, D es el coeficiente de difusión del material y $r \cdot \alpha_i$ son las raíces positivas de la función de Bessel de primera especie y orden cero. Las curvas de liberación (Fig. 4.7) fueron normalizadas respecto a la concentración de equilibrio de polifenoles en cada medio (M_∞) y se realizó un ajuste no lineal utilizando la Ec. 4.2, e igualando r al radio medio de las fibras de los mallados (Sección 4.3.2.1). La Fig. 4.8 presenta los datos normalizados para la liberación en los tres simulantes junto al ajuste realizado.

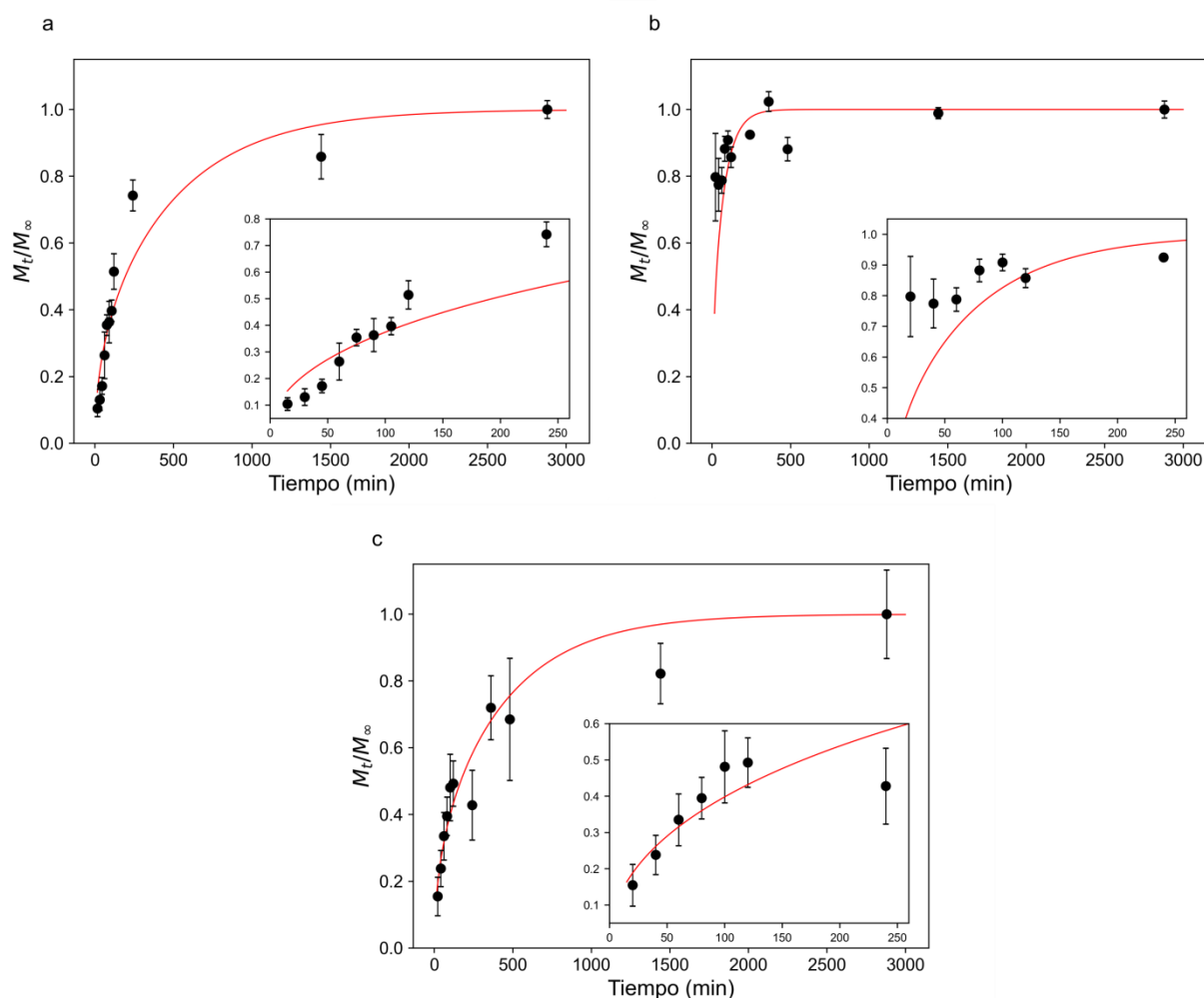


Figura 4.8. Liberación de polifenoles normalizada junto al ajuste obtenido a la solución de la ecuación de Fick (—). Simulantes hidrofílico (a), lipofílico (b) y ácido (c).

El ajuste para la liberación en el medio hidrofílico arrojó un coeficiente de difusión de $(26 \pm 5) \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{s}$ y un coeficiente de correlación aceptable ($R^2 > 0.91$, Tabla 4.4). En la Fig. 4.8a se observa que, a pesar de la bondad del ajuste, la curva obtenida muestra ciertas diferencias respecto a los datos. En particular, los primeros datos experimentales ($t < 120 \text{ min}$) presentan un crecimiento prácticamente lineal, mientras que la curva de ajuste se observa cóncava. El ajuste de los datos de liberación en el medio lipofílico arrojó un coeficiente de correlación pobre ($R^2 \sim 0.69$), y se observa además que la función propuesta no representa de manera correcta los datos experimentales (Fig. 4.8b). El ajuste sobre los datos de liberación en el medio ácido permitió obtener un coeficiente de difusión igual a $(30 \pm 4) \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{s}$ y un coeficiente de correlación aceptable ($R^2 > 0.92$, Tabla 4.4). El coeficiente de difusión obtenido no presentó diferencias significativas en el medio ácido e hidrofílico, lo cual indicaría que la velocidad de liberación es similar en estos medios, a pesar de que la disponibilidad de polifenoles sea menor en el medio ácido. Sin embargo, el PVA es un polímero capaz de absorber agua

(o los simulantes) e hincharse, por lo cual los valores de D obtenidos corresponden a un coeficiente de difusión efectivo de las fibras hinchadas. Además, este proceso de hinchamiento podría llevar a la aparición de otros mecanismos de liberación, los cuales serían responsables de la diferencia entre los datos experimentales y la curva del ajuste por la segunda ley de Fick.

Tabla 4.4: Parámetros del ajuste de liberación de polifenoles a los diferentes modelos utilizados.

Simulante	Fick		Ley de potencia			Modelo de Weibull		
	D ($\text{cm}^2/\text{s} \cdot 10^{-16}$)	R ²	k ($\cdot 10^{-2}$)	n	R ²	a ($\cdot 10^{-3}$)	b	R ²
Hidrofílico	26 ± 5	0,916	0,7 ± 0,3	0,87 ± 0,09	0,963	0,004 ± 0,002	1,05 ± 0,09	0,979
Lipofílico	192 ± 31	0,691	-	-	-	0,6 ± 0,2	0,28 ± 0,07	0,724
Ácido	30 ± 4	0,922	5 ± 2	0,4 ± 0,1	0,636	0,04 ± 0,01	0,54 ± 0,06	0,934

La liberación de moléculas activas desde materiales poliméricos es, en general, consecuencia de la suma de diferentes procesos, lo cuales no son tenidos en cuenta en la segunda ley de Fick. Los polímeros *hinchables* son aquellos capaces de absorber parte del fluido en que se encuentran inmersos. En este proceso de hinchamiento, las cadenas de polímero son separadas por las moléculas del fluido, disminuyendo su interacción. Cuando la separación es suficiente, se induce una transición vítrea del polímero y una relajación general de cadenas. Adicionalmente, la densidad del material disminuye (aumento de volumen) y el fluido que penetra puede arrastrar las partículas fuera de él. Siendo el PVA un polímero hinchable en agua (y en los simulantes utilizados), el problema puede estudiarse mediante otros enfoques. Diversos autores han desarrollado modelos empíricos que permiten distinguir entre una liberación por difusión pura (Fick) y una liberación por mecanismos complejos. Una de las ecuaciones más utilizadas es una ley de potencias (Ecuación 4.3), correspondiente al modelo semi-empírico desarrollado por Ritger & Peppas (1987):

$$M_t/M_\infty = kt^n, \quad (4.3)$$

donde k es una constante de la cinética de liberación, y n es el exponente de difusión característico de los procesos de liberación. El modelo de Ritger & Peppas considera solo la primera porción de la curva de liberación ($0 < M_t/M_\infty < 60\%$), para la cual la ley de potencias es una buena aproximación de la ley de Fick (si el proceso es puramente difusional). Valores de n cercanos a 0,45 (para geometría cilíndrica)

indican que la liberación es gobernada por la ley de Fick; valores de n cercanos a 0,89 indican que la relajación de cadenas es el principal mecanismo de liberación; valores intermedios de n indican contribución de ambos mecanismos (liberación anómala).

Un modelo alternativo para diferenciar mecanismos de liberación es la función de Weibull (Ecuación 4.4):

$$M_t/M_\infty = 1 - \exp(-at^b) , \quad (4.4)$$

donde a y b son constantes. El parámetro a define la escala temporal del proceso mientras que el parámetro b define la forma de la curva: $b=1$ corresponde a una función exponencial; $b>1$ define una curva sigmoidea con un punto de inflexión; y $b<1$ describe una función que se asemeja a una parábola en tiempos cortos seguida de una exponencial para el resto de la curva (D'Souza, Faraj, & DeLuca, 2005). Además, el parámetro b es un indicador del mecanismo de liberación involucrado: valores entre 0,35-0,75 indican liberación pura por difusión; valores en el rango 0,75-1 indican que la liberación ocurre por hinchamiento y relajación de cadenas; y valores mayores a 1 indican liberación anómala, el cual es un caso intermedio entre los otros dos tipos de cinética mencionados (Papadopoulou, Kosmidis, Vlachou, & Macheras, 2006). A diferencia del modelo de Ritger & Peppas, la ecuación de Weibull representa la curva completa de liberación ($0 < M_t/M_\infty < 100\%$), pero las constantes de la ecuación no tienen interpretación física directa al tratarse de un modelo empírico. La Fig. 4.9 presenta los datos de liberación normalizados junto a las curvas de ajuste por los modelos de Ritger & Peppas y de Weibull.

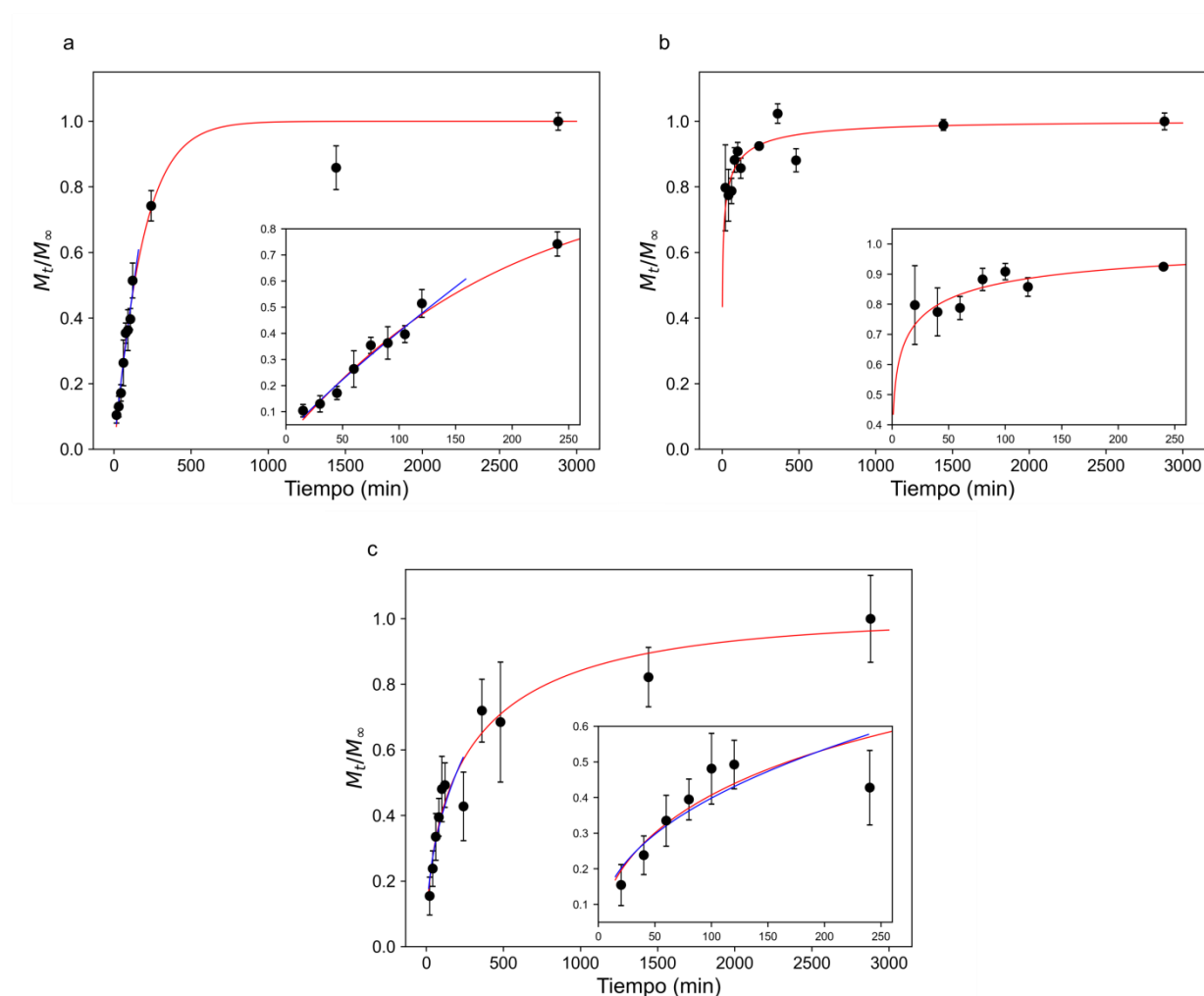


Figura 4.9. Liberación de polifenoles normalizada junto a los ajustes obtenidos al modelo de Ritger & Peppas (—) y de Weibull (—). Simulantes hidrofílico (a), lipofílico (b) y ácido (c).

En la Tabla 4.4 se presentan los resultados obtenidos del ajuste a los modelos de Ritger & Peppas y al de Weibull. El exponente de difusión característico en el medio hidrofílico resultó ($0,87 \pm 0,09$) y el parámetro de Weibull resultó ($1,05 \pm 0,09$). Ambos modelos indican que el principal mecanismo de liberación hacia este simulante es la relajación de cadenas. A diferencia de lo analizado con la ecuación de Fick, en la Fig. 4.9a se observa que ambas curvas de ajuste representan bien la cinética de liberación. La curva de liberación en el simulante lipofílico no pudo ser ajustada por el modelo de Ritger & Peppas, ya que superó el 60% de liberación en los primeros minutos ($t < 15 \text{ min}$). Por otra parte, el parámetro de Weibull en este medio resultó ($0,28 \pm 0,07$), valor que escapa al modelo y por lo tanto impide obtener conclusiones respecto a los mecanismos de liberación ($b > 0,35$). De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, solo el medio lipofílico es capaz de extraer los componentes no-polares que conforman las nanopartículas. Por lo tanto, es probable que la liberación hacia este medio esté

fuertemente guiada por la cinética de disolución de las nanopartículas. En el simulante ácido se obtuvo un exponente de difusión igual a $(0,4 \pm 0,1)$ y un parámetro de Weibull igual a $(0,54 \pm 0,06)$, indicando que la liberación ocurre principalmente por difusión siguiendo la segunda ley de Fick. De acuerdo a los resultados presentados, solo el coeficiente de difusión obtenido en el medio ácido ($D = (30 \pm 4) \text{ cm}^2/\text{s} \cdot 10^{-16}$) correspondería a la segunda ley de Fick, estando sobreestimados los coeficientes de difusión en los otros medios debido a la presencia de otros mecanismos de liberación.

El análisis realizado muestra que la cinética de liberación depende tanto de la polaridad como de la acidez del medio. En particular, la liberación en el medio lipofílico resultó sumamente rápida y se lograron liberar casi la totalidad de los compuestos encapsulados. En el simulante hidrofílico se observó una liberación controlada por el proceso de relajación de cadenas y se logró una liberación máxima del $(77 \pm 4) \%$. Finalmente, en el simulante ácido la cinética de liberación estuvo controlada por la relajación de cadenas y por difusión, y se alcanzó una liberación máxima de $(33 \pm 5) \%$. Resultados similares fueron reportados por Jin & Hsieh (2005) al estudiar mallados electrohilados de PVA/PAA⁷, quienes atribuyen las diferencias a que el hinchamiento del polímero varía con el pH del medio en que se sumerge el material. Para el caso del simulante lipofílico, la posible disolución de las nanopartículas podría ser un factor determinante en la rápida velocidad de liberación observada.

4.4. Conclusiones parciales

Los resultados de este capítulo demuestran la efectividad del proceso de electrohilado para encapsular diferentes compuestos activos, provenientes de un extracto, en fibras nanométricas de PVA conteniendo ácido cítrico. Se demuestra que el tratamiento térmico no conlleva grandes pérdidas de principios activos y permite obtener materiales insolubles en agua que funcionan como sistemas de liberación controlada hacia diferentes medios líquidos. Al respecto, la cinética de liberación de polifenoles, el porcentaje máximo de liberación y los mecanismos involucrados en ella dependen tanto de la polaridad del medio como de su acidez. Particularmente, se observó la mayor cantidad de polifenoles liberados en un simulante de alimentos lipofílico. Este último resultado indica que, para una posible aplicación, los alimentos que presenten grasas en su superficie lograrían liberar mayor cantidad de polifenoles y, por lo tanto, recibirían una mayor protección antioxidante.

4.5. Referencias

- Colín-Orozco, J., Zapata-Torres, M., Rodríguez-Gattorno, G., & Pedroza-Islas, R. (2015). Properties of poly (ethylene oxide)/whey protein isolate nanofibers prepared by electrospinning. *Food Biophysics*, 10(2), 134–144. <https://doi.org/10.1007/s11483-014-9372-1>.

⁷ PAA: poli (ácido acrílico)

- Cordeiro, A., Medeiros, M. L., Santos, N. A., Soledade, L. E. B., Pontes, L., Souza, A. L., Queiroz, N., Souza, A. G. (2013). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 113(2), 889–895. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2778-4>.
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*: 2d Ed. Clarendon Press.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217–223.
- de Araújo, G. K. P., de Souza, S. J., da Silva, M. V., Yamashita, F., Gonçalves, O. H., Leimann, F. V., & Shirai, M. A. (2015). Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2080–2087. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12869>.
- De Freitas, T. B., Santos, C. H. K., da Silva, M. V., Shirai, M. A., Dias, M. I., Barros, L., Barreiro, M.F., Ferreira, I., Gonçalves, O.H., Leimann, F. V. (2017). Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. *Food Packaging and Shelf Life*. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.10.006>.
- Domínguez, R., Barba, F. J., Gómez, B., Putnik, P., Kovačević, D. B., Pateiro, M., Santos, E.M., Lorenzo, J. M. (2018). Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Research International*, 113, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.073>.
- dos Santos Paglione, I., Galindo, M. V., de Medeiros, J. A. S., Yamashita, F., Alvim, I. D., Grosso, C. R. F., Sakanasa, L.S., Shirai, M. A. (2019). Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100419. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100419>.
- European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union, Vol. 15, pp. 12–88. <https://doi.org/10.1016/j.nucengdes.2011.01.052>.
- Fernandes, R. de P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Lima, C. G. de, Pugine, S. M. P., Muneke, P. E. S., Lorenzo, J.M., De Melo, M. P. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 451–460. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1994-x>.
- Fernandes, R. de P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Pugine, S. M. P., Lima, C. G. de, Lorenzo, J. M., & De Melo, M. P. (2017). Evaluation of oxidative stability of lamb burger with *Origanum vulgare* extract. *Food Chemistry*, 233, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.100>.

-
- Figueroa-Lopez, K. J., Enescu, D., Torres-Giner, S., Cabedo, L., Cerqueira, M. A., Pastrana, L., Fuciños, P., Lagaron, J. M. (2020). Development of electrospun active films of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by the incorporation of cyclodextrin inclusion complexes containing oregano essential oil. *Food Hydrocolloids*, 106013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106013>.
 - Gonçalves, S., Moreira, E., Andrade, P. B., Valentão, P., & Romano, A. (2019). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the total phenolic contents and antioxidant activity of wild Mediterranean edible plant extracts. *European Food Research and Technology*, 245(3), 753–762. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3197-y>.
 - Gullón, B., Eibes, G., Moreira, M. T., Herrera, R., Labidi, J., & Gullón, P. (2018). Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. *Industrial Crops and Products*, 113, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.064>.
 - Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2512–2520. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.032>.
 - Hornung, P. S., Avila, S., Apea-Bah, F. B., Liu, J., Teixeira, G. L., Ribani, R. H., & Beta, T. (2020). Sustainable Use of Ilex paraguariensis Waste in Improving Biodegradable Corn Starch Films' Mechanical, Thermal and Bioactive Properties. *Journal of Polymers and the environment*, 28(6), 1696–1709. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01723-w>.
 - Jin, X., & Hsieh, Y.-L. (2005). pH-responsive swelling behavior of poly (vinyl alcohol)/poly (acrylic acid) bi-component fibrous hydrogel membranes. *Polymer*, 46(14), 5149–5160. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.066>.
 - Joye, I. J., & McClements, D. J. (2013). Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.002>.
 - López-Córdoba, A., Medina-Jaramillo, C., Piñeros-Hernandez, D., & Goyanes, S. (2017). Cassava starch films containing rosemary nanoparticles produced by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 71, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.028>.
 - López-Palestina, C. U., Aguirre-Mancilla, C. L., Raya-Pérez, J. C., Ramirez-Pimentel, J. G., Vargas-Torres, A., & Hernández-Fuentes, A. D. (2019). Physicochemical and antioxidant properties of gelatin-based films containing oily tomato extract (*Solanum lycopersicum* L.). *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 142–150. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1564793>.

- Manessis, G., Kalogianni, A. I., Lazou, T., Moschovas, M., Bossis, I., & Gelasakis, A. I. (2020). Plant-Derived Natural Antioxidants in Meat and Meat Products. *Antioxidants*, 9(12), 1215. <https://doi.org/10.3390/antiox9121215>.
- Martelli, S. M., Motta, C., Caon, T., Alberton, J., Bellettini, I. C., do Prado, A. C. P., ... Soldi, V. (2017). Edible carboxymethyl cellulose films containing natural antioxidant and surfactants: α -tocopherol stability, in vitro release and film properties. *LWT*, 77, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.026>.
- Martínez, L., Castillo, J., Ros, G., & Nieto, G. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Rosemary, Pomegranate and Olive Extracts in Fish Patties. *Antioxidants*, 8(4), 86. <https://doi.org/10.3390/antiox8040086>.
- Oliphant, T. E. (2007). SciPy: Open source scientific tools for Python. *Computing in Science and Engineering*, 9, 10–20. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.58>
- Oliveira, G. A. R., Oliveira, A. E., Conceição, E. C., & Leles, M. I. G. (2016). Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food Chemistry*, 211, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.042>.
- Panrong, T., Karbowiak, T., & Harnkarnsujarit, N. (2019). Thermoplastic starch and green tea blends with LLDPE films for active packaging of meat and oil-based products. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100331. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100331>.
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., & Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1–2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044>.
- Pereira de Abreu, D. A., Cruz, J. M., & Paseiro Losada, P. (2012). Active and intelligent packaging for the food industry. *Food Reviews International*, 28(2), 146–187. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595022>.
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23–36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4).
- Rodríguez, G. M., Sibaja, J. C., Espitia, P. J. P., & Otoni, C. G. (2020). Antioxidant active packaging based on papaya edible films incorporated with Moringa oleifera and ascorbic acid for food preservation. *Food Hydrocolloids*, 103, 105630. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105630>.
- Scott, S. E., Rozin, P., & Small, D. A. (2020). Consumers Prefer “natural” more for preventatives than for curatives. *Journal of Consumer Research*, 47(3), 454–471. <https://doi.org/10.1093/jcr/ucaa034>.

- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., & Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science*, 98(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.020>.
- Talón, E., Trifkovic, K. T., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2017). Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. *Carbohydrate Polymers*, 175, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.067>.
- Tian, F., Decker, E. A., & Goddard, J. M. (2013). Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food & Function*, 4(5), 669–680. <https://doi.org/10.1039/C3FO30360H>.
- Uyar, T., & Besenbacher, F. (2008). Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer*, 49(24), 5336–5343. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.025>.
- Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., & Sheng, J. (2005). Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, 41(3), 423–432. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.10.027>.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.

Películas nanocompuestas de almidón obtenidas por extrusión y termoprensado

Resumen

En este capítulo se presenta el desarrollo de películas nanocompuestas de almidón termoplástico con propiedades activas obtenidas por la tecnología de extrusión seguida de calandrado y/o termoprensado. Por un lado, se desarrolló un compuesto con propiedades antioxidantes y, por otro lado, uno con propiedades bactericidas. Para el primer caso, se utilizó un extracto de romero preparado siguiendo una metodología similar a la descrita en el Capítulo 4. Para el segundo caso, se prepararon nanobarras de ZnO por un proceso de sol-gel seguida de crecimiento hidrotérmico. Para el desarrollo del nanocompuesto antioxidante se utilizó una matriz de almidón ya conocida, mientras que para el nanocompuesto antimicrobiano se utilizó una matriz mejorada obtenida durante la tesis. El desarrollo de dicha matriz también se incluye en este capítulo. Para todas las películas desarrolladas se estudiaron las características fisicoquímicas y, para los nanocompuestos activos, se determinó la actividad antioxidante o antimicrobiana asociada.

5.1. Introducción

El desarrollo y estudio de materiales biodegradables y biobasados constituye un problema central para poder reemplazar plásticos derivados de hidrocarburos fósiles y mitigar los efectos ambientales que estos producen. Adicionalmente, el desarrollo de nuevos materiales para envases activos apunta a preservar los alimentos y extender su vida útil. Dentro de los polímeros biobasados y biodegradables, el almidón es una alternativa prometedora para usar como matriz en el desarrollo de envases de alimentos, debido a su alta disponibilidad, bajo precio y a su capacidad para formar películas termoplásticas (García, Famá, D'Accorso, & Goyanes, 2015). En general, las películas basadas en almidón tienen aplicaciones limitadas debido a su carácter higroscópico y a sus pobres propiedades mecánicas y de barrera. La incorporación de antioxidantes y/o antimicrobianos nanométricos puede mejorar el

desempeño del material y, a la vez, conferirle actividad específica que permita incrementar la vida útil del producto envasado.

Los extractos de romero constituyen una fuente importante de compuestos antioxidantes, tal como se describió en el Capítulo 4, y bajo ciertas condiciones son capaces de formar nanopartículas (Joye & McClements, 2013). Por otro lado, las nanopartículas o nanoestructuras de ZnO presentan actividad antimicrobiana y son seguras (GRAS) para incorporar en materiales para envolver alimentos, con un límite de migración específico de 25 mg Zn/kg de alimento (US Food and Drug Administration, 2017). Dentro de las diferentes estructuras que puede formar el ZnO, las nanobarras constituyen una alternativa sobresaliente tanto por su desempeño mecánico como por su acentuada actividad antimicrobiana (Nafchi et al., 2013). En artículos previos al desarrollo de esta tesis, se ha mostrado que la incorporación de extracto de romero en películas de almidón conduce a materiales con mejores propiedades mecánicas (López-Córdoba et al., 2017), mientras que la incorporación de nanobarras de ZnO es beneficiosa tanto en las propiedades mecánicas como en la susceptibilidad al agua de las películas de almidón (Guz et al., 2017). Sin embargo, en ambos trabajos las películas fueron obtenidas por evaporación del solvente, la cual es una metodología de difícil escalabilidad.

