



Secretaria de Posgrado

**Diseño de Nuevos Materiales Poliméricos con
Actividad Antimicrobiana**

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

Ing. Celeste Cottet

Directora: Dra. Mercedes A. Peltzer

Co-directora: Dra. Marta Fernández-García

2023

Laboratorio LOMCEM - Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes. (Bernal, Argentina)

Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros. CSIC (Madrid, España)

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento a las directoras de mi tesis, la Dra. Mercedes Peltzer y la Dra. Marta Fernández-García, por el apoyo que me han brindado durante todos estos años, por su constante disposición a ayudarme y por alentarme a seguir creciendo. Ambas son excelentes personas y profesionales, y estoy feliz de que hayan sido mis guías en este camino.

A mi familia, por haberme brindado las herramientas que me han permitido llegar hasta este momento. Gracias por su confianza y amor incondicional.

Al equipo LOMCEM: Dr. Orlando de la Osa, Dr. Juan Francisco Delgado, Dr. Andrés G. Salvay, Dra. Yuly Andrea Ramírez-Tapias e Ing. Guillermo Rezzani. Valoré mucho el tiempo compartido, sus consejos, ayuda y constante apoyo tanto profesional como personal. ¡Gracias!.

Este trabajo se realizó gracias a la beca doctoral otorgada por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (RESO-2022-442-GDEBA-CIC) en el marco del programa de investigación PUNQ “Investigaciones aplicadas al desarrollo del sector alimentario II” financiado por la Universidad Nacional de Quilmes (Exp. 827/1300/19). Asimismo, gracias al apoyo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Programa EMHE-CSIC 2017, MHE-200043) y el MINECO (MAT2016-78437-R; AEI, Spain y FEDER, EU) fue posible realizar tres estancias de investigación en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP-CSIC, Madrid, España).

Difusión de resultados: Publicaciones y Congresos

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

2019 – XIII Simposio Argentino de Polímeros (CABA, Argentina).

2020 – BIOPOLI, IV Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompuestos (Mar del Plata, Argentina).

2021 – IV Jornadas de Investigadores en Formación CyT UNQ (Bernal, Argentina).

2021 – XIV Simposio Argentino de Polímeros (Bahía Blanca, Argentina).

2023 – XV Simposio Argentino de Polímeros, I Congreso Argentino de Materiales Compuestos (Mar del Plata, Argentina).

Asimismo, fueron publicados en las siguientes revistas científicas:

Cottet, C.; Ramirez-Tapias, Y.A.; Delgado, J.F.; de la Osa, O.; Salvay, A.G.; Peltzer, M.A. Biobased Materials from Microbial Biomass and Its Derivatives. *Materials* **2020**, 13(6), 1263.

Cottet, C.; Salvay, A.G.; Peltzer, M.A.; Fernández-García, M. Incorporation of Poly(Itaconic Acid) with Quaternized Thiazole Groups on Gelatin-Based Films for Antimicrobial-Active Food Packaging. *Polymers* **2021**, 13, 200.

Resumen

Actualmente, ante la creciente preocupación por el impacto ambiental generado por los materiales de origen petroquímico, existe la necesidad de obtener materiales a partir de fuentes renovables que no representen una amenaza para la sociedad y el planeta. La presente tesis doctoral tuvo como objetivo principal el diseño, empleando recursos renovables, de nuevos materiales poliméricos basados en polímeros catiónicos (polímeros con grupos de amonio cuaternario) con actividad antimicrobiana para su aplicación en el envasado de alimentos, como así también para otras aplicaciones, por ejemplo en aplicaciones médicas. Para ello se sintetizaron polímeros antimicrobianos por técnicas de polimerización convencionales. Se obtuvieron dos polímeros denominados MeFPIA1 y MeFPIA2, mediante la polimerización de ácido itacónico (IA), y su posterior modificación y funcionalización a partir de reacciones de esterificación y alquilación, respectivamente. Ambos polímeros fueron incorporados en matrices de polímeros naturales como gelatina/almidón y biomasa de levadura, utilizando glicerol como plastificante, y dopamina y ácido gálico como agentes entrecruzantes y aditivos antioxidantes. Las películas se obtuvieron mediante la técnica de evaporación del solvente (*casting*) a partir de las dispersiones acuosas de los polímeros y fueron caracterizadas en cuanto a sus propiedades físico-químicas, estructurales y funcionales, mediante distintos tipos de técnicas analíticas. La incorporación de MeFPIAx en las distintas formulaciones, si bien aumentó en la mayoría de los casos la permeabilidad al vapor de agua, tuvo varios efectos beneficiosos. Los materiales fueron menos translúcidos, lo cual sería una ventaja en ciertas aplicaciones, además de presentar mejores propiedades mecánicas, antimicrobianas (excepto en las películas a base de biomasa de levadura), antioxidantes y menor grado de hinchamiento. La adición de antioxidantes mejoró tanto la capacidad antioxidante como la capacidad antimicrobiana de las películas. Teniendo en cuenta estos resultados, los materiales obtenidos resultan prometedores para el desarrollo de materiales activos amigables con el medio ambiente.

Abstract

Nowadays, given the growing concern about the environmental impact generated by petrochemical-based materials, there is a need to obtain new materials from renewable sources that do not represent a threat to society and the planet. The main objective of this doctoral thesis was the design, using renewable resources, of new polymeric materials based on cationic polymers (polymers with quaternary ammonium groups) with antimicrobial activity for applications in food packaging and other fields, such as biomedicine. Antimicrobial polymers were synthesized using conventional polymerization techniques. Two polymers, called MeFPIAx (MeFPIA1 and MeFPIA2), were obtained through the polymerization of itaconic acid (IA), followed by their subsequent modification and functionalization through esterification and alkylation reactions, respectively. Both polymers were incorporated into matrices of natural polymers such as gelatin/starch and yeast biomass, using glycerol as a plasticizer, and dopamine and gallic acid as crosslinking agents and antioxidant additives. Films were prepared using the casting technique from aqueous dispersions of the polymers and characterized for their physicochemical, structural, and functional properties using various analytical techniques. Although it increased the water vapor permeability in most cases, the incorporation of MeFPIAx in the different formulations had several beneficial effects. The materials were less translucent, which would be an advantage in certain applications, in addition to exhibiting improved mechanical and antimicrobial properties (except in yeast biomass-based films), as well as reduced swelling. The addition of antioxidants enhanced both the antioxidant and antimicrobial capabilities of the films. Taking these results into account, the materials obtained show promise for the development of environmentally friendly active materials.

Capítulo 1: Introducción.....	17
1.1. Polímeros antimicrobianos con grupos amonio cuaternario.....	19
1.1.1. Ácido itacónico.....	20
1.2. Matrices poliméricas biobasadas.....	21
1.2.2. Proteínas.....	23
1.2.2.1. Gelatina.....	24
1.2.3. Polisacáridos.....	26
1.2.3.1. Almidón.....	26
1.2.4. Biomasa de levadura panadera.....	28
1.3. Materiales activos.....	30
1.3.1. Incorporación de agentes activos.....	31
1.3.1.1. Dopamina.....	32
1.3.1.2. Ácido gálico.....	33
1.4. Referencias.....	34
Capítulo 2: Objetivos.....	43
2.1. Objetivos generales	43
2.2. Objetivos específicos	43
Capítulo 3: Síntesis de Polímeros Antimicrobianos.....	45
3.1. Materiales	45
3.2. Síntesis de poli(ácido itacónico) (PIA)	45
3.3. Funcionalización del PIA con el grupo heterociclo 1,3-tiazol (FPIA)	45
3.4. Cuaternización de FPIAx con yoduro de metilo (MeFPIAx)	46
3.5. Caracterización físico-química de los polímeros sintetizados	47
3.5.1. Cromatografía de permeación en gel (GPC)	47
3.5.2. Resonancia magnética nuclear de protón (¹ H-RMN)	47
3.5.3. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	47
3.5.4. Potencial zeta (ζ).....	47
3.5.5. Análisis termogravimétrico (TGA)	47
3.5.6. Determinación de la concentración mínima de inhibición del crecimiento bacteriano (MIC)	48
3.7. Resultados y discusión	48

3.7.1. Caracterización fisicoquímica de la síntesis y modificación de Homopolímeros.....	48
3.7.2. Análisis termogravimétrico (TGA)	51
3.7.3. Determinación de la concentración mínima de inhibición (MIC)	52
3.8. Conclusiones parciales	53
3.9. Referencias	54

Capítulo 4: Diseño de Películas Activas a Base de Gelatina y Almidón

con MeFPIAx	57
4.1. Materiales	57
4.2. Obtención de las películas activas por evaporación del solvente (<i>casting</i>)	57
4.3. Caracterización de las películas activas	58
4.3.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).....	58
4.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	58
4.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	58
4.3.4. Propiedades mecánicas	59
4.3.5. Color	59
4.3.6. Permeabilidad experimental al vapor de agua (P_w^{exp})	60
4.3.7. Hidratación	61
4.3.8. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas	62
4.3.9. Actividad antioxidante	63
4.3.9.1. Preparación de las soluciones de trabajo	63
4.3.9.2. Estimación de la capacidad antioxidante de la película por contacto directo con ABTS ^{•+}	63
4.3.10. Actividad antimicrobiana	64
4.3.11. Migración específica y cinética de liberación de dopamina en simulante alimentario	64
4.3.12. Determinación de la capacidad antioxidante del simulante por el método ABTS	65
4.3.13. Análisis estadístico	66
4.4. Resultados y Discusión	66
4.4.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	67

4.4.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	68
4.4.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	70
4.4.4. Propiedades mecánicas	72
4.4.5. Color	73
4.4.6. Permeabilidad experimental al vapor de agua (P_w^{exp})	74
4.4.7. Hidratación	75
4.4.8. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas	78
4.4.9. Actividad antioxidante	82
4.4.10. Actividad antimicrobiana	83
4.4.11. Migración específica y cinética de liberación de dopamina en simulante alimentario graso	84
4.5. Conclusiones Parciales	87
4.6. Referencias	88

Capítulo 5: Diseño de Nuevas Películas Activas a Base de Gelatina y Almidón

con Distintas Concentraciones de MeFPIAx	93
5.1. Materiales	93
5.2. Obtención de las películas por evaporación del solvente (<i>Casting</i>)	93
5.3. Caracterización de las películas activas	94
5.3.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	94
5.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	94
5.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	94
5.3.4. Propiedades mecánicas	94
5.3.5. Color	94
5.3.6. Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp})	95
5.3.7. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas	95
5.3.8. Actividad antioxidante	95
5.3.9. Actividad antimicrobiana	95
5.3.10. Análisis estadístico	95
5.4. Resultados y Discusión	95
5.4.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR)	96
5.4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	97
5.4.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)	99

5.4.4. Propiedades mecánicas	100
5.4.5. Color	101
5.4.6. Permeabilidad al Vapor de Agua (P_w^{exp})	102
5.4.7. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas	103
5.4.8. Actividad Antioxidante	105
5.4.9. Actividad Antimicrobiana	106
5.5. Conclusiones parciales	107
5.6. Referencias	108

Capítulo 6: Diseño de Nuevas Películas Activas a Base de Gelatina y Almidón con MeFPIAx y Ácido Gálico.....111

6.1. Materiales.....	111
6.2. Obtención de las Películas por Evaporación del Solvente (<i>Casting</i>)	111
6.3. Caracterización de las películas activas	112
6.3.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	112
6.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	112
6.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)	112
6.3.4. Propiedades mecánicas	112
6.3.5. Color	112
6.3.6. Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp})	112
6.3.7. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas	112
6.3.8. Actividad antioxidante	113
6.3.9. Actividad antimicrobiana	113
6.3.10. Migración específica y cinética de liberación de ácido gálico en simulante alimentario graso	113
6.3.11. Análisis estadístico	113
6.4. Resultados y Discusión	113
6.4.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	115
6.4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	115
6.4.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)	117
6.4.4. Propiedades Mecánicas	119
6.4.5. Color	120

6.4.6. Permeabilidad al Vapor de Agua (P_w^{exp})	121
6.4.7. Evaluación de la Cinética Hinchamiento de las Películas	122
6.4.8. Actividad Antioxidante	125
6.4.9. Actividad Antimicrobiana	127
6.4.10. Migración en simulantes alimentario graso y su cinética de liberación	128
6.5. Conclusiones parciales	130
6.6. Referencias.....	130

Capítulo 7: Diseño de Películas Activas a Base de Biomasa de Levadura

Con MeFPIAx.....	133
7.1. Materiales	133
7.2. Determinación del contenido de β -glucanos y proteínas presentes en la biomasa de levadura	133
7.3. Obtención de las películas por evaporación del solvente (<i>casting</i>)	133
7.4. Caracterización de las películas activas	134
7.4.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	134
7.4.2. Análisis termogravimétrico (TGA)	134
7.4.3. Propiedades mecánicas	134
7.4.4. Color	134
7.4.5. Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp})	134
7.4.6. Hidratación	134
7.4.7. Actividad antioxidante	135
7.4.8. Actividad antimicrobiana	135
7.4.9. Migración específica y cinética de liberación de ácido gálico en simulante alimentario graso	135
7.4.10. Análisis estadístico	135
7.5. Resultados y Discusión	136
7.5.1. Determinación del contenido de β -glucanos y proteínas presentes en la biomasa de levadura	137
7.5.2. Caracterización de las Películas	138
7.5.2.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	138
7.5.2.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)	139
7.5.2.3. Propiedades Mecánicas	141

7.5.2.4. Color	143
7.5.2.5. Permeabilidad al Vapor de Agua (P_w^{exp})	144
7.5.2.6. Hidratación	145
7.5.2.7. Actividad Antioxidante	147
7.5.2.8. Actividad Antimicrobiana	148
7.5.2.9. Migración en simulante alimentario y su cinética de liberación	148
7.6. Conclusiones parciales	149
7.7. Referencias	150
CAPITULO 8. Conclusiones	153

Capítulo 1: Introducción

Los microorganismos son organismos unicelulares, pluricelulares o agrupación de células (*clusters*) que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y su presencia afecta invariablemente al entorno en el que se desarrollan. Se pueden dividir en cinco tipos principales: bacterias, algas, hongos, protozoos y virus. Cumplen muchas funciones favorables para los seres vivos y el medioambiente. Son beneficiosos en la producción de oxígeno, la descomposición de materia orgánica, la provisión de nutrientes para las plantas y el mantenimiento de la salud humana [1]. En medicina son una fuente de antibióticos (sustancias producidas por microorganismos que matan o inhiben otros microorganismos y luego se utilizan en el tratamiento de enfermedades infecciosas) y vacunas (sustancias derivadas de microorganismos desarrolladas para inmunizar contra enfermedades) para el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas [2]. Asimismo, la industria alimentaria utiliza ampliamente los microorganismos, que intervienen en diferentes etapas de la producción de una gran variedad de alimentos. Por ejemplo, son utilizados en la elaboración de ciertos productos, como el pan, la cerveza, el vino y los productos lácteos, entre otros [3].

Los microorganismos son una parte integral de nuestras vidas, por lo que adquirir conocimiento sobre ellos es esencial. Sin embargo, algunos pueden influir desfavorablemente en la salud y el bienestar, tanto de plantas, animales como de seres humanos, causando graves daños y enfermedades. La sociedad moderna, por lo tanto, considera a los microorganismos de manera más equilibrada, reconociendo los importantes roles que desempeñan y teniendo en cuenta tanto sus impactos positivos como negativos en nuestras vidas. No más del 1% de todos los microorganismos son perjudiciales para la vida humana, una proporción significativa es beneficiosa y la gran mayoría es neutral, esperando ser explorada y utilizada [4].

Las principales preocupaciones de la sociedad actual son las enfermedades infecciosas y los problemas relacionados con la salud. Los antibióticos revolucionaron el último siglo ya que son la gran solución a estos problemas. Sin embargo, debido al exceso en su utilización y considerando sus mecanismos de acción, que no dañan físicamente la pared celular, sino que penetran en el microorganismo, estos pueden mutar, lo que da lugar a problemas de resistencia a los antibióticos y, posteriormente, a su propagación descontrolada [5,6].

Los antibióticos dependiendo de sus mecanismos de acción se pueden dividir en cinco principales grupos [7]:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular: penicilinas, vancomicinas, cefalosporinas, β -lactámicos, carbapenemes, etc.
- Inhibición de la síntesis de proteínas: aminoglucósidos, tetraciclinas, cloroamfenicol, gentamicina, tobramicina, etc.
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: ácido nalidíxico, fluoroquinolonas, rifamicinas, imidazoles, etc.
- Inhibición de las vías metabólicas: sulfonamidas, pirimetamina, trimetoprim
- Interferencia con la integridad de la membrana celular: polimixina, bacitracina, anfotericina-B, metronidazol, azoles, etc.

Las enfermedades infecciosas, causadas principalmente por bacterias, representan aproximadamente una cuarta parte de todas las muertes en todo el mundo, agravadas por el aumento de la resistencia a los antibióticos, que es responsable de la mayoría de las infecciones en los procesos quirúrgicos [8]. Por otra parte, los daños causados por la alteración y la contaminación de los alimentos debido a la actividad microbiana, deterioran los atributos sensoriales y afectan tanto a la industria alimentaria (pérdidas económicas, daño a la reputación, etc) como a los consumidores (rechazo de los productos) [9]. La presencia de crecimiento visible como mucosidad y colonias, cambios en la textura debido a la degradación de proteínas/carbohidratos/lípidos, y la percepción de olores y sabores desagradables pueden indicar la alteración por microorganismos (por ejemplo, bacterias y mohos) [10]. El desarrollo y la producción de toxinas por parte de microorganismos patógenos comprometen la seguridad de los alimentos y representan un riesgo para la salud de los consumidores [11].

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es evidente que existe una necesidad constante de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos. En este sentido, los polímeros antimicrobianos ofrecen una gran versatilidad para evitar contaminaciones o infecciones microbianas. Los recubrimientos de superficies, los envases de alimentos, los dispositivos biomédicos o los sistemas de purificación de agua son algunas de las formas en las que se pueden incorporar polímeros antimicrobianos, brindando propiedades antimicrobianas al material [2,12-14]. Los posibles parámetros de diseño para los polímeros incluyen los grupos funcionales activos, el peso molecular, el equilibrio hidrofóbico/hidrofílico, y la arquitectura del polímero, ya que se sabe que afectan la capacidad biocida [15]. Por lo tanto, la fabricación de nuevos materiales poliméricos con capacidad antimicrobiana se ha

postulado como una alternativa muy atractiva [14,16-20]. Debido a su alto peso molecular y bajo coeficiente de difusión, los polímeros antimicrobianos no migran fácilmente de las superficies donde están incorporados [20,21].

Los sistemas poliméricos antimicrobianos pueden clasificarse en cuatro grandes clases [14]: i) aquellos que presentan una capacidad antimicrobiana intrínseca, como son los polímeros catiónicos; ii) los que a través de una modificación química se le incorpora dicha capacidad; iii) las mezclas de polímeros con compuestos orgánicos antimicrobianos tanto de alto como de bajo peso molecular, y iv) las mezclas de polímeros en los que se incorpora un compuesto inorgánico antimicrobiano.

1.1. Polímeros antimicrobianos con grupos amonio cuaternario

Recientemente, se han realizado investigaciones relacionadas con una amplia variedad de sistemas poliméricos antimicrobianos, que incluyen compuestos de amonio cuaternario, sales poliméricas de fosfonio cuaternario, polímeros que contienen guanidina y polímeros halogenados (p.e, N-halaminas), entre otros [14,22]. La mayoría de los sistemas estudiados y reportados son policatiónicos, en particular, aquellos que presentan átomos de nitrógeno cuaternario [18,23].

Si bien el mecanismo de acción de los polímeros policatiónicos no se comprende muy bien, se sabe que pueden adsorberse a la superficie celular bacteriana cargada negativamente (debido al alto contenido de fosfatidiletanolamina) a través de interacciones electrostáticas. Una vez que el polímero se adhiere, penetra la pared celular desestabilizándola, provocando rápidamente la lisis celular [3,6,8,15]. La estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es diferente. La diferencia radica en que las bacterias Gram-negativas tienen una membrana externa en la pared celular, compuesta por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos. Esta estructura generalmente limita la penetración de varios agentes antimicrobianos y compuestos anfífilos en la célula, por lo que su actividad depende tanto de su estructura como del tipo de microorganismo con el que interactúa [24,25].

Se han sintetizado muchos compuestos de amonio cuaternario que no solo son antibacterianos, sino que también poseen capacidades antifúngicas, antivirales, y anti-metaloproteinasas de matriz o matrixinas. La incorporación de grupos de amonio cuaternario (QA) en polímeros representa una de las estrategias más prometedoras para la preparación de biomateriales antimicrobianos. Se han utilizado diversas técnicas de polimerización para sintetizar polímeros con grupos QA, por ejemplo, por cuaternización de

polímeros precursores reactivos (post-polimerización). Este método generalmente genera productos con grados variables de cationización como resultado del impacto impredecible del impedimento estérico de los grupos vecinos. Otra técnica es por copolimerización directa de monómeros que contienen grupos funcionales QA, denominados monómeros QA, dentro de la red polimérica. Estos métodos generan polímeros con una funcionalidad del 100%, sin embargo, su caracterización molecular y su polimerización resultan a veces difíciles [26].

La incorporación de polímeros con grupos QA en matrices poliméricas para el desarrollo de materiales antimicrobianos presenta varias ventajas. En comparación con los materiales de liberación, los agentes antimicrobianos se unen covalentemente a la estructura del polímero. Por lo tanto, el enfoque de eliminación por contacto directo resulta beneficioso, ya que: (1) mejoran y prolongan la actividad antimicrobiana; (2) son diferentes de los antibióticos en el sentido de que su modo de acción implica la destrucción de las paredes y membranas celulares bacterianas, así como de los envoltorios virales (cápside) y, por lo tanto, es poco probable que desarrollen resistencia antibiótica.

1.1.1. Ácido itacónico

El ácido itacónico (IA, $C_5H_6O_4$) es un ácido dicarboxílico insaturado cuya producción puede llevarse a cabo mediante la fermentación microbiana de diferentes biomásas, como, por ejemplo, la biomasa lignocelulósica obtenida de residuos agrícolas y forestales [27]. Los géneros más importantes de microorganismos productores son hongos *Aspergillus terreus* y cepas de *Ustilago maydis*, o con bacterias genéticamente modificadas como *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum* [28]. El IA es uno de los ácidos orgánicos más importantes y representa un sustituto viable para el ácido acrílico producido petroquímicamente, pinturas, barnices, polímeros biodegradables y otros compuestos orgánicos diferentes. Debido a su estructura trifuncional (dos grupos carboxílicos y un doble enlace), el IA y sus derivados respaldan la síntesis de una amplia gama de polímeros innovadores mediante polimerización y mediante reticulación con aplicaciones en hidrogeles especiales para la descontaminación del agua, administración dirigida de medicamentos (especialmente en el tratamiento del cáncer), nanohidrogeles inteligentes en aplicaciones alimentarias, recubrimientos y elastómeros [29]. Adicionalmente, el IA exhibe propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antitumorales, manteniendo atributos como su efectividad en términos medioambientales, su compatibilidad con organismos vivos y su sostenibilidad [30].

El IA es altamente soluble en agua y alcoholes [31], tiene una apariencia de polvo cristalino blanco y no tiene olor [32,33]. La variación de los grupos funcionales del IA lo convierte en un intermediario eficiente para producir diferentes compuestos orgánicos complejos. Puede participar en una amplia variedad de reacciones, como la esterificación con alcoholes, la formación de sales con metales, la producción de anhídrido, la polimerización y reacciones adicionales [34].

El estudio reportado por Marvel y Shepherd fue uno de los pioneros al estudiar la aplicación del IA para producir polímeros. Describieron la copolimerización radical del IA con ácido acrílico, utilizando persulfato de potasio como iniciador. Este método se benefició del doble enlace C=C presente en su estructura, al igual que la mayoría de los estudios ya publicados [35]. Por otra parte, Chiloeches *et al.* han reportado el estudio de una serie de copolímeros catiónicos antibacterianos derivados del ácido itacónico como posibles componentes activos en formulaciones biodegradables basadas en poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) para aplicaciones de envasado. Las propiedades antibacterianas mostraron una actividad potente contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), con valores de MIC bajos de $78 \mu\text{g mL}^{-1}$. Asimismo, se biodegradaron rápidamente en condiciones de compostaje y se mezclaron exitosamente con PBAT en una relación 90/10 mediante extrusión en fundido a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ y posterior moldeo por compresión. Las películas biopoliméricas resultantes exhibieron una potente actividad antibacteriana, lo que confirma que los polímeros catiónicos incorporados como componentes activos parecen ser buenos candidatos para aplicaciones relacionadas con el envasado activo de alimentos o incluso dispositivos biomédicos [36]. Por lo tanto, el IA es sin duda un sustrato clave para la producción de polímeros antimicrobianos.

1.2. Matrices poliméricas biobasadas

Los materiales plásticos son una parte vibrante del mercado empresarial global debido a sus excelentes características funcionales y valores económicos. La versatilidad de estos materiales para diversas aplicaciones aumenta la demanda cada año. Sin embargo, la acumulación sin precedentes de residuos plásticos genera preocupaciones importantes en relación con el ciclo de vida de los materiales sintéticos, ya que representan una seria amenaza para la sociedad y el planeta [37,38]. La contaminación plástica está alcanzando actualmente un umbral crítico y los esfuerzos actuales de reciclaje no están cumpliendo con sus promesas. El ciclo de vida de los plásticos no biodegradables (ya sean de origen petroquímico o biológico) implica la liberación de disruptores endocrinos peligrosos y

micro/nanopartículas de plástico al medio ambiente que afectan negativamente tanto al ecosistema como a la salud humana [38,39]. Por lo tanto, la necesidad de reemplazar estos materiales ha generado un rápido crecimiento en la investigación en torno al desarrollo de nuevos materiales obtenidos a partir de fuentes renovables. Para lograr un cambio, es necesario superar las brechas de conocimiento que separan la investigación financiada públicamente de la implementación industrial. El sector de envases de alimentos está experimentando actualmente transformaciones para lograr la eliminación gradual de los plásticos y, de esta manera, fomentar la adopción de materiales biobasados que podrían ser aplicables a otros sectores [40].

Actualmente existen tres clases de polímeros que conforman los principales candidatos para la formación de materiales sostenibles: (1) polímeros naturales y sus derivados extraídos directamente de biomasa (por ejemplo, almidón, celulosa, lignina y quitina); (2) biopolímeros sintetizados por microorganismos (por ejemplo, polihidroxicanoatos) o (3) polímeros biobasados específicos (por ejemplo, poli(ácido láctico), PBAT, etc) [41].

Las macromoléculas biosintetizadas extraídas y aisladas fácilmente de biomasa renovable, como residuos de alimentos y plantas, pueden reintegrarse fácilmente en la biosfera y, por lo tanto, son una de las alternativas más prometedoras para evitar el impacto ambiental del ciclo de vida de los plásticos [42-44]. Se espera que los materiales renovables contribuyan de manera positiva a la economía global a medida que los cambios en el comportamiento del consumidor y las actualizaciones en las regulaciones y políticas incentiven el cambio hacia los materiales amigables con el medio ambiente [40].

Los polímeros naturales, es decir, aquellos biopolímeros que se extraen directamente de recursos renovables, como las biomásas, están recibiendo una enorme atención debido a sus características para formar materiales, su abundante disponibilidad, su biocompatibilidad y sus propiedades de biodegradabilidad. Películas y recubrimientos para aplicaciones en general y para el envasado de alimentos se producen a partir de polímeros naturales ya que se presentan como materiales alternativos adecuados y respetuosos con el medio ambiente [45,46]. Las unidades moleculares poliméricas repetidas y ordenadas están presentes en algunas biomásas animales y vegetales en forma de macromoléculas proteicas compuestas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, o como macromoléculas de polisacáridos compuestas de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos, o como moléculas de lípidos de cadena larga que contienen un grupo ácido carboxílico [47]. Entre los polímeros naturales disponibles para formar películas, la gelatina, el almidón y la biomasa de levadura se postulan como alternativas para reemplazar aquellos

materiales de origen petroquímico. Por otra parte, el ácido itacónico es un ácido orgánico obtenido de fuentes renovables que debido a su estructura es utilizado para la síntesis de una amplia gama de polímeros innovadores [36].

El método de *casting* de películas es ampliamente utilizado en la fabricación de películas biodegradables. Consiste en preparar una solución mediante la agitación y calentamiento de los polímeros formadores de película y el solvente, para luego desgasificarla y verterla sobre una superficie plana y equilibrada. El secado de la película puede realizarse a temperatura ambiente o en una estufa con condiciones controladas de temperatura y humedad. Este método ofrece ventajas en términos de practicidad y bajo costo; sin embargo, presenta dificultades para controlar el grosor y la uniformidad de la película, lo que afecta su calidad [48]. Debido a estas limitaciones, resulta complicado utilizar este método para la producción a gran escala de películas, por lo que su uso en la industria es poco frecuente.

1.2.2. Proteínas

Las proteínas se pueden definir como polímeros naturales capaces de formar estructuras tridimensionales amorfas estabilizadas principalmente por interacciones no covalentes. Las propiedades funcionales de los materiales finales dependen en gran medida de la heterogeneidad estructural, la sensibilidad térmica y el carácter hidrófilo de las proteínas. Son macromoléculas formadas por aminoácidos que se unen mediante enlaces peptídicos, a su vez, son muy diversas en forma y función, dependiendo de su origen, estructura y composición de aminoácidos. Cada aminoácido está compuesto por un carbono central (carbono α) unido a hidrógeno, un grupo carboxilo (COOH), un grupo amino (NH₂) y una cadena lateral o grupo R, que identifica y distingue un aminoácido de otro.

Las películas a base de proteínas generalmente se forman a partir de soluciones o dispersiones de la proteína en agua, etanol o mezclas de etanol y agua, a medida que se evapora el solvente. Por lo general, las proteínas deben desnaturalizarse mediante calor, ácido, álcali y/o disolvente para formar las estructuras más extendidas que se requieren para la formación del material [49]. Las películas obtenidas consisten en interacciones cadena-cadena (enlaces de hidrógeno, iónicos, hidrofóbicos y covalentes) que producen matrices cohesivas; pero la interacción se ve afectada por el grado de extensión de la cadena y la naturaleza y secuencia de los aminoácidos [50]. Diferentes proteínas se utilizan comúnmente para la elaboración de películas: proteínas de origen animal o vegetal. Las proteínas de origen animal incluyen proteína de suero, caseína, gelatina, colágeno, proteína miofibrilar de pescado, proteína de clara de huevo y queratina. Las proteínas de origen

vegetal incluyen gluten de trigo, zeína de maíz, proteína de soja, proteína de maní y proteína de semilla de algodón [51-53]. En particular, las películas a base de gelatina poseen un alto potencial para aplicaciones comerciales como películas para envasado de alimentos debido a sus buenas características.

1.2.2.1. Gelatina

La gelatina, compuesta principalmente por un 50,5% de carbono, 25,2% de oxígeno, 17% de nitrógeno y 6,8% de hidrógeno es un tipo de proteína insoluble producida por la hidrólisis parcial del colágeno, una proteína que se encuentra principalmente en ciertas partes de animales vertebrados e invertebrados, como huesos, piel, tejidos conectivos y tendones (subproductos de la industria de alimentos). El colágeno es una proteína fibrosa que forma parte de la estructura básica de los cuerpos animales (incluidos los humanos) cuya estructura consiste en moléculas rígidas en forma de barra dispuestas en fibras y unidas por enlaces covalentes [54]. La gelatina se presenta como un sólido blanco o amarillento, translúcido y brillante, cuya estructura se puede observar en la Figura 1.1.

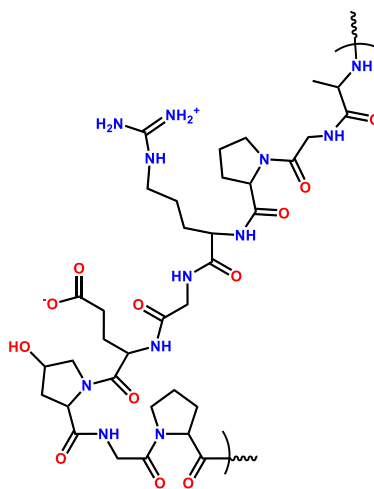


Figura 1.1. Estructura representativa de la gelatina.

Se puede extraer de fuentes u órganos animales utilizando diferentes métodos/parámetros de extracción (por ejemplo, tratamiento ácido, tratamiento alcalino, tratamiento enzimático, temperatura de extracción, tiempo de extracción, etc), los cuales influyen en el peso molecular y la composición de aminoácidos de la gelatina obtenida, determinando las estructuras moleculares (segunda, tercera y cuarta estructura), propiedades fisicoquímicas y propiedades funcionales de la gelatina [55]. Dependiendo del método de extracción, la gelatina se puede clasificar en dos tipos: (1) tipo A: con un punto

isoelectrico en un pH aproximado de 8-9, obtenida a partir de colágeno tratado con ácido; y (2) tipo B: con un punto isoelectrico en un pH aproximado de 4-5, derivada de un precursor tratado con álcali. La gelatina derivada de piel de cerdo se conoce normalmente como tipo A, mientras que la obtenida de piel de res o de huesos de cerdo y ganado se conoce como tipo B [56-57].

La gelatina es ampliamente utilizada en diversos campos como la industria alimentaria, farmacéutica, médica, fotográfica y cosmética, debido a sus características funcionales que incluyen capacidad de retención de agua, formación de gel, formación de películas, capacidad de formación de espumas y tendencia a la emulsificación [58]. En la actualidad, las demandas de los consumidores se centran en las innovaciones en tecnologías de envasado de alimentos. El desafío es producir materiales y envases que aumenten la vida útil de los alimentos, manteniéndolos más seguros y saludables, cumpliendo con la legislación actual [59]. Por lo tanto, el desarrollo de recubrimientos y películas comestibles, seguras e higiénicas, se vuelve cada vez más popular en el campo de la conservación del envase de alimentos. Los biopolímeros (por ejemplo, proteínas y polisacáridos) se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para desarrollar películas y recubrimientos compuestos debido a su buena biocompatibilidad, lo que resulta en una funcionalidad biológica y tecnológica extendida. La gelatina es compatible con varios biopolímeros que se aplican comúnmente en recubrimientos y películas comestibles, las cuales se han utilizado ampliamente en productos frescos y han mejorado su conservación. Sin embargo, el uso de gelatina como material de envasado está limitado debido a sus débiles propiedades mecánicas y alta permeabilidad al vapor de agua debido al carácter hidrófilo de los materiales [60-61]. Estudios se han centrado en el uso de mezclas de proteínas y polisacáridos, incluso de ingredientes activos como los fenoles, para mejorar las propiedades físicas y biológicas de la gelatina [62]. Asimismo, las propiedades de las películas a base de gelatina están influenciadas por factores intrínsecos y parámetros físicos, que incluyen las fuentes de gelatina, la concentración, la fuerza del gel, el proceso de fabricación de la película, la temperatura, el tiempo de secado y el tipo de plastificante asociado con la distribución del peso molecular y la composición de aminoácidos.

Por otra parte, el cuidado de heridas en el campo biomédico representa un gran desafío debido al proceso lento de cicatrización. Actualmente se han desarrollado apósitos para la curación de heridas formulados a partir de biopolímeros (por ejemplo, celulosa, quitina, gelatina, quitosano, alginato etc.), los cuales presentan propiedades interesantes. Aquellos desarrollados a base de gelatina han demostrado una excelente biocompatibilidad,

propiedad hemostática, citotoxicidad reducida, baja antigenicidad y promueven la adherencia y el crecimiento celular. Sin embargo, presentan deficiencias en sus propiedades mecánicas y actividad antimicrobiana, por lo que se incorporan agentes reforzantes o de reticulación para mejorar sus propiedades mecánicas. Además, la incorporación de agentes antimicrobianos le infiere una capacidad antimicrobiana tanto *in vitro* como *in vivo* [63-65].

1.2.3. Polisacáridos

Los polisacáridos son macromoléculas constituidas a partir de la unión de monosacáridos que están unidos por enlaces glucosídicos y han sido recientemente muy utilizados por sus excelentes propiedades estructurales para formar diversos materiales [66-67]. Los polisacáridos más comúnmente utilizados para la obtención de películas/recubrimientos son almidón, celulosa, pectina, alginatos y quitosano, entre otros [68,69]. Debido a que los materiales a base de polisacáridos son tan abundantes, son biopolímeros económicos y fácilmente disponibles, cuyo uso se ve favorecido debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta reactividad química y polifuncionalidad [70].

1.2.3.1. Almidón

El almidón es un polisacárido natural, renovable y biodegradable que las plantas producen durante la fotosíntesis como una fuente de energía almacenada, y es uno de los polímeros más comunes presentes en la naturaleza. Su versatilidad lo ha convertido en un componente ampliamente utilizado en diversas industrias, como la alimentaria, de bebidas, bioplásticos, papel, textiles y biocombustibles. El almidón ha captado considerable atención gracias a su fácil proceso de fabricación, su relativa abundancia, su no toxicidad y su capacidad de biodegradación. El almidón es una mezcla de dos polímeros de glucosa (Figura 1.2): la amilosa, que consiste en varios miles de unidades de glucosa unidas en cadena mediante enlaces α (1→4), y la amilopectina, que está altamente ramificada (con enlaces α (1→6) además de enlaces α (1→4)), y puede contener más de 100,000 residuos de glucosa. La amilosa puede estar escasamente ramificada, esto ocurre con más frecuencia en almidones de tubérculos que en almidones de cereales [71]. La mayoría de los almidones consisten en un 20-30% de amilosa y un 70-80% de amilopectina, aunque mutaciones en la vía biosintética o manipulaciones intencionales a través de la ingeniería transgénica pueden dar lugar a formas de almidón con proporciones alteradas de amilosa y amilopectina. También existen fuentes vegetales con una proporción menor de amilosa y

amilopectina, por ejemplo, en algunos pseudocereales, como el amaranto y la quinoa, tienen un 8-12% de amilosa [72].

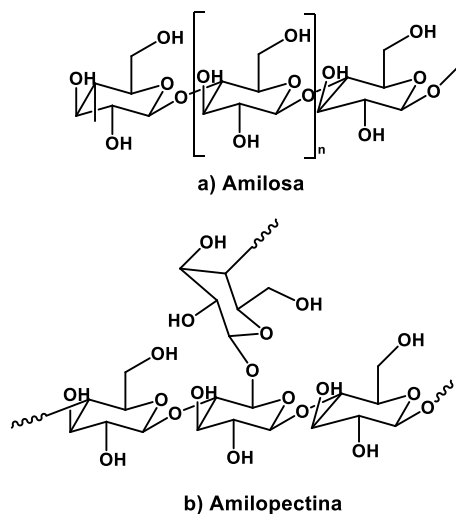


Figura 1.2. Estructuras de los componentes del almidón.

Se ha comprobado en diversas investigaciones que el almidón exhibe un gran potencial en aplicaciones biomédicas, como sustratos para el cultivo de células, soportes para la ingeniería de tejidos, sistemas de liberación de fármacos, implantes para la sustitución ósea y apósitos para heridas, entre otros [73]. Sin embargo, los almidones nativos carecen de versatilidad para una amplia gama de productos lo cual restringen su utilización en diversas aplicaciones. Estas limitaciones están relacionadas con una baja resistencia al corte, descomposición térmica, alta hidrofiliidad y tendencia a la retrogradación [74]. Por consiguiente, se han desarrollado versiones modificadas del almidón nativo. Frecuentemente, los almidones disponibles en el mercado son sometidos a modificaciones físicas o químicas con el fin de cumplir con los requisitos de la industria alimentaria y otros sectores. Se han utilizado diversos métodos, como modificaciones enzimáticas, físicas y químicas, para mejorar las propiedades del almidón y ampliar sus aplicaciones. Es importante destacar que algunos almidones químicamente modificados no representan ningún riesgo para la salud, ya que son seguros desde el punto de vista toxicológico y pueden utilizarse en alimentos y medicamentos sin limitaciones ni restricciones cuantitativas. En este sentido, se ha observado que la oxidación del almidón provoca un aumento en su carácter hidrófilo, lo que incrementa la permeabilidad al vapor de agua y mejora su solubilidad [74].

La industria alimentaria ha empleado durante las últimas décadas el almidón modificado como agente espesante. También se ha explorado su uso como agentes

capaces de formar superhidrogeles, debido a su elevada absorción de agua, lo que le hace un gran candidato para sustituir a los superabsorbentes, como por ejemplo de pañales y compresas higiénicas. Asimismo, las combinaciones de polisacárido-proteína han ganado popularidad en el campo biomédico como en la industria alimentaria para la creación de estructuras, partículas, películas, fibras y geles debido a sus interacciones intermoleculares. Estos complejos interactúan formando enlaces fuertes entre sí a través de interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas y electrostáticas. La formación de estas mezclas permite fortalecer las propiedades del material proteico mediante la incorporación del polisacárido [75]. La mayoría de las películas basadas en proteínas y polisacáridos suelen mostrar propiedades de barrera adecuadas contra el oxígeno en condiciones de baja a moderada humedad relativa, y presentan una resistencia mecánica relativamente aceptable. Sin embargo, debido a su naturaleza altamente hidrófila, presentan deficiencias en cuanto a la barrera contra la humedad y el vapor de agua [76].

1.2.4. Biomasa de levadura panadera

Las levaduras son organismos unicelulares eucariotas que forman parte de un grupo grande llamado hongos. Son organismos facultativos que pueden desarrollarse tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. Las levaduras son conocidas por sus propiedades fermentativas [77]; sin embargo, aproximadamente la mitad de las especies no pueden hacerlo. Los seres humanos han utilizado levaduras durante miles de años para la producción de alimentos fermentados, como pan, cerveza y vino. Con los avances en ciencia y tecnología, estos microorganismos se convirtieron en el foco de varias investigaciones para nuevas aplicaciones [78]. En el último siglo, se han logrado grandes avances en ingeniería genética para convertir las células de levadura en pequeñas fábricas, ya que poseen la capacidad de convertir materias primas en compuestos valiosos que se pueden utilizar, por ejemplo, como aditivos alimentarios. De esta manera, la demanda de biomasa de levadura aumentó, favoreciendo la producción no solo de alimentos y bebidas, sino también de una amplia gama de productos. Si bien se utilizan principalmente en la industria alimentaria, cada vez más desempeñan roles diferentes en otros campos. Una aplicación muy reciente e innovadora es la formación de películas y recubrimientos en la industria de materiales, principalmente para el envasado de alimentos [79].

Los componentes de la célula de levadura desempeñan el papel principal en la producción de materiales biodegradables, en particular, las proteínas del citoplasma y los β -glucanos de la pared celular, una cubierta externa muy permeable pero resistente al

estrés mecánico, compuesta principalmente de polisacáridos. Los principales polisacáridos son los β -glucanos, que son polímeros de glucosa con enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$. La solubilidad de los β -glucanos en medios ácidos/alcalinos es variable; la diferencia entre la solubilidad e insolubilidad en medio alcalino es que los solubles involucran polímeros lineales con enlaces $\beta(1-3)$, y los insolubles son polímeros altamente ramificados con enlaces $\beta(1-6)$ [80]. Los β -glucanos altamente ramificados con enlaces $\beta(1-6)$ tienen un grado de polimerización de 24 y una masa promedio de 150 kDa, mientras que los $\beta(1-3)$ glucanos tienen un grado de polimerización de 240 y una masa promedio de 1500 kDa.

Los β -glucanos se disponen en la pared celular de la siguiente manera: los lineales, los $\beta(1-3)$ -glucanos, se encuentran en modo hélice en la parte interna de la pared (como un resorte), capaces de absorber las expansiones y contracciones debido a la deshidratación y rehidratación. Los $\beta(1-6)$ -glucanos, altamente ramificados y generalmente asociados con proteínas de la pared celular, se encuentran en las partes externas de la pared. Las proteínas también pueden unirse directamente a los $\beta(1-3)$ -glucanos a través de un enlace conocido como ASL (*alkali sensitive bond*). Los β -glucanos solubles en álcali son capaces de formar geles [81].

En la actualidad, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es y sigue siendo la especie de levadura más ampliamente utilizada en la industria alimenticia (Figura 1.3). Las células de esta levadura son un ingrediente alimentario natural y de bajo costo reconocido como de grado alimentario en la nutrición humana, con alta disponibilidad para producir películas biobasadas y biodegradables. La biomasa de levadura contiene proteínas y polisacáridos, que representan aproximadamente la mitad de su peso seco, los cuales podrían ser aislados para agregar valor a la producción de levadura [82]. Estos biopolímeros extraídos directamente de la biomasa están ganando más atención en la comunidad científica para el desarrollo de materiales biodegradables para el envasado de alimentos.

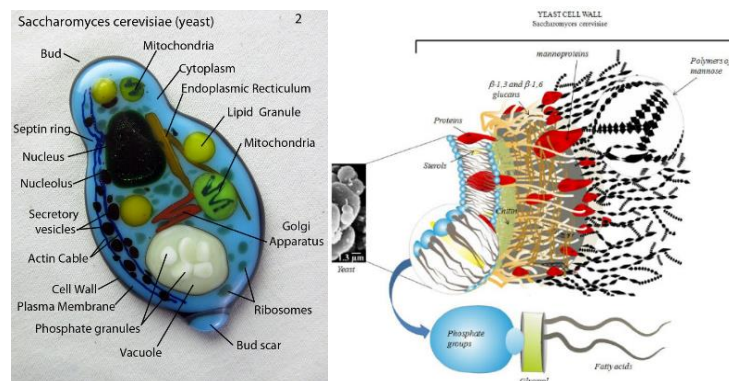


Figura 1.3. Descripción de la célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Hay pocas investigaciones relacionadas con el uso de la biomasa integral para preparar materiales biodegradables. Delgado *et al.* Prepararon películas basadas en biomasa integral de levadura [79,82]. Reportaron que para obtener los componentes capaces de formar una matriz que desarrolle el material, es necesario romper la célula y liberar el contenido citoplasmático mediante algún método de interrupción celular. De esta manera, las proteínas y los polisacáridos quedan libres para interactuar y formar la red de la película.

1.3. Materiales activos

Los sistemas poliméricos con funciones innovadoras están cobrando gran interés en el campo de la investigación de materiales. En el campo del envasado de alimentos, los envases activos permiten preservar y extender la vida útil de los productos que contienen [83]. Los envases activos aprovechan las interacciones que existen entre el material de envasado y el alimento de forma positiva, mediante la incorporación de componentes activos en el material en contacto con el producto. De esta manera, estos sistemas disminuyen la velocidad de deterioro de los alimentos y prolongan su vida útil al liberar gradualmente el compuesto activo a la superficie del alimento, donde principalmente ocurre el deterioro/contaminación de los productos alimenticios [84].

Los envases activos pueden clasificarse como sistemas absorbentes o emisores. Entre los absorbentes, los que se describen en su mayoría en la literatura son los eliminadores de humedad, oxígeno, etileno y dióxido de carbono [85]. Respecto a los emisores, es posible encontrar emisores de CO₂, liberadores de conservantes (antimicrobianos y antioxidantes), emisores de etanol, entre otros. Sin embargo, los envases de emisores activos más comunes son los envases antimicrobianos y antioxidantes [86].

Actualmente, la demanda de los consumidores por productos alimenticios más sanos y seguros ha impulsado la investigación sobre nuevas técnicas de conservación. Para reducir la oxidación de lípidos se han aplicado varias estrategias como la adición directa de antioxidantes a los alimentos o el diseño de una tecnología de envasado adecuada. La adición directa de compuestos antioxidantes a la superficie de los alimentos puede encontrar la limitación de que una vez que reacciona el compuesto, cesa la protección y se degrada la calidad de los alimentos [87]. Mientras que en envase activo, la liberación de este compuesto antioxidante se realiza de forma gradual y controlada en el tiempo y, por lo tanto, dará mayor estabilidad a los productos alimenticios sensibles a la oxidación [88].

Por su parte, los materiales activos antimicrobianos surgieron como una alternativa valiosa al uso de conservantes en las formulaciones alimentarias, para controlar el

crecimiento de bacterias y hongos en la superficie de los productos. La tecnología en los sistemas de envasado ha evolucionado para contribuir a la protección y extensión de la vida útil de los alimentos. Particularmente, las películas antimicrobianas se han desarrollado para controlar el crecimiento microbiano en la superficie de los alimentos y, no es coincidencia que, en la mayoría de los desarrollos en este ámbito, se hayan incorporado antimicrobianos de origen natural.

1.3.1. Incorporación de agentes activos

En las aplicaciones específicas de los biopolímeros, es crucial el uso de aditivos que mejoren las propiedades del material. Estos aditivos desempeñan un papel fundamental en la mejora de las propiedades funcionales de las películas. En el ámbito de la industria alimentaria, se ha observado un aumento significativo en la incorporación de aditivos antioxidantes y agentes antimicrobianos en películas a base en polímeros naturales. Los aceites esenciales son un claro ejemplo de componentes activos utilizados en el envasado de alimentos. Gracias a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, han logrado mejorar la calidad y seguridad de una amplia variedad de productos alimentarios al prevenir el crecimiento microbiano y fúngico, así como la oxidación de los alimentos [89].

Asimismo, en los materiales biopoliméricos, se han utilizado diversos tipos de agentes antimicrobianos, que incluyen agentes naturales (como bacteriocinas, ϵ -polilisina, enzimas, aceites esenciales de plantas, polifenoles del té, etc.), agentes inorgánicos (algunas nanopartículas de metales y óxidos metálicos) y agentes sintéticos orgánicos [90]. Los agentes antimicrobianos naturales se extraen y purifican de animales, plantas y microorganismos, y se consideran generalmente seguros, saludables y respetuosos con el medio ambiente.

En este trabajo se seleccionaron como compuestos activos a la dopamina y al ácido gálico, debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas demostradas en diferentes trabajos. Además, estos compuestos han demostrado poseer efecto entrecruzante en matrices biobasadas mejorando las propiedades de los materiales desarrollados. Estudios han demostrado el uso de ácido gálico como agente entrecruzante en combinación con quitosano, celulosa y otros hidrocoloides [91,92]. Se ha reportado que su incorporación en películas de quitosano y fracciones de lípidos de atún mostraron mejoras en las características de permeabilidad y resistencia mecánica [93]. Por otra parte, Bathia *et al.* incorporaron distintas concentraciones de ácido gálico en películas a base de gelatina y caseína. A más altas concentraciones, las películas mostraron estructuras más

compactas y densas, con superficies más lisas y homogéneas en comparación con las películas control (sin agente activo). Asimismo, presentaron una disminución del grado de hinchamiento, solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua. En cuanto a los parámetros mecánicos, el módulo de Young y la resistencia a la tracción aumentaron, mientras que la elongación a la ruptura disminuyó [94].

En cuanto a la dopamina, se ha demostrado que las catecolaminas son utilizadas en películas de quitosano, una fuente abundante de material polimérico. Los grupos catecol reaccionan con los grupos amina formando enlaces covalentes que desempeñan un papel crucial en las propiedades mecánicas del material, haciéndolo más resistente y robusto [95]. A su vez, Gowda *et al.* diseñaron materiales adhesivos a base de gelatina y dopamina para la cicatrización de tejidos lo que indica un potencial uso en aplicaciones clínicas. Se han estudiado sus propiedades adhesivas, variando el grado de sustitución de la dopamina, después de ser entrecruzados químicamente utilizando peryodato de sodio. Se observó que la propiedad adhesiva tiene una correlación directa con el aumento del contenido de dopamina hasta alcanzar un máximo y luego disminuir posteriormente. La formulación con un grado de sustitución moderado demostró tener la propiedad adhesiva óptima en comparación con aquellas formulaciones con un grado de sustitución menor y mayor [96].

1.3.1.1. Dopamina

La dopamina pertenece al grupo de las catecolaminas que son un grupo de aminas con un anillo fenólico sustituido por grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 4. Es el neurotransmisor más importante del sistema nervioso central de los mamíferos, y a su vez, está presente en muchas especies de plantas, como la mucuna (*Mucuna pruriens*), la patata (*Solanum tuberosum*), el plátano (*Musa acuminata*, *Musa sapientum*), y el aguacate (*Persea americana*) [97,98]. Algunos estudios han informado sobre los efectos de la dopamina en diferentes especies de plantas, los cuales están asociados con la fijación de nitrógeno, la floración, la prevención de la oxidación de las auxinas (hormona vegetal), la regulación de la permeabilidad iónica, la fotofosforilación en los cloroplastos y la defensa contra los herbívoros. Se ha encontrado evidencia de que la dopamina puede desempeñar un papel como antioxidante ya que es eficaz en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, investigadores demostraron que la dopamina posee una capacidad antioxidante superior a la del glutatión y los aditivos alimentarios (butilhidroxianisol, BHA, butilhidroxitirosol, BHT), y se asemeja más a antioxidantes más potentes como el ácido ascórbico [99].

Estudios han demostrado la actividad antibacteriana de la dopamina en ensayos *in vitro* contra 389 cepas de bacterias pertenecientes a 3 géneros Gram-positivas y 11 géneros Gram- negativas. La concentración inhibitoria mínima (MIC) de la dopamina, determinada tanto por métodos de dilución en agar como en caldo, osciló entre 25-400 µg/mL contra la mayoría de las bacterias ensayadas, incluyendo varias patógenas. A su vez, el efecto de la combinación de dopamina con otros fármacos antimicrobianos, ha mostrado una actividad sinérgica significativa frente a cinco diferentes cepas bacterianas tanto Gram-positivas como Gram-negativas. La dopamina actúa de manera sinérgica con antibióticos como la penicilina, la estreptomicina, el cloranfenicol, la eritromicina, la triflupromazina y la metadilazina cuando ha sido evaluada en ensayos *in vitro* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella boydii* [100].

1.3.1.2. Ácido gálico

El ácido gálico se encuentra ampliamente presente en el reino vegetal y en forma libre o como derivado en diferentes fuentes de alimentos como nueces, té, vino y frutas (uvas, granada, mango, etc). Entre varios polifenoles, el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es un compuesto de bajo peso molecular de origen natural que posee fuertes propiedades antioxidantes según numerosos estudios [90]. Proporciona una protección eficiente contra el daño oxidativo causado por especies reactivas que se encuentran frecuentemente en sistemas biológicos, incluyendo el radical hidroxilo (HO•), el radical superóxido (O₂•-), el radical peroxilo (ROO•) y los no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el ácido hipocloroso (HClO). Además, se ha demostrado que el ácido gálico es el componente antioxidante principal responsable de las propiedades antirradical y anticancerígenas de numerosos extractos vegetales [101,102].

El ácido gálico es una molécula plana que consiste en un anillo aromático, tres grupos hidroxilo fenólicos y un grupo ácido carboxílico. Los tres grupos hidroxilo están unidos al anillo aromático en posición *orto* con respecto entre sí. Es este orden de disposición el principal determinante de la alta capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos [103]. Se ha demostrado que el número y la posición de los grupos hidroxilo, la presencia de otros grupos funcionales y su posición con respecto a los grupos hidroxilo, influye notablemente en la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Por lo tanto, la actividad antioxidante de una molécula aumenta con el aumento en el número de grupos hidroxilo unidos al anillo aromático. Se han realizado varios estudios para investigar el mecanismo

de acción de los antioxidantes fenólicos, los cuales pueden actuar como antioxidantes donando un átomo de hidrógeno (transferencia de átomo de hidrógeno o HAT) o actuando como donantes de electrones (transferencia de electrón único o SET) [104].

El ácido gálico, además de ser un reconocido agente natural antioxidante, ha demostrado poseer propiedades antifúngicas, antibacterianas, antivirales, antialérgicas, antiinflamatorias, antimelanogénicas, antituberculosas, antimutagénicas, antiulcerosas, entre otras. Además, muestra potencial como neuroprotector, cardioprotector, hepatoprotector y nefroprotector. Al ser seguro, comestible y considerando sus amplias propiedades, puede utilizarse para el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles en la industria alimentaria [105].

1.4. Referencias

1. Maraz, K.M.; Khan, R.A. An overview on impact and application of microorganisms on human health, medicine and environment. *GSC Biol. Pharm. Sci.* **2021**, 16(01), 089-104.
2. Muñoz-Bonilla, A.; Cerrada, M. L.; Fernández-García, M. Polymeric materials with antimicrobial activity: from synthesis to applications. *The Royal Society of Chemistry: U.K.*, **2014**.
3. Cottet, C.; Ramirez-Tapias, Y. A.; Delgado, J. F.; de la Osa, O.; Salvay, A. G.; Peltzer, M. A. Biobased materials from microbial biomass and its derivatives. *Materials* **2020**, 13(6), 1263.
4. Kulasoorya, S. The amazing world of microorganisms. *Ceylon J. Sci.* **2019**, 48(4):303
5. Blair, J.M.A.; Webber, M.A.; Baylay, A.J.; Ogbolu, D.O.; Piddock, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, 13, 42–51.
6. Tejero, R.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J. L.; Fernández-García, M. Antimicrobial polymethacrylates based on quaternized 1,3-thiazole and 1,2,3-triazole side-chain groups. *Polym. Chem.* **2015**, 6(18), 3449–3459.
7. Kwaśniewska, D.; Chen, Y.-L.; Wiczorek, D. Biological activity of quaternary ammonium salts and their derivatives. *Pathogens* **2020**, 9(6), 459.
8. Tejero, R.; Gutiérrez, B.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.; Fernández-García, M. Copolymers of acrylonitrile with quaternizable thiazole and triazole side-chain methacrylates as potent antimicrobial and hemocompatible systems. *Acta Biomater.* **2015**, 25, 86–96.

9. Akkerman, R.; Farahani, P.; Grunow, M. Quality, safety and sustainability in food distribution: A review of quantitative operations management approaches and challenges. *OR Spectr.* **2010**, 32(4), 863-904.
10. Gram, L.; Ravn, L.; Rasch, M.; Bruhn, J. B.; Christensen, A. B.; Givskov, M. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, 78(1-2), 79-97.
11. Lorenzo, J. M.; Munekata, P.E.; Dominguez, R.; Pateiro, M.; Saraiva, J.A.; Franco, D. Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability. *Innovative Technologies for Food Preservation* **2018**, 53–107.
12. Tashiro, T. Antibacterial and bacterium adsorbing macromolecules. *Macromol. Mater. Eng.* **2001**, 286(2), 63–87.
13. Kenawy, E.-R.; Worley, S. D.; Broughton, R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (5), 1359–1384.
14. Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37 (2), 281–339.
15. Álvarez-Paino, M.; Muñoz-Bonilla, A.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.; Heuts, J.P.A.; Fernández-García, M. Effect of glyconits on the antimicrobial properties and toxicity behavior of polymers based on quaternized DMAEMA. *Biomacromolecules* **2014**, 16(1), 295–303.
16. Alvarez-Paino, M.; Munoz-Bonilla, A.; Fernandez-Garcia, M.; Álvarez-Paino, M.; Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Antimicrobial polymers in the nano-world. *Nanomaterials* **2017**, 7, 48.
17. Muñoz-Bonilla, A.; Echeverria, C.; Sonseca, Á.; Arrieta, M.P.; Fernández-García, M. Bio-Based Polymers with Antimicrobial Properties towards Sustainable Development. *Materials* **2019**, 12, 641.
18. Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Poly(ionic liquid)s as antimicrobial materials. *Eur. Polym. J.* **2018**, 105.
19. Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. The roadmap of antimicrobial polymeric materials in macromolecular nanotechnology. *Eur. Polym. J.* **2015**, 65.
20. Echeverria, C.; Torres, M.D.T.; Fernández-García, M.; De la Fuente-Nunez, C.; Muñoz-Bonilla, A. Physical methods for controlling bacterial colonization on polymer surfaces. *Biotechnol. Adv.* **2020**, 43, 107586.

21. Alvarez-Paino, M.; Juan-Rodríguez, R.; Cuervo-Rodríguez, R.; Tejero, R.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.; Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Antimicrobial films obtained from latex particles functionalized with quaternized block copolymers. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2016**, 140.
22. Kenawy, E.-R.; Worley, S.D.; Broughtonand, R.; Broughton, R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1359–1384.
23. Jaeger, W.; Bohrisch, J.; Laschewsky, A. Synthetic polymers with quaternary nitrogen atoms-Synthesis and structure of the most used type of cationic polyelectrolytes. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, 511–577.
24. Harley, J.P.; Prescott, M. Laboratory Exercises in Microbiology; The McGraw-Hill Companies: Boston, MA, USA, **2005**; pp. 14–46.
25. Oros, G.; Cserháti, T.; Forgács, E. Separation of the strength and selectivity of the microbiological effect of synthetic dyes by spectral mapping technique. *Chemosphere* **2003**, 52, 185–193.
26. Jiao, Y.; Niu, L.; Ma, S.; Li, J.; Tay, F.R.; Chen, J. Quaternary ammonium-based biomedical materials: state-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance. *Prog. Polym. Sci.* **2017**, 71, 53–90.
27. Sims, R.E.H.; Bassam, N. Chapter 1 Biomass and Resources. In bioenergy options for a cleaner environment. *Elsevier* **2004**, 1–28.
28. De Carvalho, J.C.; Magalhaes, A.I.; Soccol, C.R. Biobased itaconic acid market and research trends—Is it really a promising chemical? *Chim. Oggi-Chem. Today* **2018**, 36, 56–58.
29. Teleky, B.-E.; Vodnar, D. C. Biomass-derived production of itaconic acid as a building block in specialty polymers. *Polymers* **2019**, 11(6), 1035.
30. Teleky, B.-E.; Vodnar, D.C. Recent advances in biotechnological itaconic acid production, and application for a sustainable approach. *Polymers* **2021**, 13, 3574.
31. Yang, W.; Hu, Y.; Chen, Z.; Jiang, X.; Wang, J.; Wang, R. Solubility of itaconic acid in different organic solvents: Experimental measurement and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilib.* **2012**, 314, 180–184.
32. Raghu, C.; Raghuv eer, P. Itaconic acid Production—A short review. *Int. J. Adv. Eng. Technol. Manag. Appl. Sci.* **2017**, 4, 8–15.
33. Willke, T.; Vorlop, K.D. Biotechnological production of itaconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 56, 289–295.