Una característica interesante del almidón es que puede procesarse por técnicas industriales, tales como extrusión, para obtener películas termoplásticas. La extrusión del almidón es un proceso continuo que involucra poca cantidad de agua, altas temperaturas (~130 °C) y esfuerzos de corte, y que permite convertir los gránulos de almidón en una matriz termoplástica continua. En general, las películas de almidón obtenidas por extrusión presentan características fisicoquímicas diferentes a las obtenidas por evaporación del solvente, aunque se utilice la misma formulación. En el caso de películas conteniendo principios activos, la energía térmica y mecánica involucrada en la extrusión podría llevar a la degradación de los compuestos o a la pérdida de su actividad específica (Domínguez et al., 2018; Gutiérrez, Herniou-Julien, Álvarez, & Alvarez, 2018). El desarrollo de películas activas obtenidas a partir de precursores preparados por extrusión define nuevos sistema de estudio con características fisicoquímicas en general diferentes. Por otra parte, reviste especial interés estudiar la preservación de los compuestos activos durante la extrusión y determinar cómo el proceso afecta la dispersión de las cargas y las interacciones de estas con la matriz polimérica.

En este capítulo se presenta el desarrollo y estudio de películas nanocompuestas de almidón conteniendo principios activos por la técnica de extrusión y posterior calandrado y/o termoprensado. En primer lugar, se prepararon películas que incorporan extracto de romero (polvo) como agente antioxidante y se estudiaron las propiedades fisicoquímicas del material obtenido y la conservación de la capacidad antioxidante al final del proceso de producción de las películas. Luego, se prepararon películas que incorporan nanobarras de ZnO. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas del

material nanocompuesto obtenido y se analizó la actividad antimicrobiana del mismo en ensayos contra *E. coli*. En todos los casos, como control, se prepararon películas de almidón empleando las mismas formulaciones (para la matriz) y parámetros del proceso que los utilizados en los materiales compuestos.

Con el objetivo de facilitar la lectura, este capítulo se divide en dos secciones. La primera de ellas refiere al estudio de nanocompuestos de almidón conteniendo extracto de romero (Parte A), mientras que la segunda parte describe el desarrollo de nanocompuestos de almidón conteniendo nanobarras de ZnO (Parte B). La segunda sección comienza con el desarrollo de una matriz de almidón con mejores propiedades, la cual se utilizará luego como fórmula de partida para la obtención de nanocompuestos con nanobarras de ZnO. Al finalizar el capítulo, se dan conclusiones respecto a los materiales compuestos desarrollados en ambas secciones.

5.2. Parte A: Películas de almidón conteniendo extracto de romero

En esta primera parte del capítulo se presenta el desarrollo y estudio de películas de almidón conteniendo diferentes concentraciones de extracto de romero. Para ello, se utilizó un material matriz con una formulación utilizada previamente en el laboratorio y un extracto de romero similar al utilizado en el Capítulo 4.

5.2.1. Metodología

5.2.1.1. Materiales

Se utilizó el almidón de mandioca descrito en la Sección 2.4. Para el extracto de romero se utilizaron los mismos elementos del capítulo anterior (Sección 4.2.1). Además se empleó glicerol de grado analítico (Sigma-Aldrich, Alemania) y agua destilada.

5.2.1.2. Preparación del extracto de romero y caracterización

Se utilizó un extracto de romero obtenido por la misma metodología reportada en el capítulo anterior (Sección 4.2.2). El extracto líquido (claro y sin precipitados) fue sometido a un secado en 2 etapas con el objetivo de evitar incorporar etanol en la mezcla a extrudir. En una primera etapa, el volumen líquido se redujo 10 veces utilizando un evaporador rotativo (DragonLab 100 Pro, EEUU; 55 rpm, 35 °C). Luego, el extracto se dispersó en una bandeja y se colocó en una estufa a 50 °C hasta alcanzar peso constante. Se obtuvo un polvo fino de romero (ER) el cual se utilizó inmediatamente para preparar las mezclas para extrusión.

Se evaluó la actividad antioxidante del extracto en polvo para determinar si se produjeron cambios en el mismo después del proceso de secado y nueva dilución. El polvo de extracto de romero se disolvió en una solución de etanol (70 % v/v, 0,1 g de ER en 20 mL), y la solución obtenida fue caracterizada respecto a su contenido de polifenoles y a su actividad antioxidante, utilizando los métodos de F-C y DPPH, respectivamente (Sección 2.6.2).

Como se explicará en el ítem siguiente, en el proceso de obtención de las películas el extracto de romero se incorporó en el agua, dando lugar a una solución turbia. El tamaño y morfología de las partículas que generan dicha turbidez se estudió por microscopía electrónica de barrido de acuerdo a la metodología descripta anteriormente (Sección 2.6.4). Se estudió el sistema de mayor concentración de romero (ER=10%).

5.2.1.3. Fabricación de las películas conteniendo romero y caracterización

Se prepararon mezclas para extrudir partiendo de una fórmula utilizada previamente en el Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos (González-Seligra et al., 2017). Las mezclas

consistieron en almidón de mandioca, agua y glicerol en proporciones fijas. Se incorporaron diferentes cantidades de extracto de romero para obtener cuatro sistemas. El extracto de romero se dispersó primero en el agua mediante agitación magnética (10 min) y, luego, la dispersión fue sonicada en un baño de ultra sonido (30 min). A la dispersión resultante se le incorporó glicerol y se homogeneizó durante 15 min con agitación magnética. La dispersión resultante fue incorporada al almidón (polvo) y mezclada a mano para romper los agregados. Luego se homogeneizó utilizando una mezcladora automática (20 rpm, 30 min) y finalmente se tamizó con una malla metálica (2 mm). Las mezclas obtenidas fueron almacenadas por 24 h en recipientes sellados previos a la extrusión. En la Tabla 5.1 se presenta la composición de cada mezcla y su nomenclatura, siendo TPS la muestra control. El proceso de extrusión y termoprensado se llevó a cabo de acuerdo a la metodología general presentada en la Sección 2.4.

Tabla 5.1: Nomenclatura y composición de los sistemas estudiados incorporando extracto de romero. Los porcentajes reportados son en masa.

Sistema	Almidón (%)	Glicerol (%)	Agua (%)	ER (%)	Relación almidón:glicerol:agua	ER respecto al almidón (%)
TPS	60,0	20,0	20,0	0,0	3:1:1	0
TPS-ER2.5	59,1	19,7	19,7	1,5	3:1:1	2,5
TPS-ER5	58,3	19,4	19,4	2,9	3:1:1	5,0
TPS-ER10	56,6	18,9	18,9	5,7	3:1:1	10,0

Las películas obtenidas fueron caracterizadas respecto a su morfología, susceptibilidad al agua, estructura cristalina, espectro infrarrojo, análisis termo-gravimétrico, hinchamiento, análisis térmico dinámico y propiedades mecánicas (Sección 2.9).

Se estudió la cinética de liberación de polifenoles desde las películas hacia simulantes de alimentos hidrofílico A (etanol 10% v/v), ácido B (ácido acético 3% p/v) y lipofílico D1 (etanol 50% v/v) (European Commission, 2011). Se cortaron muestras de aproximadamente 500 mg, y se sumergieron en vasos de precipitados conteniendo 25 mL de simulante, los cuales se colocaron en un agitador orbital a ~100 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se midió la cantidad de polifenoles en solución por el método de F-C. Tres muestras independientes fueron utilizadas por cada tiempo. La cantidad teórica de polifenoles se calculó considerando el porcentaje en peso del extracto de romero respecto al almidón y el contenido de polifenoles del extracto. Los datos de polifenoles liberados se normalizaron respecto al contenido total teórico y se reportan como porcentaje de polifenoles liberados. Los datos fueron analizados utilizando la ecuación de Weibull para dilucidar los mecanismos involucrados en la

liberación de los principios activos. Se realizó un ajuste no lineal por cuadrados mínimos ponderados de los datos a dicha función utilizando la librería SciPy (Oliphant, 2007).

Por otra parte, se midió la actividad antioxidante de los materiales obtenidos en cada simulante de alimentos. Para ello, se prepararon soluciones conteniendo muestras de material de manera idéntica a la descrita en el párrafo anterior. Se midió la capacidad antioxidante de las soluciones luego de 24 h de inmersión de las películas, y el resultado se normalizó a la cantidad de polifenoles liberados a dicho tiempo.

5.2.2. Resultados y discusión

5.2.2.1. Caracterización de partículas de romero

Durante la preparación de las mezclas de extrusión, el extracto de romero en polvo fue incorporado en agua, lo cual dio lugar a una solución turbia. El tamaño de partículas de la dispersión, luego del proceso de sonicado, se presenta en la Figura 5.1a. La distribución de diámetros obtenida fue amplia: el 50% de las partículas presentó diámetros entre ~200 nm y ~1200 nm, el 80% tuvieron diámetros menores a ~5 μm y se obtuvieron partículas con diámetros de hasta ~40 μm . Al observar la dispersión por FE-SEM (Figura 5.1b, c), se aprecian mayoritariamente partículas con tamaños entre ~100 y ~400 nm, las cuales frecuentemente aparecen ensambladas formando conglomerados de mayor tamaño (Figura 5.1c). En el capítulo anterior (Sección 4.3.1.2) se discutió cómo la dilución del extracto base etanol en agua lleva a la formación de nanopartículas de romero como consecuencia de la precipitación de los compuestos que no son solubles en agua. En este caso, es posible que ciertos componentes formen partículas nanométricas similares durante el proceso de secado, las cuales se aglomeran a medida que disminuye el solvente disponible. Luego, al mezclar el polvo con una cantidad determinada de agua (solo la suficiente para agregar al almidón) y sonicar no fue suficiente para romper completamente dichos aglomerados.

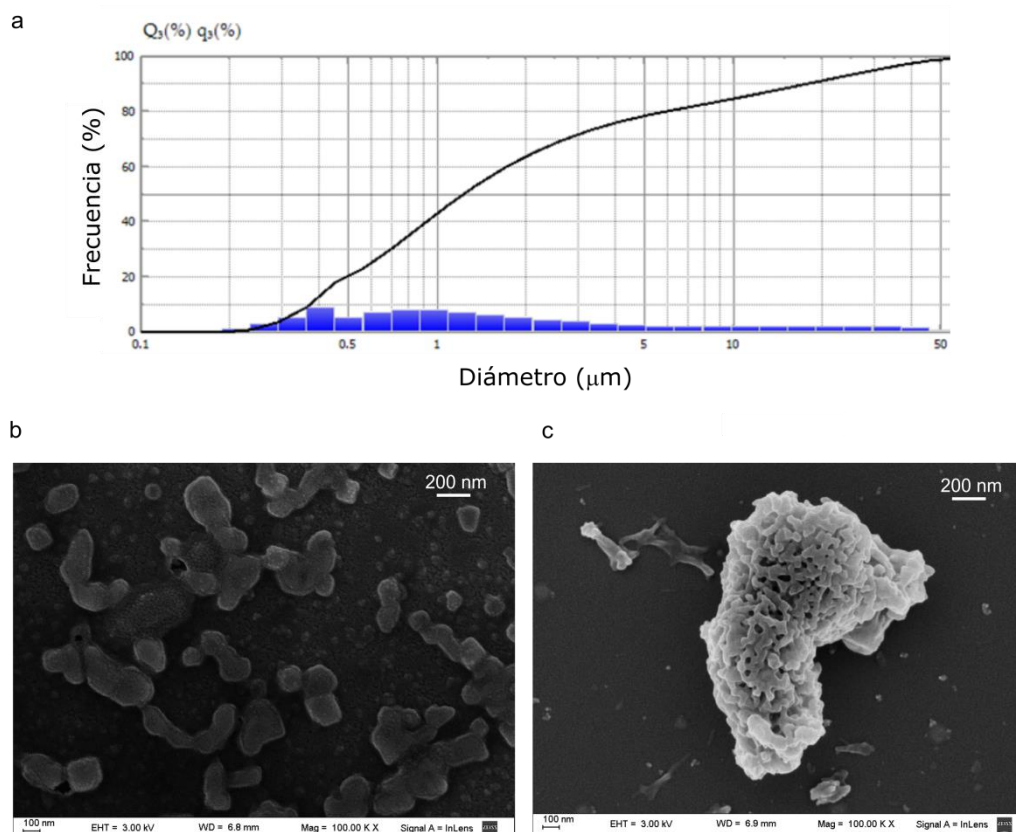


Figura 5.1. (a) Distribución de diámetros de partículas de romero suspendidas en agua; (b, c) micrografías SEM del extracto obtenidas a partir de una gota de la suspensión.

5.2.2.2. Características fisicoquímicas de las películas de almidón conteniendo romero

Las películas obtenidas mostraron un espesor medio de (290 ± 40) μm, no habiendo diferencias significativas entre los diferentes sistemas. La película control resultó opaca como consecuencia de una notable rugosidad al tacto, y presentó una coloración levemente grisácea. Por su parte, todas las películas conteniendo romero presentaron un color marrón verdoso, típico del extracto. Las películas TPS, TPS-ER2.5 y TPS-ER5 resultaron rugosas al tacto y opacas, mientras que la película TPS-ER10 fue la única que se observó traslúcida a ojo desnudo y que resultó lisa al tacto. La Figura 5.2 presenta imágenes SEM de fractura criogénica de las películas de almidón control y aquellas que contienen extracto de romero. El sistema TPS (Fig. 5.2a) presenta una superficie de fractura lisa y no se observan agujeros, fracturas ni fragmentos de gránulos de almidón, lo cual sugiere que la termo-plastificación del almidón fue completa luego del procesamiento por extrusión y posterior termoprensado (González-Seligra et al., 2017). Las películas conteniendo extracto de romero mostraron una estructura típica de nanocompuestos poliméricos, con partículas de diámetros entre ~100 nm y ~500 nm dispersas en la matriz de almidón (Figura 5.2a-c). Se observa que las partículas de romero, las cuales ya estaban

presentes en la mezcla de plastificantes, fueron conservadas durante el proceso de extrusión y termoprensado, a pesar de la energía mecánica y térmica empleada. Además, no se observó presencia de los aglomerados mayores al micrómetro que habían sido detectados en la dispersión de romero en agua. Dichos aglomerados pudieron ser desagregados o fundidos durante la extrusión debido a la temperatura y presión involucrada, y a los esfuerzos de corte resultantes del perfil del tornillo.

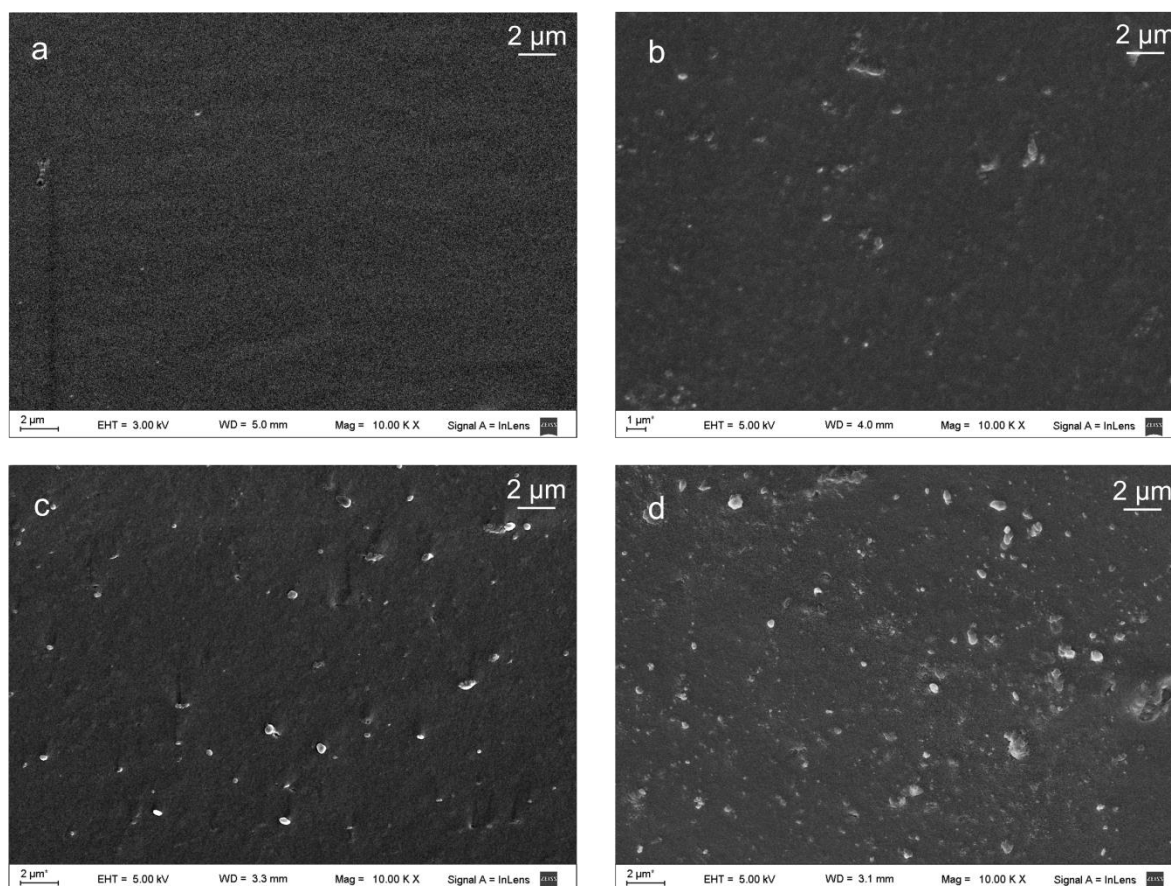


Figura 5.2. Micrografías SEM (10 kx) de la superficie de fractura criogénica de los sistemas TPS (a), TPS-ER2.5 (b), TPS-ER5 (c) y TPS-ER10 (d).

La Figura 5.3 presenta una micrografía SEM del sistema TPS-ER2.5 con mayor aumento (25 kx). No se observan espacios entre las partículas y la matriz, ni tampoco se observan huecos asociados a partículas arrancadas. Además, se puede apreciar que la matriz de almidón cubre parcialmente a las partículas. Todos estos efectos indican una buena adhesión entre las partículas y la matriz.

Tal como se presentó en el primer párrafo de esta sección, las partículas se forman a partir de compuestos del romero no polares que son insolubles en agua. Los compuestos polares, por su parte, podrían tanto formar parte de las partículas como ser miscibles con la matriz de almidón y actuar como plastificantes. Al respecto, diversos trabajos en la bibliografía reciente presentan extractos naturales base agua cuyos compuestos actúan como plastificantes de películas termoplásticas de almidón (M.

Feng et al., 2018; Kim, Kang, & Song, 2020; Medina Jaramillo, Gonzalez Seligra, Goyanes, Bernal, & Famá, 2015; Menzel, González-Martínez, Vilaplana, Diretto, & Chiralt, 2020).

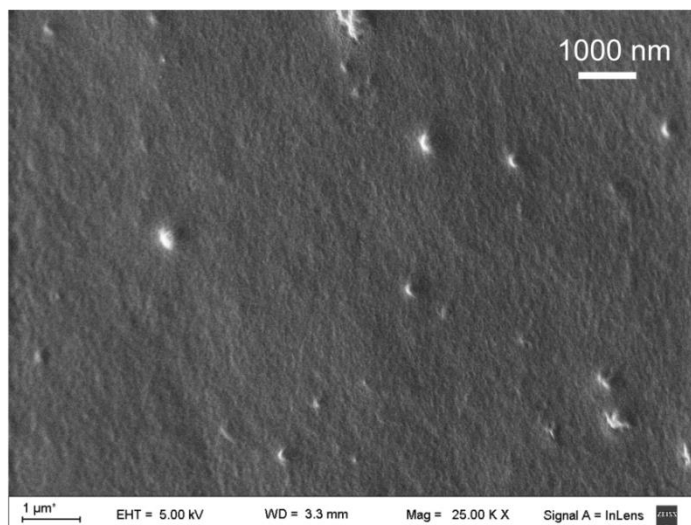


Figura 5.3. Imagen SEM de partículas de romero en el sistema TPS-ER2.5 con mayor aumento (25 kx).

A partir de las micrografías SEM de la superficie de fractura se determinó el tamaño aparente de partículas en cada sistema, suponiendo que las mismas son esféricas. La Figura 5.4 presenta los histogramas de diámetro de partículas junto con el diámetro medio de cada sistema. En general, las nanopartículas de romero estuvieron bien dispersas en los sistemas TPS-ER2.5 y TPS-ER5, donde los diámetros medios resultaron (270 ± 150) nm y (230 ± 100) nm, respectivamente. Estos valores son similares a los observados por microscopía en el caso del polvo disperso en agua, según lo detallado en el ítem anterior. Al aumentar el contenido de extracto de romero a 10%, se observa que algunas partículas se aglomeraron (Figura 5.2d). El histograma de tamaño de partículas muestra un incremento de diámetros para el sistema TPS-ER10, acompañado de un ensanchamiento de la distribución. Además se observa un desplazamiento del valor medio de diámetro de partícula hacia mayores valores, siendo este igual a (350 ± 190) nm. En TPS-ER10 tanto las partículas como los aglomerados de partículas se observaron bien dispersos dentro de la matriz de almidón (Fig. 5.2d). En un trabajo previo, López-Córdoba *et al.* (2017) reportaron que partículas de romero se aglomeran al aumentar el contenido desde 5% hasta 20% (w/w, extracto líquido respecto a solución filmogénica) en películas de almidón termoplástico obtenidas por evaporación del solvente.

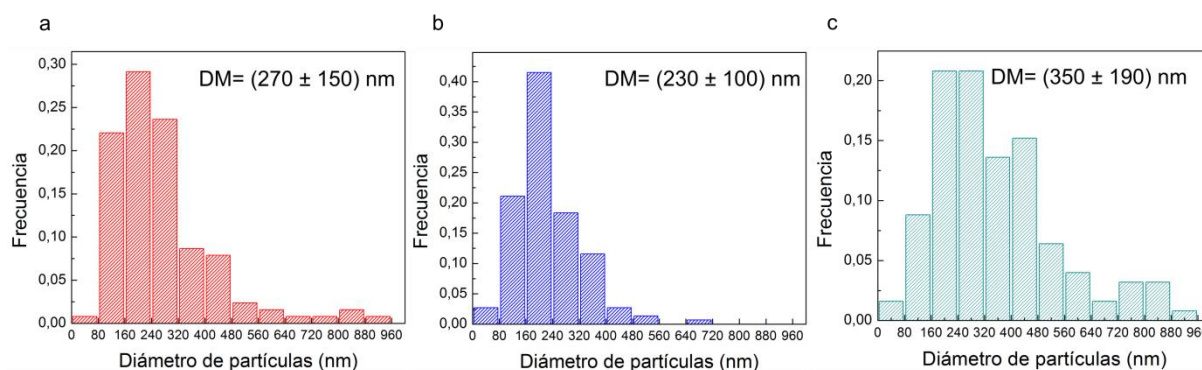


Figura 5.4. Histogramas de diámetro de partículas en las películas estudiadas. (a) TPS-ER2.5, (b) TPS-ER5, (c) TPS-ER10. Se reporta el diámetro medio (DM) para cada caso.

El espectro infrarrojo de las distintas películas y del extracto de romero se presenta en la Figura 5.5a. Tal como se discutió en la Sección 4.3.2.1, el espectro correspondiente al extracto de romero muestra las bandas comunes a los compuestos mayoritarios: estiramientos de los enlace O-H del grupo fenol ($3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$), C-H (2929 cm^{-1}), C=C en los anillos (1597 cm^{-1}) y C-OH del grupo fenol (1264 cm^{-1} y 1029 cm^{-1}). Las nanopartículas de romero están formadas por moléculas que contienen grupos hidroxilos en su estructura, por ejemplo el ácido carnósico. Estos grupos permiten a dichas partículas interactuar tanto con el almidón como con los plastificantes presentes, lo cual sería responsable de la buena adhesión observada por SEM entre partículas y matriz.

El espectro infrarrojo de la película TPS mostró las bandas características del almidón: estiramiento O-H ($3100\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$), estiramiento C-H de grupos alquilo (2927 cm^{-1} y 2892 cm^{-1}), estiramiento C-O y C-C (1149 cm^{-1} y 1077 cm^{-1} , respectivamente), y flexiones C-O-H ($1100\text{--}900\text{ cm}^{-1}$). En las películas conteniendo extracto de romero, se observa un incremento de la intensidad relativa de la banda ubicada en 1014 cm^{-1} proporcional al contenido de romero (Figura 5.5b). Esta diferencia se le atribuye al solapamiento de la banda correspondiente al grupo fenol del extracto de romero (1029 cm^{-1}) con las bandas de la vibración C-O-H del almidón. No se observaron otras bandas correspondientes al romero en los espectros de las películas compuestas ni tampoco modificaciones en las bandas características del almidón. Este resultado sugiere que la presencia del extracto no modificó las interacciones presentes en la matriz de almidón. Algunos trabajos de la literatura reportan resultados similares. En particular, no han sido observados cambios en los espectros al incorporar un extracto de romero (10% p/p respecto al polímero) en una película de almidón termoplástico obtenida por evaporación de solvente (López-Córdoba et al., 2017) o al incorporar un extracto de tomillo (15% p/p respecto al polímero) en películas de almidón-quitosano (Talón, Trifkovic, Nedovic, et al., 2017).

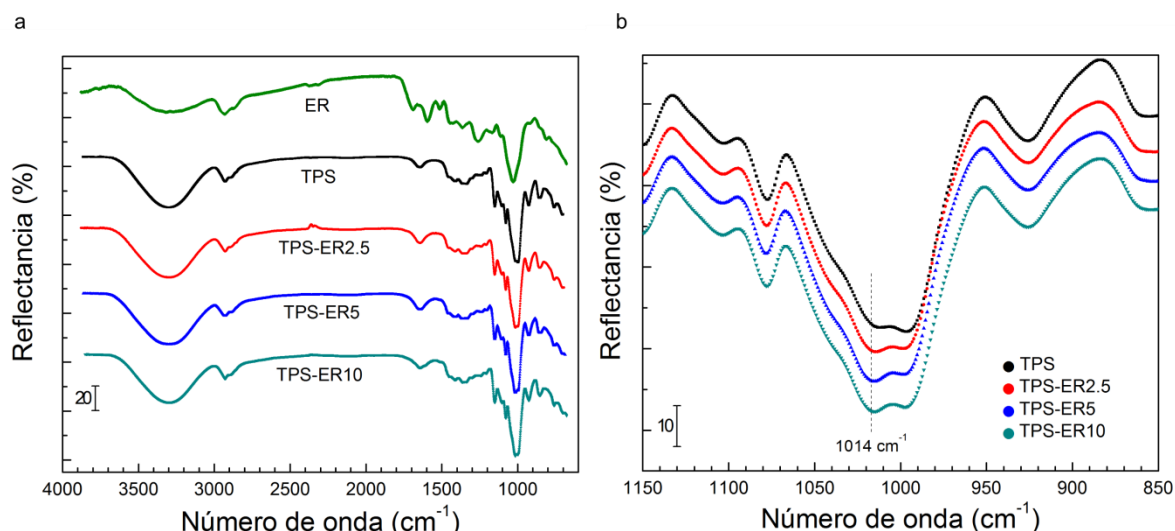


Figura 5.5. (a) Espectro FTIR del extracto de romero y de las películas estudiadas. (b) Detalle de la región 1150-850 cm^{-1} , donde se observa un incremento en la intensidad relativa de la banda centrada en 1014 cm^{-1} .

La Figura 5.6 presenta los patrones de difracción de rayos X correspondientes a las películas desarrolladas. Todos los sistemas presentaron una estructura semi-cristalina que es típica de películas de almidón termoplástico y consiste en un halo amorfo en el rango 12-28° y diferentes picos cristalinos montados sobre dicho halo. En el sistema TPS conviven 2 estructuras cristalinas diferentes: los picos centrados en 12,9°, 18,3° y 19,7° corresponde a una estructura V_h , mientras que los picos centrados en 14,9°, 16,8°, 19,0° y 22,1° corresponden a una estructura tipo B (Van Soest, Hulleman, De Wit, & Vliegenthart, 1996). Los gránulos de almidón de mandioca presentan, de manera natural, una estructura cristalina tipo C, la cual es una combinación de la estructura tipo A (característica de almidones provenientes de cereales) y tipo B (característica de tubérculos) (Buléon et al., 2007; Van Soest et al., 1996). La ausencia de determinados picos característicos de la estructura tipo C y la presencia de los picos característicos de la estructura v_h está asociada a la termo-plastificación del almidón durante el proceso de extrusión y termoprensado. Por ello, la presencia de un patrón de picos que corresponde a una fase cristalina tipo B sugiere la ocurrencia de un proceso de re-cristalización del polímero luego del procesamiento de los materiales. En general, una vez que los gránulos de almidón son desestructurados, las cadenas de amilosa y amilopectina pierden compatibilidad y se organizan de manera separada. En este caso, las cadenas de amilosa se asociaron para formar una estructura tipo B, que consiste en clústeres de hélices dobles empaquetadas en una estructura espacial $P6_1$ (celda hexagonal) y conteniendo 36 moléculas de agua por celda (Putaux, Buleon, & Chanzy, 2000). Por otro lado, la fase cristalina V_h corresponde a complejos formados entre cadenas de amilosa y lípidos, alcoholes o

moléculas pequeñas, y consiste en una hélice simple a izquierda conteniendo 6 unidades D-glicosil por vuelta y alojando en su interior a dichas moléculas (Buléon et al., 2007). En el caso de las películas TPS, dichos complejos se forman con las moléculas de glicerol durante la extrusión o durante el almacenamiento (Obiro, Sinha Ray, & Emmambux, 2012).