34. Larsen, H.; Eimhjellen, K.E.K. The mechanism of itaconic acid formation by *Aspergillus terreus*. 1. The effect of acidity. *Biochem. J.* **1955**, 6217, 135–139.
35. Winkler, M.; Lacerda, T.M.; Mack, F.; Meier, M.A.R. Renewable Polymers from Itaconic Acid by Polycondensation and Ring-Opening-Metathesis Polymerization. *Macromolecules* **2015**, 48(5), 1398–1403.
36. Chiloeches, A.; Cuervo-Rodríguez, R.; Lopez-Fabal, F.; Fernandez-García, M.; Echeverría, C.; Muñoz-Bonilla, A. Antibacterial and compostable polymers derived from biobased itaconic acid as environmentally friendly additives for biopolymers. *Polym. Test.* **2022**, 109, 107541.
37. Geyer, R.; Jambeck, J.R.; Law, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* **2017**, 3, e1700782.
38. de Souza Machado, A.A.; Kloas, W.; Zarfl, C.; Hempel, S.; Rillig, M.C. Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Glob. Change Biol.* **2018**, 24, 1405–1416.
39. Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T.S. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, 62, 2588–2597.
40. Zhang, J.; Wang, L.; Trasande, L.; Kannan, K. Occurrence of polyethylene terephthalate and polycarbonate microplastics in infant and adult feces. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2021**, 8, 989–994.
41. Tardy, B.L.; Richardson, J.J.; Greca, L.G. et al. Advancing bio-based materials for sustainable solutions to food packaging. *Nat. Sustain.* **2023**, 6, 360–367.
42. Li, T. et al. Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. *Nature* **2021**, 590, 47–56.
43. Ates, B.; Koytepe, S.; Ulu, A.; Gurses, C.; Thakur, V.K. Chemistry, structures, and advanced applications of nanocomposites from biorenewable resources. *Chem. Rev.* **2020**, 120, 9304–9362.
44. Virtanen, S.; Chowreddy, R.R.; Irmak, S.; Honkapää, K.; Isom, L. Food industry co-streams: potential raw materials for biodegradable mulch film applications. *J. Polym. Environ.* **2017**, 25, 1110–1130.
45. Vartiainen, J.; Vähä-Nissi, M.; Harlin, A. Biopolymer films and coatings in packaging applications—A review of recent developments. *Mater. Sci. Appl.* **2014**, 05, 708–718.
46. Peelman, N.; Ragaert, P.; De Meulenaer, B.; Adons, D.; Peeters, R.; Cardon, L.; Van Impe, F.; Devlieghere, F. Application of bioplastics for food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, 32, 128–141.

47. Ponnusamy, P.G.; Mani, S. Material and environmental properties of natural polymers and their composites for packaging applications—a review. *Polymers* **2022**, *14*, 4033.
48. García-Guzmán, L.; Cabrera-Barjas, G.; Soria-Hernández, C.G.; Castaño, J.; Guadarrama-Lezama, A.Y.; Rodríguez Llamazares, S. Progress in starch-based materials for food packaging applications. *Polysaccharides* **2022**, *3*, 136–177.
49. Bourtoom, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int. Food Res. J.* **2008**, *15*(3), 237-248.
50. Nur Hanani, Z.A.; Roos, Y.H.; Kerry, J.P. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *71*, 94–102.
51. Malhotra, B.; Keshwani, A.; Kharkwal, H. Natural polymer based cling films for food packaging. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *7*, 10–18.
52. Biscarat, J.; Charmette, C.; Sanchez, J.; Pochat-Bohatier, C. Development of a new family of food packaging bioplastics from cross-linked gelatin based films. *Can. J. Chem. Eng.* **2015**, *93*, 176–182.
53. Arrieta, M.P.; Peltzer, M.A.; López, J.; Garrigós, M.D.C.; Valente, A.J.M.; Jiménez, A. Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *J. Food Eng.* **2014**, *121*, 94–101.
54. Ramos, M.; Valdés, A.; Beltrán, A.; Garrigós, M. Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. *Coatings* **2016**, *6*(4), 41.
55. Zhang, T.; Xu, J.; Zhang, Y.; Wang, X.; Lorenzo, J.M.; Zhong, J. Gelatins as emulsifiers for oil-in-water emulsions: Extraction, chemical composition, molecular structure, and molecular modification. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *106*, 113–131
56. Hanani, Z. A. N. Gelatin. *Encyclopedia of Food and Health* **2016**, 191–195.
57. Sothornvit, R.; Krochta, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. *Innovations in Food Packaging* **2005**, 403–433.
58. Ahmad, T.; Ismail, A.; Ahmad, S.A.; Khalil, K.A.; Kumar, Y.; Adeyemi, K.D.; Sazili A.Q. Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. *Food Hydrocoll.* **2017**, *63*, 85–96.

59. Cottet, C.; Salvay, A.G.; Peltzer, M.A.; Fernández-García; M. Incorporation of poly(itaconic acid) with quaternized thiazole groups on gelatin-based films for antimicrobial-active food packaging. *Polymers* **2021**, 13(2), 200.
60. Xiaoqing, Z.; My Dieu, D.; Casey, P.; Sulistio, A.; Qiao, G.G.; Lundin, L.; Lillford, P.; Kosaraju, S. Chemical modification of gelatin by a natural phenolic cross-linker, tannic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 6809–6815.
61. Sazedul, H.; Soottawat, B.; Thummanoon, P. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Food Hydrocoll.* **2011**, 25, 82–90.
62. Rhim, J.W.; Park, H.M.; Ha, C.S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, 38, 1629–1652.
63. Lu, Y.; Luo, Q.; Chu, Y.; Tao, N.; Deng, S.; Wang, L.; Li, L. Application of gelatin in food packaging: a review. *Polymers* **2022**, 21, 14(3), 436.
64. Ndlovu, S.P.; Ngece, K.; Alven, S.; Aderibigbe, B.A. Gelatin-based hybrid scaffolds: promising wound dressings. *Polymers* **2021**, 13, 2959.
65. Abid, S.; Hussain, T.; Nazir, A.; Zahir, A.; Ramakrishna, S.; Hameed, M.; Khenoussi, N. Enhanced antibacterial activity of PEO-chitosan nanofibers with potential application in burn infection management. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 135, 1222–1236.
66. Aspinall, G.O. *The Polysaccharides*. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2014.
67. Atkins E.D.T. *Polysaccharides*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 1985.
68. Coma V. Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. *Polímeros* **2013**, 23, 287–297.
69. Dumitriu, S. *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. CRC press; Boca Raton, FL, USA: 2004.
70. Crini, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 38–70.
71. Lovegrove, A.; Edwards, C.H.; De Noni, I.; Patel, H.; El, S.N.; Grassby, T.; Zielke, C.; Ulmius, M.; Nilsson, L.; Butterworth, P.J.; Ellis, P.R.; Shewry, P.R. Role of polysaccharides in food, digestion, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2017**, 22, 57(2), 237-253.
72. Qian, J.; Kuhn, M. Characterization of *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* starch. *Starch - Stärke* **1999**, 51, 116-120.

73. Torres, F.G.; Commeaux, S.; Troncoso, O.P. Starch-based biomaterials for wound-dressing applications. *Starch - Stärke* **2013**, 65(7-8), 543–551.
74. Bello Perez, L. A.; Agama-Acevedo, E. Starch. *Starch-Based Materials in Food Packaging* **2017**, 1–18.
75. Bealer, E.J.; Onissema-Karimu, S.; Rivera-Galletti, A.; Francis, M.; Wilkowski, J.; Salas-de la Cruz, D.; Hu, X. Protein–polysaccharide composite materials: fabrication and applications. *Polymers* **2020**, 12(2), 464.
76. Garavand, F.; Rouhi, M.; Razavi, S.H.; Cacciotti, I.; Mohammadi, R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 104, 687–707.
77. Rawat, S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian J. Plant Sci.* **2015**, 5, 47–56.
78. Zymaczyk-Duda, E.; Brzezinska-Rodak, M.; Klimek-Ochab, M.; Duda, M.; Zerka, A. Yeast as a versatile tool in biotechnology. *Yeast Ind. Appl.* **2017**, 1, 3–40.
79. Delgado, J.F.; Peltzer, M.A.; Salvay, A.G.; de la Osa, O.; Wagner, J.R. Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2018**, 48, 240–247.
80. Wagner, J.R.; Rambla, O.; Miguel, A.; Legarreta, G. *Las Levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos*, 1st ed.; Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes: Bernal, Argentina, **2008**.
81. Santipanichwong, R.; Supphantharika, M. Influence of different β -glucans on the physical and rheological properties of egg yolk stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* **2009**, 23, 1279–1287.
82. Delgado, J.; Sceni, P.; Peltzer, M.A.; Salvay, A.G.; de la Osa, O.; Wagner, J.R. Development of innovative biodegradable films based on biomass Of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, 36, 83–91.
83. M.W. Ahmed et al. A review on active packaging for quality and safety of foods: Current trends, applications, prospects and challenges. *Food Packag. Shelf Life* **2022**, 33, 100913.
84. Rezzani, G.D.; Choque, E.; Salvay, A.G.; Mathieu, F.; Peltzer, M.A. New antioxidant active packaging films based on yeast cell wall and naphtho- γ -pyrone extract. *Polymers* **2022**, 14, 2066.

85. Lai WF. Design of polymeric films for antioxidant active food packaging. *Int J Mol Sci.* **2021**, 23(1):12.
86. Delgado, J.F.; Lopes, F.G.; Peltzer, M.A. Antioxidant and antimicrobial characterization of active films based on yeast biomass and thymol. *Food Biophys.* **2022**.
87. Zehiroglu, C.; Ozturk Sarikaya, S. B. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *J. Food Sci. Technol.* **2019**.
88. M. Rangaraj, V.; Rambabu, K.; Banat, F.; Mittal, V. Natural antioxidants-based edible active food packaging: An overview of current advancements. *Food Biosci.* **2021**, 43, 101251.
89. García-Guzmán, L.; Cabrera-Barjas, G.; Soria-Hernández, C.G.; Castaño, J.; Guadarrama-Lezama, A.Y.; Rodríguez Llamazares, S. Progress in Starch-Based Materials for Food Packaging Applications. *Polysaccharides* **2022**, 3, 136–177.
90. Tan, C.; Han, F.; Zhang, S.; Li, P.; Shang, N. Novel bio-based materials and applications in antimicrobial food packaging: recent advances and future trends. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(18):9663.
91. D.O. Kim, K. W. Lee, H. J. Lee and C. Y. Lee, J. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3713–3717.
92. K. Schlesier, M. Harwat, V. Bohm and R. Bitsch, *Free Radical Res.*, Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods, **2002**, 36, 177–187.
93. Bastos, B.M.; Farias, B.S.; Casati, M.O.; Engelmann, J.I.; Moura, J.M.; Pinto, L.A. Gelatin films from carp skin crosslinked by gallic acid and incorporated with chitosan/tuna lipid fractions. *J. Polym. Environ.* **2021**, 29, 2096–2110.
94. Bhatia, S.; Al-Harrasi, A.; Al-Azri, M.S.; Ullah, S.; Makeen, H.A.; Meraya, A.M.; Albratty, M.; Najmi, A.; Anwer, M.K. Gallic acid crosslinked gelatin and casein based composite films for food packaging.
95. Ryu, J.H.; Jo, S.; Koh, M.-Y.; Lee, H. Bio-Inspired, Water-Soluble to Insoluble Self-Conversion for Flexible, Biocompatible, Transparent, Catecholamine Polysaccharide Thin Films. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24(48), 7709–7716.
96. Gowda, A.H.J.; Bu, Y.; Kudina, O.; Kanala, V. K.; Bohara, R.A.; Eglin, D.; Pandit, A. Design of tunable gelatin-dopamine based bioadhesives. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**.

97. Kulma A, Szopa J. Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Science* **2007**; 172, 433-40
98. Kanazawa, K.; Sakakibara, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. *J Agricul Food chem* **2000**; 48, 844-8
99. Gomes, B.R.; Siqueira-Soares, R. de C.; Santos, W.D. dos; Marchiosi, R.; Soares, A.R.; Ferrarese-Filho, O. The effects of dopamine on antioxidant enzymes activities and reactive oxygen species levels in soybean roots. *Plant Signal. Behav.* **2014**, 9(12), e977704.
100. Maji Sushomasri, Maji Himangshu S., Chakraborty Pranabesh, G. Dastidas Sujata. Potential of dopamine hydrochloride as a novel antimicrobial agent. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* **2010**.
101. Ravikanth, V., Singh, R.P.; Liu, Z. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* **2006**, 27, 1445–1453
102. Chia, Y.C.; Rajbanshi, R.; Calhoun, C.; Chiu, R.H. Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. *Molecules* **2010**, 15(11), 8377-89.
103. Sroka, Z.; Cisowski, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* **2003**, 41(6), 753-8.
104. Dorman, H.J.D.; Lantto, T.A.; Raasmaja, A.; Hiltunen, R. Antioxidant, pro-oxidant and cytotoxic properties of parsley. *Food Funct.* **2011**, 2, 328–337.
105. Bhatia, S.; Al-Harrasi, A.; Al-Azri, M.S.; Ullah, S.; Makeen, H.A.; Meraya, A.M.; Albratty, M.; Najmi, A.; Anwer, M.K. Gallic acid crosslinked gelatin and casein based composite films for food packaging applications. *Polymers* **2022**, 14, 4065.

Capítulo 2: OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Este proyecto de Tesis Doctoral tiene como principal objetivo el desarrollo de nuevos materiales poliméricos basados en polímeros catiónicos (polímeros con grupos de amonio cuaternario) y polímeros naturales, para el desarrollo de materiales activos antimicrobianos que sirvan en el envasado de alimentos para aumentar la vida útil de los mismos, así como para reducir infecciones bacterianas en general.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos particulares del proyecto son:

- Sintetizar polímeros cuaternarios basados en recursos naturales, tales como el ácido itacónico, al cual se les incorporarán el grupo heterociclo 1,3-tiazol, y posteriormente se modificarán mediante reacciones de alquilación con yoduro de metilo.
- Caracterizar las propiedades físico-químicas de los polímeros sintetizados: resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{H-RMN}$), espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), cromatografía de permeación en gel (GPC), potencial electrostático o potencial zeta, análisis termogravimétrico (TGA) y concentración mínima de inhibición (MIC).
- Incorporar los polímeros sintetizados en distintas matrices para obtener películas activas, utilizando glicerol como plastificante, y dopamina o ácido gálico como agente reforzante y aditivo antioxidante.
 - Gelatina y almidón modificado (proporción másica 4:1)
 - Biomasa de levadura
- Caracterizar las películas desarrolladas mediante distintos tipos de técnicas analíticas:
 - Colorimetría, espectroscopia infrarroja (FTIR), análisis térmico (termogravimétrico y calorimétrico), y propiedades mecánicas.
 - Propiedades de hidratación, hinchamiento y permeabilidad al vapor de agua.
 - Capacidad antioxidante y antimicrobiana.
 - Ensayos de migración específica.

Capítulo 3: Síntesis de Polímeros Antimicrobianos

El presente capítulo describe la síntesis de polímeros cuaternarios basados en ácido itacónico, esterificados con el grupo heterociclo 1,3-tiazol, y modificados mediante una reacción de alquilación con yoduro de metilo.

3.1. Materiales

Ácido itacónico (IA, Sigma-Aldrich®), persulfato amónico (Sigma-Aldrich®), acetona (≥ 99.5 , Sigma-Aldrich®), 4-metil-5-tiazoletanol (Sigma-Aldrich®), ácido sulfúrico (99%, Sigma-Aldrich®), yodometano (CH_3I , 99%, Sigma-Aldrich®), N,N-dimetilformamida anhidra (DMF, 99.8%, Sigma-Aldrich®), n-hexano (99%, Sigma-Aldrich®), dimetilsulfóxido (DMSO, $>99\%$, Alfa Aesar®), membrana de celulosa D80 (Orange Scientific®), solvente DMSO deuterado (DMSO-d6, Sigma-Aldrich®), etanol 96% vol. (Porta®), peptona (Britania®), agar bacteriológico (Britania®), caldo Mueller-Hinton (Britania®), microplacas estériles de 96 pocillos (AP-Biotech®).

3.2. Síntesis de poli(ácido itacónico) (PIA)

En primer lugar, la síntesis del homopolímero PIA se realizó vía polimerización radical convencional a partir de ácido itacónico [1]. IA (400 g) y persulfato amónico como iniciador (6,67 g) se disolvieron en agua destilada (1333 mL) en un balón de 2 L. La mezcla se agitó continuamente bajo una atmósfera burbujeante de argón (solo la primera hora) en un baño termostático a 60 °C durante 48 h. Inicialmente, la mezcla de reacción obtenida era heterogénea debido a una disolución incompleta del IA, pero después de 1 hora se volvió transparente. Una vez concluido el tiempo de reacción se retiró el balón del baño termostático y se enfrió a temperatura ambiente, también bajo agitación continua. El polímero obtenido (PIA), se separó de la mezcla de reacción por precipitación en acetona fría gota a gota con agitación vigorosa. El precipitado formado se separó por filtración y se secó en desecador bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.

3.3. Funcionalización del PIA con el grupo heterociclo 1,3-tiazol (FPIA)

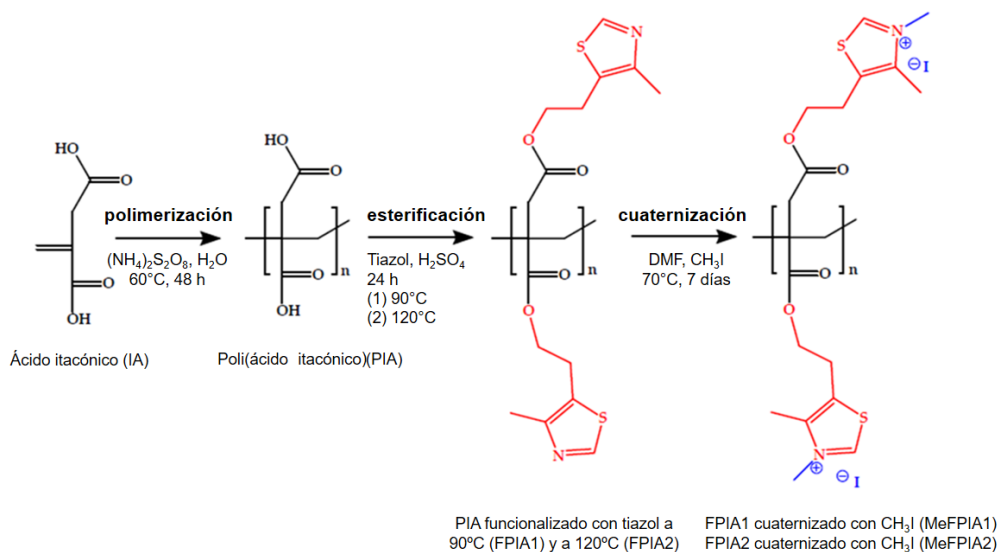
La funcionalización del PIA se llevó a cabo mediante una reacción de esterificación con el grupo heterociclo 1,3-tiazol [2]. Para ello se añadió PIA (160 g) con una cantidad en exceso de 4-metil-5-tiazoletanol (479 mL) (relación molar 1:4) en un balón sellado de 1 L y se lo colocó en un baño termostático a 90 °C con agitación hasta su completa disolución. Luego, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico como catalizador y la reacción continuó durante

24 h a 90 °C. Finalizado el tiempo de reacción, el sistema se enfrió a temperatura ambiente. El polímero funcionalizado (FPIA1) se separó de la mezcla de reacción por precipitación en agua fría gota a gota con vigorosa agitación. El precipitado formado se separó por filtración y se secó en desecador bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante. Por otro lado, se realizó otra funcionalización de PIA a 120 °C (FPIA2) para evaluar si una mayor temperatura de reacción favorecía la reacción de esterificación.

3.4. Cuaternización de FPIAx con yoduro de metilo (MeFPIAx)

Los polímeros FPIA1 y FPIA2 se modificaron mediante una reacción de N-alquilación con yoduro de metilo (CH₃I) [3]. Se disolvieron ambos polímeros (58 g) con un exceso de yoduro de metilo (278 mL, relación molar 1:10) junto con una cantidad mínima necesaria de *N,N*-dimetilformamida anhidra (415 mL) en un balón sellado de 1 L. El sistema se colocó en un baño termostático a 70 °C y se agitó durante 7 días. Una vez completada y enfriada la reacción, los polímeros se separaron por precipitación en una solución de *n*-hexano gota a gota con agitación vigorosa, hasta que se produjo una separación de fases. La fase polar se diluyó con DMSO/H₂O (2/1) y se purificó por diálisis contra agua destilada durante 7 días utilizando una membrana de celulosa con un peso molecular de corte de 6000-8000 Da. Finalmente, los polímeros cuaternizados secos (MeFPIA1 y MeFPIA2) se obtuvieron por liofilización (Telstar).

El Esquema 3.1 representa los diferentes pasos de la síntesis de PIA, su modificación y finalmente su cuaternización para la obtención de polímeros catiónicos antimicrobianos.



Esquema 3.1. Diferentes etapas de la síntesis de polímeros catiónicos antimicrobianos.

3.5. Caracterización físico-química de los polímeros sintetizados

3.5.1. Cromatografía de permeación en gel (GPC)

Para determinar el peso molecular promedio en número (M_n) y el índice de polidispersidad (IP) del polímero se realizó una cromatografía de permeación en gel (GPC) en agua, con nitrito de sodio (NaNO_2) como eluyente, a un flujo de 1 mL/min y 30 °C en un sistema cromatográfico de Perkin Elmer con una bomba isocrática 250 y un detector de índice de refracción (Serie 200, Boston, MA, EE. UU.). Se utilizó una columna Ultrahydrogel™ HR (Waters Division Millipore, Milford, MA, EE. UU.). Se utilizaron patrones de pululano (Sigma Aldrich) para calibrar las columnas.

3.5.2. Resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) se realizaron en un espectrómetro Bruker 400 MHz NMR (Bruker, Madrid, España) utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) como disolvente a temperatura ambiente. Los espectros fueron obtenidos por duplicado.

3.5.3. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis se realizó en todos los polímeros utilizando un espectrofotómetro IR Affinity–1 Shimadzu (Shimadzu Co., Japón) equipado con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante (GladiATR, Pike Technologies). El barrido se realizó en un intervalo de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , con 48 scans, 4 cm^{-1} de resolución y apodización Happ-Genzel. Los espectros fueron obtenidos por duplicado.

3.5.4. Potencial zeta (ζ)

El potencial eléctrico o ζ de los polímeros catiónicos se determinó utilizando un equipo Zetasizer Nano serie ZS (Malvern Instruments SRL, Malvern, Reino Unido), equipado con un haz láser de He-Ne a 658 nm. Se emplearon soluciones de concentración 1 mg/mL de polímero en agua MilliQ (18 $\text{m}\Omega$). Cada determinación se realizó tres veces y con un mínimo de diez corridas por cada determinación.

3.5.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis se realizó en un equipo TGA Q-500 (TA Instruments, Delaware, EEUU). Se pesaron aproximadamente 6 mg de cada polímero en una balanza de platino. La velocidad

de barrido fue de 10 °C/min, en un intervalo de temperatura de 30 °C hasta 700 °C en atmósfera de nitrógeno (flujo de 50 mL min⁻¹). Se registró la pérdida de peso en función de la temperatura y se realizaron dos mediciones por cada uno de los polímeros sintetizados.

3.5.6. Determinación de la concentración mínima de inhibición del crecimiento bacteriano (MIC)

Las MIC de los polímeros MeFP1A1 y MeFP1A2 se determinaron mediante métodos de microdilución en caldo de cultivo contra bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) obtenidas de Thermo Scientific™ según las directrices del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [4].

Se preparó una suspensión de microorganismos de ~10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL en agua de peptona 0,1% estéril para obtener una turbidez equivalente al estándar de McFarland de 0,5. Previamente, los aislados bacterianos se cultivaron en agar nutritivo durante 24 h a 37 °C. Esta suspensión se diluyó 1:100 en caldo Mueller-Hinton para lograr una suspensión de inóculo de ~10⁶ UFC/mL. Además, cada polímero se disolvió en agua destilada estéril para producir una solución madre de 32 mg/mL. Luego, se pipetearon 200 µL de solución madre en la primera columna de una microplaca estéril de 96 pocillos y 100 µL de caldo Mueller-Hinton en el resto de las columnas, excepto en la primera columna (que contenía la solución madre).

Posteriormente, se tomaron 100 µL de solución madre (primera columna) y se realizaron diluciones seriadas en el resto de los pocillos, excepto en la última columna. Finalmente, 100 µL de cada suspensión de microorganismos de prueba se inoculó en todos los pocillos, proporcionando 200 µL finales, con concentraciones de polímero de 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031 y 0,016 mg/mL (desde la primera hasta la penúltima columna). La última columna de pocillos, al no contener polímero, se utilizó como control positivo de crecimiento de microorganismos. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 h; después de este período de tiempo, las MIC se definieron visualmente como la concentración de polímero más baja a la que se inhibió el crecimiento del microorganismo.

3.7. Resultados y discusión

3.7.1. Caracterización fisicoquímica de la síntesis y modificación de homopolímeros

El PIA se sintetizó en agua a 60 °C, como se describió anteriormente. El rendimiento fue del 60% y el peso molecular promedio en número y su índice de polidispersidad fueron

59,7 kDa y 1,9, respectivamente. Es importante mencionar que la relación entre el volumen hidrodinámico y el peso molecular del polímero es diferente a la de los estándares utilizados en la técnica de GPC, por lo tanto, estos datos deben tomarse como una estimación del M_n .

La Figura 3.1 muestra el espectro de RMN de protón del PIA, donde los protones del metileno a 2,0 ppm correspondientes a la cadena principal y los protones del metileno a 3,5 ppm asignados a $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ se identifican fácilmente. Los polímeros modificados FPIA se obtuvieron a dos temperaturas diferentes (90 y 120 °C), y los picos característicos se identifican en el mencionado espectro. El grupo CH_2 de la cadena principal que se observa a 2,3 ppm y los protones de metileno de $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ a 3,5 ppm se encuentran ligeramente desplazados a mayores desplazamientos como resultado de una mayor rigidez. Los protones del metileno cerca del éster ($\text{O}-\text{CH}_2-$) se observan a 4,0 ppm, mientras que los protones CH_2 unidos al grupo tiazol aparecen a 3,0 ppm. Los protones correspondientes al grupo CH_3 unidos al grupo tiazol emergen a 2,3 ppm junto con los protones del metileno de la cadena principal.

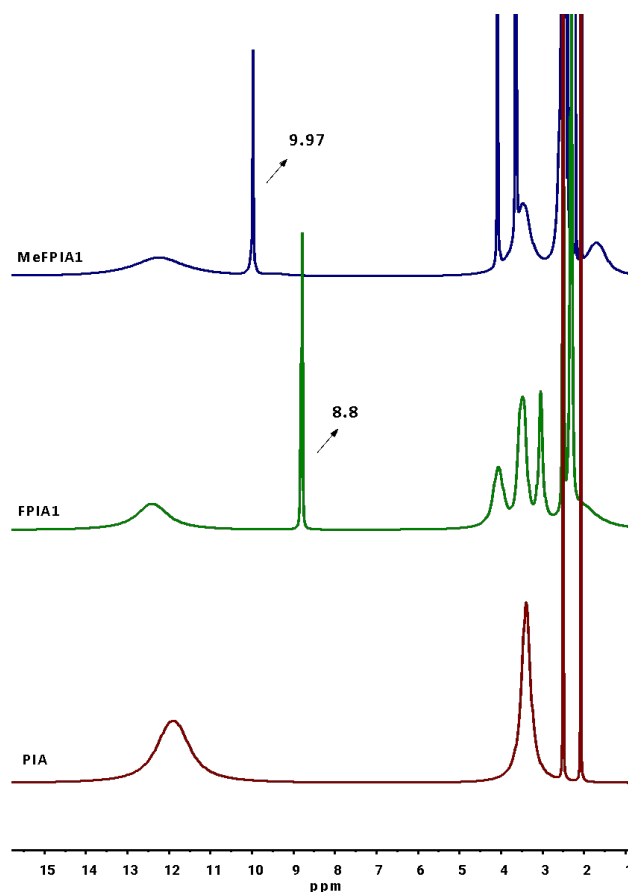


Figura 3.1. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) del PIA, FPIA1 y MeFPiA1.

El grado de modificación se determinó por $^1\text{H-NMR}$ por comparación de los protones del tiazol a 8,8 ppm y los protones de metileno de $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ a 3,5 ppm. Los resultados fueron de 28% y 60% para FPIA1 y FPIA2, respectivamente. Por lo tanto, se puede concluir que el incremento en la temperatura produce un mayor grado de modificación. En los espectros correspondientes a la posterior cuaternización de los polímeros no se observaron señales a 8,8 ppm correspondientes a los protones del tiazol, ya que se logró en ambos casos la total cuaternización de los grupos heterociclos, y un nuevo pico apareció a 10 ppm correspondiente a los protones de ambos grupos de tiazolio.

La Figura 3.2 muestra los espectros de FTIR-ATR del PIA, FPIA1 y MeFPIA1. El espectro del homopolímero PIA muestra una banda característica a 1695 cm^{-1} , correspondiente a los grupos carboxilo ($\text{C}=\text{O}$). El espectro del FPIA1, polímero con menor grado de modificación, presenta otras bandas características, como las siguientes: 3082 cm^{-1} ($=\text{C}-\text{H}$ tiazol), 2928 cm^{-1} ($\text{C}-\text{H}$), 1720 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1547 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$ tiazol) y 1117 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$) [5]. Considerando estas señales, se podría concluir que se logró la funcionalización del PIA. Asimismo, se pudo observar en el espectro del MeFPIA1 que la banda correspondiente al enlace $\text{C}=\text{N}$ se desplazó a 1572 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}^+$ tiazolio) debido a la cuaternización.

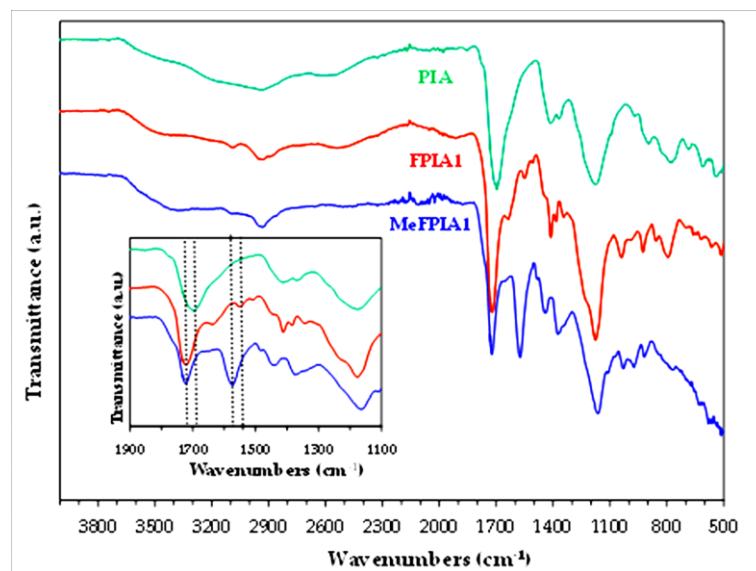


Figura 3.2. Espectro de infrarrojo por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) del PIA, FPIA1 y MeFPIA1.

Además, se determinaron los valores de potencial ζ para los polímeros cargados. Las mediciones se realizaron a partir de disoluciones de concentración 1 mg/mL de polímero en agua MilliQ ($18\text{ m}\Omega$). Los valores fueron de -60 mV para PIA, -52 mV para MeFPIA1 y -9

mV para MeFPiA2. El valor negativo observado en el PIA se debe a la presencia de grupos carboxilos en forma $-\text{COO}^-$. A medida que aumenta el grado de modificación, el potencial ζ se desplaza hacia valores menos negativos. Por lo tanto, los resultados confirman que se obtuvo un mayor grado de modificación con el aumento de la temperatura de reacción, ya que MeFPiA2 presentó un mayor potencial que MeFPiA1. Estos valores negativos fueron cambiando con la adición de unas gotas de disolución de ácido clorhídrico 0,1 M, donde el potencial ζ de los polímeros presentó valores menos negativos, debido a que los grupos carboxilos libres fueron protonados.

Por lo tanto, ambos polímeros MeFPiAx tienen una naturaleza dual, y la presencia de cargas positivas y negativas a lo largo de la cadena lateral puede producir algunas variaciones en la conformación, dando la posibilidad de ser considerados como polímeros zwitteriónicos [6]. Estos zwitteriones, incluidos los polianfolitos y las polibetaínas, son macromoléculas con grupos de carga opuesta (catiónicos y aniónicos) a lo largo de la cadena o cadena lateral que muestran distintos comportamientos dependiendo de su entorno. Teniendo en cuenta esta definición, las cargas podrían distribuirse a lo largo de la cadena de diferentes maneras [7] y, en este caso, sería una distribución al azar. Por lo general, los grupos catiónicos son amonio cuaternizado y los grupos aniónicos son sulfonatos, carboxilatos y fosfonatos [8]. La ionización de la cadena depende del pH del entorno, que tiene un marcado efecto en el comportamiento conformacional del polímero. El uso de un carboxilato como anión en ambientes ácidos resultó en la protonación y neutralización de las unidades monoméricas [7]. Los polímeros zwitteriónicos tienen gran potencial como recubrimientos anti-incrustamiento o *anti-fouling*, entre otras funcionalidades, ya que pueden resistir la adsorción de proteínas no específicas, la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas [9].

3.7.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los resultados del análisis termogravimétrico de los polímeros MeFPiA1 y MeFPiA2 se presentan en la Figura 3.3. Se pueden observar tres zonas principales de degradación en un intervalo de temperatura desde 30 hasta 450 °C con un residuo del 20%. La primera, desde 30 °C a 120 °C, puede atribuirse a la eliminación del agua libre adsorbida, característica de los polímeros hidrófilos, y la posible volatilización de compuestos de bajo peso molecular. La segunda zona, de 120 °C a 300 °C, con T_{max} centrada en 230 °C, podría estar relacionada con la formación de anillos anhídridos en la cadena de PIA. Las temperaturas iniciales de degradación tras la pérdida de humedad (T_i), se determinan en

esta zona y fueron de 180 °C y 205 °C, para MeFPiA1 y MeFPiA2, respectivamente. En la tercera zona, entre 300 °C y 450 °C, con T_{max} entre 370 °C y 380 °C, alcanzaron una pérdida de masa en torno al 50% respecto a la masa inicial. Estos resultados podrían corresponder probablemente, con los procesos de descarboxilación y carbonización. Es de destacar que el 50% de la masa inicial se conservó a temperaturas de hasta 350 °C. La masa residual se relaciona con la existencia de polímeros reticulados que se forman a altas temperaturas [10].

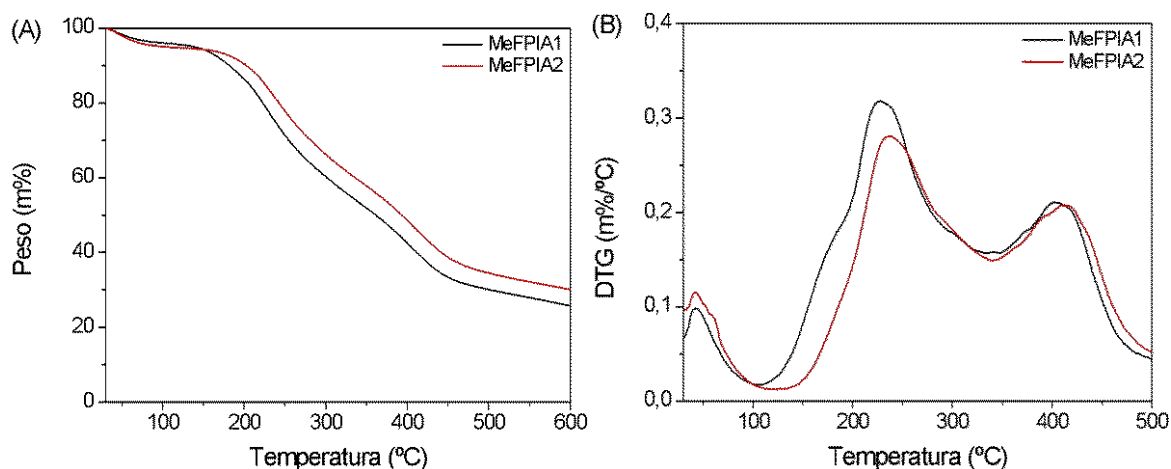


Figura 3.3. Curvas termogravimétricas: **(A)** Pérdida de peso en función de la temperatura. **(B)** Derivada del porcentaje de peso en función de la temperatura.

3.7.3. Determinación de la concentración mínima de inhibición (MIC)

Los valores de MIC se presentan en la Tabla 3.1 y se corresponden a la mínima concentración (mg/mL) de polímero que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de un período de incubación de 24 h a 37 °C [11]. Ambos polímeros MeFPiAx fueron solubles en caldo y presentaron actividad antimicrobiana. Estudios previos han demostrado el papel clave de la densidad de carga positiva de policationes y el balance anfifílico en su interacción con la superficie cargada negativamente de las membranas celulares bacterianas, lo que en consecuencia, conduce a la muerte celular [12,13,14]. Además, los resultados de las investigaciones apoyaron la hipótesis de que los polímeros que poseen una carga catiónica en los grupos de amonio cuaternario eliminan a las bacterias al dañar la membrana celular, causando lisis celular y mostrando propiedades antimicrobianas en disolución y en la superficie [15,16]. Sin embargo, en este trabajo, considerando que no se logró una completa modificación debido a la presencia de grupos carboxilo no funcionalizados, esta situación influyó en la disminución de la densidad de

cargas positivas (como se refleja en el potencial ζ), afectando las propiedades antimicrobianas. Se obtuvieron valores de MIC para los polímeros antimicrobianos que van desde 0,5 a 8 mg/mL (ver Tabla 3.1). Aunque no hubo diferencias en valores de MIC de los polímeros frente a *Escherichia coli*, MeFPiA1 mostró mayor actividad antimicrobiana que MeFPiA2 contra *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, muchos estudios informaron que el peso molecular y la distribución espacial de las cargas son otros factores a tener en cuenta con respecto a las propiedades antimicrobianas de polímeros cargados [14,17]. Por lo tanto, MeFPiA2 podría adoptar una conformación en disolución con la carga positiva menos accesible a las membranas celulares bacterianas. Además, también se describe que los polímeros aniónicos y los polianfolitos pueden presentar propiedades antimicrobianas [18,19]. Como era esperable, los polímeros presentan mayor actividad frente a bacterias Gram-positivas que frente a las Gram-negativas, debido a que las segundas poseen una doble pared celular y son más difíciles de eliminar por el mecanismo de acción de los polímeros sintetizados.

Tabla 3.1. Valores de MIC (mg/mL) de los polímeros cuaternizados MeFPiA1 y MeFPiA2.

Polímeros	MIC (mg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
MeFPiA1	8	2	0.5
MeFPiA2	8	4	0.5

3.8. Conclusiones parciales

Se sintetizaron polímeros a partir del ácido itacónico vía polimerización radical convencional, al cual se le incorporaron, mediante una reacción de esterificación, el grupo heterociclo 1,3-tiazol de manera parcial. Posteriormente, se cuaternizaron mediante una reacción de alquilación con yoduro de metilo. Los polímeros obtenidos fueron caracterizados mediante distintos tipos de técnicas. Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y FTIR-ATR, demostraron que el aumento de la temperatura de reacción favorece la funcionalización del PIA, y que la cuaternización se logró en su totalidad en ambos casos. El potencial ζ también confirmó un mayor grado de modificación con el aumento de la temperatura de reacción. Estos polímeros demostraron tener actividad antimicrobiana, obteniéndose valores de MIC que oscilan entre 0,5 y 8 mg/mL, convirtiéndose así en prometedores agentes activos a ser incorporados en distintas matrices para el desarrollo de novedosos materiales.

3.9. Referencias

1. Stawski, D.; Połowiński, S. Polymerization of itaconic acid. *Polim. Polym.* **2005**, *50*, 118–122.
2. Lei, W.; Yang, X.; Qiao, H.; Shi, D.; Wang, R.; Zhang, L. Renewable resource-based elastomer nanocomposite derived from myrcene, ethanol, itaconic acid and nanosilica: Design, preparation and properties. *Eur. Polym. J.* **2018**, *106*, 1–8.
3. Tejero, R.; Gutiérrez, B.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.; Fernández-García, M. Copolymers of acrylonitrile with quaternizable thiazole and triazole side-chain methacrylates as potent antimicrobial and hemocompatible systems. *Acta Biomater.* **2015**, *25*, 86–96.
4. CLSI M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 10th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, **2015**; ISBN 1-56238-987-4.
5. Tejero, R.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.; Fernández-García, M. Antimicrobial polymethacrylates based on quaternized 1,3-thiazole and 1,2,3-triazole side-chain groups. *Polym. Chem.* **2015**, *6*.
6. Li, M.; Zhuang, B.; Yu, J. Functional zwitterionic polymers on surface: structures and applications. *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 2060–2075.
7. Blackman, L.D.; Gunatillake, P.A.; Cass, P.; Locock, K.E.S. An introduction to zwitterionic polymer behavior and applications in solution and at surfaces. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 757–770.
8. Zheng, L.; Sundaram, H.S.; Wei, Z.; Li, C.; Yuan, Z. Applications of zwitterionic polymers. *React. Funct. Polym.* **2017**, *118*, 51–61.
9. Zhang, Y.; Liu, Y.; Ren, B.; Zhang, D.; Xie, S.; Chang, Y.; Yang, J.; Wu, J.; Xu, L.; Zheng, J. Fundamentals and applications of zwitterionic antifouling polymers. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2019**, *52*, 403001.
10. Zeghioud, H.; Lamouri, S.; Safidine, Z., & Belbachir, M. Chemical synthesis and characterization of highly soluble conducting polyaniline in mixtures of common solvents. *J. Serb. Chem. Soc.* **2015**, *80* (7), 917-931.
11. ASTM E2149-01, Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions (Withdrawn 2010); ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2001; Available online: www.astm.org (accessed on 10 December 2020).

12. Tejero, R.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.; Fernández-García, M. Antimicrobial polymethacrylates based on quaternized 1,3-thiazole and 1,2,3-triazole side-chain groups. *Polym. Chem.* **2015**, *6*.
13. Takahashi, H.; Palermo, E.F.; Yasuhara, K.; Caputo, G.A.; Kuroda, K. Molecular design, structures, and activity of antimicrobial peptide-mimetic polymers. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 1285–1299.
14. Palermo, E.F.; Kuroda, K. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 1605–1615.
15. Timofeeva, L.; Kleshcheva, N. Antimicrobial polymers: Mechanism of action, factors of activity, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *89*, 475–492.
16. Tejero, R.; Gutiérrez, B.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.J.L.; Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. Tailoring macromolecular structure of cationic polymers towards efficient contact active antimicrobial surfaces. *Polymers* **2018**, *10*, 241.
17. Palermo, E.F.; Kuroda, K. Chemical structure of cationic groups in amphiphilic polymethacrylates modulates the antimicrobial and hemolytic activities. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1416–1428.
18. Mielczarek, K.; Łabanowska, M.; Kurdziel, M.; Konefał, R.; Beneš, H.; Bujok, S.; Kowalski, G.; Bednarz, S. High-molecular-weight polyampholytes synthesized via daylight-induced, initiator-free radical polymerization of renewable itaconic acid. *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41*, 1–4.
19. Guo, J.; Xu, Q.; Shi, R.; Zheng, Z.; Mao, H.; Yan, F. Polyanionic antimicrobial membranes: an experimental and theoretical study. *Langmuir* **2017**, *33*, 4346–4355.

Capítulo 4: Diseño de Películas Activas a Base de Gelatina y Almidón con MeFPIAx

El presente capítulo describe el desarrollo y caracterización de películas a base de gelatina y almidón al 30% p/p, con la incorporación de MeFPIAx 10%, glicerol 50% como plastificante y dopamina 2% como posible entrecruzante.

4.1. Materiales

Gelatina (Scharlau®), almidón (Nestlé Health Science®, Barcelona, España), glicerol ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich®), clorhidrato de dopamina (99%, Alfa Aesar™), hidróxido de sodio (NaOH, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), carbonato de potasio (K_2CO_3 , Sigma-Aldrich®), nitrato de magnesio ($Mg(NO_3)_2$, 98%, Sigma-Aldrich®), cloruro de bario ($BaCl_2$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), ácido L-ascórbico ($C_6H_8O_6$, Sigma-Aldrich®), buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich®), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)-sal de diamonio (ABTS, Sigma® A1888), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Sigma® 216224, Saint Louis, MO, USA), etanol 96% vol. (Porta®), peptona (Britania®, CABA, Argentina), agar bacteriológico (Britania®), caldo nutritivo (Britania®).

4.2. Obtención de las películas activas por evaporación del solvente (*casting*)

Se elaboraron seis formulaciones mediante *casting* de las dispersiones acuosas al 30% p/p con respecto al total de componentes, a base de gelatina y almidón en proporción másica 4:1 y un 10% p/p de los polímeros sintetizados con respecto al peso de la relación gelatina:almidón. Se añadió glicerol al 50% p/p con respecto al peso de los polímeros totales. A la mitad de las formulaciones se le incorporó clorhidrato de dopamina al 2% p/p con respecto al peso de los polímeros totales (la otra mitad será el control sin dopamina).

Para la preparación de las películas por *casting* se prepararon las dispersiones de los polímeros en agua destilada, con agitación magnética, y se mantuvieron en un baño termostático a 70 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió poco a poco una solución de NaOH 0,1 M hasta alcanzar un pH entre 8-9 y se incorporó la dopamina dejándola reaccionar por otros 20 minutos. La dopamina se incorporó como agente entrecruzante, a partir de su interacción con los polímeros, y de esta manera, se lograría brindar más estabilidad a las películas, además como compuesto antioxidante [1]. Finalmente, las dispersiones correspondientes se vertieron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, en una cantidad aproximada de 15 g de dispersión por placa y se dejaron secar

durante una semana a temperatura y humedad ambiente. Las películas secas se despegaron de las placas y se acondicionaron durante una semana a una humedad relativa (h.r.) de 53%, proporcionada por una solución saturada de nitrato de magnesio $Mg(NO_3)_2$ y 25 °C, previamente a su caracterización. Las películas sin agregado de MeFPIAx y dopamina se consideraron películas control. Se caracterizaron las propiedades físico-químicas de los nuevos materiales obtenidos mediante distintas técnicas analíticas.

4.3. Caracterización de las películas activas

4.3.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis se realizó en todas las películas utilizando un espectrofotómetro IR Affinity-1 Shimadzu (Shimadzu Co., Japón) equipado con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante (GladiATR, Pike Technologies). El barrido se realizó en un intervalo de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , con 48 scans, 4 cm^{-1} de resolución y apodización Happ-Genzel. Los espectros fueron obtenidos por duplicado.

4.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para llevar a cabo los ensayos se utilizó un equipo MDSC Q-200 (TA Instruments, Delaware, EE. UU.) con una unidad de refrigeración RCS 90, en un intervalo de temperatura de -80 °C a 180 °C. Los experimentos se realizaron con una modulación de temperatura de ± 1 °C cada 40 segundos y una velocidad de barrido de 10 °C/min, en atmósfera de nitrógeno a 50 mL/min. Previamente, las películas (aprox. ~3-5 mg) fueron deshidratadas en cápsulas herméticas TZero® de aluminio dentro de un desecador con sílica gel.

4.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis se realizó en un equipo TGA Q-500 (TA Instruments, Delaware, EEUU). Se pesaron aproximadamente 6 mg de cada película en una balanza de platino. Previamente, las muestras se acondicionaron a una humedad relativa (h.r.) de 53% con una solución saturada de $Mg(NO_3)_2$ dentro de un desecador. La velocidad de barrido fue de 10 °C/min, en un intervalo de temperatura de 30 °C hasta 700 °C en atmósfera de nitrógeno (flujo de 50 mL/min). Se registró la pérdida de peso en función de la temperatura. Las mediciones se realizaron por duplicado.

4.3.4. Propiedades mecánicas

Se realizaron ensayos de esfuerzo-deformación para evaluar las propiedades mecánicas de los materiales. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente en una máquina Universal Instrument Megatest TC-500 serie II (Megatest, Argentina), utilizando una celda de carga de 30 kgf a una velocidad de 10 mm/min. Previamente, se cortaron probetas rectangulares (50 × 10 mm) de cada formulación y se acondicionaron dentro de un desecador a 53% de h.r. provista por una solución saturada de $Mg(NO_3)_2$. El espesor de cada probeta se determinó en cinco puntos utilizando un micrómetro digital (INSIZE Co., LTD, Suzhou New District, China, $\pm 0,001$ mm). Las curvas resultantes de esfuerzo-deformación permitieron calcular los parámetros mecánicos: Módulo de Young (MY, MPa), resistencia a la tracción (TS, MPa), y elongación a la ruptura (e, %).

4.3.5. Color

El color de las películas se midió utilizando un espectrofotómetro Konica Minolta CR400 (Tuscaloosa, NJ, USA) y se determinaron las coordenadas Cielab L^* , a^* y b^* para conocer si la adición de polímero y/o dopamina modificaba el aspecto de los materiales. Este método es ampliamente utilizado ya que correlaciona los valores numéricos de color consistentemente con la percepción visual humana. El espacio de color Cielab (Figura 4.1), es un sistema cartesiano formado por 3 ejes, un eje vertical L^* que indica luminosidad y dos ejes horizontales a^* y b^* que son las coordenadas cromáticas.

L^* = Luminosidad.

a^* = coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde).

b^* = coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul).

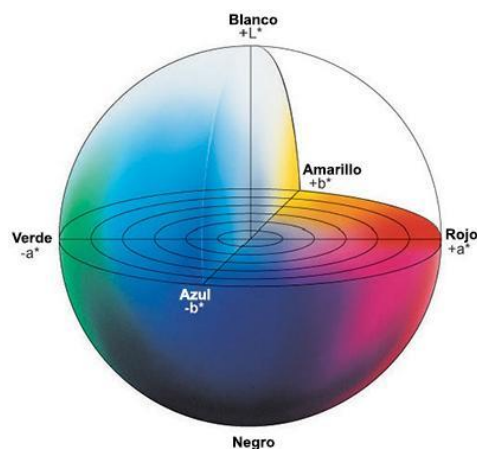


Figura 4.1. Espacio de color Cielab.

Para comparar las diferencias de color entre las distintas películas se calcula el parámetro de diferencia de color global (ΔE) el cual permite juzgar niveles de diferencias de color percibidas por el ojo humano (valores de ΔE mayores a 6) según la Ecuación 4.1. Se midieron diez puntos de cada película y se consideró la película de gelatina-almidón y glicerol (GA) como película control. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

$$\Delta E = \sqrt{(a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 + (L^* - L_0^*)^2} \quad (4.1)$$

donde a_0^* , b_0^* , y L_0^* son las coordenadas correspondientes a la película control, contra las que fueron comparadas el resto de las películas para determinar el cambio de color debido a la presencia de los polímeros sintetizados y/o dopamina.

4.3.6. Permeabilidad experimental al vapor de agua (P_w^{exp})

La permeabilidad experimental al vapor de agua (P_w^{exp}) de las películas se determinó cuantificando el flujo de vapor de agua a través de las películas de forma gravimétrica. Para ello, se utilizó la técnica ASTM-E96 (2016) con algunas modificaciones. En primer lugar, las películas se colocaron en celdas acrílicas con una abertura de 53 mm de diámetro, las cuales contenían una solución saturada de $BaCl_2$ generando una h.r. del 90%. Las celdas se colocaron dentro de un desecador que contenía una solución saturada de NaOH para proporcionar una h.r. del 10%, a una temperatura constante de 22 °C. De esta manera, una cara de la película quedó expuesta a una h.r. del 90% y otra cara a una h.r. del 10%. Se colocó un ventilador sobre las películas para mantener las condiciones de aire uniformes dentro del desecador, según recomendaciones de autores anteriores [2,3,4]. Se registraron los pesos de las celdas al inicio del experimento y a intervalos de tiempo determinados utilizando una balanza analítica de precisión (Precisa 125 A SCS, 10^{-3} g). Una vez obtenidos los valores de los pesos a lo largo del tiempo, la P_w^{exp} se calculó según la Ecuación 4.2.

$$P_w^{exp} = \frac{1}{A} \left(\frac{\Delta m}{\Delta t} \right) \frac{L}{\Delta p_w} \quad (4.2)$$

donde A es el área efectiva expuesta de la película y $\Delta m/\Delta t$ es la pendiente de la regresión lineal de la pérdida de peso frente al tiempo. L es el espesor de la película y $\Delta p_w = (p_{w2} - p_{w1})$, en unidades Pa) es la diferencia de presiones parciales de vapor de agua a través de la película, p_{w1} es la presión parcial en la superficie externa de la película (263.9 Pa) y p_{w2} es la presión parcial en la superficie interna de la película (2375.4 Pa). Los experimentos se realizaron por duplicado.

4.3.7. Hidratación

Se estudiaron las cinéticas de hidratación de las películas en un ambiente controlado a 90% h.r. En primer lugar, se determinó el peso seco de las películas colocándolas previamente en un desecador con sílica gel. Luego, se colocaron en otro desecador a una h.r de 90%, generada por una solución saturada de BaCl₂ ubicada en el interior del mismo. A determinados intervalos de tiempo, se retiraron las muestras y se registraron los pesos utilizando una balanza analítica ($\pm 10^{-4}$ g) hasta alcanzar un peso constante. Se utilizó un ventilador para mantener condiciones uniformes dentro del desecador con un flujo de circulación de aire de 160 m/min. La instalación de un ventilador dentro del desecador se lleva a cabo para eliminar la capa de aire estancada que se genera sobre la película en ausencia del mismo. Esta capa de aire produce una resistencia a la transferencia de masa que modifica el proceso de hidratación, según lo expresado por autores anteriores [2,3,4]. Es importante estudiar las cinéticas de hidratación considerando la potencial aplicación de los materiales como envases alimentarios. Los mismos suelen estar sujetos a flujos de aire cambiante durante el proceso de envasado de un alimento; su transporte y almacenamiento. El contenido de agua h , en unidades de g de agua por g de película seca (p.s.), se evaluó en función del tiempo t (días), calculando la diferencia entre la masa de la película hidratada y la masa de la película seca. Los experimentos se realizaron por triplicado a 22 °C.

En películas biopoliméricas con matriz continua y homogénea, el transporte de agua no se produce a través de los poros sino empleando el mecanismo de sorción-difusión-desorción [5]. Por lo tanto, la permeabilidad al vapor de agua depende de la hidratación o solubilidad del agua en la película, así como de la movilidad del agua en la matriz. De hecho, para películas poliméricas hidrofílicas, la permeabilidad experimental al vapor de agua P_w^{exp} se puede calcular según la Ecuación 4.3:

$$P_w^{exp} = D_w^{eff} \times S_w^{eff} \quad (4.3)$$

donde S_w^{eff} ($\text{g m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$) es el coeficiente efectivo de solubilidad de agua calculado según la Ecuación 4.4:

$$S_w^{eff} = [(h(a_{w2}) - h(a_{w1})) / (p_{w2} - p_{w1})] \times \rho_{p.s.} \quad (4.4)$$

donde $h(a_{w2})$ y $h(a_{w1})$ son el contenido de agua en la película (g H₂O por g de p.s.) en su superficie interna a p_{w2} y en su superficie externa (fuera de la copa) a p_{w1} , respectivamente.

La densidad de la película seca $\rho_{p.s.}$ (g m⁻³) se calculó a través de la Ecuación 4.5.

$$\rho_{p.s.} = \frac{m}{A \times L} \quad (4.5)$$

donde m es la masa seca (g), A el área (m²), y L el espesor (m).

De acuerdo con la Ecuación 4.3, D_w^{eff} fue luego calculado por la Ecuación 4.6.

$$D_w^{eff} = P_w^{exp} / S_w^{eff} \quad (4.6)$$

Por otra parte, el contenido de agua en función del tiempo, $h(t)$, se ajustó con la solución de la Ley de Fick de transporte diferencial de masa, para una difusión de agua unidireccional en una placa plana infinita, según el modelo de Crank, como se puede observar en la Ecuación 4.7.

$$h_{(t)} = h_{\infty} \left\{ 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp \left[-D_w (2n+1)^2 \frac{\pi^2 t}{4L^2} \right] \right\} \quad (4.7)$$

donde h_{∞} es el contenido de agua en el equilibrio, L es el espesor de la película y D_w es el coeficiente de difusión aparente en unidades de m² s⁻¹.

4.3.8. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas

Se evaluó el hinchamiento de las películas poliméricas en solución buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) a 25 °C y 37 °C. Se cortaron discos de aproximadamente 1 cm, se pesaron (alrededor de 40 mg) y se sumergieron en recipientes con 20 mL de PBS. El hinchamiento se siguió gravimétricamente, midiendo la ganancia de peso debido a la incorporación de la solución durante el tiempo de inmersión. A intervalos de tiempo determinados, se retiraron los discos, se eliminó el exceso de solución cuidadosamente con un papel de filtro, se pesaron y se devolvieron nuevamente a los contenedores. Este procedimiento se realizó hasta que no hubo más ganancia de solución (peso constante) o hasta que se observó la pérdida de integridad del disco. El ensayo se realizó por triplicado. El proceso de hinchamiento se expresó como absorción de solución, $s(t)$, en el tiempo t en unidades de g de solución por 100 g de película seca, y se calculó mediante la Ecuación 4.8.

$$s(t) = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (4.8)$$

donde W_t es el peso del disco hinchado en el tiempo t y W_0 es el peso del disco acondicionado al comienzo del experimento.

La absorción de la solución s en función del tiempo t se ajustó con un modelo de cinética de primer orden, utilizando una función biexponencial que tiene en cuenta dos etapas de absorción de solución [6], como se muestra en la Ecuación 4.9.

$$s_{(t)} = s_0 + \Delta s_1 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)\right) + \Delta s_2 \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right)\right) \quad (4.9)$$

donde $s_{(t)}$ es la absorción de la solución; s_0 es el contenido de la solución inicial ($s_0 = 0$ en las condiciones experimentales); Δs_1 y Δs_2 son la absorción de solución relacionada con el proceso de sorción 1 y 2, respectivamente; y τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo para el proceso 1 y 2, respectivamente. La absorción de la solución en el equilibrio s_{∞} se calculó a través de la Ecuación 4.10.

$$s_{\infty} = \Delta s_1 + \Delta s_2 \quad (4.10)$$

4.3.9. Actividad antioxidante

4.3.9.1. Preparación de las soluciones de trabajo

La actividad antioxidante de las películas se evaluó aplicando el método ABTS. Para esto, se preparó ABTS en solución acuosa en una concentración de 7 mM y se mezcló con $K_2S_2O_8$ hasta alcanzar una concentración de 2.45 mM para formar el radical $ABTS^{*+}$ (solución A). Esta mezcla se dejó en oscuridad durante 16 h, y después de este período de tiempo, la solución A se diluyó en diferentes disolventes: agua milliQ (solución B), etanol/agua 50/50 (solución B_1) y etanol/agua 95/5 (solución B_2), hasta ajustar la absorbancia de las soluciones a un valor de 0.70 ± 0.02 a una longitud de onda (λ) de 734 nm.

4.3.9.2. Estimación de la capacidad antioxidante de la película por contacto directo con $ABTS^{*+}$

Se cortaron discos de aproximadamente 10 mg de cada formulación y se colocaron en tubos eppendorf con 1 mL de la solución B_x correspondiente. Después de 30 min de reacción en oscuridad con ligera agitación, se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 734 nm. Cada condición se evaluó por duplicado. La actividad antioxidante de las distintas películas se calculó como el porcentaje de inhibición radicalaria (RSA (%)), como se describe en Ecuación 4.11.

$$RSA(\%) = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100 \quad (4.11)$$

donde el blanco corresponde a la absorbancia de la solución ABTS⁺⁺ (B_x) sin la película.

4.3.10. Actividad antimicrobiana

La metodología desarrollada se basó en la norma ASTM E2149 [7]. La actividad antimicrobiana de las películas se evaluó frente a la cepa bacteriana Gram-positivas *S. aureus* (ATCC 25923). El aislado del microorganismo se incubó en placas de agar nutritivo estéril durante 24 h a 37 °C. Luego, se preparó una suspensión del microorganismo en tubos con agua de peptona 0.1% estéril hasta una turbidez equivalente a 0.5 McFarland (10⁸ UFC/mL). La suspensión del inóculo se diluyó en PBS estéril (pH 7.4) hasta obtener una concentración final de 10⁵ UFC/mL. Las muestras fueron cortadas aproximadamente en cuadrados de 1 cm de lado y colocadas en tubos eppendorf con 750 µL de la solución de inóculo y 750 µL de PBS. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación de 100 rpm. Se tomaron alícuotas y se realizaron conteos de UFC totales a las 0 y 24 h de tiempo de contacto. Se realizó un control de la solución de inóculo (sin película), y aquellas que no contenían MeFPIAx se consideraron películas control. El porcentaje de reducción bacteriana (%) se calculó utilizando la Ecuación 4.12.

$$\text{Reducción bacteriana (\%)} = \frac{B-A}{B} \times 100 \quad (4.12)$$

donde A es UFC/mL para la película luego de 24 h de tiempo de contacto, y B es UFC/mL a tiempo inicial.

4.3.11. Migración específica y cinética de liberación de dopamina en simulante alimentario

Los materiales, por sus características, pueden sufrir fenómenos de interacción, tanto con el alimento como con el medio que los rodea. Uno de estos fenómenos es la migración, proceso por el que sustancias contenidas en la película pueden pasar al alimento y/o medio con el que están en contacto. La migración específica se enfoca en la determinación de una sustancia en particular que se libera desde el material de envase hacia el alimento o simulante alimentario. La norma europea EN 13130-1 [8] establece los métodos de ensayos y las condiciones de exposición de los materiales para la realización de los estudios de migración específica de sustancias no poliméricas en alimentos y simulantes alimentarios... Los ensayos de migración específica se realizan mediante el contacto directo del material

con el simulante alimentario seguido de una posterior cuantificación de los migrantes mediante un análisis químico [9]. En el caso de los sistemas activos, es interesante el estudio de la migración de un compuesto en particular que migra en condiciones controladas, y en este caso dicha migración es favorable.

En este trabajo se midió la migración específica de la dopamina contenida en las películas. Para ello, se cortaron probetas rectangulares de 6×1 cm y cada muestra se puso en contacto con 10 mL de simulante alimentario en tubos de ensayo tapados, manteniendo la relación de $6 \text{ dm}^2/\text{L}$ de simulante, condición según norma europea EN 13130-01. Se evaluaron tres probetas por cada formulación. El simulante alimentario utilizado fue etanol al 50% v/v en agua destilada como simulante alimentario graso. Las condiciones de contacto fueron de 17 días a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. A determinados intervalos de tiempo (0, 3, 5, 24 h, 7, 10, 15 y 17 d) se tomaron alícuotas de $100 \text{ }\mu\text{L}$, se reemplazaron por $100 \text{ }\mu\text{L}$ de simulante fresco y se cuantificó la dopamina liberada por espectroscopia UV a una λ de 280 nm . Se preparó una curva de calibrado utilizando patrones de dopamina entre 0.01 y 0.06 mg/mL , los cuales se midieron también a una λ de 280 nm . Los resultados se expresaron como mg de dopamina por kg de simulante.