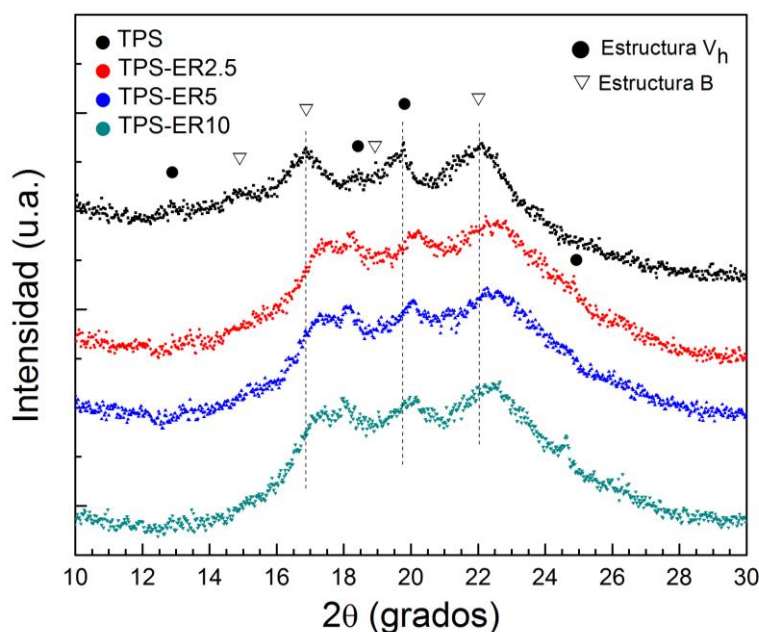


Figura 5.6. Patrones de difracción de los sistemas estudiados. Las líneas verticales evidencian el corrimiento hacia mayores ángulos de algunos picos cristalinos con la incorporación del extracto de romero. La flecha en TPS-ER5 señala el pico de la estructura V_h que incrementa su intensidad y se corre hacia menores ángulos en todos los sistemas conteniendo romero.

Los sistemas conteniendo extracto de romero presentaron patrones de difracción similares al del TPS, con algunas diferencias. En primer lugar, puede observarse un pico adicional centrado en $24,9^\circ$ que también corresponde a la estructura V_h (Van Soest et al., 1996). Los picos centrados en $16,8^\circ$, $19,7^\circ$ y $22,1^\circ$ aparecen corridos $\sim 0,3^\circ$ hacia menores ángulos y se ensanchan levemente en los patrones de las películas con extracto. Además, el pico centrado en $18,3^\circ$ muestra un corrimiento de $\sim 0,2^\circ$ hacia mayores ángulos y presenta una intensidad relativa notoriamente mayor. Todos estos cambios indican que la presencia del extracto de romero modifica las estructuras cristalinas típicas del almidón termoplástico. Al respecto, es posible que determinadas moléculas del extracto de romero reemplacen a moléculas de agua en la estructura B o formen complejos cristalinos con las cadenas de amilosa, dando lugar a fases cristalinas con diferente parámetro de red y factor de estructura. Diferentes autores han estudiado la formación de complejos de amilosa con moléculas tales como lípidos, glicerol, butanol,

alcohol isopropílico y compuestos aromáticos, entre otros (Buléon et al., 2007; Chanjarujit, Hongprabhas, & Chaiseri, 2018; Le Bail, Rondeau, & Buleon, 2005). Sin embargo, en la actualidad no hay reportes sobre complejos de amilosa con moléculas características del extracto de romero. En la Figura 5.6 también se observa que el corrimiento de la posición de los picos centrados en 16,8° y 22,1° (en TPS) es mayor en el patrón de difracción de TPS-ER2,5 que en el patrón de TPS-ER10,0. Esto sugiere que la deformación de la red cristalina de la estructura B varía con la concentración de extracto, siendo más importante para contenidos bajos de extracto de romero. Este fenómeno es esperable considerando que el extracto puede actuar como plastificante, lo cual aumentaría la movilidad de las cadenas de polímero y favorecería la re-cristalización que da origen a la estructura B. El efecto plastificante del extracto de romero fue evidenciado también en los ensayos de análisis térmico mecánico-dinámico, de susceptibilidad al agua, y de tracción uniaxial, según se describirá más adelante.

La Figura 5.7 presenta la curva de análisis termo-gravimétrico (a) y su derivada respecto a la temperatura (b). La degradación térmica del extracto se estudió sobre el polvo, y ha sido descrita detalladamente en la Sección 4.3.2.1. Brevemente, esta ocurre entre 170 °C y 400 °C (final del ensayo), donde permanece un residuo de ~45 %, y en la curva derivada se distinguen 2 procesos de degradación térmica, centrados en ~205 °C y en ~300 °C. El primer evento térmico está asociado a la evaporación de compuestos fenólicos volátiles y del remanente de solventes (agua y etanol) que permanece en el polvo. El segundo evento térmico corresponde a la descomposición de componentes bioactivos (Cordeiro et al., 2013). Se observa una pérdida <4% del extracto a 140 °C, que es la temperatura máxima del procesamiento (extrusión seguida de termoprensado). La estabilidad térmica del extracto podría contribuir a que no haya pérdidas significativas de compuestos activos durante el procesamiento.

La degradación térmica de las películas de TPS ocurre en tres etapas. La primera pérdida de masa ocurre entre 50 °C y 150 °C y corresponde a la evaporación de agua; la segunda pérdida de masa ocurre entre 150 °C y 250 °C y corresponde a la evaporación del plastificante (glicerol); la última pérdida de masa, de mayor intensidad, corresponde a la degradación de cadenas de amilosa y amilopectina (García, Ribba, Dufresne, Aranguren, & Goyanes, 2011; Wilhelm, Sierakowski, Souza, & Wypych, 2003). En la curva derivada (Figura 5.7b) se observa que la degradación del almidón ocurre a menores temperaturas en las películas conteniendo extracto de romero. En particular, el máximo del pico de degradación del almidón se centra en 318 °C para el sistema TPS, en 315 °C para el sistema TPS-ER2.5, y en 310 °C para los sistemas TPS-ER5 y TPS-ER10. Una menor temperatura de degradación del almidón indica que la presencia del extracto debilita las interacciones entre las cadenas poliméricas, mientras se favorecen las interacciones puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilos del almidón y los compuestos polares del romero. Resultados similares fueron reportados por diversos autores al estudiar películas de almidón

obtenidas por evaporación de solvente y conteniendo extracto de yerba mate, extracto de té verde o extracto de nibs de cacao, y en películas de almidón obtenidas por extrusión y termo-moldeado conteniendo extracto de arándano (Gutiérrez & Alvarez, 2018; Jaramillo, Gutiérrez, Goyanes, Bernal, & Famá, 2016; Kim, Baek, Go, & Song, 2018; Medina-Jaramillo, Ochoa-Yepes, Bernal, & Famá, 2017). En la Figura 5.7a también puede observarse que la masa residual a 400 °C aumenta con el contenido de extracto de romero. Las diferencias se corresponden con la porción de extracto de cada película que no se degrada térmicamente a la mencionada temperatura (~45% respecto a los valores reportados en la Tabla 5.1).

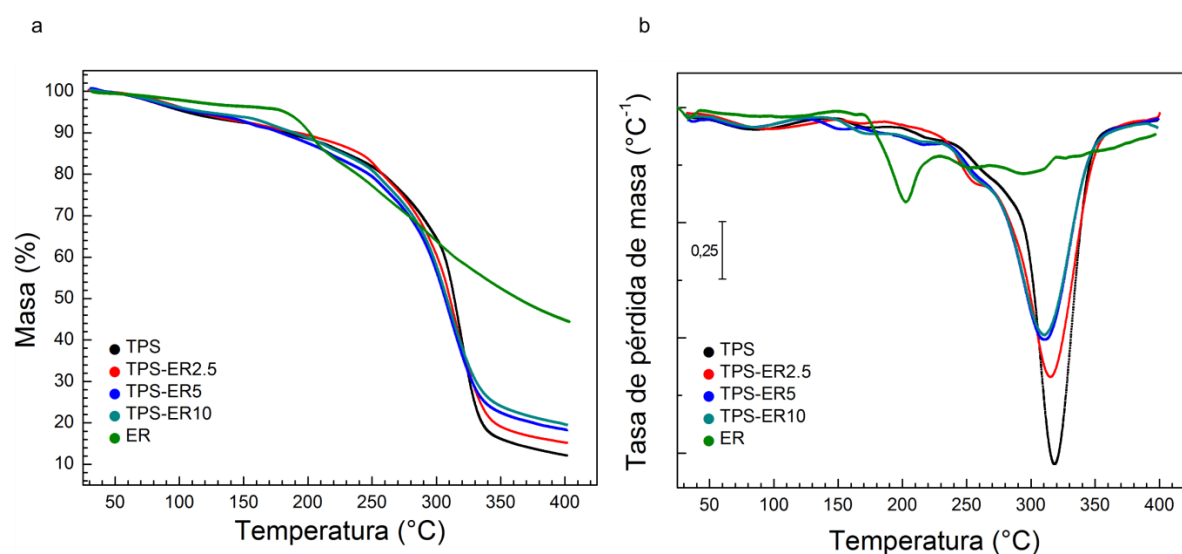


Figura 5.7. Curva de análisis termo-gravimétrico (TGA) del extracto y de las películas estudiadas (a), y derivada respecto a la temperatura de la curva TGA (b).

La Figura 5.8 presenta la evolución de la tangente de pérdida ($\tan(\delta)$) en función de la temperatura para los diferentes sistemas. Debe considerarse que los procesos de relajación del almidón termoplástico son influenciados por el contenido de humedad de las muestras, ya que el agua actúa como plastificante del almidón. Al respecto, el contenido de humedad no presentó diferencias significativas entre los distintos sistemas preparados, de acuerdo a los resultados que se presentarán más adelante (Tabla 5.2). Todos los materiales estudiados se comportaron como sistemas parcialmente miscibles con dos procesos de relajación principales asociados a la presencia de una fase rica en glicerol y una fase rica en almidón (Morales, Candal, Famá, Goyanes, & Rubiolo, 2015). El proceso ubicado a menores temperaturas (T_1) está asociado a la relajación de la fase rica en glicerol y se centra en -64 °C para el TPS. Este valor es similar al reportado por diferentes autores al estudiar sistemas de almidón plastificados con glicerol (Castillo et al., 2013; López, Lecot, Zaritzky, & García, 2011). Los sistemas conteniendo extracto de romero muestran un corrimiento de T_1 hacia mayores temperaturas y un

ensanchamiento de dicha transición. Además, dicho corrimiento es mayor para mayores concentraciones de extracto. En general, la presencia de nanopartículas insertas en una matriz de almidón reduce la movilidad de las cadenas de polímero e introduce nuevos mecanismos de fricción (García et al., 2011). Este fenómeno podría ocurrir como consecuencia de la presencia de las nanopartículas de romero, lo cual conduce al incremento de T_1 y al ensanchamiento del pico. El proceso ubicado a altas temperaturas (T_2) está asociado a la relajación de cadena de la fase rica en almidón, y se centra en 8 °C para el TPS. En el sistema TPS-ER2.5, se observa que T_2 ocurre a mayores temperaturas, lo cual también sería consecuencia de la presencia de nanopartículas. Sin embargo, para los sistemas TPS-ER5 y TPS-ER10, la relajación de la fase rica en almidón ocurre a menores temperaturas que en TPS-ER2.5. Este comportamiento sugiere que, además del efecto de las nanopartículas, el extracto de romero presenta componentes que pueden actuar como plastificantes de la fase rica en almidón y que, por lo tanto, pueden compensar el efecto de las nanopartículas en la temperatura T_2 . Al respecto, para el sistema TPS-ER2.5, el efecto de las nanopartículas en la T_g resultó mayor que el de la fase miscible que plastifica. Finalmente, puede observarse en los sistemas TPS-ER5 y TPS-ER10 que el incremento en el valor de T_1 y la disminución en el valor de T_2 conducen a procesos de relajación más cercanos en temperatura, lo cual indicaría una mayor miscibilidad entre las fases ricas en glicerol y en almidón.

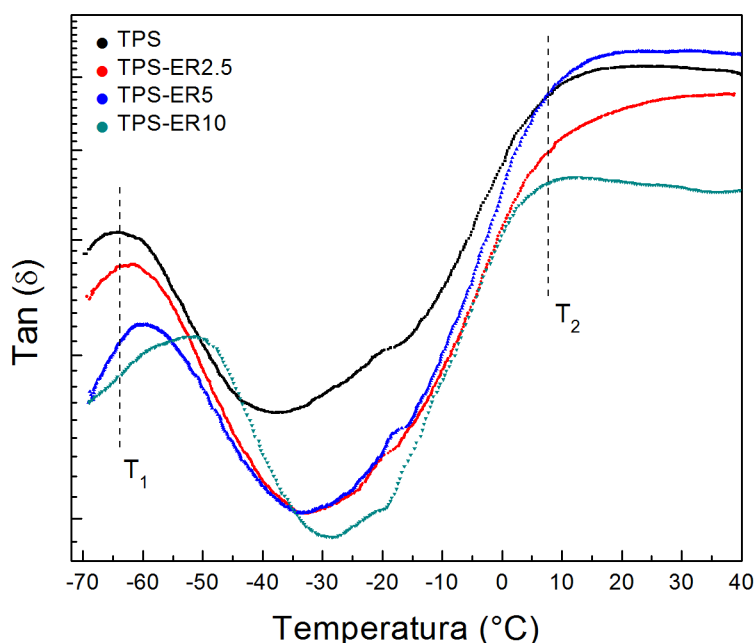


Figura 5.8. Tangente de pérdida en función de la temperatura. Las líneas verticales son una ayuda visual y están centradas en las temperaturas de transición de la fase rica en glicerol (T_1) y de la fase rica en almidón (T_2).

La Tabla 5.2 presenta los valores de contenido de humedad (MC), solubilidad al agua (WS) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) para los diferentes sistemas estudiados. Los valores de MC no presentaron diferencias significativas entre los sistemas desarrollados. Por su parte, los valores de WS fueron mayores para mayores contenidos de extracto de romero. Estas diferencias se corresponden con el contenido de extracto de romero de cada sistema, puesto que parte del extracto es soluble en agua.

Los sistemas TPS, TPS-ER2.5 y TPS-ER5 no presentaron diferencias significativas en el valor de WVP. La presencia de nanopartículas generalmente conduce a una disminución en la permeabilidad del agua, como consecuencia de un aumento del camino tortuoso que dispersa las moléculas de agua y dificulta su difusión a través de la matriz (Kuswandi, 2016). Este efecto podría no estar presente por dos motivos: i) que la concentración sea lo suficientemente baja como para que se aprecien diferencias significativas, o ii) que dicho efecto se vea compensado por el efecto que producen las moléculas del romero que son miscibles con el almidón y que actúan como plastificante. La segunda hipótesis concuerda con los resultados discutidos previamente para los ensayos DMTA, los cuales sugerían un efecto plastificante del extracto y, por lo tanto, describe mejor al comportamiento del sistema. En el sistema TPS-ER10 se observó un valor significativamente menor de WVP, el cual puede estar asociado a la presencia de aglomerados de partículas de romero de mayor tamaño bien distribuidos en la matriz, tal como se observó en las imágenes SEM. En un trabajo publicado por López-Córdoba et al. (2017), se reportó un aumento del valor de WVP en películas de almidón obtenidas por evaporación de solvente y conteniendo un extracto de romero diferente (en etanol 96% v/v). En dicho trabajo, el aumento del valor de WVP se asoció a interacciones pobres entre partículas y matriz, lo cual favorecería la difusión de moléculas de agua. En los resultados de esta tesis, el efecto fue contrario como consecuencia de la buena adhesión de la nanopartículas a la matriz de almidón. Esta mejor adhesión pudo ser consecuencia de haber utilizado un protocolo de extracción que optimiza la obtención de componentes polares del romero (Oliveira et al., 2016), capaces de interactuar tanto con la matriz como con las partículas.

Tabla 5.2: Parámetros de susceptibilidad al agua. Contenido de humedad (MC), solubilidad en agua (WS) y permeabilidad al vapor de agua (WVP). Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	MC (%)	WS (%)	WVP ($\text{g m}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \cdot 10^{-10}$)
TPS	22 ± 1^a	19 ± 1^a	$5,38 \pm 0,06^a$
TPS-ER2.5	23 ± 1^a	20 ± 1^{ab}	$4,9 \pm 0,5^a$
TPS-ER5	24 ± 2^a	22 ± 1^b	$4,6 \pm 0,8^a$
TPS-ER10	24 ± 1^a	25 ± 1^c	$2,62 \pm 0,08^b$

La Figura 5.9 presenta curvas de tensión-deformación típicas de los sistemas estudiados, mientras que en la Tabla 5.3 se presentan los valores de módulo de Young, tensión, deformación a rotura y tenacidad a la tracción. Todos los sistemas presentaron un comportamiento característico de materiales termoplásticos, el cual consiste en una deformación elástica, inicialmente lineal, seguida de una deformación plástica extensa que culmina en el quiebre de la probeta. Las películas TPS y TPS-ER2.5 presentaron un módulo de Young similar, mientras que las películas TPS-ER5 presentaron menor módulo que los primeros, y las películas TPS-ER10 un módulo aún menor. Por otro lado, el valor de tensión de rotura para el sistema TPS-ER2.5 resultó mayor respecto al sistema TPS, pero también respecto a los sistemas TPS-ER5 y TPS-ER10. La deformación a rotura resultó mayor para mayor concentración de extracto de romero en la matriz de almidón, mientras que la tenacidad a la tracción aumentó significativamente con el agregado de ER pero no mostró diferencias significativas entre los tres sistemas conteniendo extracto.

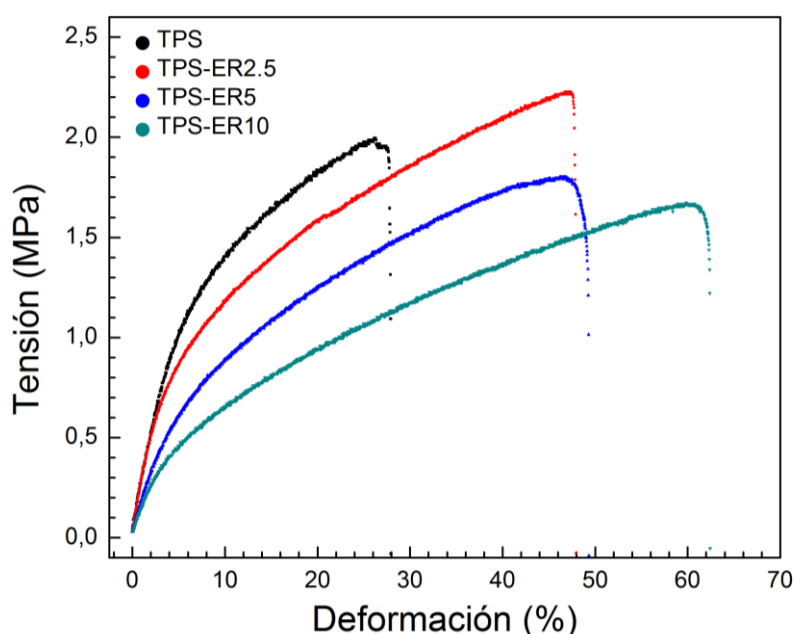


Figura 5.9. Curvas características de tensión-deformación para los diferentes sistemas.

El comportamiento mecánico descrito está asociado a la combinación de los dos efectos evidenciados anteriormente: por un lado la presencia de nanopartículas, que actúan como refuerzo mecánico y, por otro lado, al efecto plastificante de diferentes sustancias del extracto de romero. Para concentraciones relativamente bajas del extracto (TPS-ER2.5), las nanopartículas actúan como cargas bien dispersas y bien adheridas, lo cual incrementa levemente el valor de tensión de rotura sin disminuir la deformación a rotura. Para concentraciones mayores de extractos (TPS-ER5 y TPS-ER10), el efecto plastificante se hace más evidente y particularmente para el sistema TPS-ER10 el refuerzo mecánico

también es menos efectivo como consecuencia de la aglomeración de partículas, tal como fue observado en las imágenes SEM.

El análisis expuesto concuerda con la discusión de los resultados sobre permeabilidad al vapor de agua y las pruebas mecánicas dinámicas (DMTA), confirmando la convivencia de efectos producidos tanto por las nanopartículas de romero (componentes no miscibles) como por las moléculas del extracto, solubles en agua, que pueden actuar como plastificantes del almidón (componentes miscibles).

Tabla 5.3: Módulo de Young (E), tensión de rotura (σ_b), deformación a rotura (ϵ_b), y tenacidad a la tracción (T) de los sistemas estudiados. Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)	T (MJ m ⁻³)
TPS	24 ± 2 ^a	2,01 ± 0,16 ^{ab}	30 ± 2 ^a	0,47 ± 0,07 ^a
TPS-ER2.5	23 ± 1 ^a	2,28 ± 0,25 ^a	50 ± 4 ^b	0,92 ± 0,08 ^b
TPS-ER5	15 ± 2 ^b	1,99 ± 0,24 ^{ab}	49 ± 5 ^b	0,65 ± 0,06 ^{ab}
TPS-ER10	9 ± 2 ^c	1,75 ± 0,25 ^b	70 ± 10 ^c	0,89 ± 0,13 ^b

5.2.2.3. Actividad antioxidante y liberación de polifenoles

El extracto de romero (en polvo) presentó un contenido total de polifenoles de 290 mg GAE/g y una actividad antioxidante de (1,88 ± 0,07) $\mu\text{mol TE/mg GAE}$. La actividad antioxidante no mostró diferencias significativas respecto a la actividad del extracto de romero (líquido) reportada en el capítulo anterior, indicando que el proceso de secado realizado no disminuyó la capacidad antioxidante de manera significativa. Dicho secado resulta necesario para poder fabricar las películas mediante extrusión, ya que este es un procesamiento en seco y el contenido de agua y de etanol del extracto modificaría las condiciones. En particular, se ha reportado que la inclusión de etanol en películas de almidón obtenidas por extrusión produce diferentes efectos: disminución del contenido de humedad, incremento en el módulo de Young, y cristalización de amilosa encapsulando moléculas de etanol (V_h) (Gilfillan, Moghaddam, Bartley, & Doherty, 2016). El extracto en polvo permite evitar la aparición de estos efectos sin disminuir su capacidad antioxidante.

La Tabla 5.4 presenta el contenido teórico de polifenoles de cada sistema desarrollado, el cual se obtiene considerando la cantidad de polifenoles del extracto y la cantidad de romero en cada sistema (Tabla 5.1). Además se presenta la cantidad de polifenoles liberada a los diferentes simulantes alimenticios luego de 24 h de exposición y la actividad antioxidante correspondiente. Todos los sistemas liberaron más del 90 % del contenido teórico de polifenoles a los simulantes hidrofílico y lipofílico. Por ejemplo, para los sistemas TPS-ER5 y TPS-ER10 se obtuvo un porcentaje de liberación de ~98 % en el

simulante lipofílico. Estos resultados demuestran que no hubo pérdidas significativas de polifenoles durante el proceso de extrusión y posterior termoprensado. Además, muestran que no es necesario realizar una extracción a mayores temperaturas para medir el contenido de polifenoles, puesto que la liberación a temperatura ambiente en el simulante lipofílico alcanzó valores sin diferencias significativas respecto al contenido teórico. Por otra parte, la liberación de polifenoles al simulante de alimentos ácidos fue menor en todos los sistemas, alcanzando porcentajes de liberación entre ~76 % y ~87 %. La menor liberación al medio ácido se asocia a la menor solubilidad de los compuestos de romero en este medio (Wood, Senthilmohan, & Peskin, 2002), en concordancia con los resultados de liberación del sistema PVA-ER (Sección 4.3.2.3). Respecto a la actividad antioxidante, como era de esperar, los materiales con mayor contenido de polifenoles presentaron mayor capacidad antioxidante en todos los simulantes. Para el sistema TPS-ER2.5 no se observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante alcanzada en cada medio. Para los sistemas TPS-ER5 y TPS-ER10 se observó un valor significativamente mayor en la capacidad antioxidante en el medio lipofílico respecto a los otros dos medios, lo cual se asocia a la mayor solubilidad de compuestos no polares tales como carnosol y ácido carnósico, en concordancia con lo discutido en el capítulo anterior para el sistema PVA-ER.

Tabla 5.4: Contenido teórico de polifenoles, cantidad máxima de polifenoles liberados y actividad antioxidante a 24 h. Superíndices diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	Contenido teórico de polifenoles (mg GAE/g)	Polifenoles liberados (mg GAE/g)			Actividad antioxidante (mg TE/g)		
		Hidrofílico	Lipofílico	Ácido	Hidrofílico	Lipofílico	Ácido
TPS-ER2.5	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1 ^a	4,0 ± 0,3 ^{ab}	3,6 ± 0,3 ^b	8,4 ± 0,7 ^{ab}	9,1 ± 0,9 ^a	7,4 ± 0,6 ^b
TPS-ER5	8,5 ± 0,3	7,8 ± 0,6 ^a	8,3 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,2 ^b	16,2 ± 0,9 ^a	20 ± 2 ^b	15 ± 1 ^a
TPS-ER10	16,4 ± 0,6	16,0 ± 0,4 ^a	16,1 ± 0,3 ^a	14,2 ± 0,8 ^b	31 ± 2 ^a	35 ± 2 ^b	34 ± 3 ^a

5.2.2.4. Cinética de liberación de polifenoles

La liberación de polifenoles a los diferentes simulantes alimenticios en función del tiempo, junto a las curvas de ajuste por la función de Weibull, se presenta en la Figura 5.10. En todos los materiales estudiados se observó que la liberación alcanza un máximo entre 120 min y 240 min en los simulantes hidrofílico y ácido, seguido de una disminución del contenido de polifenoles. Esto podría asociarse a la oxidación de los componentes liberados en dichos medios, en acuerdo con lo reportado por otros autores (Talón, Trifkovic, Vargas, et al., 2017). Por el contrario, el contenido de polifenoles no disminuyó en el simulante lipofílico en los tiempos estudiados, probablemente por una menor oxidación consecuencia de menor difusión de O₂ en un medio de estas características (Sada, Kito, Oda, & Ito,

1975) y/o con la liberación tardía de compuestos que forman nanopartículas y que solo son solubles en este medio. De acuerdo a lo discutido en la Sección 4.3.2.3, las nanopartículas de romero están formadas por compuestos que no son solubles en agua pero sí en etanol (70 % v/v), por lo cual solo podrían ser afines al simulante alimenticio lipofílico.

En todos los sistemas (Figura 5.10a-c) la liberación al medio hidrofílico (▲) ocurre de manera abrupta y descontrolada, alcanzando el máximo en aproximadamente 90 min. Por su parte, la liberación al medio lipofílico (▼) fue más rápida para sistemas con mayor contenido de romero, como puede apreciarse si se compara la posición del conjunto de datos entre 60 min y 120 min. Además, el máximo de liberación se alcanza a tiempos mayores (~240 min) respecto al máximo en el medio hidrofílico. Todas las películas de almidón conteniendo romero liberaron menor cantidad de polifenoles al simulante ácido respecto a los otros medios. Además, la liberación de polifenoles desde las películas TPS-ER10 al medio ácido fue notoriamente más rápida respecto a la liberación desde TPS-ER2.5 o TPS-ER5 hacia dicho simulante, lo cual se evidencia en los valores de porcentaje de liberación alcanzado a tiempos relativamente cortos ($t < 60$ min). Este último resultado se relaciona al efecto plastificante del romero antes descrito, el cual es notorio para concentraciones altas de romero. La presencia de un plastificante adicional disminuye la interacción entre cadenas de polímero, lo cual favorece la liberación de compuestos.