La concentración de dopamina c en función del tiempo t se ajustó con un modelo de cinética de primer orden, utilizando una función biexponencial (Ecuación 4.13) que tiene en cuenta dos etapas de liberación de dopamina [6].

$$c_{(t)} = c_0 + \Delta c_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_1} \right) \right) + \Delta c_2 \left(1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_2} \right) \right) \quad (4.13)$$

donde $c_{(t)}$ es la concentración de dopamina (mg/mL); c_0 es la concentración inicial liberada al medio ($c_0 = 0$ en las condiciones experimentales); Δc_1 y Δc_2 son la concentración de dopamina relacionada con el proceso de liberación 1 y 2, respectivamente; y τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo para el proceso 1 y 2, respectivamente. La liberación de dopamina en el equilibrio c_∞ se calculó a través de la Ecuación 4.14.

$$c_\infty = \Delta c_1 + \Delta c_2 \quad (4.14)$$

4.3.12. Determinación de la capacidad antioxidante del simulante por el método ABTS

Uno de los parámetros utilizados para medir la capacidad antioxidante, tal como se mencionó anteriormente, es el porcentaje de inhibición radicalaria (RSA%), el cual relaciona la absorbancia de una solución de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ puro (blanco) con una solución de $\text{ABTS}^{+\cdot}$ con la

muestra. Sin embargo, otra forma de expresar la capacidad antioxidante es como capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C (VCEAC).

La curva de calibración de la vitamina C se realizó a partir de soluciones patrón de distintas concentraciones conocidas. Para ello, se pesaron 5 mg de ácido L-ascórbico y se añadieron a 1 mL de agua milliQ. Una vez disuelto completamente, se realizaron dos diluciones seriadas 1/10. Esta última solución es la que se utilizó para armar la curva de calibración. En las Tablas 4.1 y 4.2 se detalla la composición y concentración de las soluciones patrón de vitamina C. Luego de la adición de 900 μ L de ABTS^{•+} (solución B), se dejó reaccionar durante 6 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm.

Tabla 4.1. Soluciones patrón de vitamina C utilizadas para elaborar la curva de calibración.

Diluciones	Blanco	1/50	1/20	1/12.5	1/10
Vitamina C (μ L)	0	20	50	80	100
Agua (μ L)	100	80	50	20	0
ABTS ^{•+} (μ L)	900	900	900	900	900

Tabla 4.2. Concentración de soluciones patrón de vitamina C para elaborar la curva de calibración.

Diluciones	Concentración (mg/mL)
Blanco	0
1/50	1,1
1/20	2,5
1/12,5	4,0
1/10	5,0

4.3.13. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como medias \pm desviación estándar (S.D.) y fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software PSPP. Se aplicó la prueba de Tukey (test post-hoc) para encontrar las medias que fueron significativamente diferentes entre sí, con un nivel de significación de $p < 0.05$.

4.4. Resultados y Discusión

La Tabla 4.3 muestra los nombres y la descripción de cada película elaborada; tal y como se mencionó anteriormente, aquellas sin polímero y dopamina fueron consideradas películas control (GA). Las películas resultaron uniformes, flexibles, lisas y no se observaron grietas ni poros, a simple vista (Figura 4.2).

Tabla 4.3. Descripción de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	Descripción
GA	Película a base de gelatina, almidón y glicerol (Control)
GA-MeFPIA1	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA1
GA-MeFPIA2	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA2
GA-D	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y dopamina
GA-MeFPIA1D	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA1 y dopamina
GA-MeFPIA2D	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA2 y dopamina

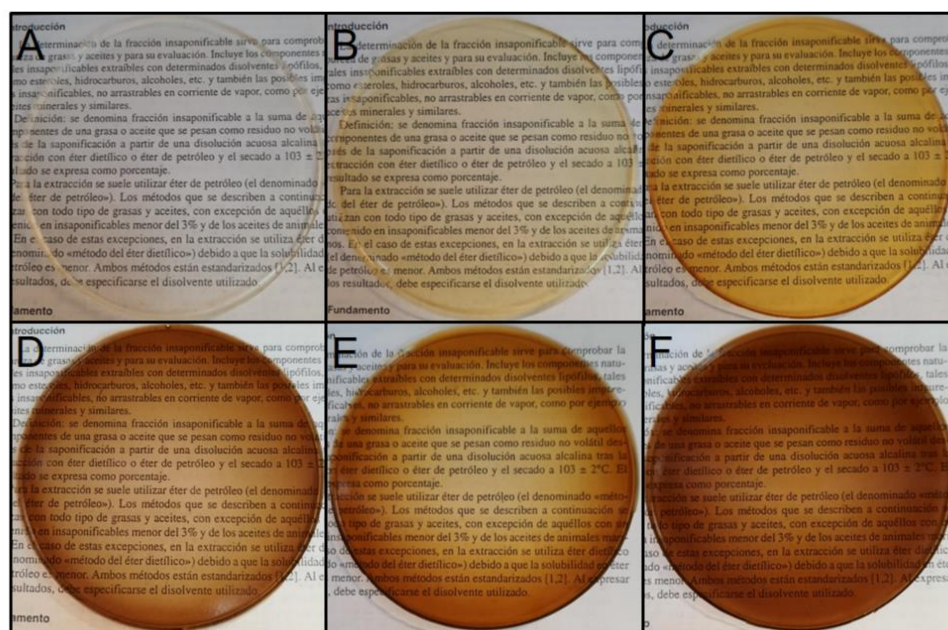


Figura 4.2. Películas a base de gelatina y almidón: (A) GA, (B) GA-MeFPIA1, (C) GA-MeFPIA2, (D) GA-D, (E) GA-MeFPIA1D, (F) GA-MeFPIA2D

4.4.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Cómo se puede observar en la Figura 4.3, los espectros infrarrojos muestran las bandas de absorción de las películas de gelatina y almidón en presencia y ausencia de MeFPIAx y dopamina. En primer lugar, el intervalo comprendido entre 3750-3000 cm^{-1} , aparece una banda ancha que se asocia a la absorción de grupos hidroxilos (-OH) del agua, glicerol y polisacáridos, y a los enlaces N-H del grupo amino de las proteínas. Las bandas encontradas en el intervalo 3000-2800 cm^{-1} corresponden a la flexión del enlace C-H de los grupos funcionales metilo y metileno. En la región de absorción comprendida entre 1750-1200 cm^{-1} se encontraron cinco bandas: 1634 cm^{-1} , 1551 cm^{-1} , 1452 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , y 1238

cm^{-1} los cuales corresponden a grupos amida. Por último, en el intervalo comprendido entre $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ se encuentran las bandas asignadas a las vibraciones de los enlaces C-O-C, C-C, C-OH y C-H. Estas bandas podrían asociarse a los movimientos vibracionales de los grupos funcionales que conforman el almidón [12]. Ahora bien, las señales características de los polímeros MeFPiAx y dopamina se solapan con las señales de la gelatina y almidón, por lo tanto, no se observan diferencias entre los distintos espectros.

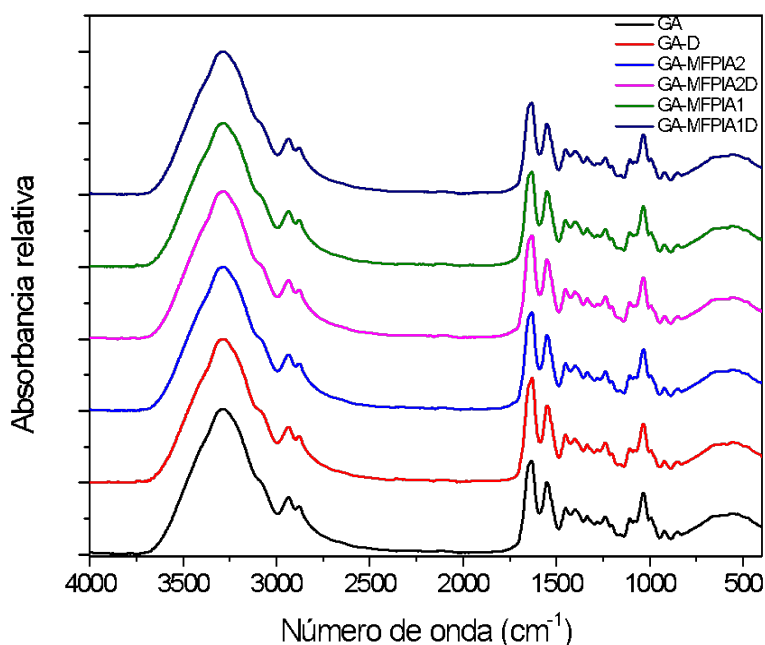


Figura 4.3. Espectro de infrarrojo por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) de las películas basadas en gelatina y almidón.

4.4.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Previamente al ensayo, las muestras de las películas fueron deshidratadas en un desecador que contenía en su interior sílica gel para poder identificar eventos térmicos independientes del contenido de agua, ya que la misma ejerce un efecto plastificante en las películas [13,14]. Esta técnica se realizó principalmente para medir las transiciones térmicas de los materiales obtenidos. En la Figura 4.4 se muestran los termogramas correspondientes al flujo total de calor de las muestras. Las T_{gs} identificadas fueron confirmadas mediante el análisis del flujo de calor reversible dado por la modulación. La determinación de las mismas es de suma importancia para seleccionar las condiciones de procesamiento y almacenamiento de las películas, y definir sus posibles aplicaciones. Sus correspondientes temperaturas de transición se presentan en la Tabla 4.4. Las curvas DSC de estas películas presentaron en todos los casos, sólo una T_g seguida de un pico

endotérmico de relajación o envejecimiento (T_{pico}), estudios previos demostraron resultados similares [15]. La T_g es la temperatura a la cual el material cambia desde el estado vítreo al estado elastomérico para un determinado flujo de calentamiento, y se obtuvieron valores que oscilan entre 31 y 53 °C. La incorporación de MeFPIAx en las películas generó un descenso de la T_g , siendo este efecto aún mayor en las películas con MeFPIA2. Un descenso en la T_g está asociado con un aumento en la movilidad de las cadenas poliméricas, es decir, un aumento en la flexibilidad. Ahora bien, con la incorporación de dopamina en las películas este efecto es aún mayor, incrementando el volumen libre y provocando, de esta manera, una disminución de la T_g [15].

En cuanto a la presencia de un pico endotérmico, es característico del proceso de relajación (envejecimiento físico) y se produce debido a que durante la etapa de calentamiento en un experimento mediante DSC, el material recupera la energía liberada durante el almacenamiento en donde las moléculas de gelatina podrían sufrir cambios moleculares, como por ejemplo agregación [15]. Este fenómeno responde por un lado a la disminución del volumen específico que ocurre a medida que el material se relaja, y a la disminución de la movilidad molecular producto de la relajación que hace que la recuperación de energía se produzca a una temperatura más alta [16]. Al añadir MeFPIAx y producirse un aumento de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas (menor volumen específico y menor movilidad molecular) la temperatura del pico endotérmico se desplaza hacia valores mayores.

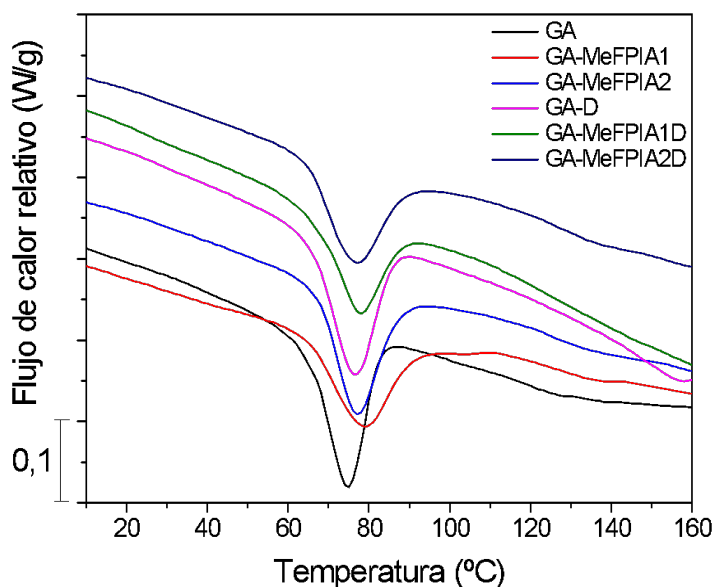


Figura 4.4. Curvas de DSC para las películas de gelatina y almidón.

Tabla 4.4. Temperaturas de transición de las películas de gelatina y almidón.

Películas	T _g (°C)	T _{pico} (°C)
GA	53	75
GA-MeFPIA1	45	79
GA-MeFPIA2	32	77
GA-D	31	76
GA-MeFPIA1D	32	78
GA-MeFPIA2D	31	77

4.4.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los resultados de los análisis termogravimétricos de las películas desarrolladas se presentan en la Figura 4.5. La temperatura inicial de degradación tras la pérdida de agua (T_i) se determinó como la temperatura a la cual ocurre el 15% de la pérdida de masa, mientras que las temperaturas de máxima degradación (T_{max}) para cada etapa se determinaron a partir de los picos de las curvas derivadas (DTG). Los datos de las temperaturas se presentan en la Tabla 4.5. Se pueden observar tres zonas principales de degradación en un intervalo de temperatura desde 30 hasta 700 °C con un residuo del 20%. La primera zona de degradación térmica ocurre cerca de los 100 °C en todas las películas, esto podría atribuirse a la pérdida de humedad y posible volatilización de compuestos de bajo peso molecular [17]. La segunda zona se observa en el intervalo 150-250 °C. Este evento posiblemente implique el inicio de la degradación parcial de las proteínas y la pérdida de glicerol [18]. A su vez, tal como se vio en el capítulo anterior, comienzan a degradarse los polímeros sintetizados, lo cual explica que la degradación térmica en este intervalo de temperaturas sea más significativa para las muestras con MeFPIAx (GA-MeFPIA1 y GA-MeFPIA2) en comparación con la película control (GA). Con la presencia de dopamina ocurre lo contrario, las películas con dopamina sin agregado de MeFPIAx (GA-D) presentan mayor intensidad de degradación que aquellas con polímero (GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2D). Esto sugiere que la dopamina podría interferir entre las interacciones fuertes que se dan entre la gelatina y los polímeros MeFPIAx, generándose nuevos tipos de interacciones. En la tercera zona que ocurre cerca de los 300 °C se alcanzó una pérdida de masa en torno al 50% respecto de la masa inicial. Estos resultados podrían corresponder probablemente a los procesos de degradación de los polisacáridos [19] y la completa degradación de las proteínas y polímeros sintetizados [20]. Es de destacar que el 50% de

la masa inicial se conservó a temperaturas de hasta 300 °C. La masa residual o contenido de cenizas de la muestra es de aproximadamente 20% [21].

Tabla 4.5. Temperaturas correspondientes a las temperaturas iniciales y máximas de degradación de las películas basadas en gelatina y almidón.

Películas	T _i (°C)	T _{max 1} (°C)	T _{max 2} (°C)
GA	174	241	294
GA-MeFPIA1	174	242	292
GA-MeFPIA2	171	239	298
GA-D	194	240	292
GA-MeFPIA1D	163	254	288
GA-MeFPIA2D	161	245	289

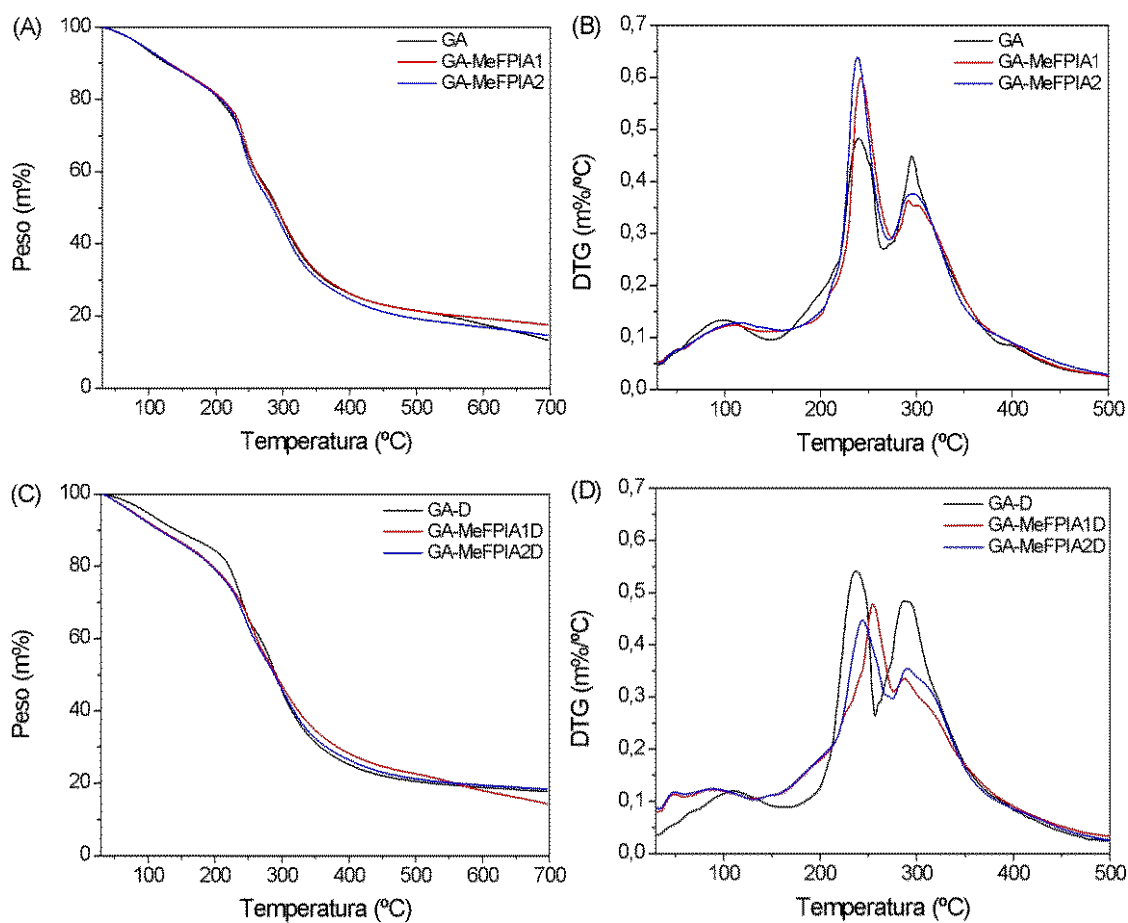


Figura 4.5. Curvas termogravimétricas: (A) y (C) Pérdida de peso en función de la temperatura, (B) y (D) Derivada del porcentaje del peso en función de la temperatura.

4.4.4. Propiedades mecánicas

La propiedad deseada de un material depende de la aplicación específica. En general, un material puede ser rígido e indeformable para proporcionar estructura e integridad, o bien una película flexible y deformable para otras aplicaciones [22]. La resistencia a la tracción (TS), el módulo de Young (MY) y la elongación a la rotura (e%) son parámetros que representan las propiedades mecánicas de las películas y dependen de sus características microestructurales. Estos parámetros se presentan en la Tabla 4.6, y se observó un aumento en la TS y e% con la adición de MeFPIAx (GA-MeFPIA1 y GA-MeFPIA2), mostrando estadísticamente una variación significativa ($p < 0.05$). La gelatina es un biopolímero muy valioso; sin embargo, sus pobres propiedades mecánicas limitan su aplicación como material de envasado [23]. La mejora considerable en TS y e% puede deberse a la presencia de un aumento de las fuerzas electrostáticas e interacciones de enlaces puente de hidrógeno entre las macromoléculas de gelatina y los grupos carboxilo de los MeFPIAx e hidroxilo del almidón, que constituyen una red estable con mejores propiedades mecánicas [24].

La diferencia entre las películas con ambos polímeros funcionalizados es que MeFPIA1 tiene un mayor número de grupos carboxilo libres capaces de interactuar con las cadenas proteicas. La gelatina tiene un carácter anfótero debido a los grupos funcionales de los aminoácidos, como son los grupos amino y carboxilo terminales creados durante la hidrólisis del colágeno [25], por lo que poseen la capacidad de formar enlaces con las cadenas poliméricas. No se observaron diferencias en los valores de MY.

Tabla 4.6. Parámetros mecánicos de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	TS (MPa)	MY (MPa)	e (%)
GA	2,86 ± 0,32 ^a	15,7 ± 3,0 ^a	140 ± 6 ^a
GA-MeFPIA1	5,24 ± 0,26 ^b	12,2 ± 2,4 ^{a,b}	199 ± 7 ^b
GA-MeFPIA2	4,18 ± 0,51 ^c	12,6 ± 4,8 ^{a,b}	170 ± 7 ^{c,d}
GA-D	3,07 ± 0,15 ^{a,d}	16,4 ± 2,0 ^a	146 ± 10 ^a
GA-MeFPIA1D	3,59 ± 0,29 ^d	10,9 ± 4,0 ^{a,b}	183 ± 5 ^d
GA-MeFPIA2D	3,32 ± 0,29 ^{a,d}	9,9 ± 1,9 ^b	166 ± 12 ^c

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

Se obtuvieron resultados similares con la incorporación de dopamina a la mezcla. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las películas GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2D en comparación con la muestra solamente con dopamina sin polímeros

modificados (GA-D). Las películas GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2D mostraron valores más altos de e%, probablemente debido al aumento de las interacciones generadas por ambos polímeros (como se mencionó anteriormente) y dopamina añadida para formar puntos de red [26]. La dopamina pertenece a la familia de los catecoles y su incorporación en casi cualquier matriz polimérica induce la reacción con los grupos funcionales presentes en la cadena principal de un polímero en un entorno débilmente alcalino [24]. Aunque hubo un ligero aumento en la TS, como era de esperarse, esta diferencia no fue significativa. Además, se observó una disminución en el MY. Esto podría explicarse debido a que la dopamina puede interferir entre las interacciones fuertes entre la gelatina y las cadenas poliméricas.

4.4.5. Color

El color de las películas biopoliméricas se considera un factor importante para evaluar su calidad. Se afirma que el color está influenciado por varios factores, como el valor de pH, el grado de reticulación, el contenido de plastificante, el proceso térmico y el procedimiento de fabricación [27]. Las propiedades de color se muestran en la Tabla 4.7, donde se observó un claro cambio en los valores de color con la adición de MeFPIAx. La presencia de MeFPIA2 en la formulación provocó una disminución de la luminosidad (disminución de los valores L^*) de las muestras. Además, las películas con MeFPIA1 y MeFPIA2 se volvieron verdosas (disminución de los valores a^*) y amarillentas (aumento de los valores b^*), el aumento más pronunciado en el color amarillo de las películas se observó con la adición de MeFPIA2. Por lo tanto, el cambio de color ΔE^* es significativo para ambos polímeros y perceptible al ojo humano, como se puede apreciar en la Figura 4.2; este cambio fue más abrupto para el polímero con menor potencial negativo.

Por otro lado, la adición de dopamina produjo un cambio aún mayor en todos los parámetros estudiados. El valor L^* de las muestras se redujo significativamente. Las muestras con dopamina tienden a ser rojizas (aumento de los valores de a^*), más aún en la muestra con MeFPIA2. A su vez, en todas las muestras se observó un aumento de los valores de b^* hacia el amarillo.

En general, las películas incoloras son deseables en muchas aplicaciones, ya que permite una mejor visibilidad del contenido o del objeto al que se aplica el material. Los apósitos transparentes son útiles cuando los profesionales médicos desean controlar la cicatrización de heridas, sin necesidad de remover el material [28]. En cuanto los materiales para alimentos, la transparencia permite evaluar la frescura y apariencia de los productos

mediante la inspección visual antes de comprarlos. Sin embargo, a veces la transparencia podría ser un inconveniente debido a la exposición a la luz, provocando, por ejemplo, el deterioro de los alimentos. Por lo tanto, las películas con ese color podrían proteger los alimentos de la degradación de la luz [29]. En este sentido, la incorporación de MeFPIAx podría ser una ventaja.

Tabla 4.7. Propiedades de color de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	L*	a*	b*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
GA	89 ± 1 ^a	1 ± 0,02 ^a	-1,0 ± 0,1 ^a				
GA-MeFPIA1	87 ± 1 ^a	-3,0 ± 0,2 ^c	18 ± 1 ^c	-2	-4	18	19
GA-MeFPIA2	83 ± 1 ^c	-3,0 ± 0,2 ^c	34 ± 4 ^b	-6	-4	35	36
GA-D	56 ± 3 ^b	9 ± 1 ^b	34 ± 1 ^b	-33	7	35	49
GA-MeFPIA1D	62 ± 2 ^e	8 ± 1 ^b	37 ± 1 ^b	-27	6	38	47
GA-MeFPIA2D	47 ± 1 ^d	16,0 ± 0,4 ^d	36 ± 2 ^b	-42	14	37	58

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

4.4.6. Permeabilidad experimental al vapor de agua (P_w^{exp})

La calidad de la mayoría de los productos alimenticios se deteriora debido a la absorción de humedad, y esto puede ocurrir entre los alimentos y el ambiente atmosférico, por lo que es importante caracterizar las propiedades de barrera de las películas frente al vapor de agua [30]. El flujo de agua a través de las películas poliméricas no se produce a través de los poros, pero se puede entender teniendo en cuenta que el proceso ocurre en tres etapas: (i) sorción de vapor de agua en la capa superficial de la película en contacto con la h.r. interna más alta; (ii) difusión de las moléculas permeantes a través de la película; y (ii) desorción de vapor de agua desde la otra superficie de la película, donde la h.r. externa es más baja [31]. Por lo tanto, la estructura química, la polaridad, el grado de cristalinidad, densidad, grado de reticulación, peso molecular y polimerización, así como la presencia de plastificantes, son factores a tener en cuenta porque afectarán la permeabilidad al vapor de agua [32, 33].

Como se puede observar en la Tabla 4.8, la incorporación de MeFPIAx provocó un aumento en la P_w^{exp} . Las proteínas y los polisacáridos interactúan fuertemente con el agua; por lo tanto, las películas desarrolladas a base de estos biopolímeros son películas hidrofílicas [32]. Considerando que la estructura polimérica de la matriz influye significativamente en la permeabilidad y que los polímeros hidrofílicos suelen favorecer este fenómeno [34], se puede decir que la incorporación de MeFPIAx incrementa los grupos

afines al agua en la matriz, como los grupos carboxilo, lo cual favorece la P_w^{exp} [35]. En el caso de GA-MeFPIA1, al presentar mayor cantidad de grupos carboxílicos, el valor de P_w^{exp} es aún más alto. Además, el polímero incrementó las interacciones entre los componentes, lo que mejoró la elongación de los materiales. Al aumentar la movilidad de las cadenas poliméricas, se facilita el paso del vapor de agua a través de las películas [36].

Si estos materiales se destinan a ser utilizados como apósitos para heridas, lo ideal sería que permitan el transporte de humedad y gases para prevenir la deshidratación excesiva y la acumulación de exudados [37]. Por lo tanto, sería ventajoso que la incorporación de los polímeros sintetizados (MFPIAx) aumente la P_w^{exp} en este tipo de aplicaciones. Otros estudios han observado resultados similares en películas de quitosano entrecruzado con PVA carboxilado, donde hay un aumento en la permeabilidad al vapor de agua al añadir un agente entrecruzante. Los autores indicaron que esto se debe a la incorporación de grupos hidrofílicos [35].

Tabla 4.8. Valores de la P_w^{exp} , D_w^{eff} y S_w^{eff} de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	P_w^{exp} (10^{-10} g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)	D_w^{eff} (10^{-13} m ² s ⁻¹)	S_w^{eff} (g m ⁻³ Pa ⁻¹)
GA	9,0 ± 0,1 ^a	10,9 ± 0,4	826 ± 21
GA-MeFPIA1	10,8 ± 0,1 ^b	13,1 ± 0,4	826 ± 20
GA-MeFPIA2	9,1 ± 0,1 ^a	9,8 ± 0,4	930 ± 25
GA-D	8,6 ± 0,1 ^c	11,4 ± 0,4	755 ± 18
GA-MeFPIA1D	8,7 ± 0,1 ^c	13,5 ± 0,5	643 ± 16
GA-MeFPIA2D	8,6 ± 0,1 ^c	10,1 ± 0,4	854 ± 21

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

Por otro lado, al comparar las muestras con MeFPIAx con las películas que contienen tanto MeFPIAx como dopamina, se observa que la incorporación de dopamina redujo ligeramente los valores de P_w^{exp} . Esto puede deberse a que la dopamina podría disminuir la cantidad de grupos ácidos presentes en ambos polímeros, debido a la formación de nuevas interacciones. Como resultado, al haber menos grupos funcionales que sean afines al vapor de agua, los valores de permeabilidad fueron menores.

4.4.7. Hidratación

La investigación del transporte del vapor de agua en materiales poliméricos es fundamental para las aplicaciones de envasado, especialmente en el envasado de alimentos. De hecho, la transferencia de agua a través de un material de envasado puede tener efectos perjudiciales en el producto alimenticio, como pérdida de calidad, degradación

acelerada (por ejemplo, a través del desarrollo microbiano) y la reducción de la vida útil de los alimentos [38]. El agua de hidratación afecta a las principales propiedades estructurales y funcionales de las películas hidrofílicas [39], ya que el agua actúa como plastificante, intercalándose entre las cadenas poliméricas y aumentando su separación, lo que reduce la temperatura de transición vítrea y afecta la flexibilidad del material [40]. Por lo tanto, es sumamente importante caracterizar la hidratación de las películas desarrolladas, ya que estos ensayos brindan información sobre la movilidad del agua en los materiales. Además, las cinéticas de hidratación permiten obtener la solubilidad del agua en la película S_w^{eff} y el coeficiente de difusión D_w^{eff} . Las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas dependen tanto de S_w^{eff} como de D_w^{eff} [36]. Como se mencionó anteriormente, el D_w^{eff} se calculó indirectamente teniendo en cuenta los valores de P_w^{exp} y S_w^{eff} , a partir de la Ecuación 4.6. En la Tabla 4.8 se pueden observar los valores de S_w^{eff} y D_w^{eff} correspondientes a cada película. Se pudo determinar que los valores de D_w^{eff} fueron similares cuando se compara cada película sin dopamina vs con dopamina (GA vs GA-D, GA-MeFPIA1 vs GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2 vs GA-MeFPIA2D). Sin embargo, la incorporación de dopamina produjo un descenso de los valores de P_w^{exp} , tanto en presencia como en ausencia de MeFPIAx. Esto se debe a que los valores de S_w^{eff} fueron menores en aquellas películas con dopamina añadida a su formulación. Este efecto se debe, como se mencionó en el apartado anterior, a que la dopamina posiblemente genera nuevas interacciones con los grupos carboxílicos presentes en los polímeros, lo cual reduce la afinidad del material hacia el agua. Esto se manifiesta en una menor solubilidad del vapor de agua en el material.

La Figura 4.6 muestra las curvas que representan las cinéticas de hidratación a 90% h.r. de las películas con ventilación. Las curvas que conectan los datos experimentales fueron los mejores ajustes que se obtuvieron utilizando la Ecuación 4.7. A su vez, en la Tabla 4.9 se detallan los parámetros cinéticos obtenidos a partir de dicho ajuste.