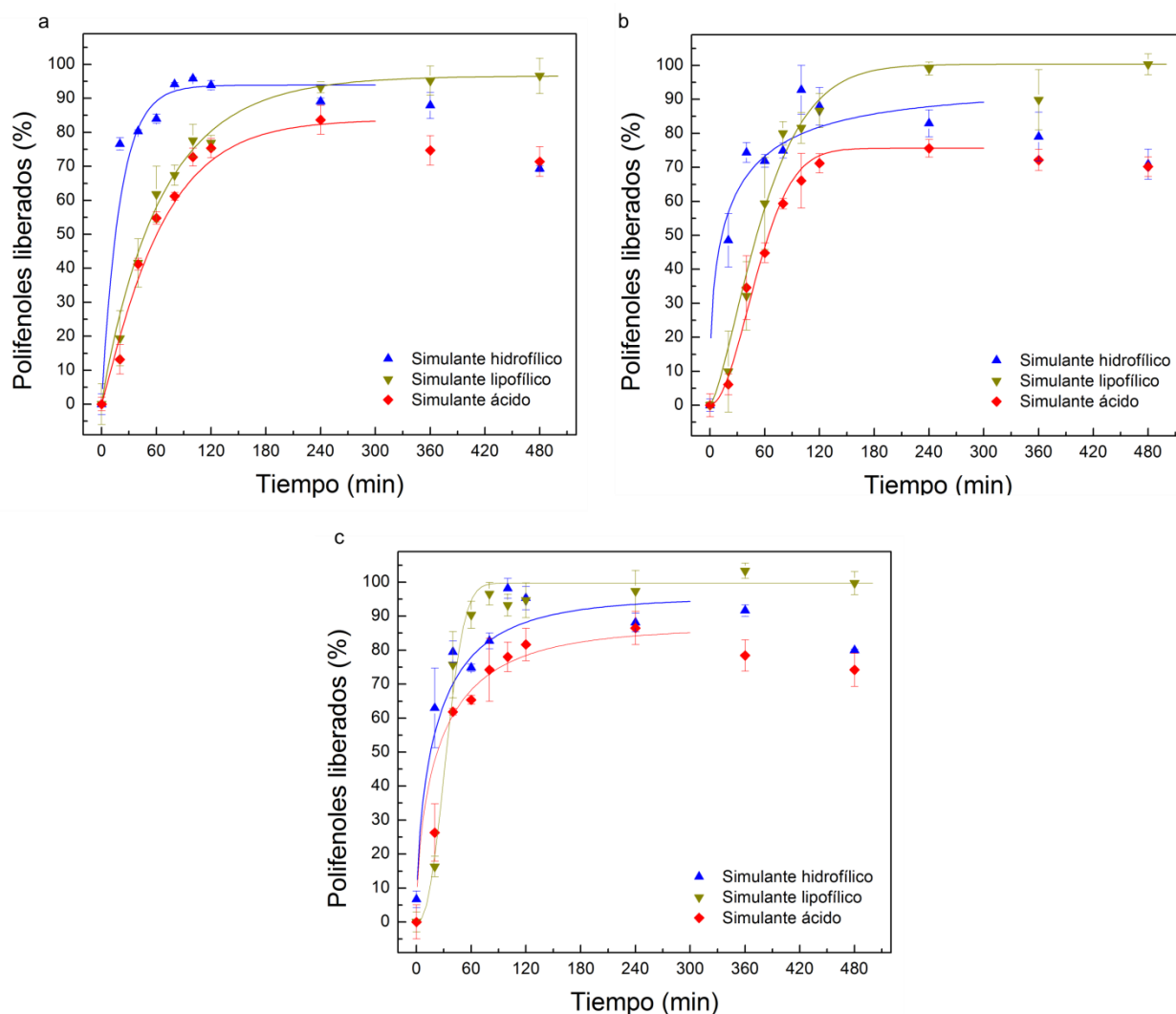


Figura 5.10. Datos de liberación de polifenoles en función del tiempo y curvas de ajuste a la función de Weibull para los sistemas TPS-ER2.5 (a), TPS-ER5 (b) y TPS-ER10 (c).

En el capítulo anterior se presentó el modelo de difusión (ecuación de Fick) y las ecuaciones de Ritger & Peppas (semi-empírica) y de Weibull (empírica) para explicar el comportamiento de liberación de compuestos y dilucidar los mecanismos que intervienen. La rápida liberación de compuestos observada aquí, junto con la solubilidad en agua de la matriz de almidón (~19 %), indicarían que el mecanismo de difusión tiene un rol despreciable frente a otros mecanismos, por lo cual los resultados aquí presentados no se analizaron con dicha función. Al respecto, el grado de hinchamiento (S) de la matriz de almidón (TPS) en los medios hidrofílicos, lipofílico y ácido resultó $(188 \pm 3) \%$, $(123 \pm 3) \%$ y $(251 \pm 1) \%$, respectivamente. La ecuación de Ritger & Peppas tampoco pudo ser utilizada porque solo tiene validez para el primer 60 % de liberación y, en los experimentos presentes, dicho porcentaje se alcanzó a tiempos muy cortos en todos los sistemas. En esta serie de experimentos, los datos de liberación solo fueron ajustados al modelo de Weibull, el cual viene dado por la Ecuación 5.1:

$$M_t/M_\infty = 1 - \exp(-at^b) , \quad (5.1)$$

donde a y b son constantes. El parámetro a define la escala temporal del proceso mientras que el parámetro b define la forma de la curva: $b = 1$ corresponde a una función exponencial; $b > 1$ define una curva sigmoidea con un punto de inflexión; y $b < 1$ describe una función que se asemeja a una parábola en tiempos cortos seguida de una exponencial para el resto de la curva (D'Souza et al., 2005). Además, el parámetro b es un indicador del mecanismo de liberación involucrado: valores entre 0,35-0,75 indican liberación pura por difusión; valores en el rango 0,75-1 indican que la liberación ocurre por hinchamiento y relajación de cadenas; y valores mayores a 1 indican liberación anómala, el cual es un caso intermedio entre los otros dos tipos de cinética mencionados (Papadopoulou et al., 2006).

En la Figura 5.10 se incluye el ajuste a la función de Weibull junto con los datos experimentales de liberación, y en la Tabla 5.5 se presentan los parámetros obtenidos de cada ajuste. Los ajustes se realizaron considerando solo los puntos previos al máximo de liberación. Se observa en la Figura 5.10 que las curvas de ajuste en el medio hidrofílico no representan bien a los datos experimentales. En este caso, las curvas no lograron incluir a todos los puntos como consecuencia de la dispersión alta y, por lo tanto, el coeficiente de correlación fue pobre en este medio. Además, el parámetro b obtenido para la liberación en el medio hidrofílico presenta una incerteza alta, que no permite elucidar qué mecanismo de liberación predomina. La liberación al medio lipofílico y ácido fue bien representada por las curvas de ajuste a la función de Weibull. El parámetro b resultó mayor a 1 para el medio lipofílico, indicando que la liberación es anómala en todos los sistemas. Para la liberación hacia el simulante alimenticio ácido, el parámetro b resultó mayor a 1 en los sistemas TPS-ER2.5 y TPS-ER5, indicando nuevamente que la liberación aquí es anómala. Sin embargo, para el sistema TPS-ER10 el parámetro b tomó un valor intermedio ($0,6 \pm 0,2$), sugiriendo que la difusión sí es relevante cuando este material se sumerge en dicho medio. En particular, la presencia de aglomerados de nanopartículas, de difícil disolución en medio ácido, podría ser responsable del cambio en los mecanismos de liberación.

Tabla 5.5: Parámetros de los ajustes realizados por la función de Weibull a los datos experimentales de liberación. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Sistema	Hidrofílico			Lipofílico			Ácido		
	a	b	R ²	a	b	R ²	a	b	R ²
TPS-ER2.5	0,05 ± 0,07 ^a	1,0 ± 0,4 ^a	0,963	0,018 ± 0,004 ^a	0,96 ± 0,06 ^a	0,991	0,010 ± 0,004 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	0,989
TPS-ER5	0,24 ± 0,16 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	0,956	0,003 ± 0,003 ^b	1,4 ± 0,2 ^b	0,984	0,0004 ± 0,0002 ^b	1,9 ± 0,1 ^b	0,986
TPS-ER10	0,14 ± 0,11 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	0,969	0,0002 ± 0,0002 ^b	2,4 ± 0,3 ^c	0,979	0,12 ± 0,07 ^c	0,6 ± 0,2 ^c	0,945

De acuerdo a los resultados presentados a lo largo de esta sección, el proceso de extrusión es adecuado para procesar películas de almidón conteniendo un extracto natural antioxidante típico, como el de romero. A pesar de la temperatura involucrada en el proceso, la capacidad antioxidante del extracto de romero se conserva y las películas son capaces de liberar compuestos activos a diferentes medios simulantes de alimentos, aunque no de una manera controlada. Además, el desempeño del material se vio beneficiado en sus propiedades mecánicas al agregar extracto de romero. Sin embargo, la matriz de almidón utilizada (almidón plastificado con glicerol) presentó un valor bajo de deformación plástica en los ensayos de tracción y su espesor resultó alto, además de tener una superficie rugosa. En la siguiente sección, se presenta primero una investigación destinada a mejorar el procesamiento del material matriz, donde se utilizan distintos plastificantes y se estudia el efecto de la concentración de ácido cítrico como potencial esterificante/reticulante. Este estudio tiene como objetivo obtener un material con menor espesor, menos rugoso y con mejores propiedades mecánicas y de susceptibilidad al agua. Luego, se presenta el desarrollo asociado al material compuesto obtenido con la matriz optimizada e incorporando nanobarras de ZnO como principio activo antimicrobiano.

5.3. Parte B: Películas de almidón conteniendo nanobarras de ZnO

Para el desarrollo de este tipo de nanocompuestos, se decidió cambiar la formulación de la matriz de almidón que ya, a esta altura de la tesis, estaba claro que adolecía de diversos problemas. En particular, se cambiaron los plastificantes y se estudió las ventajas de adicionar ácido cítrico como esterificante/reticulante. Esta segunda parte comienza con el proceso de optimización del material matriz (Sección 5.3.1), y luego continúa con el desarrollo de nanocompuestos antimicrobianos (Sección 5.3.2). Los materiales nanocompuestos fueron fabricados empleando la nueva matriz optimizada, es decir utilizando la composición para la cual se obtuvo la mejor performance desde el punto de vista de las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua. Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, se estudió un único sistema conteniendo 1% (p/p) de nanobarras de ZnO.

5.3.1. Optimización del material matriz

Las propiedades fisicoquímicas de películas de almidón termoplástico dependen, en general, del origen botánico del almidón, de los plastificantes incorporados y del procesamiento del material. En la parte A de este capítulo se desarrollaron películas de almidón conteniendo extracto de romero partiendo de una matriz de almidón plastificada con agua y glicerol. Las películas presentaron una rugosidad marcada, lo cual dificultaría su utilización en sistemas bicapa, y propiedades mecánicas pobres. En esta sección, se presenta una investigación cuyo objetivo fue mejorar el desempeño de la matriz de almidón.

5.3.1.1. Metodología

5.3.1.1.1. Materiales

Se utilizó almidón de mandioca y glicerol que fueron presentados previamente (Sección 5.2.1.1), sorbitol grado industrial (Mapal, Argentina), ácido cítrico anhidro (Stanton, Argentina), hipofosfito de sodio mono-hidrato p.a. (Biopack, Argentina) y agua destilada.

5.3.1.1.2. Preparación y caracterización de las películas

De acuerdo a ensayos preliminares y a la información reportada por otros autores, se utilizó una mezcla de glicerol y sorbitol en partes iguales como plastificantes. Manteniendo fija la concentración de estos plastificantes, se estudió el efecto de la incorporación de ácido cítrico e hipofosfito de sodio en distintas concentraciones. El ácido cítrico tiene como objetivo entrecruzar las cadenas de almidón mediante una reacción de esterificación, mientras que el hipofosfito de sodio es un catalizador de dicha reacción (Feng, Xiao, Sui, Wang, & Xie, 2014; Gonzalez Seligra, Medina Jaramillo, Famá, & Goyanes, 2016; Reddy & Yang, 2010). En primer lugar, se preparó la mezcla de plastificantes con agua y se homogeneizó con agitación magnética por 15 min. Luego se incorporó ácido cítrico e hipofosfito de

sodio y se mantuvo la agitación por 20 min a 50 °C, hasta disolución total de los componentes sólidos. Esta mezcla se incorporó al almidón de mandioca, se homogeneizó primero manualmente hasta romper los agregados, luego en una mezcladora automática (20 rpm, 30 min) y finalmente se tamizó con una malla metálica (2 mm). Las mezclas fueron almacenadas por 24 h en recipientes sellados previos a la extrusión. En la Tabla 5.6 se presenta la composición de las diferentes mezclas y su nomenclatura, siendo TPS la muestra control. Las mezclas fueron procesadas por extrusión con boquilla plana, seguida de calandrado y termoprensado (este último proceso para corregir inhomogeneidades del espesor de las películas calandradas), de acuerdo a los detalles experimentales presentados en la Sección 2.4. Las películas obtenidas fueron almacenadas durante 4 semanas a humedad relativa controlada (56%) y temperatura ambiente, y luego se caracterizaron de acuerdo a la morfología, susceptibilidad al agua, propiedades mecánicas en ensayos de tracción uniaxial, análisis termo-gravimétrico y espectro infrarrojo (Sección 2.9).

Tabla 5.6: Nomenclatura y composición de los sistemas estudiados incorporando ácido cítrico. *El sistema TPS es diferente al utilizado previamente (distintos plastificantes).

Sistema	Almidón (%)	Agua (%)	Glicerol (%)	Sorbitol (%)	Ácido cítrico (%)	Hipofosfito de sodio (%)	Ácido cítrico respecto al almidón (%)
TPS*	66,6	13,4	10,0	10,0	0,0	0,0	0
TPS-AC1	66,0	13,2	9,9	9,9	0,66	0,33	1,0
TPS-AC5	63,5	12,7	9,5	9,5	3,18	1,59	5,0
TPS-AC10	60,6	12,1	9,1	9,1	6,06	3,03	10,0

5.3.1.2. Resultados y discusión de la optimización del material matriz

5.3.1.2.1. Características fisicoquímicas

Se observó que el material control (TPS) no pudo ser aplanado por la calandra, obteniéndose un espesor de aproximadamente de 1 mm. Por su parte, los espesores resultaron aproximadamente de 300 µm para los materiales calandrados a partir de las formulaciones TPS-AC1, TPS-AC5 y TPS-AC10. Luego de someter los materiales al proceso de termoprensado, se obtuvieron películas delgadas que presentaron espesores de (390 ± 70) µm, (120 ± 30) µm, (150 ± 20) µm y (180 ± 40) µm para los sistemas TPS, TPS-AC1, TPS-AC5 y TPS-AC10, respectivamente. En primer lugar, se destaca la disminución del espesor de las películas obtenidas por extrusión y calandrado como consecuencia de la incorporación del ácido cítrico. En segundo lugar, para un proceso de termoprensado idéntico, las películas conteniendo ácido cítrico presentaron un valor significativamente menor de espesor respecto al sistema

control TPS. En cuanto al aspecto, las películas TPS presentaron una marcada rugosidad al tacto y fueron opacas, de forma similar a lo observado en la matriz de la parte A de este capítulo. Por su parte, todas las películas conteniendo ácido cítrico fueron lisas al tacto y translúcidas al ojo desnudo.

La Figura 5.11 presenta micrografías SEM típicas de la fractura criogénica de las películas de almidón plastificadas con glicerol y sorbitol y conteniendo diferentes cantidades de ácido cítrico. Todas las películas mostraron una superficie de fractura lisa, y para los sistemas TPS, TPS-AC1 y TPS-AC5 no se observaron gránulos rotos de almidón ni agujeros, lo cual sugiere una termo-plastificación completa luego del proceso de extrusión y calandrado/termoprensado (González-Seligra et al., 2017). El sistema TPS-AC10 presenta fragmentos de gránulos de almidón menores a 500 nm dispersos en la matriz. No obstante, la cantidad de fragmentos es baja y, por lo tanto, no se espera que produzca efectos notorios en las propiedades del material correspondiente.

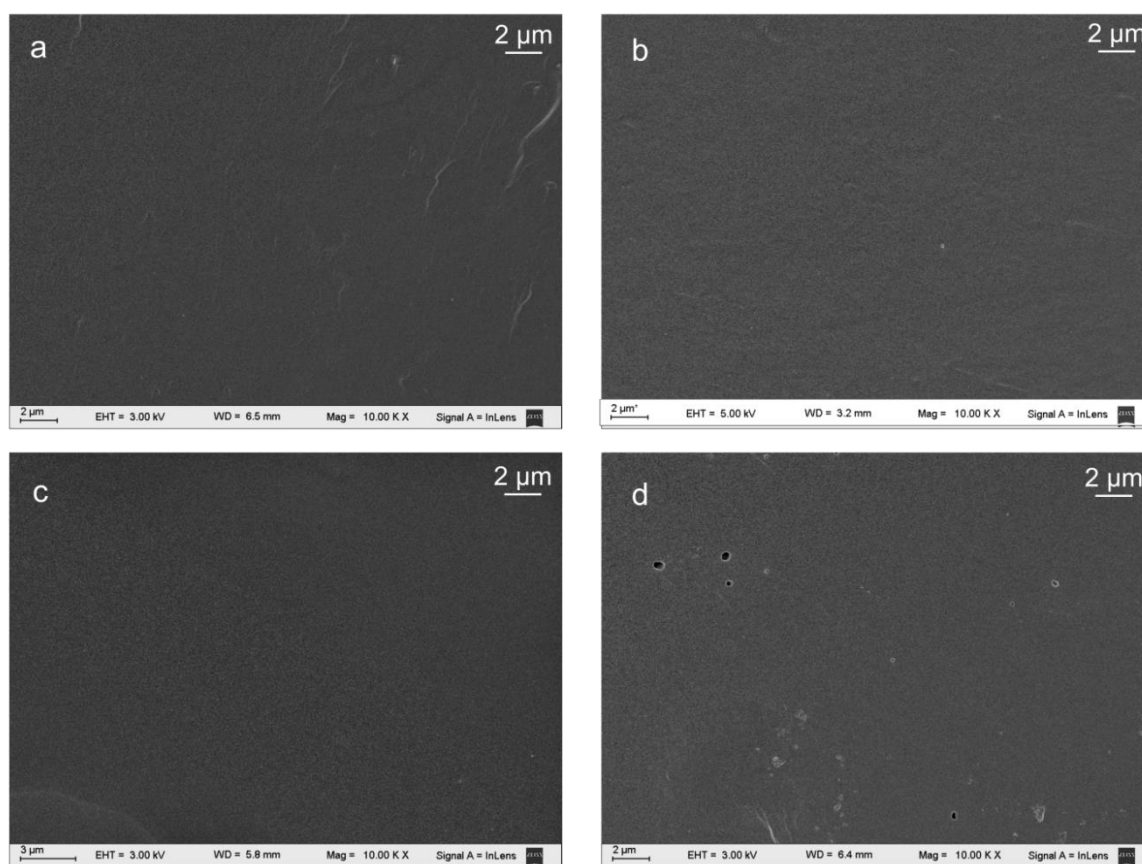


Figura 5.11. Micrografías SEM (10 kx) de la superficie de fractura criogénica de los sistemas TPS (a), TPS-AC1 (b), TPS-AC5 (c) y TPS-AC10 (d).

La Figura 5.12 presenta los espectros FTIR de los sistemas estudiados. Todos los sistemas presentaron las bandas características del almidón, señaladas en la sección previa: estiramiento O-H ($3100-3600\text{ cm}^{-1}$), estiramiento C-H de grupos alquilo (2927 cm^{-1} y 2892 cm^{-1}), estiramiento C-O y C-C

(1149 cm^{-1} y 1077 cm^{-1} , respectivamente), y flexiones C-O-H ($1100\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). Con la incorporación de ácido cítrico e hipofosfito de sodio, se observa una banda adicional centrada en 1716 cm^{-1} . De acuerdo a la literatura, el estiramiento del grupo C=O en el ácido cítrico produce una banda centrada en 1709 cm^{-1} (Shi et al., 2007), mientras que el estiramiento C=O en el éster de ácido cítrico origina una banda centrada en 1760 cm^{-1} (Stein, 2016). El pico observado se localiza a números de onda intermedios, por lo que puede asociarse a la superposición de ambas bandas. Un efecto similar fue reportado por Shi y col. (2007) al estudiar películas de almidón de maíz conteniendo ácido cítrico y por Reddy y col. (2010) al estudiar películas de almidón de maíz conteniendo ácido cítrico e hipofosfito de sodio. La intensidad de la banda a 1716 cm^{-1} aumenta con el incremento de la concentración de ácido cítrico en el sistema, indicando mayor presencia de enlaces C=O (Figura 5.12b). No se observan corrimientos de la banda con la variación en la cantidad de ácido cítrico, lo cual sugiere que la proporción entre carboxilos y ésteres se mantiene constante. La formación de enlaces éster puede conducir al entrecruzamiento de cadenas por diferentes mecanismos, siendo el más sencillo una molécula de ácido cítrico que se enlaza a dos cadenas de polímero. Un modelo más complejo, estudiado por otros autores, propone que dos moléculas de ácido cítrico se enlazan a diferentes cadenas poliméricas, y los ácidos se unen entre sí por medio de una molécula de glicerol. En este modelo, cada molécula de ácido cítrico forma un éster con una cadena del polímero, y la molécula de glicerol actúa como puente, uniéndose con ambos ácidos por enlaces éster (Gonzalez Seligra et al., 2016). Si bien el entrecruzamiento entre cadenas es posible mediante la esterificación, los resultados de los espectros FTIR solo evidencian la formación del enlace, el cual también podría darse entre el ácido cítrico y una sola cadena de almidón o entre el ácido y alguno de los plastificantes (glicerol o sorbitol).

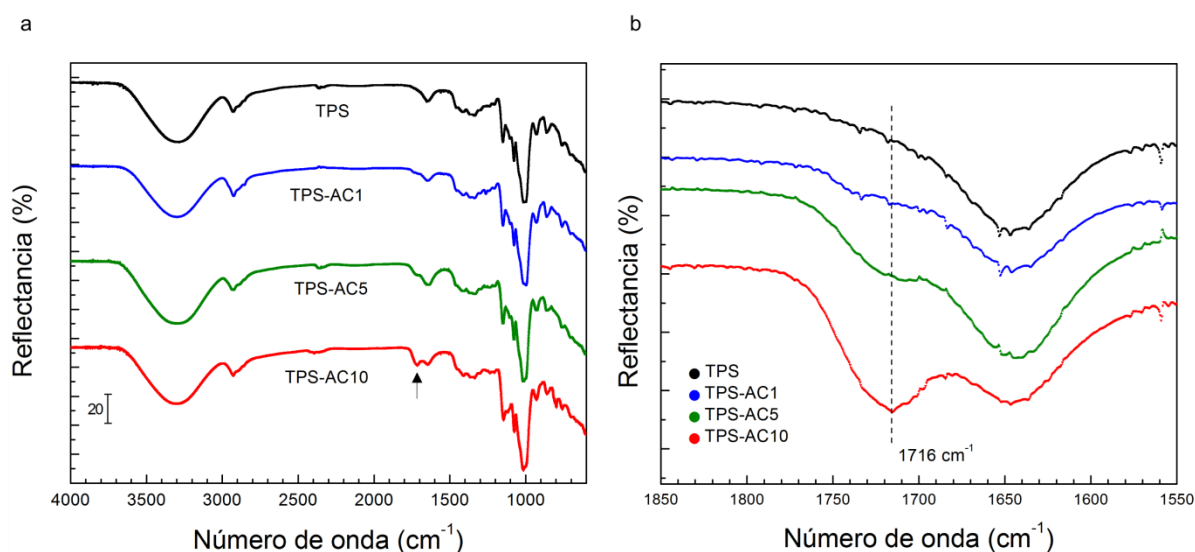


Figura 5.12. Espectro FTIR de las películas estudiadas (a) y detalle de la región $1550\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$, donde se observa un incremento en la intensidad relativa de la banda centrada en 1716 cm^{-1} (b).

La Figura 5.13 presenta las curvas de análisis termo-gravimétrico (a) de los distintos materiales y la curva derivada respecto al tiempo (b). La degradación térmica de las películas TPS ocurre en 3 etapas: la primera (50-150 °C) corresponde a evaporación de agua; la segunda (150-250 °C) corresponde a la evaporación de los plastificantes; y la última (250-340 °C), de mayor intensidad, corresponde a la degradación de cadenas de amilosa y amilopectina. En la Figura 5.13a se puede apreciar que la pérdida de masa que ocurre a partir de 250 °C es mayor para todos los sistemas conteniendo ácido cítrico y, además, el escalón presenta un corrimiento hacia menores temperaturas para los sistemas TPS-AC5 y TPS-AC10. Ambos efectos se pueden distinguir con mayor claridad en la curva derivada (Figura 5.13b), donde el máximo del pico asociado a la degradación del almidón ocurre a menores temperaturas en las películas TPS-5.0 y TPS10.0. En particular, el máximo del pico de degradación del almidón se centra en 312 °C para los sistemas TPS y TPS-AC1, en 303 °C para el sistema TPS-AC5, y en 300 °C para el sistema TPS-AC10. En este caso, la menor temperatura de degradación del almidón sugiere que la presencia de ácido cítrico promueve la despolimerización del almidón durante el proceso de extrusión y termoprensado, siendo estos efectos significativos para concentraciones de ácido cítrico de 5% o 10%. Resultados similares fueron reportados para películas de almidón de maíz obtenidas por extrusión y conteniendo 2% y 4% de ácido cítrico (Wang, Yu, Chang, & Ma, 2007). Al respecto, otros autores mostraron que la incorporación de ácido cítrico en bajas proporciones (2% p/p) favorece las interacciones entre almidón y plastificante, pero en sistemas en que la concentración de ácido cítrico fue mayor (4% p/p) ocurre una hidrólisis durante el procesamiento (Zain, Kahar, & Noriman, 2016). Los resultados presentados en esta tesis muestran un comportamiento similar: solo para concentraciones de ácido cítrico relativamente altas (5% o 10%) se observa disminución en la temperatura de degradación, la cual puede asociarse a un menor peso molecular del polímero.

La masa residual al final de los ensayos (400 °C) muestra un incremento significativo en las películas TPS-5.0 y TPS-10.0 con respecto al sistema TPS, siendo dicha diferencia mayor para mayor contenido de ácido cítrico. Este efecto corresponde a la formación de ésteres entre ácido cítrico y las cadenas poliméricas, lo cual incrementa la cantidad relativa de carbono en el material (Shi et al., 2007).

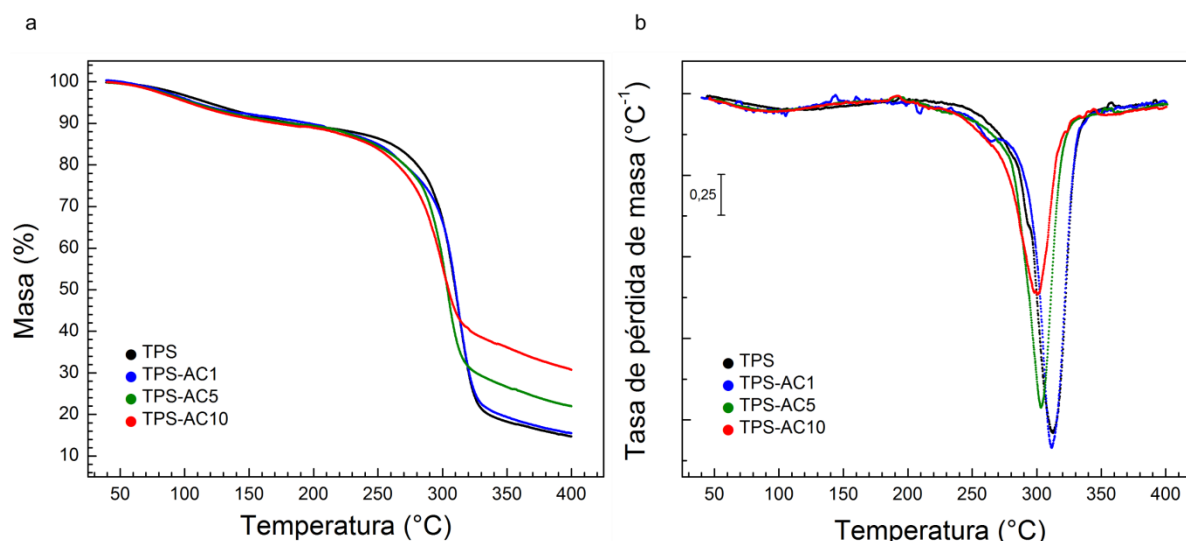


Figura 5.13. Curva de análisis termo-gravimétrico (TGA) de las películas estudiadas (a), y derivada respecto a la temperatura de la curva TGA (b).

La Figura 5.14 presenta el análisis térmico diferencial (DTA) para los sistemas estudiados. Para el sistema TPS se distinguen cuatro procesos endotérmicos: los primeros dos (T_1 y T_2) están asociados a la fusión de cristallitos remanentes de los gránulos de almidón y de complejos de amilosa, respectivamente, mientras que el tercero y el cuarto (T_3 y T_4) corresponden a la degradación térmica de amilosa y amilopectina, respectivamente (Colonna & Buleon, 2009; González-Seligra et al., 2017; Hosney, Zeleznak, & Yost, 1986). Para los sistemas TPS-AC1 y TPS-AC5 se distinguen los mismos procesos con algunas leves diferencias. Para TPS-AC1, las temperaturas T_2 y T_3 muestran un corrimiento hacia mayores valores. Esta mayor estabilidad térmica de la amilosa podría ser ocasionada por formaciones de enlaces éster entre el ácido cítrico y el polímero, las cuales inducen una menor interacción entre cadenas. Para TPS-AC5, la temperatura T_2 presenta un valor mayor respecto al sistema TPS-AC1, indicando un mayor grado de esterificación como consecuencia del mayor contenido de ácido cítrico. Por otro lado, T_3 y T_4 se presentan a menores valores respecto al sistema TPS-AC1 y, particularmente, el corrimiento es mayor para T_4 . La degradación térmica más temprana de amilosa y de amilopectina puede asociarse a menor peso molecular de los polímeros, obtenido como consecuencia de un proceso de hidrólisis durante el procesamiento (Menzel et al., 2013). Finalmente, el sistema TPS-AC10 presentó solo dos procesos endotérmicos. El primero corresponde a T_1 mientras que el segundo puede interpretarse como una combinación de T_2 , T_3 y T_4 . Al respecto, la tendencia observada en los sistemas anteriores indica que el incremento del contenido de ácido cítrico incrementa el valor de T_2 y disminuye los valores de T_3 y T_4 , lo cual llevaría a la superposición de los picos asociados a estos procesos.

Los resultados de los ensayos térmicos (TGA/DTA) sugieren la convivencia de dos fenómenos al procesar muestras de almidón termoplásticos conteniendo ácido cítrico. Por un lado, la formación de enlaces éster entre el ácido cítrico y el polímero y, por otro lado, una disminución del peso molecular como consecuencia de una hidrólisis durante el procesamiento.

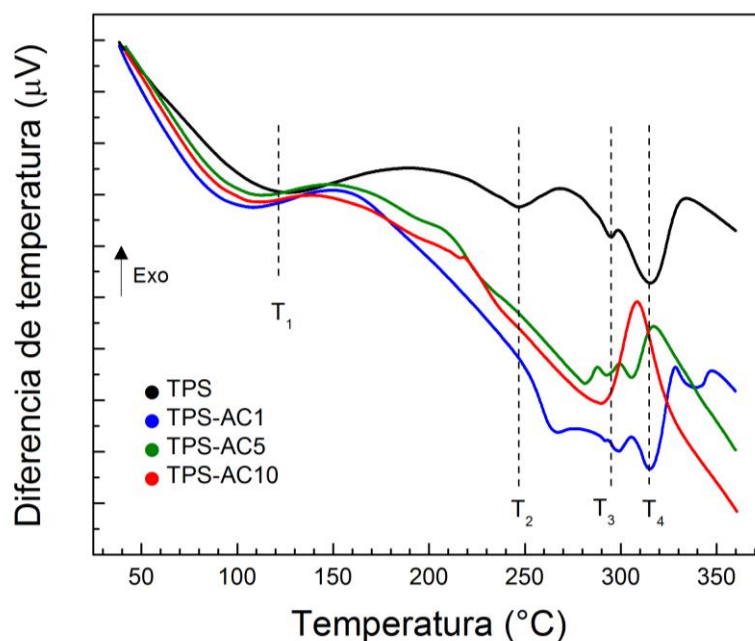


Figura 5.14. Análisis térmico diferencial (DTA) para las películas conteniendo diferente concentración de ácido cítrico. Las temperaturas señaladas se asocian a la fusión de cristalitas (T_1), y a la degradación térmica de amilosa (T_3) y amilopectina (T_4)

La Tabla 5.7 presenta los valores de los parámetros de susceptibilidad al agua para los sistemas estudiados. Para el sistema TPS-AC1 se obtuvo un valor de MC significativamente menor con respecto al sistema TPS, mientras que los valores de WS y WVP no mostraron diferencias significativas. Este resultado demuestra que la adición de ácido cítrico en baja concentración mejora la susceptibilidad al agua de las películas de almidón de mandioca obtenidas por extrusión. Por otra parte, para los sistemas TPS-AC5 y TPS-AC10 se observa un incremento en MC y WVP con respecto al sistema TPS-AC1, y además el sistema TPS-AC10 presentó un valor de WS significativamente mayor respecto al correspondiente a los otros sistemas. Por ello, el aumento en la concentración de ácido cítrico empeora la susceptibilidad al agua de las películas. Este efecto puede explicarse con las características fisicoquímicas discutidas anteriormente y, en particular, a la convivencia de los procesos de hidrólisis y esterificación durante el procesamiento. Para concentraciones bajas de ácido cítrico, la esterificación del almidón y de los plastificantes (componentes higroscópicos) disminuye la cantidad relativa de grupos hidroxilos disponibles, lo cual conduce a una menor afinidad a la humedad ambiente y a la disminución observada

en el MC. Para los sistemas TPS-AC5 y TPS-AC10, donde la concentración de ácido cítrico es mayor, la hidrólisis se vuelve más relevante y se logran materiales más sensibles al agua. La división de cadenas de polímero durante la hidrólisis aumenta la cantidad de extremos de cadena y conduce a estructuras más abiertas que favorecen la absorción de agua, lo cual explicaría los mayores valores de MC y de WVP. (Gonzalez Seligra et al., 2016).

Tabla 5.7: Parámetros de susceptibilidad al agua. Contenido de humedad (MC), solubilidad en agua (WS) y permeabilidad al vapor de agua (WVP). Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Sistema	MC (%)	WS (%)	WVP ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1} \cdot 10^{-10}$)
TPS	20 ± 1^a	$23,7 \pm 0,6^a$	$3,5 \pm 0,6^a$
TPS-AC1	$14,6 \pm 0,9^b$	26 ± 3^a	$2,9 \pm 0,6^a$
TPS-AC5	29 ± 2^c	22 ± 2^a	8 ± 1^b
TPS-AC10	25 ± 1^d	35 ± 4^b	$4,6 \pm 0,2^c$

La Figura 5.15 presenta curvas de tensión-deformación típicas de los sistemas estudiados, y en la Tabla 5.8 se presentan los valores de módulo de Young, tensión y deformación a rotura y tenacidad a la tracción. Todos los sistemas mostraron un comportamiento típico de materiales termoplásticos, el cual consiste en una deformación elástica, inicialmente lineal, seguida de una deformación plástica extensa que culmina en el quiebre de la muestra. Las películas TPS, plastificadas con glicerol y sorbitol, presentan mayor módulo de Young, mayor tensión al quiebre y mayor tenacidad a la tracción con respecto a la películas plastificadas solo con glicerol (resultados presentados en la Sección 5.2.2.3). Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura para películas de almidón de mandioca obtenidas por evaporación de solvente (Mali, Sakanaka, Yamashita, & Grossmann, 2005) y para películas de almidón de mango (Nawab, Alam, Haq, & Hasnain, 2016). En ambos trabajos, se encontró la misma tendencia en las propiedades mecánicas al utilizar una mezcla glicerol:sorbitol (1:1) en vez de glicerol como plastificante.

Al incorporar ácido cítrico en la mezcla, en general se obtienen películas con menor módulo de Young, menor tensión de rotura, mayor deformación a rotura y mayor tenacidad a la tracción. Sin embargo, para el sistema TPS-AC1 no hubo diferencias significativas en ningún parámetro con respecto al TPS. Para los otros sistemas, se observó que, a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico, disminuyen los valores de módulo de Young, tensión de rotura y tenacidad a la tracción y aumenta el valor de deformación a rotura. El comportamiento observado está relacionado a las propiedades fisicoquímicas discutidas previamente. En particular, la unión por enlaces éster del ácido cítrico al almidón y posible entrecruzamiento conduce a una estructura más abierta, con menores interacciones

entre cadenas, resultando en un material con mayor deformación a rotura pero menor módulo de Young y tensión de rotura (González-Seligra, 2019). Adicionalmente, en los sistemas TPS-AC5 y TPS-AC10, la ruptura de cadenas por hidrólisis disminuye el peso molecular del polímero y el nivel de entrelazamiento entre las cadenas, lo cual lleva a la disminución del módulo de Young y tensión de rotura (Zain et al., 2016).

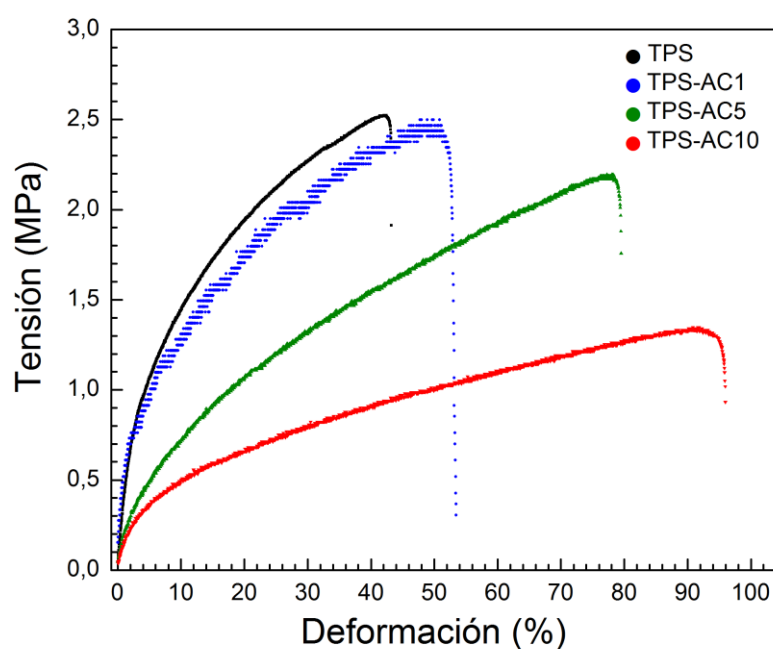


Figura 5.15. Curvas características de tensión-deformación para los diferentes sistemas.

Tabla 5.8: Módulo de Young (E), tensión de rotura (σ_b), deformación a rotura (ϵ_b), y tenacidad a la tracción (T) de los sistemas estudiados. Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)	T (kJ m ⁻³)
TPS	34 ± 5^a	$2,6 \pm 0,3^a$	47 ± 5^a	$0,9 \pm 0,2^a$
TPS-AC1	34 ± 4^a	$2,3 \pm 0,2^{ab}$	59 ± 9^a	$1,1 \pm 0,1^a$
TPS-AC5	22 ± 9^b	$1,9 \pm 0,3^b$	79 ± 7^b	$1,0 \pm 0,15^a$
TPS-AC10	7 ± 2^c	$1,2 \pm 0,2^c$	100 ± 4^c	$0,7 \pm 0,1^b$

Los resultados de esta sub-sección muestran que la incorporación de ácido cítrico en las mezclas de extrusión permite modificar las propiedades de los materiales obtenidos. Todos los sistemas conteniendo ácido cítrico pudieron ser procesados por una calandra y se obtuvieron películas transparentes, lisas y más delgadas respecto a las películas sin ácido cítrico. En particular, para concentraciones bajas de ácido cítrico (1%) no se encontraron diferencias significativas en las

propiedades mecánicas, pero se obtuvo un material con menor susceptibilidad al agua. Por otro lado, para concentraciones mayores de ácido cítrico (5% o 10%) se obtienen materiales con propiedades mecánicas diferentes (mayor elongación y menor energía de deformación) y, en general, más solubles en agua. Además, la incorporación de una mezcla glicerol:sorbitol como plastificantes fue beneficioso para las propiedades mecánicas, obteniéndose mayor módulo de Young y tensión de rotura respecto al sistema solo plastificado con glicerol, y sin disminuir la deformación a rotura.

5.3.2. Películas nanocompuestas incorporando nanobarras de ZnO

Considerando los resultados de la sección previa, para el desarrollo de compuestos conteniendo nanobarras de ZnO se decidió utilizar como matriz de almidón al sistema plastificado con la mezcla glicerol:sorbitol y con el agregado de 1% de ácido cítrico (sistema TPS-AC1 de la Tabla 5.6). En esta sección se presenta el desarrollo de películas de almidón conteniendo nanobarras de ZnO como principio activo antimicrobiano. Teniendo en cuenta la bibliografía consultada, se estudió un único sistema conteniendo 1% (p/p respecto al almidón) de nanobarras (Nafchi et al., 2013).

5.3.2.1. Metodología

5.3.2.1.1. Materiales

Se utilizaron los mismos componentes descriptos anteriormente (Sección 5.3.1.1.1): almidón de mandioca, glicerol, sorbitol, ácido cítrico anhidro, hipofosfito de sodio mono-hidrato y agua destilada. Para la síntesis de las nanobarras de ZnO se utilizó acetato de cinc di-hidrato (Sigma-Aldrich, Alemania), metanol absoluto p.a. (Cicarelli), hidróxido de sodio en lentejas (Sigma-Aldrich, Alemania), tetrametilamonio hidróxido (Sigma-Aldrich, Alemania), hexametilentetramina (Biopack, Argentina) y nitrato de cinc hexa-hidrato (J.T. Baker, EEUU).

5.3.2.1.2. Síntesis de nanobarras de ZnO y caracterización

Las nanobarras de ZnO fueron preparadas de acuerdo a la metodología reportada por Guz, Famá, Candal & Goyanes (2017). El proceso consiste en sintetizar semillas nanométricas de ZnO por un método sol-gel y, a partir de ellas, crecer las nanobarras. Para la síntesis de las semillas, se agregó gota a gota una solución de hidróxido de sodio en metanol (NaOH, 0,030 M, 50 mL) en una solución de acetato de cinc en metanol ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, 0,020 M, 50 mL) a 60 °C, con reflujo y bajo agitación magnética. La solución se mantuvo a dicha temperatura durante 2 h, hasta obtener una suspensión de nanopartículas (sol). Dicha suspensión fue enfriada hasta temperatura ambiente, se incorporó hidróxido de tetrametilamonio⁸ (3 mL) y se llevó a un baño de ultra-sonido por 30 min. A partir del sol de semillas nanométricas de ZnO, se prepararon nanobarras de ZnO por crecimiento hidrotermal. Para ello, se

⁸ El hidróxido de tetrametilamonio se emplea como agente para direccionar el crecimiento de las partículas.

agregaron 12,0 mL de la suspensión de semillas en una solución de nitrato de cinc y hexametilentetramina (360 mL, ambos 8,0 mM), y se calentó a 90 °C por 3 h en un frasco hermético de 500 mL. Los precipitados fueron colectados por ultra-centrifugado (10^4 rpm, 10 min) y lavados con agua destilada, repitiendo el proceso 6 veces consecutivas.

Las nanobarras de ZnO se caracterizaron morfológicamente por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.

5.3.2.1.3. Preparación de películas conteniendo nanobarras de ZnO y caracterización

Para la obtención de nanocompuestos conteniendo nanobarras de ZnO, se partió de la matriz que mejores propiedades presentó entre los sistemas conteniendo ácido cítrico, considerando tanto la susceptibilidad al agua como las propiedades mecánicas. Se preparó un sistema conteniendo 1% (p/p respecto al almidón) de nanobarras de ZnO y un sistema control (sin nanobarras), según la formulación detallada en la Tabla 5.9. El porcentaje de carga se escogió considerando los resultados publicados previamente por otros autores, donde muestran que concentraciones mayores al 1% de nanobarras de ZnO conducen a materiales con menor deformación a rotura (Nafchi et al., 2013).

Para preparar las mezclas de extrusión, primero se dispersaron las nanobarras de ZnO en el agua mediante sonicador de punta (200 W, 5 min). Luego se incorporaron los plastificantes, ácido cítrico e hipofosfito de sodio, y se homogeneizó mediante agitación magnética a 50 °C por 20 min. La mezcla de plastificantes conteniendo ZnO se incorporó al almidón, se mezcló a mano para romper agregados y luego se homogeneizó en una mezcladora automática (20 rpm, 30 min). Finalmente, la mezcla se tamizó con una malla metálica (2 mm) y se almacenó por 24 h en recipiente sellado. Las mezclas fueron procesadas por extrusión de acuerdo a los detalles de la Sección 2.4. Se empleó una boquilla plana (32 mm x 1,5 mm), se acopló una calandra (120 °C) a la salida de la extrusora, y las películas obtenidas se termoprensaron para homogeneizar el espesor.

Tabla 5.9: Nomenclatura y composición del sistema conteniendo nanobarras ZnO. **El sistema control es diferente a los sistemas de control de las sub-secciones previas.

Sistema	Almidón (%)	Agua (%)	Glicerol (%)	Sorbitol (%)	Ácido cítrico (%)	Hipofosfito de sodio (%)	ZnO (%)
TPS**	66,0	13,2	9,9	9,9	0,66	0,33	0,0
TPS-ZnO	65,6	13,1	9,8	9,8	0,66	0,33	0,66

Las películas obtenidas fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo, análisis termo-gravimétrico, espectrometría infrarroja, difracción de rayos X, susceptibilidad al agua, propiedades mecánicas y actividad bactericida (Sección 2.9).

5.3.2.2. Resultados y discusión de las películas conteniendo nanobarras de ZnO

5.3.2.2.1. Caracterización de nanobarras de ZnO

En la Figura 5.16 se presenta una micrografía representativa de las barras de ZnO obtenidas, y los histogramas de los tamaños correspondientes. En general se obtuvieron barras aisladas sin presencia de nanopartículas, aunque también se observaron algunas agrupaciones de barras formando erizos. Ambos histogramas presentan una distribución amplia de los tamaños característicos de las barras. El ancho medio resultó (90 ± 40) nm y el largo medio fue (900 ± 400) nm, mientras que la relación de aspecto resultó (10 ± 4) .

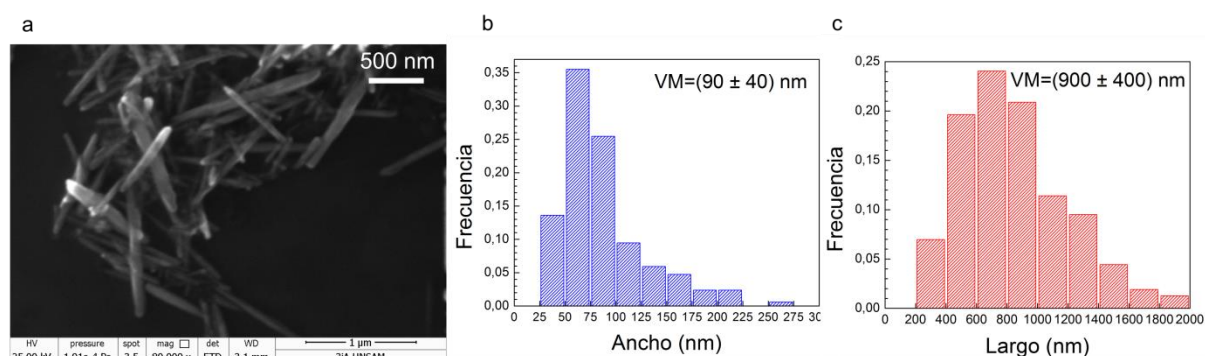


Figura 5.16. Micrografía SEM de las nanobarras de ZnO sintetizadas (a), e histogramas de ancho (b) y largo (c) de las barras. En los histogramas se indica el valor medio (VM) y su desvío estándar.

5.3.2.2.2. Características fisicoquímicas de películas nanocompuestas

En la Figura 5.17 se presentan micrografías típicas de la superficie de fractura criogénica de las películas TPS y TPS-ZnO. La película TPS presentó una superficie lisa y sin agujeros ni fragmentos de gránulos de almidón, en concordancia con los resultados de la sección anterior. Por su parte, la película TPS-ZnO también mostró una superficie lisa en la cual se observan dispersas las nanobarras de ZnO. Las barras no conservaron su relación de aspecto probablemente porque fueron partidas durante el procesamiento del material. Los esfuerzos de corte durante la extrusión resultaron suficientemente grandes para fragmentar las barras dentro de la mezcla con el almidón y los plastificantes. En general, las nanobarras (o fragmentos de nanobarras) fueron dispersadas en la matriz de almidón, aunque también se observaron algunos agregados. No se observaron agujeros en las interfases entre las nanobarras y la matriz de almidón, lo cual sugiere una buena adhesión. Resultados de otros autores

muestran que las nanobarras también presentan una buena adhesión en películas de almidón de mandioca o de sagú obtenidas por evaporación de solvente (Guz et al., 2017; Nafchi et al., 2012).

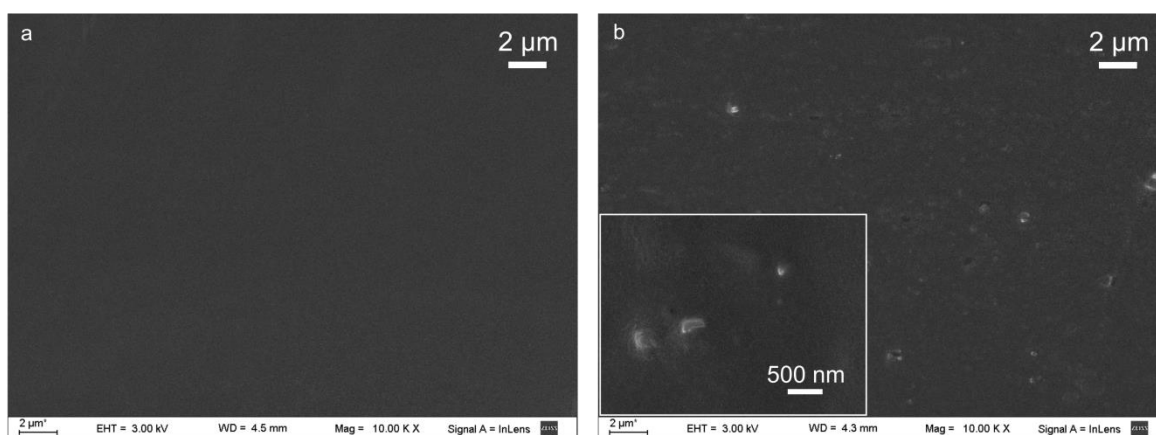


Figura 5.17. Micrografías SEM de la fractura criogénica de las películas TPS (a) y TPS-ZnO (b). En el recuadro se muestra una ampliación sobre tres nanobarras, donde no se ven agujeros en la interfase.

La Figura 5.18 presenta el patrón de difracción de rayos X (a) y el espectro FTIR (b) de las películas estudiadas. Ambas películas presentaron una estructura semi-cristalina típica de películas de almidón termoplástico, que consiste en un halo amorfo en el rango $12\text{--}28^\circ$ y diferentes picos cristalinos montados sobre dicho halo. En el sistema TPS conviven 2 estructuras cristalinas diferentes: los picos centrados en $13,0^\circ$, $18,5^\circ$ y $19,8^\circ$ corresponde a una estructura V_h , mientras que los picos centrados en $14,9^\circ$, $17,1^\circ$ y $22,3^\circ$ corresponden a una estructura tipo B (Van Soest et al., 1996). La estructura cristalina de TPS resultó similar a la correspondiente a las películas plastificadas solo con glicerol, la cual fue presentada en la Sección 5.3.1.2. Tal como fue discutido en dicha sección, la presencia de una fase cristalina tipo B en las películas de almidón termoplástico se corresponde a un proceso de re-cristalización luego del procesamiento de los materiales, mientras que la fase cristalina V_h corresponde a complejos formados entre cadenas de amilosa y glicerol durante la extrusión o durante el almacenamiento (Obiro et al., 2012). El patrón de difracción de las películas TPS-ZnO resultó similar pero mostró algunas diferencias puntuales. Se observan dos nuevos picos centrados en $\sim 14,3^\circ$ (superpuesto con los picos a $13,0^\circ$ y $14,9^\circ$) y en $24,7^\circ$, y además la intensidad relativa de los picos centrados en $14,9^\circ$, $17,1^\circ$ y $22,3^\circ$ aumentó. Considerando que estos 2 picos cristalinos corresponden a la estructura B, se deduce que ocurrió un incremento relativo de esta fase cristalina. Este resultado podría estar relacionado a una interacción preferencial de los plastificantes con las nanobarras de ZnO, lo cual lleva a una menor disponibilidad de moléculas de glicerol para formar cristales tipo V_h , favoreciendo la retrogradación y crecimiento de la estructura B. Un efecto similar fue reportado por otros autores al

incorporar nanotubos de carbono a películas de almidón termoplástico plastificadas con glicerol (Morales et al., 2015). No se observaron picos de difracción de la estructura cristalina del ZnO, probablemente debido al bajo contenido de ZnO utilizado en la formulación. De la misma manera, otros autores tampoco observaron picos asociados a cristalitas de ZnO al incorporar nanobarras de ZnO en películas de almidón de mandioca obtenidas por evaporación de solvente (Guz et al., 2017).

Los espectros infrarrojo de las películas TPS y TPS-ZnO presentaron las bandas características del almidón: estiramiento O-H ($3100-3600\text{ cm}^{-1}$), estiramiento C-H de grupos alquilo (2927 cm^{-1} y 2892 cm^{-1}), estiramiento C-O y C-C (1149 cm^{-1} y 1077 cm^{-1} , respectivamente), y flexiones C-O-H ($1100-900\text{ cm}^{-1}$). No se detectaron diferencias significativas entre los espectros infrarrojos de ambos sistemas.

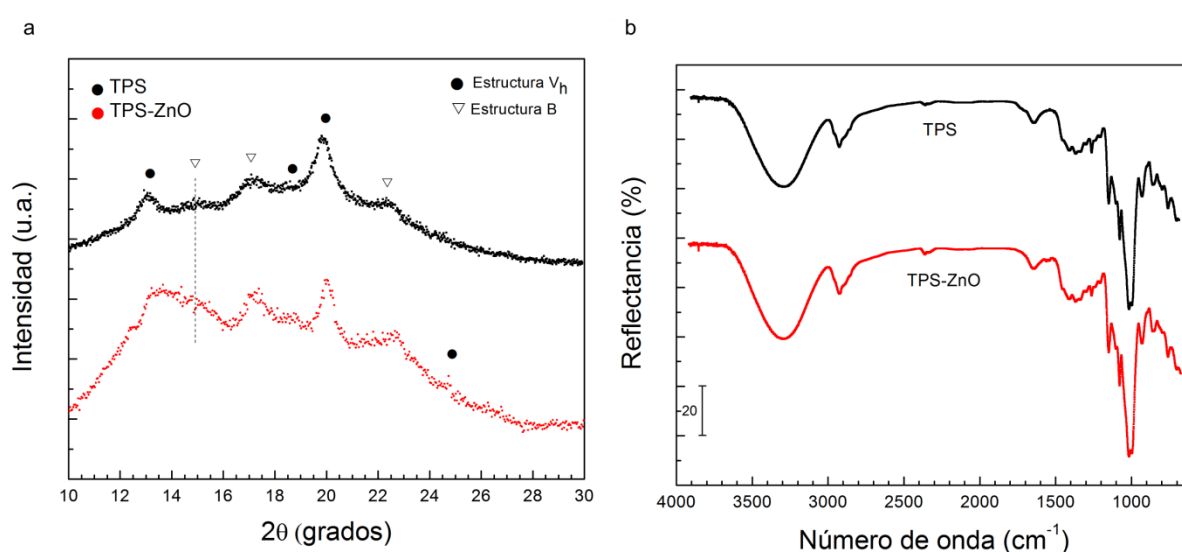


Figura 5.18. Patrón de difracción de rayos X (DRX, a) y espectro infrarrojo (FTIR, b) correspondientes a los sistemas TPS y TPS-ZnO. La línea en (a) es una ayuda visual y muestra la superposición de picos.