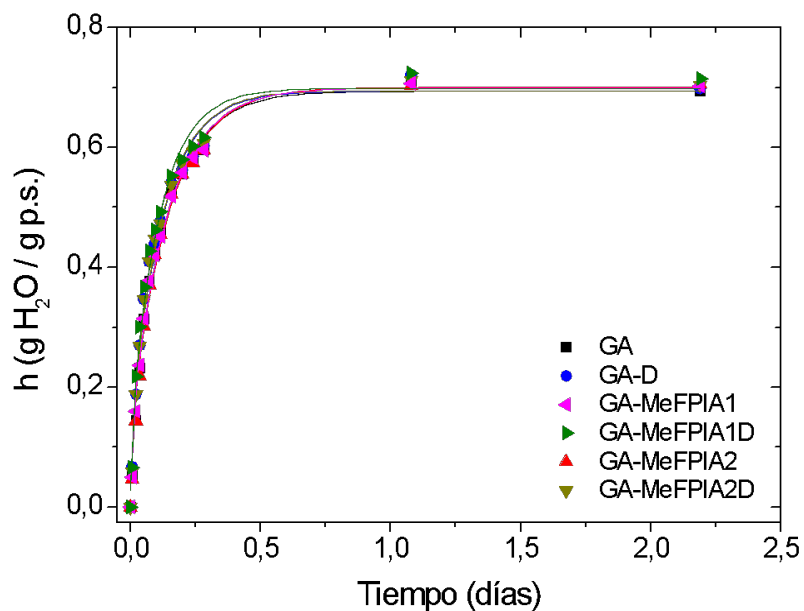


Figura 4.6. Cinética de sorción de agua a 90% h.r. de películas a base de gelatina y almidón.

Tabla 4.9. Valores de los parámetros cinéticos de hidratación a 90% h.r. obtenidos por el ajuste con el modelo de Crank, para las películas con ventilación.

Películas	Modelo de Crank			
	D_w ($10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	h_w (g H ₂ O por g p.s.)	S_w^{eff} ($\text{g m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$)	R^2
GA	$10,8 \pm 0,9$	$0,69 \pm 0,02$	826 ± 21	0,986
GA-MeFPIA1	$11,5 \pm 0,9$	$0,70 \pm 0,02$	826 ± 20	0,988
GA-MeFPIA2	$8,7 \pm 0,7$	$0,70 \pm 0,02$	930 ± 25	0,985
GA-D	$11,0 \pm 0,9$	$0,69 \pm 0,02$	755 ± 18	0,987
GA-MeFPIA1D	14 ± 1	$0,70 \pm 0,02$	643 ± 16	0,984
GA-MeFPIA2D	$11,2 \pm 0,9$	$0,69 \pm 0,02$	854 ± 21	0,987

Cuando una película completamente deshidratada se expone a un ambiente de alta humedad relativa, la película experimenta gradualmente transformaciones en la movilidad de las cadenas poliméricas (en algunos casos, pasando de un estado vítreo a uno elastomérico a temperatura ambiente) debido al avance del frente de agua [32,33]. Dado que D_w es un fenómeno de transporte de masa que no solo representa la difusión de Fick, sino todos los diferentes mecanismos de transporte de agua que ocurren en el material, D_w se concibe como una difusividad global [38]. Por lo tanto, D_w representa un valor promedio durante todo el proceso. En primer lugar, se puede observar que el modelo de Crank se ajustó bien a los datos experimentales en todas las películas. Como se puede apreciar en la Figura 4.6 y en la Tabla 4.9, tanto la adición de MeFPIAx como de dopamina no provocó

ningún cambio en el contenido de agua en equilibrio a 90% h.r. (h_{∞}). Sin embargo, es interesante destacar que la incorporación de dopamina en todas las películas provocó una disminución en los valores de solubilidad (S_w^{eff}), tal como se mencionó anteriormente), y un aumento en los coeficientes de difusión en comparación con las películas que no contenían dopamina en su formulación.

4.4.8. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas

El conocimiento del transporte de agua o de una solución hacia el interior de algunos materiales durante el proceso de hinchamiento presenta una importancia significativa en diferentes campos, como la medicina (sistemas de administración de medicamentos), medio ambiente (eliminación de contaminantes) y agricultura (sistemas de fertilización). La Figura 4.7 muestra el comportamiento de hinchamiento de las diferentes películas en PBS a 25 °C y 37 °C.

Las películas control (GA) mostraron el mayor grado de hinchamiento, como se puede ver en la Figura 4.7A y en la Tabla 4.10; y fueron las matrices más débiles. El hinchamiento de las películas control no puede determinarse fácilmente debido a su disolución en agua. Con el tiempo, esas películas perdieron su capacidad de hincharse, así como su integridad, siendo disueltas en el medio, como ocurrió a 37 °C, donde no se pudo concluir el ensayo. Por lo tanto, los agentes entrecruzantes o de refuerzo son necesarios para introducir enlaces covalentes en la red, previniendo la disolución de los geles [41]. La capacidad de hinchamiento depende de muchos factores, como las propiedades del líquido de hinchamiento (pH, temperatura, naturaleza y concentración de sales y propiedades, entre otros) y propiedades de la propia matriz (relación gelatina/almidón, grado de degradación, presencia de impurezas y condiciones bajo las cuales se secaron las películas de gelatina, entre otros) [42].

Las películas con MeFPIA1 y MeFPIA2 que se muestran en la Figura 4.7A, presentaron un menor grado de hinchamiento en comparación con el control; y en todas las condiciones ensayadas fueron más estables, debido a la aparición de nuevas interacciones, principalmente por la presencia de grupos carboxilo libres. Aquellos polímeros que presentan en su estructura grupos carboxilo son capaces de desarrollar diferentes interacciones intermoleculares como interacciones electrostáticas, enlaces puente de hidrógeno e ión-dipolo con otros polímeros. Muchas investigaciones han demostrado que estas interacciones ejercen una fuerte influencia en el comportamiento de los hidrogeles con respecto al hinchamiento [43].

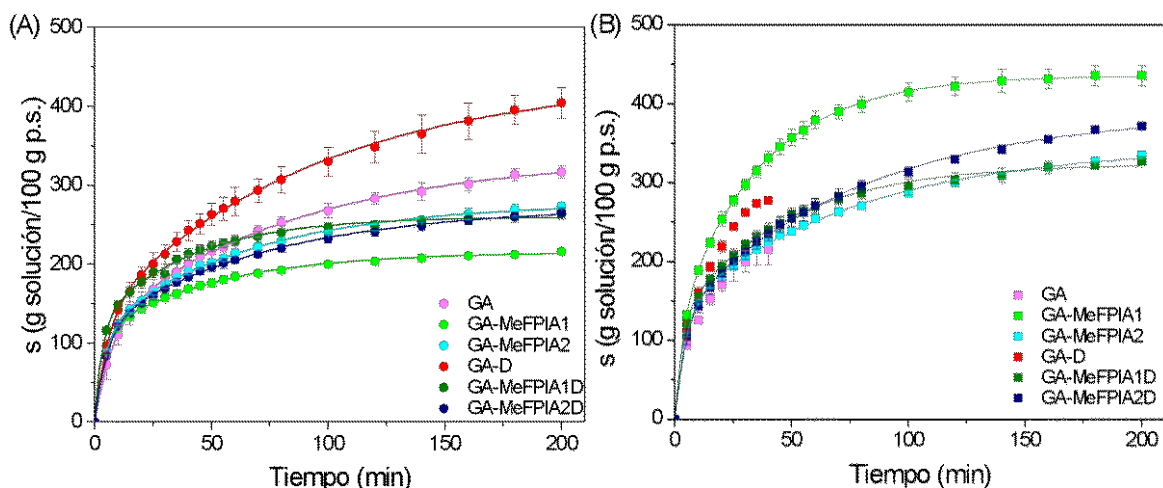


Figura 4.7. Curvas de hinchamiento de las diferentes películas a (A) 25 °C y (B) 37 °C en PBS.

En este estudio, las muestras que contenían dopamina conservaron mejor su integridad estructural durante el tiempo de ensayo. Sin embargo, presentaron un hinchamiento mayor en comparación con aquellas películas sin dopamina. Al diseñar películas multicomponentes, hay que tener en cuenta que son varios factores los que determinan las propiedades finales del material, como, por ejemplo: estructura química de los componentes, cargas eléctricas, grado de interacción, orden de mezcla, pH, entre otros [44]. A su vez, distintas conformaciones son las que pueden adoptar las cadenas poliméricas, desde estructuras ordenadas (modelo de escalera) a estructuras desordenadas [45], aún más considerando la distribución al azar de las cargas en los polímeros MeFPIAx. Por lo tanto, es posible que la dopamina interfiera con las fuertes interacciones entre la gelatina y el polímero, y se generen otro tipo de interacciones, que, si bien brindan estabilidad, las cadenas poliméricas podrían estar más distanciadas y, por lo tanto, favorecer el hinchamiento y retención de la solución.

Cabe señalar que durante la prueba de hinchamiento podría ocurrir la solubilización de alguno de los componentes, como podría ser el caso de la dopamina. Aunque la misma no entrecruzó completamente con las cadenas poliméricas como se esperaba, porque parte fue liberada al medio de solución, aumentó el número de enlaces, especialmente cuando se incorpora también MeFPIAx, que contiene grupos carboxilo y amonio para interactuar, proporcionando mayor estabilidad [25].

La temperatura de conversión de la gelatina se determina como su punto de fusión (proceso sol-gel), y el gel se convierte en una solución a medida que la temperatura aumenta de 30 a 40 °C [46]. Entre todas las variables examinadas, el aumento de temperatura de 25 a 37 °C produjo un aumento en el proceso de hinchamiento. Este efecto

se causa por un rápido acercamiento al punto de fusión del gel a medida que se eleva la temperatura. Así, las películas hinchadas a 37 °C fueron más débiles que las películas hinchadas a 25 °C, lo que indica una menor resistencia al hinchamiento [47].

Está bien establecido que, cuando el comportamiento de absorción de agua o solución en polímeros se considera una difusión verdaderamente Fickiana, el gráfico de $(W_t - W_0)/W_0$ frente a $t^{1/2}$ debería ser lineal hasta casi un 60% de aumento en la masa del hidrogel, independientemente de cualquier dependencia del coeficiente de difusión sobre la concentración de humedad [30]. De esta manera, y de acuerdo con la segunda ley de Fick y considerando una difusión unidimensional, el contenido de la solución como función del tiempo se puede ajustar con la ecuación de la ley de potencia cuando n es igual a 0.5, y el transporte de la solución sigue una difusión Fickiana.

$$\frac{(W_t - W_0)}{W_0} = kt^n \quad (4.15)$$

En consecuencia, al graficar $(W_t - W_0)/W_0$ frente a $t^{1/2}$ en las etapas iniciales de hinchamiento, se puede analizar el comportamiento Fickiano. Los gráficos correspondientes se muestran en la Figura 4.8. Como se puede observar, las curvas de absorción de la solución de las películas para todas las formulaciones fueron no lineales hasta un aumento del 60% en la masa de hidrogel. Por lo tanto, como se puede ver en la figura, la mayoría de las diferentes formulaciones no siguieron la difusión Fickiana unidimensional, por lo que los valores que toma n deben ser diferentes a 0,5, y los datos deben ser ajustados por un proceso no fickiano o de difusión anómalo.

Se describe que los factores dinámicos, incluidos los reordenamientos en la estructura del polímero, como respuesta al proceso de sorción y difusión de la solución, pueden ser responsables de las desviaciones del comportamiento ideal de Fick. De hecho, estos cambios estructurales tienen sus correspondientes constantes de tiempo de relajación. Consecuentemente, los datos experimentales se ajustaron usando una función biexponencial como se puede observar en la Ecuación 4.9. Esta ecuación expresa que el proceso de hinchamiento se produce a través de dos procesos diferentes, uno más rápido que el otro. Este modelo ajustó bastante bien los datos obtenidos según el comportamiento de las películas durante el hinchamiento (ver las líneas de la Figura 4.7).

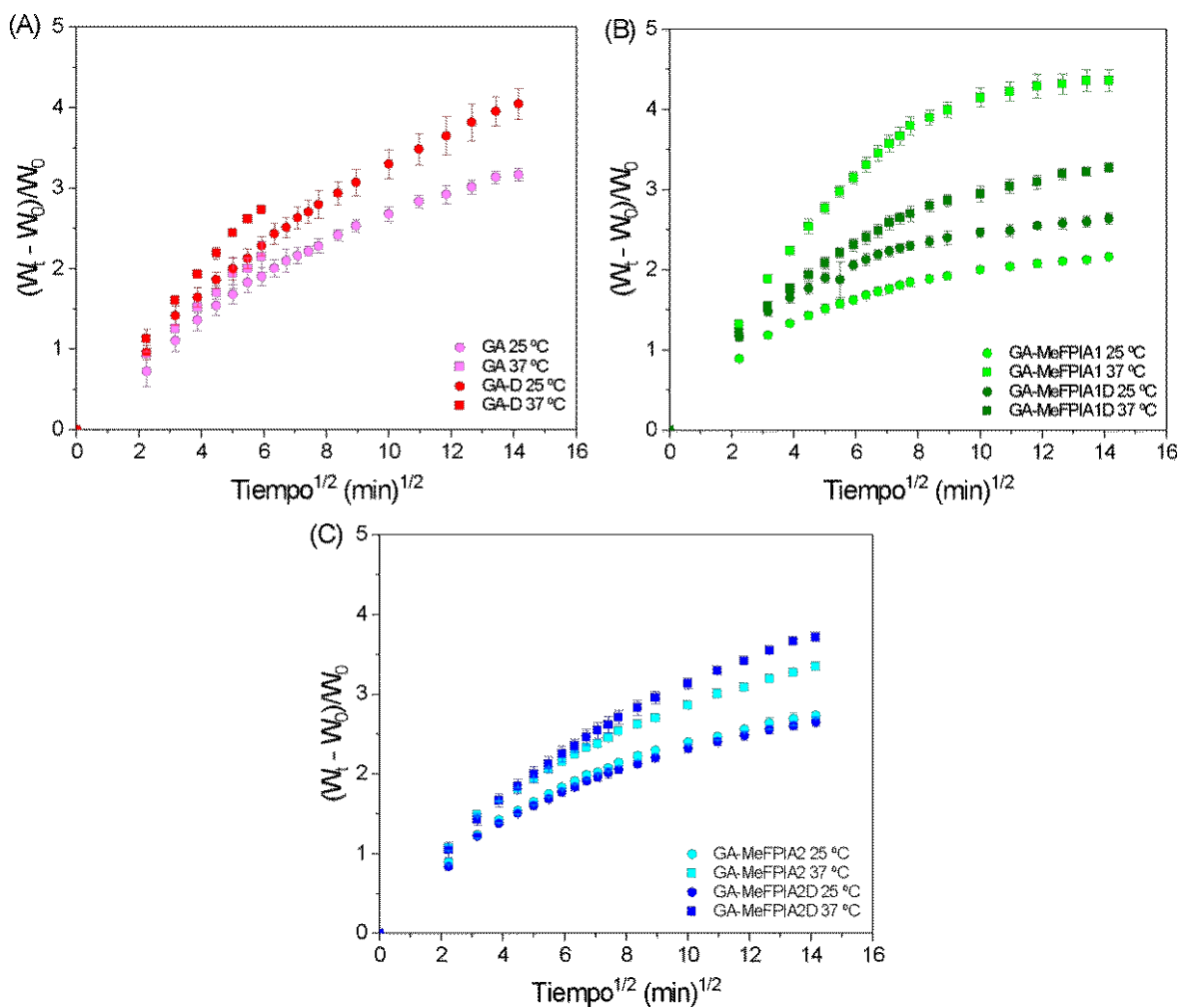


Figura 4.8. Representación de $(W_t - W_0)/W_0$ frente a $t^{1/2}$ a 25 y 37 °C en PBS: (A) GS y GS-D, (B) GS-MeFPIA1 y GS-MeFPIA1D y (C) GS-MeFPIA2 y GS-MeFPIA2D.

Los resultados de los diferentes procesos de relajación que contribuyen a la absorción de la solución se muestran en la Tabla 4.10, donde ϕ_1 y ϕ_2 son las fracciones de soluciones que contribuyen a los procesos 1 y 2; esto es $\Delta s_1/s_\infty$ y $\Delta s_2/s_\infty$ [48]. En todas las curvas, la correlación cuadrática fue superior a 0,999, lo que indica la precisión del ajuste. La Tabla 4.8 muestra que los parámetros para GA y GA-D a 37 °C no se determinaron (n.d.), porque las películas se desintegraron en la solución y, por lo tanto, no se pudo ajustar.

Los dos procesos, sugeridos por el modelo biexponencial, se pueden atribuir a un rápido mecanismo de absorción de la solución más asociado con la interacción de la solución con la matriz polimérica, y un proceso lento relacionado con la solución, menos asociado con la matriz, y eso podría estar llenando cavidades vacías y formando grandes multicapas de solución.

Tabla 4.10. Parámetros cinéticos de hinchamiento de las distintas películas.

Películas	T (°C)	s_w (g/g)	Δs_1 (g/g)	τ_1 (min)	ϕ_1	Δs_2 (g/g)	τ_2 (min)	ϕ_2
GA	25	336 ± 7	118 ± 4	7.6 ± 0.4	0.35	218 ± 3	85 ± 4	0.65
GA-MeFPIA1		215 ± 5	109 ± 3	4.0 ± 0.2	0.51	106 ± 2	50 ± 2	0.49
GA-MeFPIA2		277 ± 7	114 ± 4	4.6 ± 0.3	0.41	163 ± 3	65 ± 3	0.59
GA-D		436 ± 10	132 ± 6	5.7 ± 0.4	0.30	304 ± 4	93 ± 5	0.70
GA-MeFPIA1D		260 ± 11	123 ± 6	3.0 ± 0.4	0.47	137 ± 5	38 ± 3	0.53
GA-MeFPIA2D		273 ± 5	117 ± 3	5.1 ± 0.3	0.43	156 ± 2	73 ± 3	0.57
GA		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GA-MeFPIA1	37	436 ± 7	118 ± 4	3.4 ± 0.2	0.27	318 ± 3	36 ± 1	0.73
GA-MeFPIA2		345 ± 7	137 ± 4	4.5 ± 0.3	0.40	208 ± 3	76 ± 4	0.60
GA-D		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GA-MeFPIA1D		324 ± 10	125 ± 6	3.1 ± 0.4	0.39	199 ± 4	46 ± 2	0.61
GA-MeFPIA2D		388 ± 8	129 ± 5	4.6 ± 0.4	0.33	259 ± 3	78 ± 4	0.67
GA		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

4.4.9. Actividad antioxidante

La Figura 4.9 exhibe los resultados de la actividad antioxidante de las películas en diferentes soluciones. En base a los resultados obtenidos, se pudo observar que hubo una disminución en la absorbancia de las muestras frente al control y, por lo tanto, un aumento del valor RSA%, demostrando la actividad antioxidante de las películas desarrolladas. Estos valores fueron aún más altos en películas con dopamina, y se observó un aumento de dicho valor con el aumento del contenido de agua de la solución B. Es bien sabido que la gelatina es soluble en agua y en soluciones acuosas de alcoholes polihídricos; sin embargo, es prácticamente insoluble en solventes orgánicos menos polares como acetona, tetracloruro de carbono, etanol, éter, benceno, dimetilformamida y la mayoría de los demás disolventes orgánicos no polares [23]. Considerando esto, como el contenido de agua en la solución B aumentó, también lo hace la afinidad con el agua, y las muestras se hincharon más rápidamente, liberando dopamina más fácilmente al medio, aumentando el poder antioxidante de la dopamina. El aumento de la actividad antioxidante en muestras con dopamina añadida se debió al hecho de que muchos estudios han indicado que la dopamina es un fuerte inhibidor de radicales libres, por lo que reacciona fuertemente con el radical ABTS [1]. La molécula de dopamina tiene un grupo hidroxilo fenólico en la estructura (como la mayoría de los antioxidantes sintéticos y naturales), y se ha reconocido que los antioxidantes fenólicos funcionan como donantes de hidrógeno, actuando como un

secuestrador de radicales libres [49]. Cuando se realizó el ensayo en la solución B (solución de agua), las formulaciones con MeFPIA2 mostraron significativa actividad antioxidante incluso sin la presencia de dopamina. Este hecho puede deberse a un mayor potencial de donación de hidrógeno de la matriz formada.

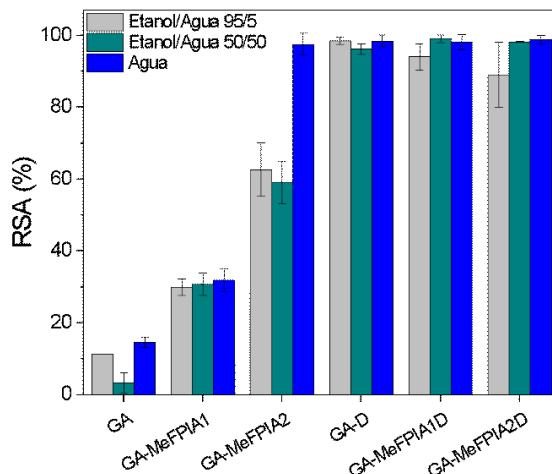


Figura 4.9. Actividad antioxidante de las películas por el método ABTS.

4.4.10. Actividad antimicrobiana

Los resultados presentados en la Figura 4.10 muestran las reducciones bacterianas (%) de las películas desarrolladas después de un período de incubación de 24 h a 37 °C con ligera agitación en contacto con bacterias de *S. aureus*. En base a los porcentajes de reducción obtenidos, se puede concluir que las películas control no mostraron ninguna inhibición. Contrariamente, las películas con dopamina, GA-D, GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2D, mostraron una completa inhibición debido a la actividad antimicrobiana del compuesto fenólico [24].

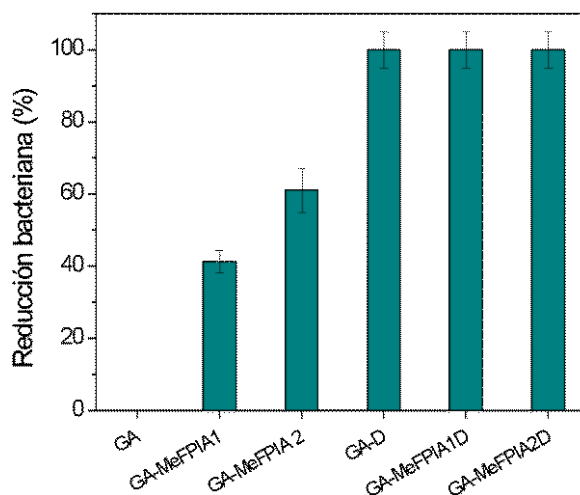


Figura 4.10. Porcentaje de reducción bacteriana frente a *S. aureus* de las diferentes películas.

Estudios han demostrado la actividad antibacteriana significativa de la dopamina en ensayos *in vitro* contra 389 cepas de bacterias, incluyendo 3 géneros Gram-positivos y 11 Gram-negativos [50]. Los valores de Concentración Mínima de Inhibición (MIC), determinados mediante métodos de dilución en caldo, se encontraron en el rango de 25 a 400 µg/mL frente a la mayoría de las bacterias analizadas, incluyendo varias patógenas. Por lo tanto, la dopamina tiene el potencial de desarrollarse como un agente antimicrobiano tanto en forma individual como en combinación con otros agentes antimicrobianos, para combatir infecciones bacterianas [50]. A su vez, las películas que contienen MeFP1A1 y MeFP1A2 (sin dopamina) también presentaron actividad antimicrobiana. Estudios demostraron que existen inicialmente interacciones electrostáticas entre las cadenas poliméricas catiónicas y los fosfolípidos cargados negativamente dentro de la membrana celular bacteriana. Luego, la penetración de la parte catiónica en la pared celular y la interacción destructiva con la membrana citoplasmática conducen a la liberación de los componentes intracelulares y, en consecuencia, a la muerte celular [51]. Esta actividad fue aún mayor para aquellas muestras con MeFP1A2, como se esperaba, porque ese polímero presentó un mayor grado de funcionalización (cuaternización), y más grupos catiónicos están disponibles en la superficie de la película para el comportamiento de eliminación por contacto directo.

4.4.11. Migración específica y cinética de liberación de dopamina en simulante alimentario graso

La curva de calibración realizada a partir de soluciones estándar con distintas concentraciones de dopamina se utilizó para determinar su concentración presente en las muestras de simulante. En la Tabla 4.11 se presentan los valores de la migración específica de dopamina a los 10 días de incubación a 22 °C. Los resultados se expresaron como RSA (%) y como mg equivalentes de vitamina C/mL.

Tabla 4.11. Migración específica de dopamina en simulante alimentario, RSA (%) y VCEAC (mg/mL).

Películas	Concentración de dopamina (mg/kg de simulante)	RSA (%)	Equivalentes de Vitamina C (mg/mL)
GA-D	80 ± 5 ^a	91,2 ± 0,7	4,13 ± 0,02
GA-MeFP1A1D	101 ± 1 ^b	96,1 ± 0,9	4,38 ± 0,01
GA-MeFP1A2D	104 ± 6 ^b	98,3 ± 0,5	4,49 ± 0,06

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey (P≥0,05).

Se puede observar que los valores de actividad antioxidante de los simulantes que estuvieron en contacto con las películas que contenían polímero y dopamina (GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2D) fueron mayores en comparación con los valores obtenidos a partir de la película control (GA-D). Esto era de esperarse, ya que las películas con polímero y dopamina fueron las que liberaron mayor concentración de dopamina al simulante durante el tiempo de ensayo. Por lo tanto, a mayor concentración de dopamina presente en el simulante, mayor será el poder antioxidante. Además, todas las muestras brindaron excelentes valores de RSA%. Algunos autores señalan que la capacidad antioxidante de la dopamina se debe a los grupos hidroxilo presentes en su estructura. Se identifica como un fuerte antioxidante soluble en agua con mayor potencia antioxidante que el glutatión, los aditivos alimentarios como el hidroxianisol e hidroxitolueno butilado (BHA y BHT, respectivamente), algunos polifenoles como la luteolina, quercetina y catequina, y de potencia similar a los antioxidantes más fuertes como galocatequina galato y ácido ascórbico [52].

En la Figura 4.11 se puede observar la cinética de liberación de la dopamina presente en las películas desarrolladas en contacto con el simulante alimentario graso (etanol al 50% v/v en agua destilada). Como se explicó en la Sección 4.4.8, las películas con agregado de polímero presentaron un menor grado de hinchamiento en comparación con el control. Por lo tanto, es lógico que inicialmente el simulante en contacto con la película GA-D presente mayor concentración de dopamina, en comparación con el simulante en contacto con GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2D. Asimismo, se puede observar que rápidamente alcanza un estado de equilibrio. Contrariamente, a partir de las 24 horas el simulante en contacto con las películas GA-MeFPIA1D y GA-MeFPIA2D presentó valores más altos de concentración de dopamina, sin haber alcanzado el equilibrio una vez concluido el tiempo de ensayo. Se esperaría que las películas con dopamina sin adición de polímero presenten una mayor concentración de dopamina en el simulante, dado que, al evaluar su capacidad de hinchamiento, fueron las matrices más débiles y las que más se hincharon. En este caso, es posible que la dopamina que no haya reaccionado con la gelatina y el almidón, sea liberada al medio, al hincharse rápidamente la película. En cuanto a las películas con MeFPIAx, es posible que las interacciones entre el polímero y la gelatina sean más intensas, y la dopamina podría actuar como un plastificante en la matriz, liberándose gradualmente. Sin embargo, la determinación de las interacciones predominantes entre varios componentes en los materiales puede ser un proceso complejo que depende de diversos factores (estructura química, cargas eléctricas, grado de interacción, orden de mezcla, pH,

entre otros) [44]. Estos resultados se han ajustado a una liberación biexponencial, donde los parámetros cinéticos obtenidos se detallan en la Tabla 4.12.

La dopamina pertenece a la familia de las catecolaminas que son un grupo de aminas con un anillo de fenilo 3,4-dihidroxi-sustituido. Se encuentran principalmente en los animales y son bien conocidas por su rol como neurotransmisores en mamíferos, aunque también se han encontrado catecolaminas en muchas plantas y su síntesis está regulada por condiciones de estrés. Se ha identificado una larga lista de organismos vegetales responsables de la biosíntesis de catecolaminas. Estudios previos reportaron hasta 44 especies de plantas, 29 de las cuales están presentes en la dieta humana, que contienen cantidades razonables de estos compuestos en cada órgano de la planta [53]. Por ejemplo, la dopamina se encuentra presente en altas concentraciones en banano (*Musa acuminata*, *Musa sapientum*), plátano (*Plantago major*), papa (*Solanum tuberosum*) y aguacate (*Persea americana*) [54]. Como se puede observar en la Tabla 4.11, las concentraciones de dopamina presentes en el simulante superan las concentraciones reportadas en ciertas frutas, como, por ejemplo, el plátano rojo que contiene 55 mg por kg de fruta fresca. Si bien la abundancia de aminas aromáticas en varios vegetales demuestra un papel activo en los procesos vivos, aún queda por resolver si unos pocos miligramos de dopamina tiene un efecto favorable o desfavorable sobre la salud humana [53,55]. De todas formas, aunque estas películas fueron diseñadas con el propósito de estar en contacto con alimentos de bajo contenido acuoso debido al carácter hidrófilo de los materiales desarrollados, no se considera la posibilidad de una inmersión completa. Por lo tanto, se estima que las concentraciones de dopamina que pudiesen llegar a migrar sean menores que los valores reportados. Por otra parte, las aplicaciones de estos materiales no se limitan únicamente al sector alimentario. Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de la dopamina, y considerando que la gelatina es uno de los polímeros naturales más conocidos en la ciencia de los biomateriales, se podrían utilizar en el campo de la medicina [56].

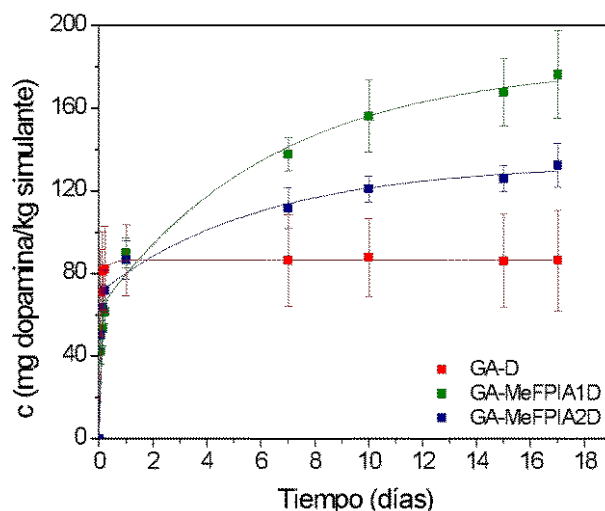


Figura 4.11. Cinética de migración de dopamina en simulante alimentario graso.

Tabla 4.12. Parámetros cinéticos de liberación de dopamina para las diferentes películas.

Películas	c_{∞} (mg/kg)	Δc_1 (mg/kg)	τ_1 (días)	ϕ_1	Δc_2 (mg/kg)	τ_2 (días)	ϕ_2
GA-D	87 ± 4	78 ± 2	0,020 ± 0,001	0,905	8 ± 8	0,3 ± 0,2	0,095
GA-MeFPIA1D	181 ± 14	61 ± 2	0,05 ± 0,02	0,339	119 ± 12	7 ± 2	0,661
GA-MeFPIA2D	133 ± 13	70 ± 6	0,04 ± 0,01	0,527	63 ± 7	6 ± 2	0,473

4.5. Conclusiones Parciales

La adición de MeFPIAx en películas a base de gelatina y almidón no solo mejoró las propiedades mecánicas de los materiales, sino que también disminuyó la capacidad de absorción de las moléculas de agua durante el proceso de hinchamiento, debido a una mayor interacción entre las cadenas poliméricas. Sin embargo, al incorporar grupos carboxilo en la matriz, que tienen afinidad por el agua, tuvo un efecto negativo en la permeabilidad al vapor de agua, obteniendo valores superiores en comparación con las películas de control. Por otra parte, las películas demostraron actividad antimicrobiana y antioxidante en comparación con las muestras control, y la adición de dopamina mejoró ambas propiedades. A su vez, se observaron cambios de color en los materiales, siendo este cambio más abrupto con la adición de dopamina. El color oscuro de las películas obtenidas podría ser beneficioso en aquellas aplicaciones que son sensibles a la luz.