En la Figura 5.19 se presentan las curvas de análisis termo-gravimétrico (a) y su derivada (b) para los sistemas TPS y TPS-ZnO. La degradación térmica de las películas TPS ocurre en 3 etapas, de manera similar a lo presentado en las secciones previas. La primera pérdida de masa ocurre entre 50 °C y 150 °C y corresponde a evaporación de agua; la segunda pérdida de masa ocurre entre 150 °C y 250 °C corresponde a la evaporación de los plastificantes (glicerol y sorbitol); y la última pérdida de masa, de mayor intensidad y ubicada en el rango $270-330\text{ °C}$, corresponde a la degradación térmica de las cadenas de polímero. En la curva TGA del sistema TPS-ZnO se observa que la pérdida de masa correspondiente a la evaporación de plastificantes ocurre con menor pendiente (recuadro en sub-figura a), lo cual también se evidencia en la curva derivada. Este comportamiento indica que la evaporación de plastificantes fue retardada en el sistema TPS-ZnO. Una mayor estabilidad térmica de los

plastificantes en el sistema TPS-ZnO se asocia a interacciones de las moléculas de glicerol o sorbitol con la superficie de las nanobarras de ZnO. Este resultado concuerda con lo discutido respecto al patrón de difracción, donde también se evidencia la interacción entre las nanobarras y los plastificantes. En artículos de otros autores, se reportó que la incorporación de ZnO en películas de almidón de mandioca obtenidas por evaporación de solvente conduce a la disminución de la estabilidad térmica del plastificante (glicerol) (Guz et al., 2017). Al respecto, y considerando los resultados de la presente investigación, el procesamiento del material afecta de forma notoria las interacciones preferenciales entre polímero, plastificante y refuerzo. La fabricación de películas por evaporación de solvente podría favorecer las interacciones entre el polímero y el ZnO durante la formación del gel, mientras que el procesamiento por extrusión promueve las interacciones entre los plastificantes y las nanobarras de ZnO.

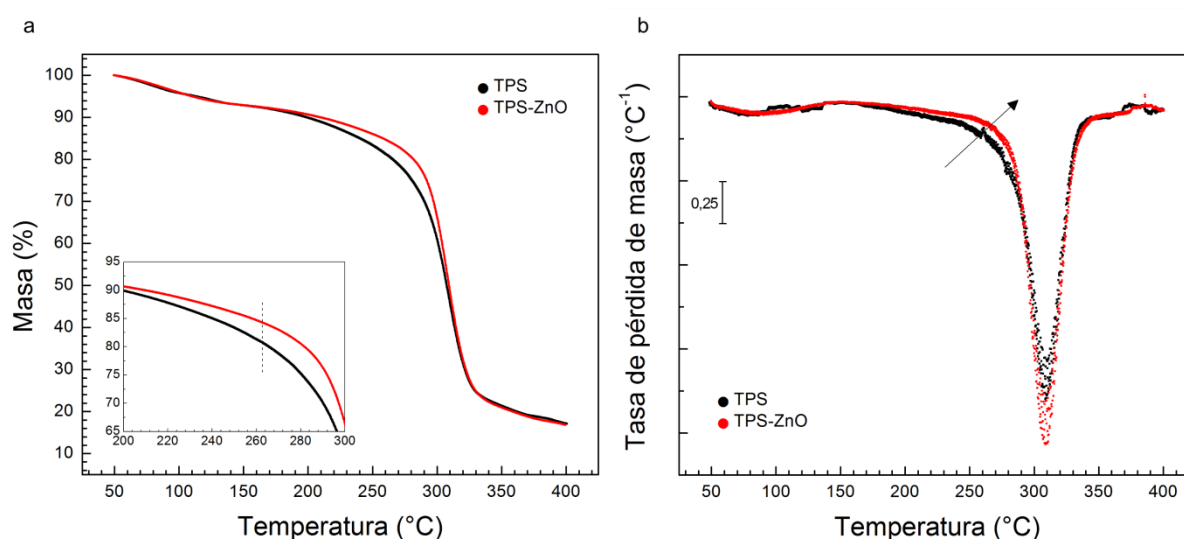


Figura 5.19. Curvas de análisis termo-gravimétrico (TGA, a) y su derivada (b). El recuadro muestra el retardo en la evaporación de plastificantes del sistema TPS-ZnO respecto a TPS.

La Tabla 5.10 presenta los parámetros de susceptibilidad al agua de los sistemas TPS y TPS-ZnO. La película TPS-ZnO presentó un contenido de humedad ~8% menor y una solubilidad al agua ~10% menor con respecto al sistema TPS. La disminución en el valor de MC y WS se atribuye a las interacciones entre las nanobarras de ZnO y los plastificantes, discutidas previamente. Los enlaces de hidrógeno entre plastificantes y nanobarras reducen la capacidad de las moléculas libres de agua de interactuar con el material, ya que tanto el glicerol como el sorbitol son plastificantes higroscópicos (Huntrakul & Harnkarnsujarit, 2020). Por otra parte, el valor de la permeabilidad al vapor de agua mostró una tendencia hacia menores valores en el sistema TPS-ZnO, lo cual se asocia tanto a la menor disponibilidad de moléculas higroscópicas como al incremento del camino tortuoso por la presencia de las nanobarras

de ZnO. Una disminución en el contenido de humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua fue reportada por otros autores al incorporar nanobarras de ZnO en películas de almidón de mandioca obtenidas por evaporación de solvente (Guz et al., 2017).

Tabla 5.10: Parámetros de susceptibilidad al agua. Contenido de humedad (MC), solubilidad en agua (WS) y permeabilidad al vapor de agua (WVP). Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	MC (%)	WS (%)	WVP ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1} \cdot 10^{-10}$)
TPS	$14,6 \pm 0,9^a$	26 ± 3^a	$2,9 \pm 0,6^a$
TPS-ZnO	$12,2 \pm 0,4^b$	20 ± 3^b	$2,0 \pm 0,4^a$

La Figura 5.20 presenta curvas de tensión-deformación típicas de los sistemas TPS y TPS-ZnO, y los valores de las propiedades mecánicas se reportan en la Tabla 5.11. Los dos sistemas mostraron curvas de tracción típicas de materiales termoplásticos: una deformación elástica seguida de una deformación plástica extensa, la cual termina en la rotura de la probeta. La incorporación de nanobarras de ZnO condujo a un incremento significativo en los valores del módulo de Young y de la tensión de rotura (Tabla 5.11). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la deformación a rotura entre los sistemas TPS y TPS-ZnO.

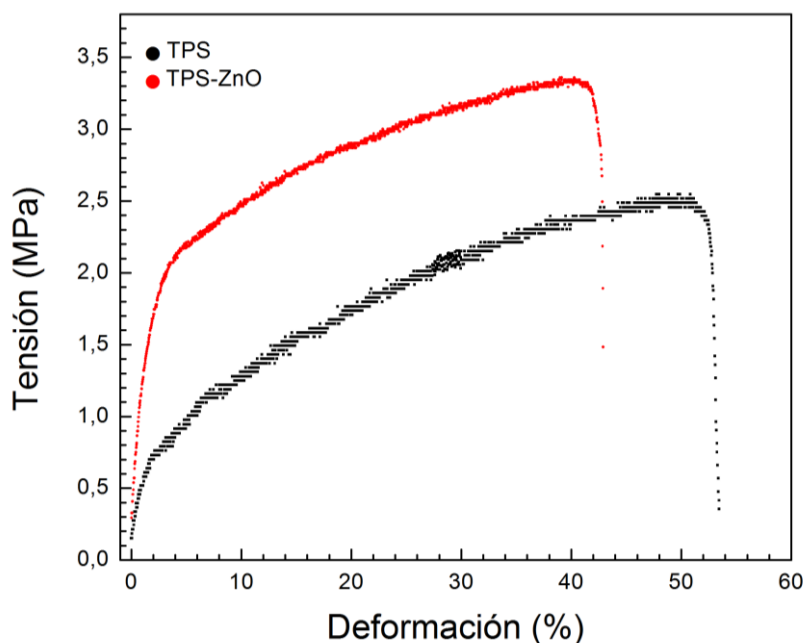


Figura 5.20. Curvas típicas de tensión vs deformación para los materiales TPS y TPS-ZnO.

El incremento en el valor del módulo de Young y de la tensión de rotura está relacionado a las interacciones entre plastificantes y ZnO. Una menor cantidad de plastificante disponible en la matriz de un material termoplástico tiene como consecuencia un incremento en el módulo de Young y de la tensión de rotura (Müller, Laurindo, & Yamashita, 2011; Nafchi et al., 2013). Generalmente, el incremento en estos parámetros se acompaña de una disminución en la deformación a rotura en materiales compuestos. La película TPS-ZnO logró aumentar tanto el módulo de Young como la tensión de rotura sin disminuir la deformación a rotura, lo cual conduce además a un incremento notable en la tenacidad a la tracción del material. Este comportamiento se explica por una transferencia eficiente de la tensión desde la matriz hacia las nanobarras, lo cual evita la formación de agujeros y permite mayores deformaciones. Un efecto similar fue observado al incorporar nanotubos de carbono en películas de almidón (L. M. Famá, Pettarin, Goyanes, & Bernal, 2011). La buena adhesión de las barras observada en las micrografías FE-SEM resulta necesaria para lograr el desempeño mecánico observado.

Tabla 5.11: Módulo de Young (E), tensión de rotura (σ_b), deformación a rotura (ϵ_b), y tenacidad a la tracción (T) de los sistemas estudiados. Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)	T (kJ m ⁻³)
TPS	47 ± 9^a	$2,1 \pm 0,2^a$	50 ± 16^a	$0,9 \pm 0,1^a$
TPS-ZnO	90 ± 10^b	$3,2 \pm 0,2^b$	47 ± 8^a	$1,4 \pm 0,2^b$

5.3.2.2.3. Actividad antimicrobiana de las películas

La actividad antimicrobiana fue evaluada primero mediante el método de difusión en agar, y el resultado se presenta en la Figura 5.20. No se observó halo de inhibición en la película TPS ni tampoco en la película TPS-ZnO, a pesar de la presencia del agente antimicrobiano. En este ensayo, el halo de inhibición se forma como consecuencia de la migración del agente antimicrobiano hacia el agar, por lo cual este resultado indica que las nanobarras de ZnO no migraron hacia el medio. Sin embargo, puede observarse que la película TPS fue parcialmente colonizada por las bacterias, mientras que la película TPS-ZnO no, lo cual sugiere un posible efecto antimicrobiano en la superficie del material. Con el objetivo de cuantificar actividad antimicrobiana, se realizaron ensayos según la norma estándar JIS Z2801, la cual evalúa el crecimiento de colonias de bacterias sobre superficie. Las colonias de *E. coli* pudieron crecer en la película TPS hasta alcanzar una concentración de $(1.5 \pm 0.4) \times 10^7$ CFU/mL. Por su parte, el sistema TPS-ZnO inhibió el crecimiento de bacterias, y se midió una concentración al final del ensayo de $(9 \pm 1) \times 10^5$ CFU/mL, la cual es más de un orden de magnitud menor a la concentración en las muestras control. Estos resultados confirman que, si bien no se logró eliminar todas las bacterias presentes (efecto bactericida), el material TPS-ZnO inhibió el crecimiento de bacterias sobre su

superficie (efecto bacteriostático). Las nanobarras de ZnO han sido propuestas como agentes bactericidas que funcionan por varios mecanismos, incluidos la solubilización de zinc iónico y la generación de especies reactivas de oxígeno (Nair et al., 2009). Al incorporarse a la matriz de almidón, este efecto se ve reducido y no se logran eliminar completamente las bacterias. En artículos previos a esta tesis, la actividad antimicrobiana de películas de almidón obtenidas por evaporación de solvente y conteniendo nanobarras de ZnO se mostró como una reducción en la biodegradabilidad y una reducción en la población de bacterias en una suspensión en la cual se incorporó el material activo (Guz et al., 2017).

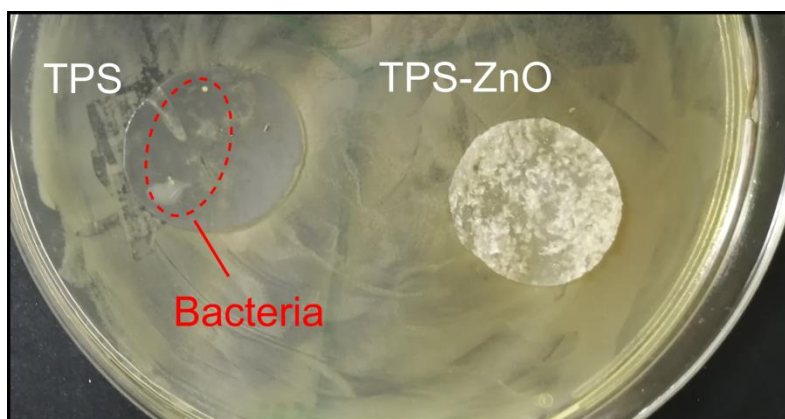


Figura 5.20. Actividad antimicrobiana evaluada por el método de difusión en agar.

5.4. Conclusiones parciales

Se demostró que la técnica de extrusión y posterior termoprensado, o calandrado más termoprensado, es adecuada para la obtención de materiales nanocompuestos activos de almidón, particularmente basados en una matriz de almidón de mandioca que incorpora un extracto de romero o nanobarras de ZnO. Además, se evidenció que el procesamiento escogido permite obtener una buena distribución de cargas en la matriz de almidón y que la actividad específica del agente se conserva a la vez que mejora la respuesta mecánica y/o la susceptibilidad al agua.

En particular, para los compuestos que incorporan extracto de romero, se demostró que la concentración de extracto es determinante respecto a las propiedades mecánicas del material. Esto se debe a que el extracto presentó una fase miscible con el almidón, que actúa como plastificante de la matriz, y una fase inmiscible, que forma nanopartículas que actúan como refuerzo mecánico.

En el caso de los compuestos incorporando nanobarras de ZnO, se observó que las nanobarras fueron partidas durante el proceso de fabricación y que los fragmentos fueron bien distribuidos y

adheridos a la matriz de almidón. Además, se evidenció una migración del plastificante hacia la superficie de las nanobarras. Este hecho, junto a la buena distribución de cargas, trajo como consecuencia una mejora en la susceptibilidad al agua y en las propiedades mecánicas, evidenciada por un incremento en el módulo de Young y en la tensión a rotura sin disminución de la deformación a rotura. Finalmente, el material compuesto presentó actividad antimicrobiana en la superficie de contacto con las bacterias (efecto bacteriostático).

5.5. Referencias

- Buléon, A., Véronèse, G., & Putaux, J.-L. (2007). Self-association and crystallization of amylose. *Australian Journal of Chemistry*, 60(10), 706–718. <https://doi.org/10.1071/CH07168>.
- Castillo, L., López, O., López, C., Zaritzky, N., García, M. A., Barbosa, S., & Villar, M. (2013). Thermoplastic starch films reinforced with talc nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 95(2), 664–674. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.026>.
- Chanjarujit, W., Hongsprabhas, P., & Chaiseri, S. (2018). Physicochemical properties and flavor retention ability of alkaline calcium hydroxide-mungbean starch films. *Carbohydrate Polymers*, 198, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.118>.
- Colonna, P., & Buleon, A. (2009). Thermal transitions of starches. In *Starches* (pp. 83–114). CRC Press.
- Cordeiro, A., Medeiros, M. L., Santos, N. A., Soledade, L. E. B., Pontes, L., Souza, A. L., Queiroz, N., Souza, A. G. (2013). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 113(2), 889–895. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2778-4>.
- Domínguez, R., Barba, F. J., Gómez, B., Putnik, P., Kovačević, D. B., Pateiro, M., Santos, E.M., Lorenzo, J. M. (2018). Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Research International*, 113, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.073>.
- D'Souza, S. S., Faraj, J. A., & DeLuca, P. P. (2005). A model-dependent approach to correlate accelerated with real-time release from biodegradable microspheres. *Aaps Pharmscitech*, 6(4), E553–E564. <https://doi.org/10.1208/pt060470>.
- European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, Vol. 15, pp. 12–88. <https://doi.org/10.1016/j.nucengdes.2011.01.052>.
- Famá, L. M., Pettarin, V., Goyanes, S. N., & Bernal, C. R. (2011). Starch/multi-walled carbon nanotubes composites with improved mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 83(3), 1226–1231. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.027>.

- Feng, M., Yu, L., Zhu, P., Zhou, X., Liu, H., Yang, Y., Zhou, J., Gao, C., Bao, X., Chen, P. (2018). Development and preparation of active starch films carrying tea polyphenol. *Carbohydrate Polymers*, 196, 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.043>.
- Feng, X., Xiao, Z., Sui, S., Wang, Q., & Xie, Y. (2014). Esterification of wood with citric acid: The catalytic effects of sodium hypophosphite (SHP). *Holzforschung*, 68(4), 427–433. <https://doi.org/10.1515/hf-2013-0122>.
- García, N L, Famá, L., D'Accorso, N. B., & Goyanes, S. (2015). Biodegradable starch nanocomposites. In *Eco-friendly polymer nanocomposites* (pp. 17–77). https://doi.org/10.1007/978-81-322-2470-9_2.
- García, N.L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M., & Goyanes, S. (2011). Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.024>.
- Gilfillan, W. N., Moghaddam, L., Bartley, J., & Doherty, W. O. S. (2016). *Thermal extrusion of starch film with alcohol*. *Journal of Food Engineering*, 170, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.023>.
- González-Seligra, P. (2019). *Nanocompuestos de base almidón con aplicaciones en envases biodegradables*. Universidad de Buenos Aires.
- González-Seligra, P., Guz, L., Ochoa-Yepes, O., Goyanes, S., & Famá, L. (2017). Influence of extrusion process conditions on starch film morphology. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.027>.
- Gonzalez-Seligra, P., Medina Jaramillo, C., Famá, L., & Goyanes, S. (2016). Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*, 138, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.041>.
- Gutiérrez, T. J., & Alvarez, V. A. (2018). Bionanocomposite films developed from corn starch and natural and modified nano-clays with or without added blueberry extract. *Food Hydrocolloids*, 77, 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.017>.
- Gutiérrez, T. J., Herniou-Julien, C., Álvarez, K., & Alvarez, V. A. (2018). Structural properties and in vitro digestibility of edible and pH-sensitive films made from guinea arrowroot starch and wastes from wine manufacture. *Carbohydrate Polymers*, 184, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.039>.
- Guz, L., Famá, L., Candal, R., & Goyanes, S. (2017). Size effect of ZnO nanorods on physicochemical properties of plasticized starch composites. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1611–1619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.041>.

-
- Hoseneý, R. C., Zeleznak, K. J., & Yost, D. A. (1986). A note on the gelatinization of starch. *Starch-Stärke*, 38(12), 407–409. <https://doi.org/10.1002/star.19860381203>.
 - Huntrakul, K., & Harnkarnsujarit, N. (2020). Effects of plasticizers on water sorption and aging stability of whey protein/carboxy methyl cellulose films. *Journal of Food Engineering*, 272, 109809. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109809>.
 - Jaramillo, C. M., Gutiérrez, T. J., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2016). Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, 151, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.025>.
 - Joye, I. J., & McClements, D. J. (2013). Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.002>.
 - Kim, S., Baek, S.-K., Go, E., & Song, K. Bin. (2018). Application of adzuki bean starch in antioxidant films containing cocoa nibs extract. *Polymers*, 10(11), 1210. <https://doi.org/10.3390/polym10111210>.
 - Kim, S., Kang, J.-H., & Song, K. Bin. (2020). Development of a Sword Bean (*Canavalia gladiata*) Starch Film Containing Goji Berry Extract. *Food and Bioprocess Technology*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02447-4>.
 - Kuswandi, B. (2016). Nanotechnology in Food Packaging. In S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Eds.), *Nanoscience in Food and Agriculture 1* (pp. 151–183). https://doi.org/10.1007/978-3-319-39303-2_6.
 - Le Bail, P., Rondeau, C., & Buleon, A. (2005). Structural investigation of amylose complexes with small ligands: helical conformation, crystalline structure and thermostability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 35(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.09.001>.
 - López-Córdoba, A., Medina-Jaramillo, C., Piñeros-Hernandez, D., & Goyanes, S. (2017). Cassava starch films containing rosemary nanoparticles produced by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 71, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.028>.
 - López, O. V., Lecot, C. J., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2011). Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.029>.
 - Mali, S., Sakanaka, L. S., Yamashita, F., & Grossmann, M. V. E. (2005). Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 60(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.01.003>.

- Medina-Jaramillo, C., Ochoa-Yepes, O., Bernal, C., & Famá, L. (2017). Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. *Carbohydrate Polymers*, 176, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.079>.
- Medina-Jaramillo, C., Gonzalez Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2015). Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. *Starch-Stärke*, 67(9–10), 780–789. <https://doi.org/10.1002/star.201500033>.
- Menzel, C., González-Martínez, C., Vilaplana, F., Diretto, G., & Chiralt, A. (2020). Incorporation of natural antioxidants from rice straw into renewable starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 976–986. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.222>.
- Menzel, C., Olsson, E., Plivelic, T. S., Andersson, R., Johansson, C., Kuktaite, R., Järnström, L., Koch, K. (2013). Molecular structure of citric acid cross-linked starch films. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.044>.
- Morales, N. J., Candal, R., Famá, L., Goyanes, S., & Rubiolo, G. H. (2015). Improving the physical properties of starch using a new kind of water dispersible nano-hybrid reinforcement. *Carbohydrate Polymers*, 127, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.071>.
- Müller, C. M. O., Laurindo, J. B., & Yamashita, F. (2011). Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. *Industrial Crops and Products*, 33(3), 605–610. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.021>.
- Nafchi, A. M., Mahmud, S., & Robal, M. (2012). Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.017>.
- Nafchi, A. M., Nassiri, R., Sheibani, S., Ariffin, F., & Karim, A. A. (2013). Preparation and characterization of bionanocomposite films filled with nanorod-rich zinc oxide. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.055>.
- Nair, S., Sasidharan, A., Rani, V. V. D., Menon, D., Nair, S., Manzoor, K., & Raina, S. (2009). Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(1), 235. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3548-5>.
- Nawab, A., Alam, F., Haq, M. A., & Hasnain, A. (2016). Biodegradable film from mango kernel starch: Effect of plasticizers on physical, barrier, and mechanical properties. *Starch-Stärke*, 68(9–10), 919–928. <https://doi.org/10.1002/star.201500349>.

-
- Obiro, W. C., Sinha Ray, S., & Emmambux, M. N. (2012). V-amylose structural characteristics, methods of preparation, significance, and potential applications. *Food Reviews International*, 28(4), 412–438. <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.660718>.
 - Oliphant, T. E. (2007). SciPy: Open source scientific tools for Python. *Computing in Science and Engineering*, 9, 10–20. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.58>.
 - Oliveira, G. A. R., Oliveira, A. E., Conceição, E. C., & Leles, M. I. G. (2016). Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food Chemistry*, 211, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.042>.
 - Papadopoulos, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., & Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1–2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044>.
 - Putaux, J.-L., Buleon, A., & Chanzy, H. (2000). Network formation in dilute amylose and amylopectin studied by TEM. *Macromolecules*, 33(17), 6416–6422. <https://doi.org/10.1021/ma000242j>.
 - Reddy, N., & Yang, Y. (2010). Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 118(3), 702–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.050>.
 - Sada, E., Kito, S., Oda, T., & Ito, Y. (1975). Diffusivities of gases in binary mixtures of alcohols and water. *The Chemical Engineering Journal*, 10(1), 155–159.
 - Shi, R., Zhang, Z., Liu, Q., Han, Y., Zhang, L., Chen, D., & Tian, W. (2007). Characterization of citric acid/glycerol co-plasticized thermoplastic starch prepared by melt blending. *Carbohydrate Polymers*, 69(4), 748–755. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.010>.
 - Stein, S. E. (2016). NIST/EPA Gas-Phase Infrared Database-JCAMP Format, *NIST Standard Reference Database 35*. Disponible en: <https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C1587208&Mask=80>. Consultado en Noviembre 2020.
 - Talón, E., Trifkovic, K. T., Nedovic, V. A., Bugarski, B. M., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2017). Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1153–1161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.080>.
 - Talón, E., Trifkovic, K. T., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2017). Release of polyphenols from starch-chitosan based films containing thyme extract. *Carbohydrate Polymers*, 175, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.067>.
 - US Food and Drug Administration. (2017). FDA cite: 21CFR176.170.

- Van Soest, J. J. G., Hulleman, S. H. D., De Wit, D., & Vliegenthart, J. F. G. (1996). Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products*, 5(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(95\)00048-8](https://doi.org/10.1016/0926-6690(95)00048-8).
- Wang, N., Yu, J., Chang, P. R., & Ma, X. (2007). Influence of Citric Acid on the Properties of Glycerol-plasticized dry Starch (DTPS) and DTPS/Poly (lactic acid) Blends. *Starch-Stärke*, 59(9), 409–417. <https://doi.org/10.1002/star.200700617>.
- Wilhelm, H.-M., Sierakowski, M.-R., Souza, G. P., & Wypych, F. (2003). Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52(2), 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00239-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00239-4).
- Wood, J. E., Senthilmohan, S. T., & Peskin, A. V. (2002). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*, 77(2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00329-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00329-6).
- Zain, A. H. M., Kahar, A. W. M., & Noriman, N. Z. (2016). Chemical-mechanical hydrolysis technique of modified thermoplastic starch for better mechanical performance. *Procedia Chemistry*, 19, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.03.064>.

Fabricación de películas bicapa activas

Resumen

Se presenta el desarrollo de una película bicapa con propiedades activas diferentes en cada lado. Para conformar dicho sistema, se partió de materiales con propiedades antioxidantes y antimicrobianas desarrollados previamente en la tesis. En particular, la capa externa consiste en una película nanocompuesta de almidón conteniendo nanobarras de ZnO (TPS-ZnO) y la capa interna consiste en un mallado electrohilado de PVA incorporando extracto de romero (PVA-ER). En el sistema propuesto, la capa interna tiene el objetivo de liberar polifenoles hacia un posible alimento a la vez que actúa de barrera para evitar la migración de Zn(II) desde la capa externa. Por su parte, la capa externa pretende otorgar actividad antimicrobiana en superficie para evitar el ataque microbiano sobre el envase y el posible producto empaquetado.

6.1. Introducción

En las últimas décadas la producción y distribución de alimentos ha sufrido grandes cambios alrededor del mundo, observándose una concentración de la venta de alimentos en supermercados y una tendencia a la comercialización de alimentos pre-envasados. Del mismo modo, estos cambios fueron acompañados por una sofisticación de los envases destinada a preservar los alimentos e incrementar su vida útil (Dixon, 2011). En los capítulos anteriores, se desarrollaron conceptos relacionados a la incorporación de agentes activos en materiales poliméricos biodegradables obtenidos por técnicas escalables. En todos los casos se obtuvieron películas delgadas que podrían utilizarse como recubrimientos de una sola capa para alimentos. En general, en la industria de envases de alimentos no es posible cumplir todos los requerimientos de un envase con un solo material, y se recurre al diseño de estructuras multicapa que combinan propiedades diferentes de cada material de partida. En el caso de envases activos, en una estructura multicapa pueden confinarse distintos principios activos en cada capa.

La técnica de electrohilado resulta efectiva para encapsular polifenoles de romero en nanofibras de PVA y así obtener un material antioxidante (Capítulo 4). Por las características del sistema, la mayor actividad antioxidante del material se presenta en medios simulantes de alimentos lipofílicos. Para una posible aplicación como envase, los mallados electrohilados por sí solos no resultan adecuados por ser materiales porosos que no evitan la migración de gases y de vapor de agua. Por otra parte, la técnica de extrusión resulta adecuada para obtener películas nanocompuestas de almidón incorporando diferentes agentes activos, por ejemplo nanobarras de ZnO (Capítulo 5).

Ambos materiales pueden combinarse en el diseño de un material bicapa con propiedades superadoras. El material PVA-ER se propone como una capa interna, destinada a estar en contacto con un posible alimento de tal forma de liberar los polifenoles de romero. El material TPS-ZnO se propone como la capa externa de tal forma de proteger al envase biodegradable y al producto envasado del ataque microbiológico. Un producto de este tipo, basado en polímeros biodegradables, realizado íntegramente a partir de técnicas escalables industrialmente y con características estructurales distintivas en una estructura bicapa es prometedor para la fabricación de envases funcionales para alimentos. Sin embargo, deben contemplarse ciertos requisitos imprescindibles para su efectiva utilización. Por un lado, se requiere lograr una buena adhesión entre las dos capas para evitar la delaminación durante la manipulación del material propuesto (Gartner, Li, & Almenar, 2015). Al ser polímeros compatibles, los dos materiales podrían unirse directamente mediante un proceso de termoprensado sin necesidad de un adhesivo adicional. En este punto, resulta interesante el rol de la estructura de nanofibras para lograr una buena adhesión con una matriz continua. Por otro lado, en un sistema bicapa activo, los principios activos podrían migrar entre las capas y así afectar el desempeño del envase activo. En particular, la actividad antioxidante sobre el alimento podría verse disminuida si los compuestos antioxidantes migran hacia la capa externa. Del mismo modo, podría haber migración del agente antimicrobiano desde la capa externa hacia el interior del envase. En particular para el sistema propuesto, la legislación presente establece límites para la migración de Zn desde materiales de envases hacia alimentos (US Food and Drug Administration, 2017).

En este capítulo se presenta el desarrollo y estudio de un material bicapa con actividad diferente en cada lado, el cual se compone de los materiales de una capa desarrollados en los capítulos previos. La capa interna consiste en un mallado electrohilado de PVA conteniendo polifenoles de romero como agente antioxidante (PVA-ER), mientras que la capa externa consiste en una película de almidón termoplástico conteniendo nanobarras de ZnO como agente antimicrobiano (TPS-ZnO). El material obtenido será analizado respecto a su morfología, y a sus características térmicas y estructurales. Se estudiarán las propiedades mecánicas, susceptibilidad al agua y actividad antioxidante y antimicrobiana

del material bicapa y se compararán con aquellas del material de una capa. Además, se estudiará la posible migración de Zn(II) desde la capa externa hacia un simulante de alimentos.

6.2. Metodología

6.2.1. Materiales

Se fabricaron películas de almidón conteniendo nanobarras de ZnO utilizando los mismos materiales descritos en el capítulo anterior (Sección 5.3.2.1.1). Las nanobarras de ZnO utilizadas fueron las mismas que se sintetizaron en el capítulo anterior. Se fabricaron mallados electrohilados de PVA con ácido cítrico y extracto de romero utilizando los mismos materiales descritos en la Sección 4.2.1. El extracto de romero fue preparado de la misma manera a lo reportado en la Sección 4.2.2.

6.2.2. Preparación de películas bicapa y caracterización

En primer lugar, se preparó una película de almidón conteniendo nanobarras de ZnO (TPS-ZnO) por extrusión y calandrado, con las mismas condiciones descritas en la Sección 5.3.2. Luego, se incorporó un mallado de electrohilado de PVA con ácido cítrico conteniendo extracto de romero (PVA-ER). Para ello, se colocaron películas TPS-ZnO sobre el colector del equipo de electrohilado y se sostuvieron mediante cinta adhesiva en los bordes. El proceso de electrohilado se llevó a cabo durante 30 min de manera continua, utilizando la solución y los parámetros de procesamiento descritos en la Sección 4.2. Una vez obtenidas las dos capas, el sistema fue sometido a un proceso de termoprensado (35 kPa, 130 °C, 15 min) con el fin de mejorar la adhesión entre capas y obtener una película transparente. Con fines comparativos, se prensaron películas TPS-ZnO y mallados electrohilado PVA-ER por separado. La Figura 6.1 presenta un esquema del proceso completo propuesto.

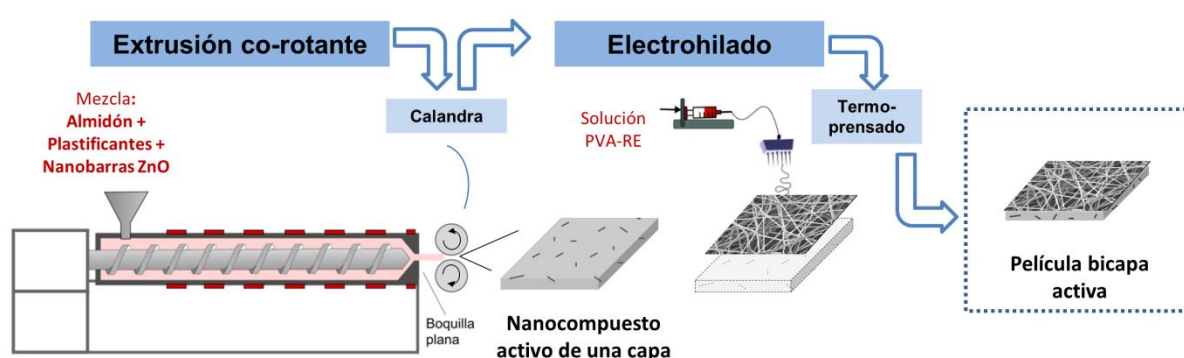


Figura 6.1. Esquema del proceso de fabricación de las películas bicapa. Primero se obtienen películas de almidón por extrusión, y sobre estas se incorporan las nanofibras por electrohilado.

Las películas obtenidas fueron caracterizadas por FE-SEM (superficie del lado PVA-RE y fractura criogénica), FTIR, TGA, DRX, susceptibilidad al agua y propiedades mecánicas. Se determinó el contenido de polifenoles de la capa de PVA-RE y se evaluó la actividad antioxidante del bicapa en dos simulantes alimenticios lipofílicos: D1 (etanol 50% v/v) y D2 (aceite vegetal). Estos simulantes fueron escogidos considerando los resultados del Capítulo 4, donde se mostró que medios lipofílicos permiten una mayor extracción de polifenoles de romero desde mallados de PVA. Luego, se evaluó la actividad antimicrobiana en superficie de ambas caras del material. Finalmente, se determinó la migración de Zn(II) desde el bicapa hacia el simulante de alimentos D1. En este caso, se utilizó un solo simulante lipofílico, ya que el simulante D2 no pudo ser removido e imposibilitaba la determinación de Zn(II). Los detalles de la caracterización del bicapa fueron descriptos en la Sección 2.10.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Características fisicoquímicas de la película bicapa

La Figura 6.2 presenta una micrografía FE-SEM representativa del mallado electrohilado sobre la película nanocompuesta de almidón y el histograma correspondiente al diámetro de fibras. Las fibras obtenidas de PVA-RE fueron uniformes y con orientación aleatoria. No se observaron esferas ni acumulaciones de material, y el diámetro medio resultó (180 ± 70) nm. La morfología y diámetro de las fibras fue similar al reportado en el Capítulo 4 (Sección 4.3.2.1) a pesar de que, en este caso, el colector del equipo de electrohilado fue cubierto por la película termoplástica (dieléctrico). Este resultado indica que el protocolo presentado (Figura 6.1) es adecuado para la obtención de películas bicapa y, además, confirma que la presencia de la película de almidón no interfiere en el proceso de electrohilado.

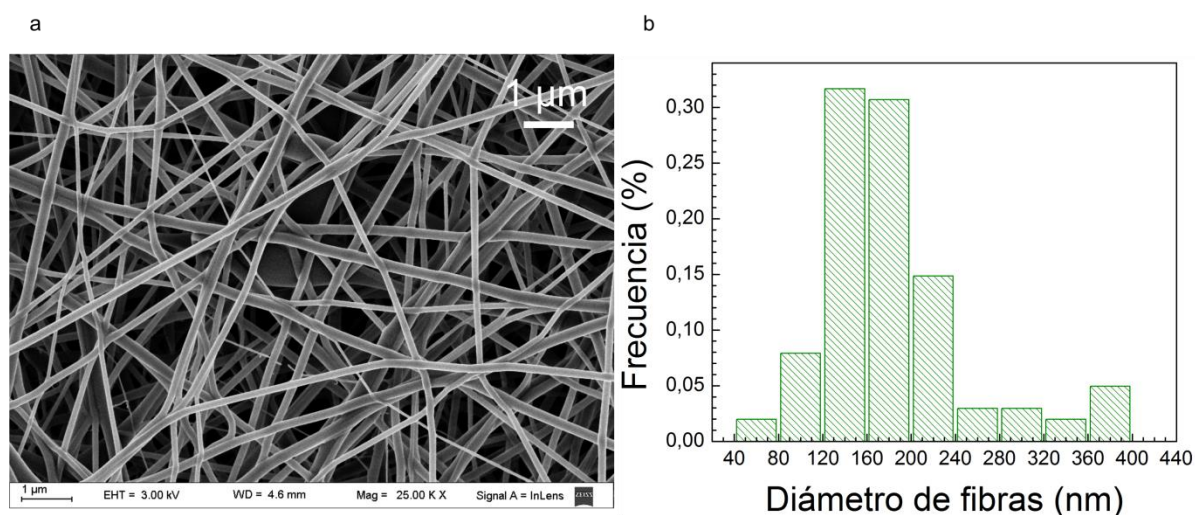


Figura 6.2. Micrografía SEM del mallado electrohilado sobre la película de almidón (a), e histograma correspondiente al diámetro de las fibras (b).

Una vez obtenidas las fibras sobre la película de almidón, el material bicapa fue termoprensado para adherir completamente las fibras sobre la película continua. La Figura 6.3a presenta una micrografía SEM de la superficie de la película prensada, del lado del PVA-RE. Con fines comparativos, en la Figura 6.3b se presenta una micrografía SEM de un mallado electrohilado (sin almidón) sometido al mismo proceso de termoprensado. Para la superficie PVA-RE de la película bicapa, se observa una matriz polimérica continua con la presencia de algunas fibras sobre ella. En el mallado PVA-RE termoprensado (sin almidón) se observa que las fibras fueron bien preservadas luego del proceso, aunque se observan algunas zonas donde el polímero parece fundido y se pierde la estructura de fibras. Considerando que el termoprensado no cambió significativamente la estructura de fibras, es probable que el almidón haya podido reacomodarse frente a las condiciones de presión y temperatura del proceso. Al respecto, la temperatura del termoprensado (130 °C) es superior a la temperatura de transición vítrea de ambos polímeros, lo cual facilitaría el reacomodamiento de ambos materiales y permitiría que el almidón ocupe los espacios entre las nanofibras.

La Figura 6.3c muestra la apariencia y transparencia de las películas de una capa (ii, TPS-ZnO) y bicapa (TPS-ZnO/PVA-ER) antes (iii) y después (iv) del termoprensado. Con fines comparativos, también se incluyó una película de almidón termoplástico control (i, TPS). Tanto la película TPS como la película TPS-ZnO fueron transparentes, mientras que la película bicapa TPS-ZnO/PVA-ER fue opaca inicialmente pero transparente luego del termoprensado. La opacidad inicial está asociada a la estructura de fibras de la capa PVA-ER, donde ocurre la dispersión de luz visible. Como se explicó en el párrafo anterior, durante el termoprensado el almidón se reacomoda para ocupar los espacios entre las fibras. Esto conduce a un material compuesto cuya transparencia se justifica en un índice de refracción similar tanto para la matriz de almidón como para las fibras embebidas de PVA ($n=1,49$ para el almidón, $n=1,48$ para PVA) (Cimadoro, Ribba, Ledesma, & Goyanes, 2018). En las secciones siguientes, se referirá solo al material bicapa termoprensado. Un efecto similar fue reportado en un trabajo previo, en el que un mallado electrohilado de PVA fue inmerso en un gel de almidón de papa, el cual fue luego secado para obtener una estructura multicapa (López-Córdoba, Estevez-Areco, & Goyanes, 2019).

La Figura 6.3d presenta una micrografía FE-SEM de la superficie de fractura criogénica del material bicapa obtenido (TPS-ZnO/PVA-ER), mientras que la superficie de fractura criogénica del material de una capa (TPS-ZnO) fue presentada y discutida en el Capítulo 5 (Sección 5.3.2.2). La micrografía revela la estructura bicapa en la que el mallado electrohilado PVA-ER se localizó sobre la superficie (flecha en la Fig. 6.3d) y tuvo un espesor de $\sim 1,6 \mu\text{m}$. El espesor total del bicapa fue $(150 \pm 30) \mu\text{m}$. No se observó delaminación entre las capas luego de la fractura criogénica, lo cual indica una buena adhesión entre las capas. La buena adhesión fue lograda durante el proceso de

termoprensado y favorecida por la compatibilidad entre los polímeros y por el diámetro nanométrico de las fibras (Fabra, Lopez-Rubio, & Lagaron, 2013; Neppalli et al., 2010).

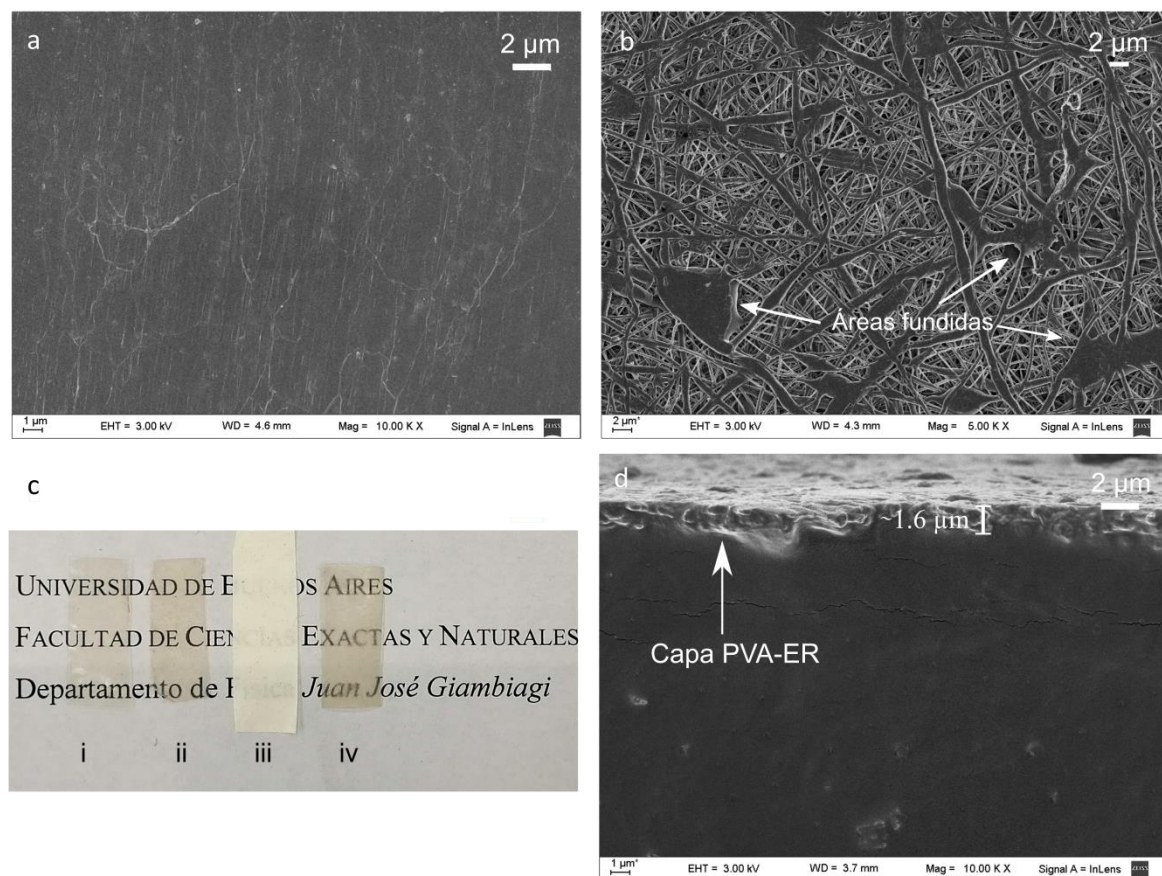


Figura 6.3. (a) Micrografía SEM de la superficie del material bicapa del lado PVA-ER y (b) de la superficie de un mallado electrohilado (sin almidón) sometido al mismo proceso de termoprensado. (c) Apariencia de las películas TPS (i), TPS-ZnO (ii) y TPS-ZnO/PVA-ER antes (iii) y después (iv) del termoprensado. (d) Micrografía SEM de la fractura criogénica del material bicapa.

La Figura 6.4a presenta el patrón de difracción de rayos X de las películas estudiadas. El patrón de difracción de la película de una capa (TPS-ZnO) fue presentado y discutido en el capítulo anterior. Consiste en un halo amorfo en el rango $12-28^\circ$ y varios picos cristalinos asociados a 2 estructuras cristalinas diferentes. Los picos centrados en $18,5^\circ$, $19,8^\circ$ y $24,7^\circ$ corresponden a una estructura V_h , mientras que los picos centrados en $17,1^\circ$ y $22,3^\circ$ corresponden a una estructura tipo B (Van Soest et al., 1996). El pico ancho centrado en $14,2^\circ$ se corresponde a la superposición de 3 picos cristalinos, según lo discutido en la Sección 5.3.2.2. La fase cristalina tipo B se corresponde con un proceso de re-cristalización luego del procesamiento de los materiales, mientras que la fase cristalina V_h corresponde a complejos formados entre cadenas de amilosa y glicerol durante la extrusión o durante el

almacenamiento (Obiro et al., 2012). Por su parte, el patrón de difracción del mallado PVA-ER presentó un halo amorfo superpuesto con un único pico cristalino centrado en $19,4^\circ$ que se corresponde con la cristalinidad del PVA (Patra, Salerno, & Cernik, 2017). El halo amorfo en este caso se asocia a la estructura conformada por la interacción entre el polímero y los compuestos del extracto de romero, ya que los mallados electrohilados de PVA no presentan dicho halo (Sección 3.3.2). La película bicapa TPS-ZnO/PVA-ER presentó un patrón de difracción que consiste en un halo amorfo ancho superpuesto con picos cristalinos centrados en $16,3^\circ$, $18,9^\circ$ y $21,9^\circ$. Estos picos se corresponden con la estructura cristalina de la capa TPS-ZnO, aunque muestran un corrimiento hacia menores ángulos. Dicho corrimiento indica un mayor espacio entre planos cristalinos de acuerdo a la Ley de Bragg, lo cual probablemente se deba a la presencia de las nanofibras de PVA-ER. Al respecto, diferentes autores han reportado que la presencia de nanoestructuras modifica el espaciado entre planos de las cristalitos (Arshad et al., 2019; Wang et al., 2019).

La Figura 6.4b presenta los espectros FTIR de las películas estudiadas. La película de una capa TPS-ZnO mostró las bandas características del almidón termoplástico, tal como fue discutido en el capítulo anterior. Dichas bandas están asociadas al estiramiento de los grupos O-H (3300 cm^{-1}), estiramiento C-H de grupos alquilo (2927 cm^{-1} y 2892 cm^{-1}), estiramiento C-O y C-C (1149 cm^{-1} y 1077 cm^{-1} , respectivamente), y flexiones C-O-H ($1100\text{--}900\text{ cm}^{-1}$). Por su parte, el mallado electrohilado PVA-ER presenta las bandas típicas del PVA, asociadas al estiramiento de los grupos O-H (3300 cm^{-1}), estiramiento C-H de grupos alquilo (2936 cm^{-1} y 2912 cm^{-1}), flexión C-H₂ (1422 cm^{-1} y 1329 cm^{-1}) y estiramiento C-O (1092 cm^{-1}). Adicionalmente, se presenta una banda característica de los grupos fenol de los compuestos del romero ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$), tal como se discutió en la Sección 4.3.2.1. El espectro FTIR de la película bicapa presentó picos característicos tanto del almidón como del PVA. La presencia de bandas asociadas a ambos polímeros confirma que el almidón termoplástico llenó los espacios entre las fibras del almidón, tal como fue propuesto al analizar las micrografías SEM. Al respecto, la técnica FTIR-ATR mide solo la superficie de la muestra, siendo la profundidad de penetración del haz aproximadamente $3\text{ }\mu\text{m}$ para polímeros como almidón termoplástico o PVA. Por otra parte, no se detectaron interacciones entre el almidón termoplástico y las fibras PVA-ER mediante la técnica FTIR, las cuales suelen evidenciarse por corrimientos de bandas características o cambios en sus intensidades.

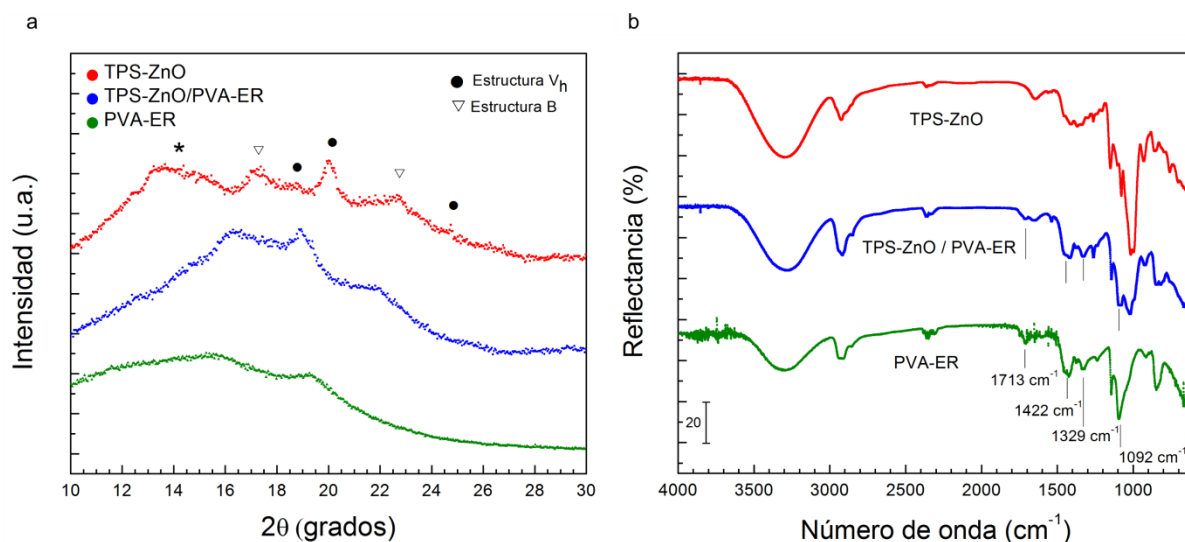


Figura 6.4. (a) Patrón de difracción de rayos X y (b) espectro infrarrojo de las películas estudiadas. En (a) se señala el pico ancho (*) en $\sim 14.2^\circ$ que corresponde a la superposición de picos cristalinos (Sección 5.3.2.2).

La Figura 6.5 presenta las curvas de análisis termo-gravimétrico de los diferentes sistemas. La película TPS-ZnO presentó tres pérdidas de masa típicas del almidón termoplástico, tal como fue presentado en el capítulo anterior. La primera se asocia a evaporación de agua ($50\text{-}150^\circ\text{C}$), la segunda a la evaporación de plastificantes ($150\text{-}250^\circ\text{C}$) y la tercera, de considerable mayor intensidad, se asocia a la degradación térmica de las cadenas de amilosa y amilopectina ($270\text{-}330^\circ\text{C}$). Por otra parte, la degradación térmica del mallado PVA-ER ocurre en dos etapas. La primera etapa ocurre en el rango $200\text{-}250^\circ\text{C}$ e involucra la degradación térmica de grupos laterales del polímero. La segunda etapa ocurre entre $350\text{-}450^\circ\text{C}$ y está relacionada a la degradación térmica de la cadena principal de polímero. El segundo escalón en la curva TGA además incluye la degradación térmica de los compuestos del extracto de romero, según lo discutido en el Capítulo 4 (Sección 4.3.2.1). La curva TGA del material bicapa TPS-ZnO/PVA-RE resultó similar a la del material de una capa TPS-ZnO. De acuerdo a lo observado por micrografías SEM, el espesor de la capa PVA-RE sólo constituye $\sim 1,6 \mu\text{m}$ dentro del espesor total de la película de $\sim 150 \mu\text{m}$. Por lo tanto, la masa de PVA-ER en el bicapa es despreciable frente a la masa de TPS-ZnO, lo cual explica que no pueda distinguirse la degradación térmica del PVA-ER en la curva TGA. Sin embargo, en el material bicapa se observa una pequeña diferencia en el escalón asociado a la evaporación de los plastificantes del almidón ($\sim 130\text{-}220^\circ\text{C}$, recuadro de la Figura 6.5). El efecto podría estar asociado a que la presencia del mallado PVA-ER dificulta y retarda la evaporación de parte de los plastificantes, probablemente a una migración parcial de moléculas de glicerol o sorbitol hacia la superficie del mallado electrohilado y a interacciones entre ambos. Esta diferencia en la degradación

térmica alcanza un valor máximo de ~1% a una temperatura de 170 °C. Considerando que la cantidad de plastificantes en el sistema es ~20%, no se espera que se vean afectadas las propiedades del material.

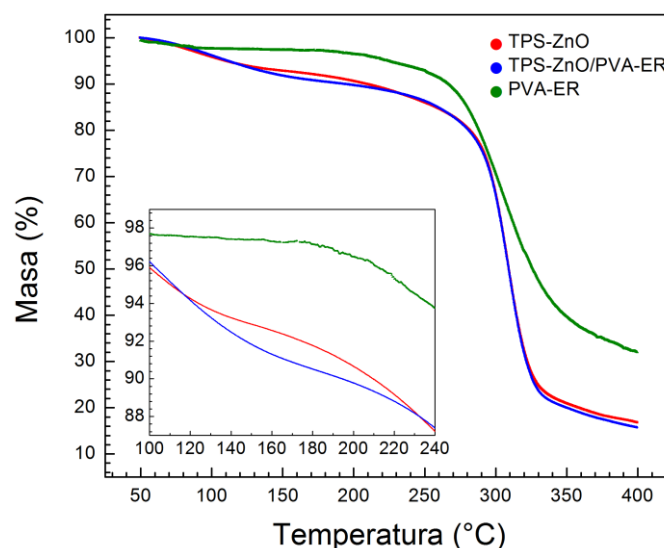


Figura 6.5. Curvas termo-gravimétricas del material bicapa TPS-ZnO/PVA-ER y de cada capa por separado. El recuadro amplía el rango donde se diferencian las curvas del material bicapa y la del material de una sola capa.