En conclusión, la incorporación de polímeros MeFPIA y agentes activos como la dopamina en sistemas poliméricos, y teniendo en cuenta sus propiedades, podría considerarse como una opción prometedora para desarrollar materiales novedosos con aplicaciones en el campo de alimentos y/o medicina.

4.6. Referencias

1. Yen, G.C.; Hsieh, C.L. Antioxidant effects of dopamine and related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, 61, 1646–1649.
2. McHugh, T.H.; Avena-Bustillo, R.; Krochta, J.M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J. Food Sci.* **1993**, 58(4), 899–903.
3. Gennadios, A.; Weller, C.L.; Gooding, C.H. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *J. Food Eng.* **1994a**, 21, 395-409.
4. Gennadios, A.; Bradenburg A.H.; Park J.W.; Weller C.L., Testin R.F. Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. *Ind. Crops Prod.* **1994b**, 2, 189-195.
5. Delgado, J.F.; Peltzer, M.A.; Salvay, A.G. Water vapour transport in biopolymeric materials: effects of thickness and water vapour pressure gradient on yeast biomass-based films. *J. Polym. Environ.* **2022**, 30, 2976-2989.
6. Salvay, A.G.; Colombo, M.F.; Raúl Grigera, J. Hydration effects on the structural properties and haem–haem interaction in haemoglobin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 192–197.
7. ASTM E2149-01, Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions (Withdrawn 2010); ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 2001; Available online: www.astm.org (accessed on 10 December 2020).
8. Norma Europea EN 13130-1
9. Stoffers, N.H.; Störmer, A.; Bradley, E.L.; Brandsch, R.; Cooper, I.; Linssen, J.P.H. Feasibility study for the development of certified reference materials for specific migration testing. Part 1: Initial migrant concentration and specific migration. *Food Addit. Contam.* **2004**, 21(12), 1203-1216.
12. Wang, K.; Wang, W.; Ye, R.; Xiao, J.; Liu, Y.; Ding, J.; Liu, A. Mechanical and barrier properties of maize starch-gelatin composite films: effects of amylose content. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, 97(11), 3613–3622.
13. Coma, M.E.; Peltzer, M.A.; Delgado, J.F.; Salvay, A.G. Water kefir grains as an innovative source of films: Study of plasticizer content on film properties. *Eur. Polym. J.* **2019**, 120.

14. Ramírez Tapias, Y.A.; Peltzer, M.A.; Delgado, J.F.; Salvay, A.G. Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. *Food Bioproc. Tech.* **2020**, 13, 1166–1180.
15. Chuaynukul, K.; Prodpran, T.; Benjakul, S. Preparation, thermal properties and characteristics of gelatin molding compound resin. *Res J. Chem. Environ. Sci.* **2014**, 2, 01-09.
16. Díaz-Calderón, P.; Quero, F.; MacNaughtan, B.; Rousennova, M.; Enrione, J. Effect of sorbitol on structural relaxation of gelatin films in the glassy state. *Rev. Ion.* **2015**, 28(2), 93-101.
17. Arrieta, M.P.; Peltzer, M.A.; Del Carmen Garrigós, M.; Jiménez, A. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *J. Food Eng.* **2013**, 114(4), 486-494.
18. Delgado, J.F.; Peltzer, M.A.; Salvay, A.G.; de la Osa, O.; Wagner, J.R. Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2018b**, 48, 240-247.
19. Novák, M.; Synytsya, A.; Gedeon, O.; Slepíčka, P.; Procházka, V.; Synytsya, A.; Čopíková, J. Yeast β (1-3),(1-6)-d-glucan films: preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydr. Polym.* **2012**, 87(4), 2496-2504.
20. Wu, C.; Chu, B.; Kuang, L.; Meng, B.; Wang, X.; Tang, S. Synthesis of β -1,3-glucan esters showing nanosphere formation. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 98(1), 807-812.
21. Babaei-Ghazvini, A.; Shahabi-Ghahfarrokhi, I.; Goudarzi, V. Preparation of UV-protective starch/kefiran/ZnO nanocomposite as a packaging film: Characterization. *Food Packag. Shelf Life* **2018**, 16, 103–111.
22. Mali, S.; Grossmann, M.V.E.; García, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydr. Polym.* **2004**, 56(2), 129–135.
23. Keenan, T.R. 10.13-Gelatin; Matyjaszewski, K., Möller, M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **2012**; pp. 237–247. ISBN 978-0-08-087862-1.
24. Wu, X.; Liu, Y.; Wang, W.; Han, Y.; Liu, A. Improved mechanical and thermal properties of gelatin films using a nano inorganic filler. *J. Food Process Eng.* **2017**, 40, 1–10.

25. Kang, S.M.; Hwang, N.S.; Yeom, J.; Park, S.Y.; Messersmith, P.B.; Choi, I.S.; Langer, R.; Anderson, D.G.; Lee, H. One-step multipurpose surface functionalization by adhesive catecholamine. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 2949–2955.
26. Strauss, G.; Gibson, S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocoll.* **2004**, *18*, 81–89.
27. Garavand, F.; Rouhi, M.; Razavi, S.H.; Cacciotti, I.; Mohammadi, R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: a review. *Inter. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 687–707.
28. Guzman-Puyol, S.; Benítez, J.J.; Heredia-Guerrero, J.A. Transparency of polymeric food packaging materials. *Food Res. Int.* **2022**, *161*, 111792.
29. Peltzer, M.A.; Salvay, A.G.; Delgado, J.F.; De la Osa, O.; Wagner, J.R. Use of residual yeast cell wall for new biobased materials production: effect of plasticization on film properties. *Food Bioprocess Technol.* **2018**, *11*, 1995–2007.
30. Han, J.H. Chapter 9-Edible Films and Coatings: A Review. In *Food Science and Technology*, 2nd ed.; Han, J.H., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, **2014**; pp. 213–255. ISBN 978-0-12-394601-0.
31. Molyneux, P. “Transition-site” model for the permeation of gases and vapors through compact films of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *79*, 981–1024.
32. Delgado, J.F.; Peltzer, M.A.; Wagner, J.R.; Salvay, A.G. Hydration and water vapour transport properties in yeast biomass based films: A study of plasticizer content and thickness effects. *Eur. Polym. J.* **2018**, *99*, 9–17.
33. Moreno Henao, J.M.; Bohórquez Pérez, Y.; Ayala Sánchez, L.; Valenzuela Real, C. Efecto del ph sobre propiedades mecánicas, fisicoquímicas y morfológicas en películas comestibles multicomponentes. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* **2020** *23*(1), 1457.
34. Bui, T.D.; Wong, Y.; Thu, K.; Oh, S. J.; Kum Ja, M.; Ng, K.C.; Chua, K. J. Effect of hygroscopic materials on water vapor permeation and dehumidification performance of poly(vinyl alcohol) membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*(17).
35. Balakrishnan, B.; Mohanty, M.; Umashankar, P.; Jayakrishnan, A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* **2005**, *26*(32), 6335–6342.
36. Sothornvit, R.; Krochta, J.M. Plasticizers in edible films and coatings. *Innov. Food Packag.* **2005**, 403–433.

37. Zhang, D.; Zhou, W.; Wei, B.; Wang, X.; Tang, R.; Nie, J.; Wang, J. Carboxyl-modified poly(vinyl alcohol)-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 125, 189–199.
38. Giacobazzi, G.; Gioia, C.; Vannini, M.; Marchese, P.; Guillard, V.; Angellier-Coussy, H.; Celli, A. Water vapor sorption and diffusivity in bio-based poly(ethylene vanillate)—pev. *Polymers*, **2021**, 13, 524.
39. Cuq, B.; Gontard, N.; Aymard, C.; Guilbert, S. Relative humidity and temperature effects on mechanical and water vapor barrier properties of myofibrillar protein-based films. *Polym. Gels Networks*. **1997**, 5(1), 1–15.
40. Levine, H.; Slade, L. Water as a plasticizer: physico-chemical aspects of low-moisture polymeric systems. *Water Sci.* **1988**, 3, 79–185.
41. Kuijpers, A.J.; Engbers, G.H.; Krijgsveld, J.; Zaat, S.A.; Dankert, J.; Feijen, J. Cross-linking and characterisation of gelatin matrices for biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2000**, 11, 225–243.
42. Jopling, D.W. The Swelling of Gelatin Films the Effects of Drying. *J. Appl. Chem.* **1956**, 6, 79–84.
43. Yin, Y.; Ji, X.; Dong, H.; Ying, Y.; Zheng, H. Study of the swelling dynamics with overshooting effect of hydrogels based on sodium alginate-g-acrylic acid. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 71(4), 682–689.
44. Moreno Henao, J.M.; Bohórquez Pérez, Y.; Ayala Sánchez, L.; Valenzuela Real, C. Efecto del pH sobre propiedades mecánicas, fisicoquímicas y morfológicas en películas comestibles multicomponentes. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* **2020**, 23(1):e1457.
45. Kulkarni, A.D.; Vanjari, Y.H.; Sancheti, K.H.; Patel, H.M.; Belgamwar, V.S.; Surana, S.J.; Pardeshi, C.V. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* **2016**, 44(7), 1615–1625.
46. Mariod, A.A.; Adam, H.F. Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2013**, 12, 135–147.
47. Crank, J.; Park, G.S.; Crank, J.; Park, G.S. Diffusion of Polymers; Academic Press Incorporated: New York, NY, USA, 1968; ISBN 9780121970505.
48. Wang, Q.; Wang, T.; Lv, Z.; Cui, M.; Zhao, Z.; Cao, X.; Wei, Q. A comprehensive review on water diffusion in polymers focusing on the polymer. *Polymers* **2020**, 12, 138.

49. Shahidi, F.; Janitha, P.K.; Wanasundara, P.D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 67–103.
50. Sushomasri, M.; Himangshu, M.; Pranabesh, C.; Sujata, G.D. Potential of dopamine hydrochloride as a novel antimicrobial agent. *Int. J. Pharm. Biomed.* **2010**, *4*(2), 70-75.
51. Tejero, R.; López, D.; López-Fabal, F.; Gómez-Garcés, J.L.; Fernández-García, M. Antimicrobial polymethacrylates based on quaternized 1,3-thiazole and 1,2,3-triazole side-chain groups. *Polym. Chem.* **2015**, *6*(18), 3449–3459.
52. Koser, S.A.; Chinn, B.D.; Saunders, F. Gelatin as a source of growth-promoting substances for bacteria. *J. Bacteriol.* **1938**, *36*, 57–65.
53. Kulma, A.; Szopa, J. Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Sci.* **2007**, *172*(3), 433–440.
54. Gomes, B.R.; Siqueira-Soares, R. de C.; Santos, W. D. dos; Marchiosi, R.; Soares, A. R.; Ferrarese-Filho, O. The effects of dopamine on antioxidant enzymes activities and reactive oxygen species levels in soybean roots. *Plant Signal. Behav.* **2014**, *9*(12), e977704.
55. Kanazawa, K.; Sakakibara, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*(3), 844–848.
56. Valencia-Gómez, L.E.; Martel-Estrada, S.A.; Vargas-Requena, C.L.; Rodríguez-González, C.A.; Olivas-Armendariz, I. Natural polymers aposites for skin regeneration. *Rev. Mex. de Ing Biomed.* **2016**, *37*(3), 235–249.

Capítulo 5: Diseño de Nuevas Películas Activas a Base de Gelatina y Almidón con Distintas Concentraciones de MeFPIAx

El presente capítulo describe el desarrollo y caracterización de películas a base de gelatina y almidón al 15% p/p, con la incorporación de distintas concentraciones de MeFPIA, 10, 15 y 20%, y glicerol al 25% como plastificante.

5.1. Materiales

Gelatina (Scharlau®), almidón (Nestlé Health Science®, Barcelona, España), glicerol ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich®), hidróxido de sodio (NaOH, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), carbonato de potasio (K_2CO_3 , Sigma-Aldrich®), nitrato de magnesio ($Mg(NO_3)_2$, 98%, Sigma-Aldrich®), cloruro de bario ($BaCl_2$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich®), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)-sal de diamonio (ABTS, Sigma®), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Sigma®), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma®), etanol 96% vol. (Porta®), peptona (Britania®), agar bacteriológico (Britania®), caldo nutritivo (Britania®).

5.2. Obtención de las películas por evaporación del solvente (*Casting*)

Se elaboraron siete formulaciones mediante *casting* de las dispersiones acuosas al 15% p/p con respecto a la gelatina y el almidón, a base de gelatina y almidón en proporción másica 4:1 y distintas concentraciones de los polímeros sintetizados 10, 15 y 20% p/p con respecto al peso de la relación gelatina:almidón. Se añadió glicerol al 25% p/p con respecto al peso de los polímeros totales.

Para la preparación de las películas por *casting* se prepararon las dispersiones de los polímeros en agua destilada, con agitación magnética, y se mantuvieron en un baño termostático a 70 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió poco a poco una solución de NaOH 1,0 M hasta alcanzar un pH entre 8-9. Finalmente, las dispersiones correspondientes se vertieron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, en una cantidad aproximada de 10 g de dispersión por placa y se dejaron secar durante una semana a temperatura y humedad ambiente. Las películas secas se despegaron de las placas y se acondicionaron durante una semana a 53% h.r., previo a su caracterización. Las películas sin agregado de MeFPIAx se consideraron películas control. Se caracterizaron las propiedades físico-químicas de los nuevos materiales obtenidos mediante distintos tipos de técnicas analíticas.

5.3. Caracterización de las películas activas

5.3.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis por FTIR se llevó a cabo en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.1 del Capítulo 4 (página 58).

5.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis por DSC se llevó a cabo en condiciones sin modular realizando un doble calentamiento para borrar la historia térmica del material. El ensayo se realizó mediante un equilibrado a -80 °C y posterior calentamiento a 10 °C/min hasta 180 °C. Seguidamente, se equilibró a -80 °C y se volvió a calentar a 10 °C/min hasta 180 °C. El ensayo se realizó en atmosfera inerte de nitrógeno (50 mL/min).

5.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis por TGA se llevó a cabo en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.3 del Capítulo 4 (página 58).

5.3.4. Propiedades mecánicas

Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente en una máquina Universal Instrument Megatest TC-500 serie II (Megatest, Argentina), utilizando una celda de carga de 30 kgf a una velocidad de 15 mm/min. Previamente, se cortaron probetas rectangulares (50 × 10 mm) de cada formulación y se acondicionaron dentro de un desecador a 53% de h.r. provista por una solución saturada de Mg(NO₃)₂. El espesor de cada probeta se determinó en cinco puntos utilizando un micrómetro digital (INSIZE Co., LTD, Suzhou New District, China, ±0,001 mm). Las curvas resultantes de esfuerzo-deformación permitieron calcular los parámetros mecánicos: Módulo de Young (MY, MPa), resistencia a la tracción (TS, MPa), y elongación a la ruptura (e, %).

5.3.5. Color

El color de las películas se midió según se describió en la sección 4.3.5 del Capítulo 4 (página 59).

5.3.6. Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp})

La permeabilidad al vapor de agua se determinó bajo las mismas condiciones explicadas en la sección 4.3.6 del Capítulo 4 (página 60).

5.3.7. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas

La cinética de hinchamiento se llevó a cabo en las condiciones descritas en la sección 4.3.8 del Capítulo 4 (página 62).

5.3.8. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante determinada por el método ABTS de las películas se llevó a cabo siguiendo los procedimientos detallados en la sección 4.3.9 del Capítulo 4 (página 57).

A su vez, se evaluó la capacidad antioxidante por el método DPPH, ya que cada ensayo puede detectar diferentes mecanismos de acción, por lo que al utilizar ambos métodos, se obtiene una visión más completa de la actividad antioxidante de las películas.

Se preparó DPPH en etanol absoluto en una concentración de 1 mM y se dejó reaccionar una hora en oscuridad (solución A). Luego, se cortaron discos de aproximadamente 10 mg de cada formulación y se colocaron en tubos eppendorf con 0,8 mL de etanol absoluto y 0,2 mL de la solución A. Después de 5 min de reacción en oscuridad con ligera agitación, se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 517 nm. Cada condición se evaluó por duplicado. La actividad antioxidante de las distintas películas se calculó como el porcentaje de inhibición radicalaria (RSA (%)), como se describió en Ecuación 4.11 del Capítulo 4.

5.3.9. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas se determinó siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.3.10 del Capítulo 4 (página 64).

5.3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó según se describió en la sección 4.3.13 del Capítulo 4 (página 66).

5.4. Resultados y Discusión

La Tabla 5.1 muestra los nombres y la descripción de cada película elaborada; aquellas sin polímero fueron consideradas películas control (GA).

Tabla 5.1. Descripción de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	Descripción
GA	Película a base de gelatina, almidón y glicerol
GA-MeFPIA1 10%	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA1 10%
GA-MeFPIA1 15%	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA1 15%
GA-MeFPIA1 20%	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA1 20%
GA-MeFPIA2 10%	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA2 10%
GA-MeFPIA2 15%	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA2 15%
GA-MeFPIA2 20%	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA2 20%

Las películas resultaron uniformes, flexibles, lisas y no se observaron grietas ni poros, a simple vista (Figura 5.1).

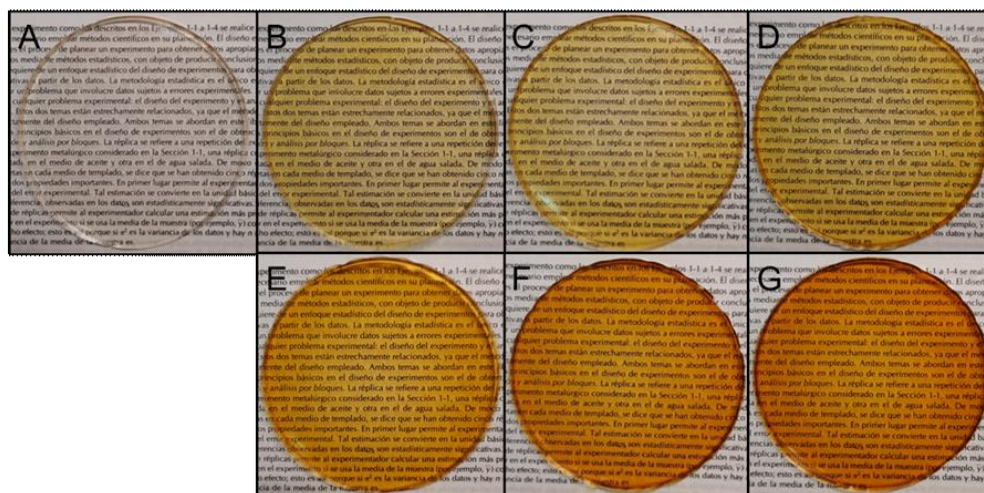


Figura 5.1. Películas a base de gelatina y almidón: (A) GA, (B) GA-MeFPIA1 10%, (C) GA-MeFPIA1 15%, (D) GA-MeFPIA1 20%, (E) GA-MeFPIA2 10%, (F) GA-MeFPIA2 15%, (G) GA-MeFPIA2 20%.

5.4.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR)

Como se puede observar en la Figura 5.2, los espectros infrarrojos muestran las bandas de absorción de las películas de gelatina y almidón en presencia y ausencia de las distintas concentraciones de MeFPIAx. Si bien las películas analizadas en el presente capítulo difieren en su formulación con las películas analizadas en el capítulo anterior, contienen los mismos componentes, por lo que los espectros de FTIR son muy similares. Nuevamente se pueden diferenciar tres zonas. La primera relacionada con los grupos funcionales –OH y –NH ($3750\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) correspondientes al agua, glicerol, polisacáridos

y proteínas. La segunda zona relacionada a los grupos amida ($1750-1200\text{ cm}^{-1}$), y una tercera zona ($1200-800\text{ cm}^{-1}$) relacionada mayormente a los movimientos vibracionales de los grupos funcionales correspondientes a los polisacáridos [1,2].

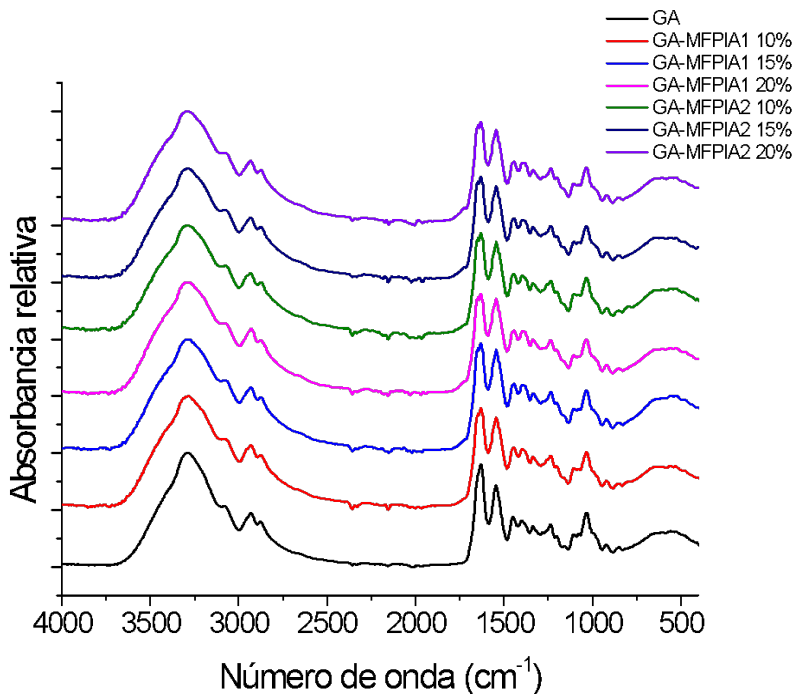


Figura 5.2. Espectros de infrarrojo por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) de las películas basadas en gelatina y almidón.

5.4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Tal como se explicó en el capítulo anterior, las muestras de las películas fueron deshidratadas en un desecador que contenía en su interior sílica gel. En la Figura 5.3 se muestran los termogramas correspondientes al flujo total de calor relativo de las muestras. Sus correspondientes temperaturas de transición se presentan en la Tabla 5.2. Las curvas DSC de estas películas presentaron en todos los casos, sólo una T_g seguida de un pico endotérmico de relajación o envejecimiento físico (T_{pico}), al igual que se explicó en el capítulo anterior. Se obtuvieron valores de T_g que oscilan entre $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $77\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los valores más altos con respecto a la película control se presentaron en las películas que contenían 10% de polímero, tanto de MeFPIA1 como de MeFPIA2. Este comportamiento posiblemente se deba al aumento de las fuerzas electrostáticas e interacciones puente de hidrógeno que se producen entre las macromoléculas de gelatina y almidón con los grupos carboxilo de los polímeros. El aumento de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas

poliméricas induce a una disminución del volumen libre y de la movilidad del sistema, dificultando la transición al estado elastomérico [3]. Por lo tanto, al estar más impedida el movimiento, la T_g se desplaza hacia valores más altos.

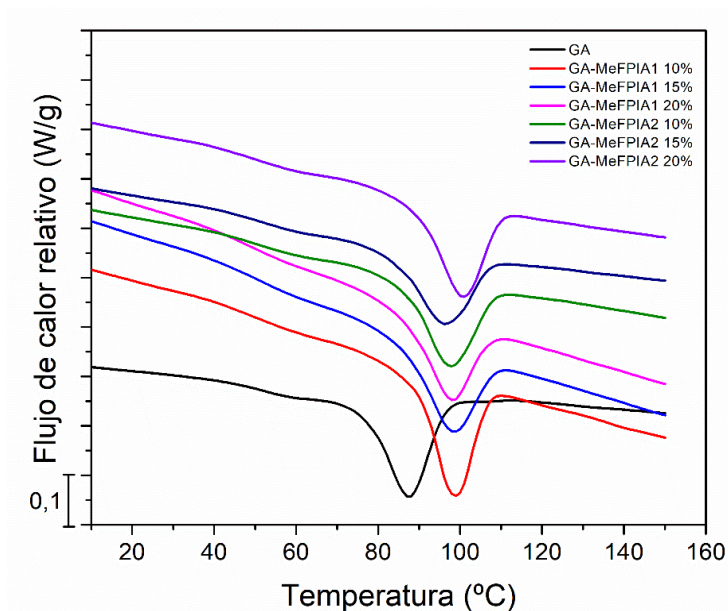


Figura 5.3. Termogramas de DSC de las películas de gelatina y almidón.

Tabla 5.2. Temperaturas de transición de las películas de gelatina y almidón.

Películas	Primer calentamiento		Segundo Calentamiento
	T_g (°C)	T_{pico} (°C)	T_g (°C)
GA	65	88	29
GA-MeFPIA1 10%	67	99	56
GA-MeFPIA1 15%	66	98	65
GA-MeFPIA1 20%	66	98	60
GA-MeFPIA2 10%	68	98	39
GA-MeFPIA2 15%	65	96	45
GA-MeFPIA2 20%	77	101	49

En cuanto a la presencia de un pico endotérmico, como ya se mencionó anteriormente, es característico del proceso de relajación [4], este proceso se confirmó con un segundo calentamiento en el cual dicha transición desaparece debido a que se elimina la historia térmica del material. Cuando un polímero amorfo o semicristalino se almacena a temperaturas por debajo de su T_g , se producen reorganizaciones moleculares lentas en la región amorfa (rotación de grupos pequeños de átomos, movimientos de vibración y

rotación de enlaces químicos a lo largo de la cadena polimérica). Con el tiempo, el polímero se relaja hacia su equilibrio termodinámico, produciéndose cambios en sus propiedades volumétricas o entalpías. A este fenómeno se lo denomina envejecimiento físico [5]. Por otra parte, estudios previos han atribuido ese pico endotérmico a la fusión de cristales de almidón formados durante la retrogradación. Una cristalización continua de la amilopectina podría originarse a partir de la amilosa y la amilopectina co-cristalizadas durante el proceso de formación de las películas [6,7].

5.4.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los resultados de los análisis termogravimétricos de las películas desarrolladas se presentan en la Figura 5.4. Los datos de las temperaturas iniciales y de máxima degradación (T_i y T_{max}) se presentan en la Tabla 5.3. Tal como se explicó en el Capítulo 4, se distinguen tres zonas de degradación. La primera (cerca de los 100 °C) asociada a la pérdida de humedad y posible volatilización de compuestos de bajo peso molecular. Una segunda zona (150-250 °C) asociada a la degradación parcial de las proteínas y la pérdida de glicerol. Por último, una tercera zona (cerca de los 300 °C) asociada a la degradación de los polisacáridos y la completa degradación de las proteínas y polímeros sintetizados.

Tabla 5.3. Temperaturas correspondientes a las temperaturas iniciales y máximas de degradación de las películas basadas en gelatina y almidón.

Películas	T_i (°C)	$T_{max 1}$ (°C)	$T_{max 2}$ (°C)
GA	196	241	297
GA-MeFPIA1 10%	211	265	300
GA-MeFPIA1 15%	207	256	296
GA-MeFPIA1 20%	201	265	292
GA-MeFPIA2 10%	204	245	299
GA-MeFPIA2 15%	204	255	300
GA-MeFPIA2 20%	201	264	296

En cuanto a las T_i , se puede observar cómo la incorporación de MeFPIAx ha generado un aumento en las mismas. Esto indica que las películas son más termorresistentes, lo cual confirma un incremento en las interacciones entre sus componentes. Estos resultados revelan que el material podría procesarse a temperatura cercana a los 180 °C sin degradarse.

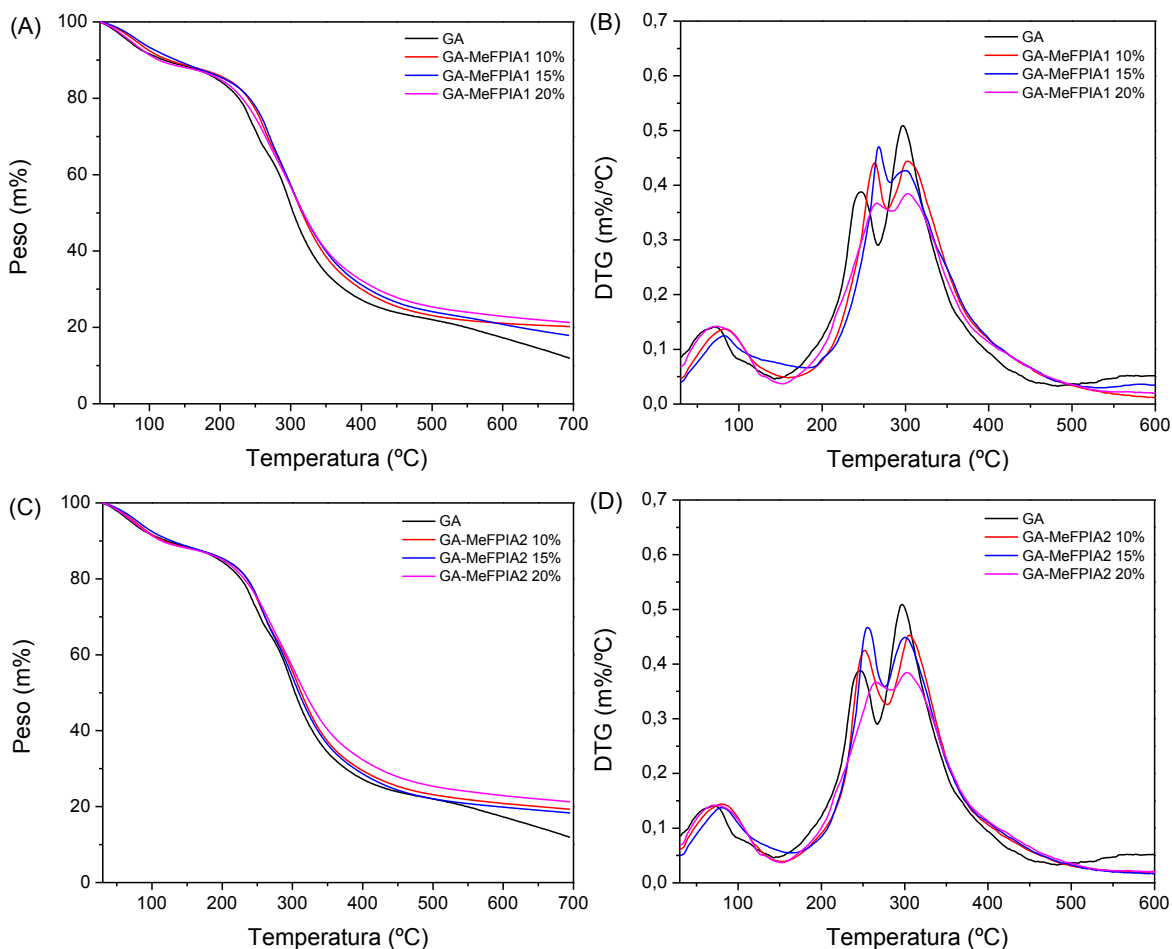


Figura 5.4. Curvas termogravimétricas: **(A)** y **(C)** Pérdida de peso en función de la temperatura, **(B)** y **(D)** Derivada del porcentaje del peso en función de la temperatura.