La Tabla 6.1 presenta los parámetros de susceptibilidad al agua para las películas desarrolladas. La película bicapa TPS-ZnO/PVA-ER no mostró diferencias significativas en los valores de MC y de WS respecto al sistema TPS-ZnO. Como se mencionó previamente, la capa de PVA-ER constituye una porción pequeña en el espesor y en la masa de la película bicapa, por lo cual no afectaría el contenido de humedad ni la solubilidad global de la película. El valor de la permeabilidad al vapor de agua del sistema bicapa no mostró diferencias significativas respecto al sistema de una capa, pero sí muestra una tendencia a menores valores medios. En el capítulo anterior, la WVP del sistema TPS-ZnO también mostró una tendencia a menores valores respecto al sistema control TPS. Al comparar el valor de WVP del sistema bicapa, que incorpora tanto nanobarras de ZnO como nanofibras de PVA, con el valor de WVP del sistema TPS, sí se encuentran diferencias significativas ($WVP = (2,9 \pm 0,6) \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1} \cdot 10^{-10}$ para TPS). Al respecto, tanto la presencia de nanobarras de ZnO como del mallado de PVA-ER podrían contribuir en el incremento del camino tortuoso de las moléculas de vapor de agua. Debe considerarse que el PVA, si bien es un polímero hidrofílico, presenta un valor de permeabilidad al vapor de agua menor al almidón termoplástico (Cano et al., 2015)

Tabla 6.1: Parámetros de susceptibilidad al agua. Contenido de humedad (MC), solubilidad en agua (WS) y permeabilidad al vapor de agua (WVP). Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	MC (%)	WS (%)	WVP ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1} \cdot 10^{-10}$)
TPS-ZnO	12.2 ± 0.4^a	20 ± 3^a	2.0 ± 0.4^a
TPS-ZnO/PVA-ER	12.0 ± 0.4^a	26 ± 4^a	1.7 ± 0.4^a

La Figura 6.6 presenta curvas características de tensión vs deformación para ensayos de tracción uniaxial de los sistemas desarrollados en este capítulo, y en la Tabla 6.2 se presentan los valores obtenidos de las propiedades mecánicas. Ambos materiales presentan una curva de deformación típica de materiales termoplásticos, que consiste en una deformación elástica seguida de una zona de deformación plástica hasta la rotura. No se observaron diferencias significativas en los valores de módulo de Young ni de tensión de rotura. Por otra parte, la deformación a rotura y la tenacidad a la tracción presentaron valores significativamente mayores. En particular, la deformación a rotura resultó ~61% mayor y la tenacidad a la tracción resultó ~50% mayor respecto a las películas de una capa TPS-ZnO. De acuerdo a estos resultados, el material bicapa se comporta como un material compuesto reforzado en el cual las nanofibras de PVA-ER evitan la propagación de fisuras y, por lo tanto, mejoran la elongación del material sin disminuir la tensión de rotura ni el módulo de Young.

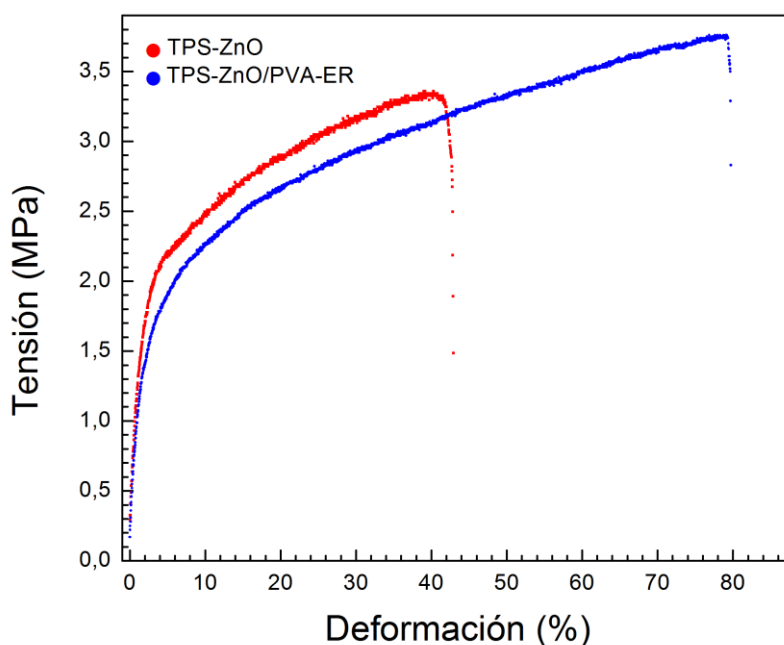


Figura 6.6. Curvas representativas de tensión vs deformación para los sistemas de una capa (TPS-ZnO) y bicapa (TPS-ZnO/PVA-ER).

Tabla 6.2: Módulo de Young (E), tensión de rotura (σ_b), deformación a rotura (ϵ_b), y tenacidad a la tracción (T) de los sistemas estudiados. Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Sistema	E (MPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)	T (kJ m ⁻³)
TPS-ZnO	90 ± 10 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	47 ± 8 ^a	1,4 ± 0,2 ^a
TPS-ZnO/PVA-ER	70 ± 10 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	76 ± 9 ^b	2,1 ± 0,3 ^b

Considerando los resultados de esta sección y los presentados en el capítulo anterior (Sección 5.3.2.2), se observa que todos los parámetros mecánicos y de susceptibilidad al agua fueron incrementados significativamente al incorporar al material de manera simultánea nanobarras de ZnO (en volumen) y nanofibras de PVA-ER (como una segunda capa).

6.3.2. Migración de Zn(II), actividad antioxidante y actividad bactericida

El contenido de polifenoles del extracto de romero resultó (9,9 ± 0,3) mg GAE/mL y su actividad antioxidante resultó (12,3 ± 0,8) mg TE/mL. Por su parte, el mallado PVA-ER (sin la presencia de la película de almidón) presentó un contenido de polifenoles de (13,8 ± 0,4) mg GAE/g y una actividad antioxidante de (18 ± 1) mg TE/g. Estos valores son levemente menores a los reportados en el Capítulo 4 cuando se estudió detalladamente la producción de nanofibras de PVA conteniendo extracto de romero. Esta diferencia puede deberse simplemente a la variabilidad en la composición y contenido de fenoles de las hojas de romero, la cual puede estar asociada tanto al clima y zona geográfica donde creció la planta como a las prácticas durante la cosecha y durante el almacenamiento (Bahmanzadegan, Rowshan, Zareian, Alizaden, & Bahmanzadegan, 2015; Sekeroglu, Urlu, Kulak, Gezici, & Dang, 2017; Teixeira, Negri, Salatino, & Stringheta, 2010). Por su parte, la eficiencia de encapsulación durante el proceso de electrohilado resultó (83 ± 5) % y no presentó diferencias significativas con lo expuesto en el Capítulo 4.

En el material bicapa desarrollado, la capa PVA-ER está destinada a ser el interior de un posible envase activo de manera que libere antioxidantes hacia el producto envasado que permanece en contacto con dicha capa. En el Capítulo 4 se estudió la cinética de liberación de polifenoles desde un mallado PVA-ER hacia diferentes simulantes alimenticios líquidos y se concluyó que los medios lipofílicos son capaces de extraer mayor cantidad de compuestos antioxidantes. Considerando este resultado, la actividad antioxidante del material bicapa se evaluó directamente sobre dos simulantes alimenticios lipofílicos (D1: etanol 50% v/v, D2: aceite vegetal). La actividad antioxidante de la película bicapa resultó (0,121 ± 0,009) mg TE/g en el simulante D1. Este valor está normalizado a la masa del material, pero los polifenoles se localizan solo en la capa PVA-ER. Al normalizar la actividad antioxidante a la masa de PVA-ER en el bicapa, se obtuvo que la actividad antioxidante de las fibras PVA-ER embebidas en la

matriz de almidón es (15 ± 2) mg TE/g, correspondiendo al ~83 % de la actividad antioxidante inicial del mallado. Probablemente, la pérdida de actividad antioxidante se deba a una menor disponibilidad de polifenoles en el material bicapa como consecuencia de una menor superficie libre de las nanofibras de PVA-ER. En el material bicapa, dichas fibras se encuentran inmersas en la matriz de TPS-ZnO. Por otra parte, no se obtuvo actividad antioxidante en el simulante D2. A diferencia del simulante de alimentos D1, el cual es una solución etanol (50% v/v), el simulante D2 es un medio fuertemente no polar (aceite vegetal) que puede interactuar poco con un polímero polar tal como es el PVA. Por ello se explica que no ocurre migración de polifenoles desde las fibras PVA-ER hacia el simulante D2. Los resultados presentados muestran que el material desarrollado es más efectivo para ser utilizado como envase activo en alimentos que se comporten como el simulante D1, el cual representa emulsiones de aceite en agua (European Commission, 2011).

Por otra parte, la capa TPS-ZnO del material bicapa fue propuesta para ser el exterior de un posible envase biodegradable activo, de tal forma que la actividad antimicrobiana de las nanobarras de ZnO evite el crecimiento bacteriano sobre la superficie del material y así proteja al producto envasado. Para este material se evaluó la actividad antimicrobiana utilizando el protocolo que determina el crecimiento bacteriano sobre la superficie (JIS Z2801). La Figura 6.7 presenta los resultados de crecimiento de colonias de *E. coli* luego de 24 h para los distintos materiales. La película TPS-ZnO logró inhibir el crecimiento bacteriano al comparar con el material control (TPS), obteniéndose una concentración final de $(9 \pm 1) \times 10^5$ CFU/mL en comparación con $(1,5 \pm 0,4) \times 10^7$ CFU/mL del material control. Este resultado fue presentado previamente en el Capítulo 5. Tal como fue discutido allí, las nanobarras de ZnO presentes en la matriz no logran actuar como bactericidas porque no disminuyen la concentración inicial de bacterias, pero sí actúan como agente bacteriostático y logran retardar el crecimiento de los microorganismos. La película bicapa mostró una actividad diferente en cada capa. Al evaluar el crecimiento bacteriano sobre la superficie PVA-ER, se observa que no hubo inhibición, obteniéndose una concentración final de bacterias de $(1,8 \pm 0,4) \times 10^7$ CFU/mL. El estudio indica que el mallado PVA-ER no presenta ninguna actividad antimicrobiana contra *E. coli* y, además, que los agentes antimicrobianos no migraron de manera significativa desde la capa TPS-ZnO hacia la superficie de PVA-ER. Por otra parte, el crecimiento de bacterias sí fue inhibido sobre la superficie TPS-ZnO del bicapa, alcanzando una concentración final de $(13 \pm 4) \times 10^5$ CFU/mL, la cual no presenta diferencias significativas con el resultado obtenido para el material de una capa TPS-ZnO.

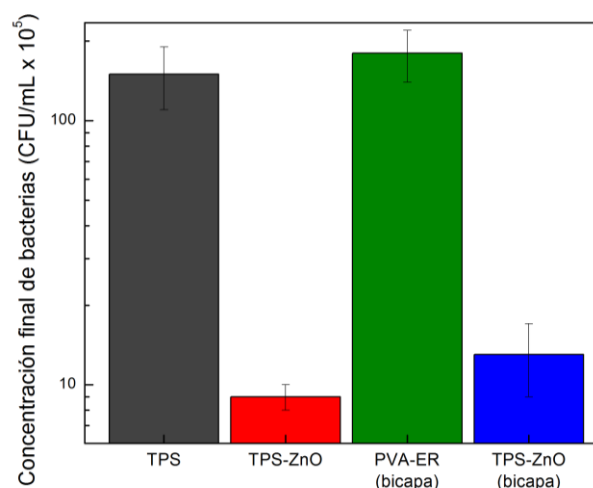


Figura 6.7. Concentración de *E. coli* medida luego de 24 h de crecimiento. Los resultados están representados en escala logarítmica.

La configuración propuesta para el material bicapa permite, en primer lugar, lograr una actividad diferente en cada cara (antimicrobiana en el exterior y antioxidante en el interior). La presencia de la capa interna PVA-ER también podría contribuir a mitigar la migración de Zn(II) hacia el interior, donde en una aplicación se alojaría un alimento. Al respecto, las nanobarras de ZnO son consideradas seguras para formar parte de un envase alimenticio si el Zn(II) no migra en una cantidad mayor a 25 mg Zn/kg de alimento (US Food and Drug Administration, 2017). Para analizar la migración de Zn, el material de una capa (TPS-ZnO) y el bicapa, del lado PVA-ER, se pusieron en contacto con filtros conteniendo un simulante de alimento, y luego del ensayo se analizó por EDS la superficie tanto de las muestras como de los filtros (detalles experimentales en la Sección 2.10.9). Los resultados se presentan en la Tabla 6.3. Se determinó la presencia de diferentes elementos, siendo la mayoría parte del material, del substrato o del recubrimiento metálico. Se detectó Zn(II) en los filtros luego de estar en contacto con la película TPS-ZnO. Sin embargo, no se detectó Zn(II) en los filtros luego de haber estado en contacto con la cara PVA-ER de la película bicapa, lo cual indica que la capa PVA-ER actúa de forma efectiva como barrera para evitar la migración de Zn(II) hacia el producto envasado. Al analizar la superficie de las películas luego del ensayo de migración, se detectó Zn(II) sobre la superficie de la capa TPS-ZnO pero no se detectó sobre el lado PVA-ER del bicapa. El Zn(II) presente en la superficie TPS-ZnO pudo migrar directamente hacia el simulante alimenticio, en acuerdo con los resultados anteriores. Sin embargo, el Zn(II) no fue capaz de migrar entre capas, lo cual justifica que tampoco haya migrado hacia el simulante alimenticio.

Tabla 6.3: Resultados EDS de las muestras luego de los ensayos de migración. Se analizaron ambas caras del material bicapa (superficie TPS-ZnO y superficie PVA-ER), y la superficie de los filtros conteniendo simulante alimenticio que estuvieron en contacto con el film de una capa TPS-ZnO film (Sim_TPS-ZnO) o con el bicapa del lado PVA-ER (Sim_PVA-RE).

Elemento	Masa (%)			
	Sim_TPS-ZnO	Sim_PVA-ER	Superficie TPS-ZnO	Superficie PVA-ER
Zn	0,8 ± 0,1	-	1,5 ± 0,2	-
C	38,9 ± 0,2	39,4 ± 0,2	30,9 ± 0,1	39,7 ± 0,2
N	18,9 ± 0,4	20,4 ± 0,4	-	-
O	36,1 ± 0,3	35,0 ± 0,3	59,1 ± 0,3	55,6 ± 0,3
Na	-	0,26 ± 0,02	-	0,21 ± 0,03
Al	0,14 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,22 ± 0,02
Si	0,16 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,49 ± 0,02
Pt	4,95 ± 0,09	4,52 ± 0,09	8,0 ± 0,1	3,80 ± 0,08
K	-	-	0,11 ± 0,02	-

6.4. Conclusiones parciales

Se demostró que la tecnología de electrohilado puede ser utilizada para el desarrollo de películas bicapas transparentes, mediante la deposición de fibras directamente sobre una película continua y un posterior termoprensado. La posibilidad de conseguir la transparencia de la película a pesar de la estructura de nanofibras, la cual es originalmente opaca, se fundamenta en que las fibras pueden ser embebidas en la matriz continua al termoprensar ambas capas.

La incorporación de la capa de nanofibras a la película de almidón permite mejorar de manera significativa las propiedades mecánicas del material a la vez que disminuye la permeabilidad al vapor de agua, en comparación con la película continua de una capa. Ambas mejoras fueron posibles por la compatibilidad entre los dos polímeros y por la estructura de nanofibras, los cuales aseguraron una buena adhesión entre capas sin necesidad de utilizar adhesivos adicionales.

La metodología propuesta permitió desarrollar un nuevo material con un principio activo confinado en cada capa, siendo la propuesta de aplicación que la capa antioxidante esté en contacto con un posible alimento mientras que la capa antimicrobiana prevenga el crecimiento de bacterias sobre la superficie externa del envase. Se demostró que en la película bicapa obtenida los dos principios activos utilizados fueron efectivos y mantuvieron su actividad. Adicionalmente, se destaca que la capa interna evita la migración hacia el interior del envase del principio activo incorporado en la capa externa.

6.5. Referencias

- Arshad, A. N., Wahid, M. H. M., Rusop, M., Majid, W. H. A., Subban, R. H. Y., & Rozana, M. D. (2019). Dielectric and Structural Properties of Poly (vinylidene fluoride)(PVDF) and Poly (vinylidene fluoride-trifluoroethylene)(PVDF-TrFE) Filled with Magnesium Oxide Nanofillers. *Journal of Nanomaterials*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5961563>.
- Bahmanzadegan, A., Rowshan, V., Zareian, F., Alizaden, R., & Bahmanzadegan, M. (2015). Seasonal variation in volatile oil, polyphenol content and antioxidant activity in extract of *Laurus nobilis* grown in Iran. *J. Pharm. Pharmacol*, 3, 223–231. <https://doi.org/10.17265/2328-2150/2015.05.003>.
- Cano, A., Fortunati, E., Cháfer, M., Kenny, J. M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2015). Properties and ageing behaviour of pea starch films as affected by blend with poly (vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 48, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.008>.
- Cimadoro, J., Ribba, L., Ledesma, S., & Goyanes, S. (2018). Electrospun Mats: From White to Transparent with a Drop. *Macromolecular Materials and Engineering*, 303(10), 1800237. <https://doi.org/10.1002/mame.201800237>.
- Dixon, J. (2011). *Packaging materials: Multilayer packaging for food and beverages*. ILSI Europe.
- European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, Vol. 15, pp. 12–88. <https://doi.org/10.1016/j.nucengdes.2011.01.052>.
- Fabra, M. J., Lopez-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2013). High barrier polyhydroxyalcanoate food packaging film by means of nanostructured electrospun interlayers of zein. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.007>.
- Gartner, H., Li, Y., & Almenar, E. (2015). Improved wettability and adhesion of polylactic acid/chitosan coating for bio-based multilayer film development. *Applied Surface Science*, 332, 488–493. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.01.157>.
- López-Córdoba, A., Estevez-Areco, S., & Goyanes, S. (2019). Potato starch-based biocomposites with enhanced thermal, mechanical and barrier properties comprising water-resistant electrospun poly (vinyl alcohol) fibers and yerba mate extract. *Carbohydrate Polymers*, 215, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.105>.
- Neppalli, R., Marega, C., Marigo, A., Bajgai, M. P., Kim, H. Y., & Causin, V. (2010). Poly (ϵ -caprolactone) filled with electrospun nylon fibres: A model for a facile composite fabrication. *European Polymer Journal*, 46(5), 968–976. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.01.004>.

- Obiro, W. C., Sinha Ray, S., & Emmambux, M. N. (2012). V-amylose structural characteristics, methods of preparation, significance, and potential applications. *Food Reviews International*, 28(4), 412–438. <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.660718>.
- Patra, N., Salerno, M., & Cernik, M. (2017). Electrospun polyvinyl alcohol/pectin composite nanofibers. In *Electrospun Nanofibers* (pp. 599–608). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100907-9.00022-2>.
- Sekeroglu, N., Urlu, E., Kulak, M., Gezici, S., & Dang, R. (2017). Variation in total polyphenolic contents, DNA protective potential and antioxidant capacity from aqueous and ethanol extracts in different plant parts of *Hypericum perforatum* L. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51, 1–7. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.2s.43>.
- Teixeira, E. W., Negri, G., Salatino, A., & Stringheta, P. C. (2010). Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem177>.
- US Food and Drug Administration. (2017). FDA cite: 21CFR176.170.
- Van Soest, J. J. G., Hulleman, S. H. D., De Wit, D., & Vliegthart, J. F. G. (1996). Crystallinity in starch bioplastics. *Industrial Crops and Products*, 5(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(95\)00048-8](https://doi.org/10.1016/0926-6690(95)00048-8).
- Wang, H., Gong, X., Miao, Y., Guo, X., Liu, C., Fan, Y.-Y., Zhang, J., Niu, B., Li, W. (2019). Preparation and characterization of multilayer films composed of chitosan, sodium alginate and carboxymethyl chitosan-ZnO nanoparticles. *Food Chemistry*, 283, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.022>.

Conclusiones

7.1. Conclusiones generales

El trabajo de esta tesis fue motivado por la necesidad de desarrollar materiales biodegradables que se adecuen a los nuevos requerimientos y tecnologías de la industria de envases de alimentos. En este marco, se concluye que las tecnologías empleadas, así como los materiales elegidos, resultaron adecuados para concretar los objetivos planteados para esta tesis. En particular, los resultados obtenidos permiten concluir que el electrohilado y la extrusión son metodologías que permiten desarrollar materiales nanoestructurados o nanocompuestos con propiedades activas, donde los principios activos quedan distribuidos de forma homogénea en la matriz. Además, es posible combinar ambas técnicas para obtener un sistema multicapas con propiedades superadoras.

El estudio vinculado al desarrollo de materiales por electrohilado demostró que los mallados nanofibrosos de PVA entrecruzados con ácido cítrico son insolubles en agua y poseen la capacidad de incorporar agentes antioxidantes, particularmente un extracto de romero, preservando su composición y actividad reductora. Estos agentes son liberados con cinéticas que dependen de la composición del medio. Por otra lado, se determinó que la incorporación de ciertos agentes con actividad antimicrobiana, como el d-limoneno, afectan significativamente la biodegradabilidad del material. La encapsulación previa de este agente en complejos con ciclodextrina limita su actividad antimicrobiana.

El estudio vinculado con el desarrollo de materiales por extrusión demostró que este proceso es adecuado para preparar materiales nanocompuestos con propiedades activas y con una buena distribución de cargas, los cuales presentan mejor desempeño respecto al material matriz. A pesar de la energía involucrada a lo largo de proceso, la evidencia muestra que las cargas permanecen atrapadas en la matriz y preservan su actividad antimicrobiana o antioxidante. Además, la incorporación de los principios activos disminuye la hidrofiliidad de las películas de almidón y mejora sus propiedades mecánicas. Para el caso del material que incorpora extracto de romero, se evidenció la coexistencia de un efecto de refuerzo por parte de los componentes inmiscibles, que forman nanopartículas, con un efecto plastificante por parte de los componentes miscibles.

La combinación de la técnica de electrohilado con la formación de películas por extrusión seguida de calandrado demostró que es factible electrohilar un polímero sobre una película de otro polímero no conductor usado como base. En el caso particular desarrollado en esta tesis, la afinidad del PVA electrohilado con la película de almidón condujo a la preparación de un sistema bicapa. Se demostró que un proceso de termoprensado que supera la temperatura de transición vítrea del almidón logra que este llene los espacios entre fibras, lo cual permite lograr la transparencia de la película y promueve la buena adhesión entre capas. Por otra parte, cada una de las tecnologías involucradas en la fabricación de las capas permite la encapsulación de un principio activo específico, manteniendo la actividad en el producto final. Al formar el bicapa, se demostró que la capa interna de nanofibras es capaz de evitar la migración del principio activo presente en la capa exterior.

Finalmente, se concluye que a través de la combinación de técnicas novedosas y tradicionales de preparación de materiales poliméricos es factible diseñar estrategias para la fabricación de películas con actividades espacialmente diferenciadas, que no se anulan mutuamente y cuyo efecto puede dirigirse hacia diferentes medios en contacto con dicha película. Estos sistemas presentan gran potencialidad para el desarrollo de envases orientados a la preservación de productos valiosos y sensibles, como el caso de alimentos, cosméticos, medicamentos, entre otros. Es destacable que las técnicas y metodologías empleadas no son particularmente costosas ni de difícil implementación, pudiendo ser operadas por personal calificado de una fábrica convencional de plásticos (sin más que un entrenamiento previo simple), lo que facilitaría su producción a gran escala.

7.2. *Perspectivas futuras*

Siguiendo la línea de mallados de nanofibras funcionalizados, sería interesante el estudio de estrategias para lograr cinéticas de liberación específicas. Para ello se requiere generar conocimiento respecto a la influencia de parámetros de la matriz (morfología, características del polímero) y de parámetros del principio activo (fuente del extracto, solvente del extracto, encapsulación previa) sobre los mecanismos de liberación involucrados. Un aspecto interesante a estudiar lo constituye el desarrollo de protocolos para evaluar la migración de compuestos activos hacia alimentos con distinto contenido de humedad, aspecto que no fue indagado a lo largo de esta tesis.

Con respecto a los nanocompuestos de almidón, la matriz hidrofílica utilizada en esta tesis no es adecuada para la mayoría de las aplicaciones de envases de alimentos. La incorporación de los principios activos permitió lograr una disminución en la hidrofiliidad del material, pero para ser aplicado como envase de un producto en góndola es necesario que el material no sea sensible a la humedad ambiente. Las estrategias para mejorar la matriz de almidón pueden incluir modificaciones químicas, mezcla de

almidón con otros polímeros e incorporación de compuestos hidrofóbicos con compatibilizantes adecuados.

Finalmente, respecto al desarrollo de sistemas multicapas que incluyen fibras de electrohilado, se requiere profundizar el estudio de las interacciones entre capas, de manera de lograr un mejor entendimiento respecto a las propiedades obtenidas. Al respecto, sería interesante estudiar la posible migración de plastificantes del almidón hacia las nanofibras, así como la influencia de la presencia de nanofibras embebidas en el proceso de retrogradación del almidón.

Comentarios finales del autor

Al día de la fecha, el presente trabajo de tesis ha originado tres publicaciones en revistas internacionales (Estevez-Areco, Guz, Candal, & Goyanes, 2018; Estevez-Areco, Guz, Candal, & Goyanes, 2020; Estevez-Areco, Guz, Famá, Candal, & Goyanes, 2019). Además, los resultados obtenidos han sido presentados en diferentes congresos, incluyendo el Simposio Argentino de Polímeros (2017, 2019), el Simposio Latinoamericano de Polímeros y Congreso Iberoamericano de Polímeros (2018) y el Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompuestos (2018).

El presente documento abarca años de trabajo y logra englobar y ampliar los resultados de las publicaciones citadas. Considero que los materiales desarrollados presentan características que los convierten en alternativas interesantes para su aplicación como envases de alimentos. Asimismo, los resultados y conceptos presentados contribuyen de forma significativa a la comprensión de materiales nanocompuestos biodegradables y confío en que sirvan en el futuro para el desarrollo de nuevos sistemas. Finalmente, debo mencionar que los objetivos perseguidos permitieron ampliar el conocimiento sobre sistemas materiales de interés en la comunidad, pero además me permitieron formarme y adquirir habilidades que enriquecen mi carrera científica.

Artículos publicados

- Estevez-Areco, S., Guz, L., Candal, R., & Goyanes, S. (2018). Release kinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) polyphenols from polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibers in several food simulants. *Food Packaging and Shelf Life*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.08.006>.
- Estevez-Areco, S., Guz, L., Candal, R., & Goyanes, S. (2020). Active bilayer films based on cassava starch incorporating ZnO nanorods and PVA electrospun mats containing rosemary extract. *Food Hydrocolloids*, 106054. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106054>.
- Estevez-Areco, S., Guz, L., Famá, L., Candal, R., & Goyanes, S. (2019). Bioactive starch nanocomposite films with antioxidant activity and enhanced mechanical properties obtained by extrusion followed by thermo-compression. *Food Hydrocolloids*, 96, 518–528. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.054>.

Trabajos presentados en congresos

- S. Estevez Areco, L. Guz, R. Candal, S. Goyanes. Material bicapa obtenido a partir de electrospinning de PVA sobre películas de almidón termoplástico. Poster presentado en el *XIII Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2019)*, 09 al 11 de Octubre de 2019, Buenos Aires, Argentina.
- S. Estevez Areco, L. Guz, P.S. Cuenca, R. Candal, S. Goyanes. Release of polyphenols from PVA electrospun mats into food simulants. Poster presentado en el *XVI Simposio Latino-americano de*

Polímeros (SLAP 2018) y XIV Congreso Iberoamericano de Polímeros (CIP 2018), 06 al 09 de Noviembre de 2018, Mar del Plata, Argentina.

- S. Estevez Areco, L. Guz, R. Candal, S. Goyanes. Rosemary compounds encapsulation in PVA electrospun mats. Presentación oral en el *III Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompuestos (Biopoli 2018)*, 23 al 25 de abril de 2018, Bahía Blanca, Argentina.
- S. Estevez Areco, L. Guz, R. Candal, S. Goyanes. Efecto antimicrobiano de d-limoneno encapsulado en β -ciclodextrina o sin encapsular, incorporado en mallados electroestirados de poli(alcohol vinílico). Poster presentado en *XII Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2017)*, 18 al 20 de octubre de 2017, Córdoba, Argentina.
- S. Estevez Areco, L. Guz, R. Candal, S. Goyanes. Películas de poli(alcohol vinílico) obtenidas por electroestirado conteniendo principios activos naturales. Poster presentado en *Escuela de Desarrollo y tecnologías sustentables en Materiales Poliméricos*, 15 al 20 de octubre de 2017, Córdoba, Argentina.
- S. Estevez Areco, L. Guz, R. Candal, S. Goyanes. Encapsulación de d-limoneno y extracto de romero en nano-fibras de PVA obtenidas por electroestirado. *Memorias del 6° Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales (JIM 2017)*, 17 y 18 de agosto de 2017, Albarellos, Argentina. ISBN 978-950-532-350-0.
- S. Estevez Areco, L. Guz, R. Candal, S. Goyanes. Encapsulation of d-limonene in electrospun PVA nanofibers. Poster presentado en *Frontiers in Physical Science*, Humboldt Kolleg, 14 al 18 de noviembre de 2016, Buenos Aires, Argentina.