5.4.4. Propiedades mecánicas

Los valores correspondientes a la resistencia a la tracción (TS), el módulo de Young (MY) y la elongación a la rotura (e%) se presentan en la Tabla 5.4. Se pudo observar un aumento en los valores TS y MY y, en consecuencia, una disminución en los valores e%, al añadir distintas concentraciones de MeFPIA1 y MeFPIA2. Estas diferencias mostraron una variación significativa estadísticamente ($p < 0,05$). Además, la resistencia a la tracción y la elongación a la rotura de las películas están inversamente relacionadas. La presencia de MeFPIAx en la solución filmogénica podría aumentar las interacciones con la gelatina y el almidón, formando enlaces puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del almidón, los grupos carboxílicos del polímero y los grupos amino de gelatina [8]. De esta manera, se incrementaron las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas poliméricas, lo que resultó en un aumento de la resistencia a la tracción y una disminución de la flexibilidad y

movilidad de las cadenas. Por otro lado, el MY indica la rigidez de la película; un MY más alto indica un material más rígido. La Tabla 5.4 muestra que la incorporación de MeFPIAx condujo a un aumento del MY a medida que aumenta la concentración de ambos polímeros, siendo dicho aumento significativo con el agregado de 20% de MeFPIA1. Esto implica una matriz más resistente. Además, se observó una disminución en la elongación a medida que aumentaban las concentraciones de polímero. La diferencia entre las películas con ambos polímeros funcionalizados radica en que MeFPIA1 tiene un mayor número de grupos carboxilo libres capaces de interactuar con las cadenas proteicas.

Tabla 5.4. Parámetros mecánicos de las películas a base de gelatina y almidón.

Formulaciones	TS (MPa)	MY (MPa)	e (%)
GA	10,8 ± 0,6 ^a	114,1 ± 7,7 ^a	86,5 ± 5,2 ^a
GA-MeFPIA1 10%	20,1 ± 2,0 ^b	266,3 ± 13,1 ^b	68,2 ± 7,7 ^{b,d}
GA-MeFPIA1 15%	19,2 ± 1,1 ^b	261,8 ± 37,1 ^b	61,8 ± 5,0 ^{b,d}
GA-MeFPIA1 20%	18,8 ± 1,0 ^b	342,7 ± 52,2 ^c	36,3 ± 7,8 ^c
GA-MeFPIA2 10%	21,4 ± 1,4 ^{b,c}	259,0 ± 12,7 ^b	70,3 ± 3,3 ^b
GA-MeFPIA2 15%	23,2 ± 1,1 ^c	271,2 ± 17,3 ^b	71,2 ± 4,3 ^b
GA-MeFPIA2 20%	20,8 ± 1,1 ^{b,c}	284,7 ± 21,2 ^b	59,8 ± 4,3 ^d

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey (P≥0,05).

5.4.5. Color

Al igual que en el capítulo anterior, el color de los materiales se midió definiendo los parámetros de L*, a* y b*, los cuales representan luminosidad, el color rojo/verdoso y el color amarillo/azulado, respectivamente [9]. Las propiedades de color se muestran en la Tabla 5.5, donde se observó un claro cambio en los valores de color con la adición de las distintas concentraciones de MeFPIAx. La presencia de MeFPIA1 en la formulación provocó cierta disminución de la luminosidad (disminución de los valores de L*) con una tendencia al verde y al amarillo (disminución de los valores de a* y aumento de los valores de b*, respectivamente). Ahora bien, con el agregado de MeFPIA2 se observó una disminución de la luminosidad significativa del material con una tendencia al rojo y al amarillo (aumento de los valores de a* y b*, respectivamente). El cambio de color ΔE^* es significativo para ambos polímeros respecto al control y perceptible al ojo humano, como se puede apreciar en la Figura 5.1; este cambio fue más abrupto para el polímero con menor potencial negativo (MeFPIA2).

Tabla 5.5. Propiedades de color de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	L*	a*	b*	ΔE^*
GA	83 ± 0,3 ^a	0,4 ± 0,05 ^a	0,2 ± 0,04 ^a	
GA-MeFPIA1 10%	80 ± 0,5 ^b	-4,3 ± 0,1 ^b	17,2 ± 0,6 ^b	18
GA-MeFPIA1 15%	80 ± 0,4 ^b	-4,4 ± 0,3 ^{b,c}	18,0 ± 1,7 ^{b,c}	19
GA-MeFPIA1 20%	79 ± 0,3 ^b	-4,8 ± 0,1 ^c	19,4 ± 0,5 ^c	19
GA-MeFPIA2 10%	74 ± 0,5 ^c	-3,1 ± 0,2 ^d	29,6 ± 0,6 ^d	31
GA-MeFPIA2 15%	70 ± 0,7 ^d	-1,1 ± 0,5 ^e	33,1 ± 0,5 ^e	35
GA-MeFPIA2 20%	68 ± 0,4 ^e	0,5 ± 0,2 ^a	33,9 ± 0,2 ^e	37

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

5.4.6. Permeabilidad al Vapor de Agua (P_w^{exp})

Dado que la gelatina contiene una amplia gama de aminoácidos hidrofílicos, las películas con alto contenido proteico podrían absorber más moléculas de agua del entorno [10]. Además, teniendo en cuenta que en la formulación está presente una proporción de almidón modificado, que absorbe una gran cantidad de agua, existe una fuerte afinidad por las moléculas de agua en las películas formuladas. Como resultado, la difusión de agua a través de estas películas es alta, lo que resulta en materiales con una alta permeabilidad al vapor de agua [11]. Los datos de P_w^{exp} se presentan en la Tabla 5.6, y como se puede observar, la incorporación de concentraciones más altas de polímero MeFPIAx redujo los valores. Si bien los polímeros aumentan el contenido de grupos hidrofílicos en la matriz, también aumentan las interacciones entre los distintos componentes de las películas, lo que se refleja en una mayor barrera al vapor de agua. Al reforzar la matriz, las cadenas poliméricas tienen una menor movilidad, lo que dificulta el paso del vapor de agua a través de ellas.

Tabla 5.6. Valores de la P_w^{exp} de las películas a base de gelatina y almidón.

Formulaciones	P_w^{exp} (10^{-10} g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)
GA	4,89 ± 0,05 ^{a,e}
GA-MeFPIA1 10%	4,60 ± 0,03 ^b
GA-MeFPIA1 15%	4,53 ± 0,03 ^c
GA-MeFPIA1 20%	4,30 ± 0,03 ^d
GA-MeFPIA2 10%	4,81 ± 0,09 ^{a,e}
GA-MeFPIA2 15%	4,98 ± 0,08 ^a
GA-MeFPIA2 20%	4,76 ± 0,09 ^e

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

5.4.7. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas

Determinar el hinchamiento de las películas es un factor importante ya que mide la eficiencia de una película para mantener su integridad estructural en un ambiente acuoso. La Figura 5.6 muestra el comportamiento de hinchamiento de las diferentes películas en PBS a 25 °C. Si bien el interés en mezclar polisacáridos y proteínas se debe a las ventajas complementarias de estos componentes [6], la gelatina y el almidón son polímeros altamente hidrofílicos [11]. Por lo tanto, se forman películas con una gran capacidad de absorción de agua debido a la gran cantidad de grupos afines al agua presentes en la matriz [12]. Por lo tanto, las películas control sin MeFPIAx mostraron un mayor grado de hinchamiento y fueron las más débiles, ya que con el tiempo de ensayo perdieron su integridad. Sin embargo, las películas con MeFPIAx presentaron un grado de hinchamiento menor en comparación con el control y fueron las más estables. Con la incorporación del polímero, a medida que aumentó su concentración en la mezcla, se incrementó el número de interacciones intermoleculares, lo que provocó que el material pierda elasticidad al disminuir los espacios entre las cadenas poliméricas. Esto hace que el material sea menos flexible y, por lo tanto, disminuye su capacidad de deformarse e hincharse [13,14]. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en las propiedades mecánicas y sugieren la formación de una estructura de red densa de la película, lo cual inhibe la entrada de agua en las películas.

En la Figura 5.6A se puede observar claramente que al incorporar un 10% y 15% de MeFPIA1 se producen reducciones en los valores de hinchamiento, sin grandes diferencias entre ambos porcentajes. Sin embargo, al incorporar un 20%, los valores de hinchamiento se reducen considerablemente, posiblemente debido a una mayor cantidad de grupos

carboxílicos que pueden interactuar con la gelatina y el almidón. Este resultado era de esperarse, ya que, si recordamos las propiedades mecánicas, estas películas presentaron los valores más altos de MY (módulo de elasticidad) y los valores más bajos de $\epsilon\%$ (deformación).

En la Figura 5.6B, se puede observar que al incorporar un 10% y 15% de MeFPiA2, también se observa una reducción en los valores de hinchamiento en comparación con las películas de control, registrándose valores muy similares. Sin embargo, al incorporar un 20%, los valores fueron ligeramente mayores, aunque no se observaron diferencias significativas. Es importante tener en cuenta que las películas en las tres concentraciones presentaron valores similares de MY, que está relacionado con la flexibilidad del material.

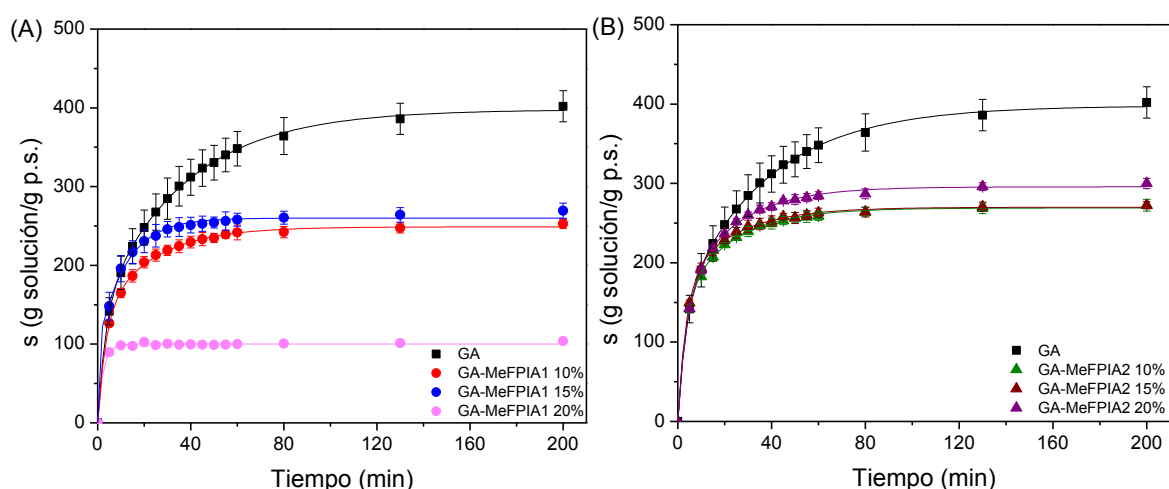


Figura 5.6. Curvas de hinchamiento de las diferentes películas a 25 °C en PBS: **(A)** GA, GA-MeFPiA1 10%, GA-MeFPiA1 15%, GA-MeFPiA1 20%, **(B)** GA, GA-MeFPiA2 10%, GA-MeFPiA2 15%, GA-MeFPiA2 20%.

Al graficar $(W_t - W_0)/W_0$ frente a $t^{1/2}$ en las etapas iniciales de hinchamiento, se puede analizar el comportamiento Fickiano. Los gráficos correspondientes se muestran en la Figura 5.7. Como se puede observar, las curvas de absorción de la solución de las películas para todas las formulaciones fueron no lineales hasta un aumento del 60% en la masa de hidrogel. Por lo tanto, como se puede ver en la figura, la mayoría de las formulaciones no siguieron la difusión Fickiana unidimensional, por lo que los valores de n son diferentes a 0,5 y los datos deben ser ajustados por un proceso no fickiano o de difusión anómalo. Tal como se vio en el capítulo anterior, las películas presentan el mismo comportamiento anómalo. Consecuentemente, los datos experimentales se ajustaron usando una función biexponencial. Este modelo ajustó bastante bien los datos obtenidos según el comportamiento de las películas durante el hinchamiento (ver las líneas de la Figura 5.6 A y B).

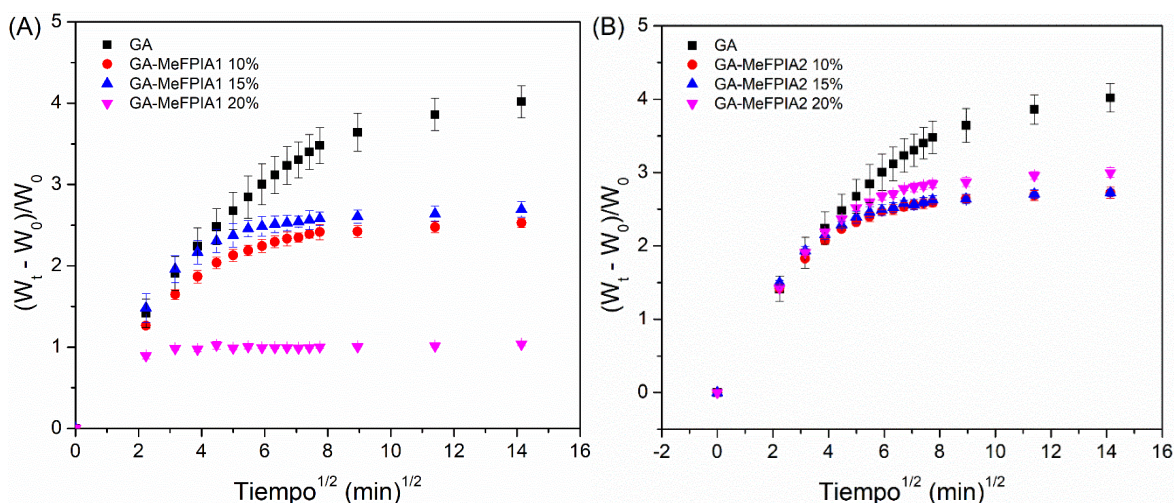


Figura 5.7. Representación de $(W_t - W_0)/W_0$ frente a $t^{1/2}$ a 25 °C en PBS: **(A)** GA, GA-MeFPIA1 10%, GA-MeFPIA1 15%, GA-MeFPIA1 20%, **(B)** GA, GA-MeFPIA2 10%, GA-MeFPIA2 15%, GA-MeFPIA2 20%.

Tabla 5.7. Parámetros cinéticos de hinchamiento para las diferentes películas a base de gelatina y almidón.

Películas	T (°C)	s_w (g/g)	Δs_1 (g/g)	τ_1 (min)	ϕ_1	Δs_2 (g/g)	τ_2 (min)	ϕ_2
GA		398 ± 12	140 ± 7	$3,4 \pm 0,3$	0,35	258 ± 5	37 ± 1	0,65
GA-MeFPIA1 10%		249 ± 17	133 ± 9	$3,4 \pm 0,4$	0,53	116 ± 8	22 ± 2	0,47
GA-MeFPIA1 15%		265 ± 17	186 ± 9	$4,1 \pm 0,3$	0,70	79 ± 8	24 ± 3	0,30
GA-MeFPIA1 20%	25	$100 \pm 0,4$	100 ± 1	$2,2 \pm 0,2$	1	--	--	--
GA-MeFPIA2 10%		269 ± 16	150 ± 8	$3,3 \pm 0,3$	0,56	119 ± 8	22 ± 2	0,44
GA-MeFPIA2 15%		270 ± 16	170 ± 9	$3,5 \pm 0,3$	0,63	100 ± 8	22 ± 2	0,37
GA-MeFPIA2 20%		295 ± 22	152 ± 12	$3,8 \pm 0,4$	0,52	143 ± 11	22 ± 2	0,48

5.4.8. Actividad Antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante de los materiales a través de dos de los métodos más comúnmente utilizados para obtener una mejor comprensión de las propiedades de las películas. Cada método se basa en diferentes principios químicos y proporciona información complementaria sobre la capacidad antioxidante de los materiales. Al utilizar dos métodos diferentes, se puede obtener una mayor confianza en los resultados obtenidos. Si ambos métodos muestran una actividad similar, se refuerza la evidencia de que las películas desarrolladas presentan propiedades antioxidantes. Ambos son métodos de elevada sensibilidad, rápidos y prácticos. La Figura 5.8 muestra los resultados de la actividad antioxidante de las películas mediante dos ensayos diferentes: ABTS y DPPH. Según los resultados obtenidos, se observó una actividad antioxidante muy baja en las películas de gelatina y almidón. Estos resultados concuerdan con estudios previos que

también reportaron resultados similares [15]. Al incorporar MeFPiA1, pudo observarse que mediante el método del ABTS el valor de RSA (%) disminuyó respecto al control, lo que podría deberse a una interacción entre los polímeros en la cual se ven comprometidos aquellos grupos que reaccionan con el ABTS. Por otro lado, la incorporación de 10% de MFPIA2 mostro un aumento en el valor de RSA (%). Este comportamiento ya fue descrito en el capítulo anterior con dicho polímero. En cuanto al ensayo con DPPH, se observa un ligero aumento en el valor de RSA (%) con la adición de los MFPIAx, aunque dicho aumento no es muy significativo.

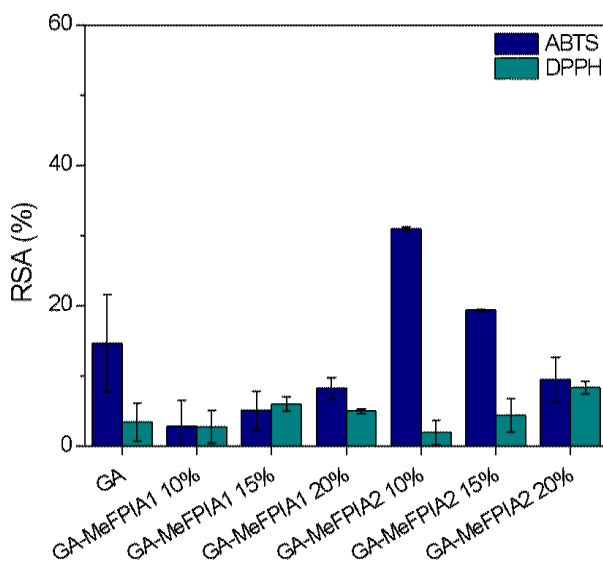


Figura 5.8. Actividad antioxidante de las películas por el método ABTS y DPPH.

5.4.9. Actividad Antimicrobiana

Los resultados presentados en la Figura 5.9 muestran las reducciones bacterianas (%) de las películas desarrolladas después de un período de incubación de 24 horas a 37 °C con ligera agitación en contacto con bacterias de *S. aureus* (ver Figura 5.10). Según los porcentajes de reducción obtenidos, se observa que la muestra de control (sin MeFPiAx) no mostró ninguna inhibición bacteriana. Sin embargo, las películas que contienen MeFPiA1 y MeFPiA2 mostraron actividad antimicrobiana, siendo aún mayor en las muestras con MeFPiA1.

A pesar del desarrollo continuo de antibióticos más potentes, los materiales poliméricos antimicrobianos, especialmente los polímeros catiónicos, presentan ventajas significativas.

Estos materiales tienen la capacidad de matar algunos patógenos resistentes a los antibióticos debido a su mecanismo de acción, como se explicó en el capítulo anterior.

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes porcentajes evaluados. Por lo tanto, la elección de un 10% de MeFPIAx sería la más adecuada para su incorporación en estas matrices, ya que no se mejoran las propiedades antimicrobianas con un mayor contenido de polímero. Consecuentemente, la elección de dicha concentración en el capítulo anterior fue la adecuada y en los próximos ensayos se realizarán utilizando 10% de MFPIAx dicha concentración.

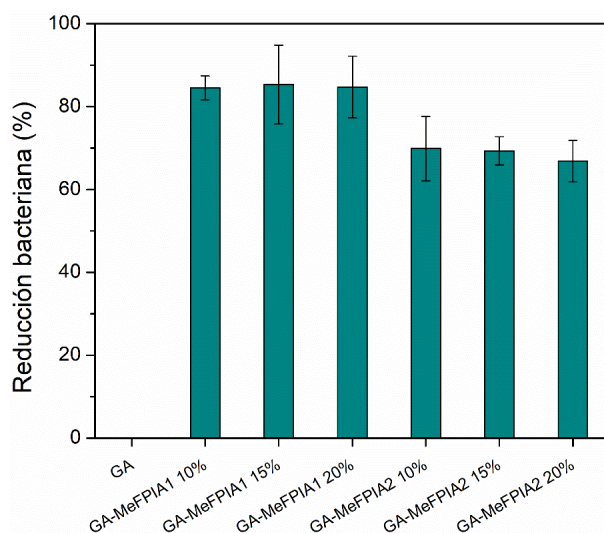


Figura 5.9. Porcentaje de reducción bacteriana frente a *S. aureus* de las diferentes películas.

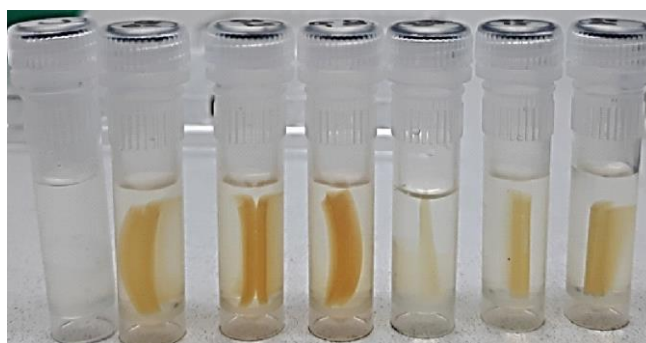


Figura 5.10. Foto ilustrativa de las películas junto con 1 mL de la solución de inóculo a tiempo inicial (de izquierda a derecha: GA, GA-MeFPIA2 10%, GA-MeFPIA2 15%, GA-MeFPIA2 20%, GA-MeFPIA1 10%, GA-MeFPIA1 15%, GA-MeFPIA1 20%).

5.5. Conclusiones parciales

La incorporación de MeFPIAx en películas a base de gelatina y almidón no solo mejoró las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua de los materiales, sino que

también redujo la capacidad de absorción de moléculas de agua durante el proceso de hinchamiento, gracias a una mayor interacción entre las cadenas poliméricas.

Por otro lado, aunque las películas no mostraron actividad antioxidante, sí exhibieron actividad antimicrobiana. Además, se observaron cambios de color en los materiales, siendo más notables con la adición de polímeros de potencial más negativo. El color oscuro de las películas obtenidas puede tener beneficios, como se mencionó anteriormente.

Considerando las mejoras significativas logradas en estos materiales y el continuo avance en investigación y desarrollo, se espera poder ofrecer soluciones más eficientes y seguras en el campo de la alimentación y el cuidado de la salud. Estos avances abren nuevas posibilidades para desarrollar materiales con propiedades mejoradas, como mayor resistencia y capacidad. Con estas mejoras, se espera satisfacer las necesidades crecientes de la industria alimentaria y médica, proporcionando productos más eficientes y seguros para el beneficio de los consumidores y los pacientes.

5.6. Referencias

1. Wang, K.; Wang, W.; Ye, R.; Xiao, J.; Liu, Y.; Ding, J.; Liu, A. Mechanical and barrier properties of maize starch-gelatin composite films: effects of amylose content. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, 97(11), 3613–3622.
2. Thi Tuong Vi Tran; Nhu-Ngoc Nguyen; Quoc-Duy Nguyen; Tran-Phong Nguyen; Tuyet-Ngan Lien. Gelatin/carboxymethyl cellulose edible films: modification of physical properties by different hydrocolloids and application in beef preservation in combination with shallot waste powder. *RSC Adv.*, **2023**, 13, 10005-10014.
3. Sothornvit, R.; Krochta, J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of lactoglobulin films. *J. Food Eng.* **2001**, 50, 149–155.
4. Chuaynukul, K.; Prodpran, T.; Benjakul, S. Preparation, thermal properties and characteristics of gelatin molding compound resin. *Res J. Chem. Environ. Sci.* **2014**, 2, 01-09.
5. Gerometta, M.; Rocca-Smith, J. R.; Domenek, S.; Karbowiak, T. Physical and chemical stability of PLA in food packaging. *Reference Module in Food Science, Elsevier*, **2019**.
6. Medina Jaramillo, C.; Gutiérrez, T.J.; Goyanes, S.; Bernal, C.; Famá, L. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 151, 150–159.
7. Bergo, P.V.A.; Carvalho, R.A.; Sobral, P.J.A.; dos Santos, R.M.C.; da Silva, F.B.R.; Prison, J.M., Solorza-Feria, J.; Habitante, A.M.Q.B. Physical properties of edible

- films based on cassava starch as affected by the plasticizer concentration. *Packag. Technol. Sci.* **2008**, 21(2), 85–89.
8. Tongdeesoontorn, W.; Mauer, L.J.; Wongruong, S.; Sriburi, P.; Rachtanapun, P. Mechanical and physical properties of cassava starch-gelatin composite films. *Int. J. Polym.* **2012**, 61(10), 778–792.
 9. Said, N.S.; Sarbon, N.M. Physical and mechanical characteristics of gelatin-based films as a potential food packaging material: a review. *Membr.* **2022**, 12, 442.
 10. McHugh, T.H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, J.M. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J. Food Sci.* **1993**, 58(4), 899-903.
 11. Al-Hassan, A.A.; Norziah, M.H. Starch–gelatin edible films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocoll.* **2012**, 26(1), 108–117.
 12. Luo, Q.; Hossen, M.A.; Zeng, Y.; Dai, J.; Li, S.; Qin, W.; Liu, Y. Gelatin-based composite films and their application in food packaging: A review. *J. Food Eng.* **2022**, 313, 110762.
 13. Acosta, S.; Jiménez, A.; Cháfer, M.; González-Martínez, C.; Chiralt, A. Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. *Food Hydrocoll.* **2015**, 49, 135–143.
 14. Caykara, T.; Özyürek, C.; Kantoglu, Ö.; Güven, O. Equilibrium swelling behavior of pH- and temperature-sensitive poly(n-vinyl 2-pyrrolidone-g-citric acid) polyelectrolyte hydrogels. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* **2000**, 38, 2063–2071.
 15. Benítez, J.L.; Lárez-Velásquez, C.; Rojas de Gáscue, B. Kinetic absorption and transport of water on synthesized hydrogels from acrylamide and maleic anhydride. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* **2015**, 35(2), 242-253.

Capítulo 6: Diseño de Nuevas Películas Activas a Base de Gelatina y Almidón con MeFPIAx y Ácido Gálico

El presente Capítulo describe el desarrollo y caracterización de películas a base de gelatina y almidón al 15% p/p, con la incorporación de MeFPIAx al 10%, glicerol al 25% y distintas concentraciones de ácido gálico, 2, 5 y 7%.

6.1. Materiales

Gelatina (Scharlau®), almidón (Nestlé Health Science®, Barcelona, España), glicerol ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich®), hidróxido de sodio (NaOH, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), carbonato de potasio (K_2CO_3 , Sigma-Aldrich®), nitrato de magnesio ($Mg(NO_3)_2$, 98%, Sigma-Aldrich®), cloruro de bario ($BaCl_2$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich®), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)-sal de diamonio (ABTS, Sigma®), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Sigma®), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma®), etanol 96% vol. (Porta®), peptona (Britania®), agar bacteriológico (Britania®), caldo nutritivo (Britania®).

6.2. Obtención de las Películas por Evaporación del Solvente (*Casting*)

Se elaboraron diez formulaciones mediante *casting* de las dispersiones acuosas al 15% p/p a base de gelatina y almidón en proporción másica 4:1, y una proporción del 10% p/p de los polímeros sintetizados con respecto al peso de la relación gelatina:almidón. Se añadió glicerol al 25% p/p con respecto al peso de los polímeros totales.

Para la preparación de las películas por *casting* se prepararon las dispersiones de los polímeros en agua destilada, con agitación magnética, y se mantuvieron en un baño termostático a 70 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió poco a poco una solución de NaOH 1,0 M hasta alcanzar un pH entre 8-9. Luego, se incorporaron distintas concentraciones de ácido gálico, 2, 5 y 7% p/p, como agente antioxidante y como posible entrecruzante, con el que se lograría brindar más estabilidad a las películas [1,2,3].

Finalmente, las dispersiones correspondientes se vertieron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, en una cantidad aproximada de 10 g de dispersión por placa y se dejaron secar durante una semana a temperatura y humedad ambiente. Las películas secas se despegaron de las placas y se acondicionaron durante una semana a 53% h.r. y 25 °C, previamente a su caracterización. Las películas sin agregado de MeFPIAx y ácido gálico se

consideraron películas control. Se caracterizaron las propiedades físico-químicas de los nuevos materiales obtenidos mediante distintos tipos de técnicas analíticas.

6.3. Caracterización de las películas activas

6.3.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis por FTIR se llevó a cabo en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.1 del Capítulo 4 (página 58).

6.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El análisis por DSC se llevó a cabo en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.2 del Capítulo 4 (página 58).

6.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis por TGA se llevó a cabo en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.3 del Capítulo 4 (página 58).

6.3.4. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los materiales se evaluaron en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 5.3.4. del Capítulo 5 (página 94).

6.3.5. Color

El color de las películas se midió según se describió en la sección 4.3.5 del Capítulo 4 (página 59).

6.3.6. Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp})

La permeabilidad al vapor de agua se determinó bajo las mismas condiciones explicadas en la sección 4.3.6 del Capítulo 4 (página 60).

6.3.7. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas

La cinética de hinchamiento se llevó a cabo en las condiciones descritas en la sección 4.3.8 del Capítulo 4 (página 62).

6.3.8. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las películas se llevó a cabo siguiendo los procedimientos detallados en la sección 5.3.8 del Capítulo 5 (página 95).

6.3.9. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas se determinó siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.3.10 del Capítulo 4 (página 64).

6.3.10. Migración específica y cinética de liberación de ácido gálico en simulante alimentario graso

En este capítulo se midió la migración específica del ácido gálico en las películas. Para ello, se cortaron probetas rectangulares de 6 × 1 cm y cada muestra se puso en contacto con 10 mL de simulante alimentario en tubos de ensayo tapados, manteniendo la relación de 6 dm²/L de simulante, condición según norma europea EN 13130-01. Se evaluaron tres probetas por cada formulación. El simulante alimentario utilizado fue etanol al 50% v/v en agua destilada como simulante alimentario graso. Las condiciones de contacto fueron de 10 días a 22 °C. A determinados intervalos de tiempo (0, 1, 5, 24 h, 7, 9 y 10 d) se tomaron alícuotas de 100 µL, se reemplazaron por 100 µL de simulante fresco y se cuantificó el ácido gálico liberado por espectroscopia UV a una λ de 272 nm. Se preparó una curva de calibrado utilizando patrones de ácido gálico entre 2,5 y 15 mg/L, los cuales se midieron también a una λ de 272 nm. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por kg de simulante.

6.3.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó según se describió en la sección 4.3.13 del Capítulo 4 (página 66).

6.4. Resultados y Discusión

La Tabla 6.1 muestra los nombres y la descripción de cada película elaborada; aquellas sin agregado de polímero ni ácido gálico fueron consideradas películas control y son las mostradas en el Capítulo 5, GA, que resultaron ser transparentes.

Tabla 6.1. Descripción de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	Descripción
GAG2	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y ácido gálico 2%
GAG5	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y ácido gálico 5%
GAG7	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y ácido gálico 7%
GAG2-MeFPIA1	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA1 10%, ácido gálico 2%
GAG5-MeFPIA1	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA1 10%, ácido gálico 5%
GAG7-MeFPIA1	Película a base de gelatina, almidón, glicerol y MeFPIA1 10%, ácido gálico 7%
GAG2-MeFPIA2	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA2 10%, ácido gálico 2%
GAG5-MeFPIA2	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA2 10%, ácido gálico 5%
GAG7-MeFPIA2	Película a base de gelatina, almidón, glicerol, MeFPIA2 10%, ácido gálico 7%

Las demás películas resultaron uniformes, flexibles, lisas y no se observaron grietas ni poros, a simple vista, tal y como se muestra en la Figura 6.1.

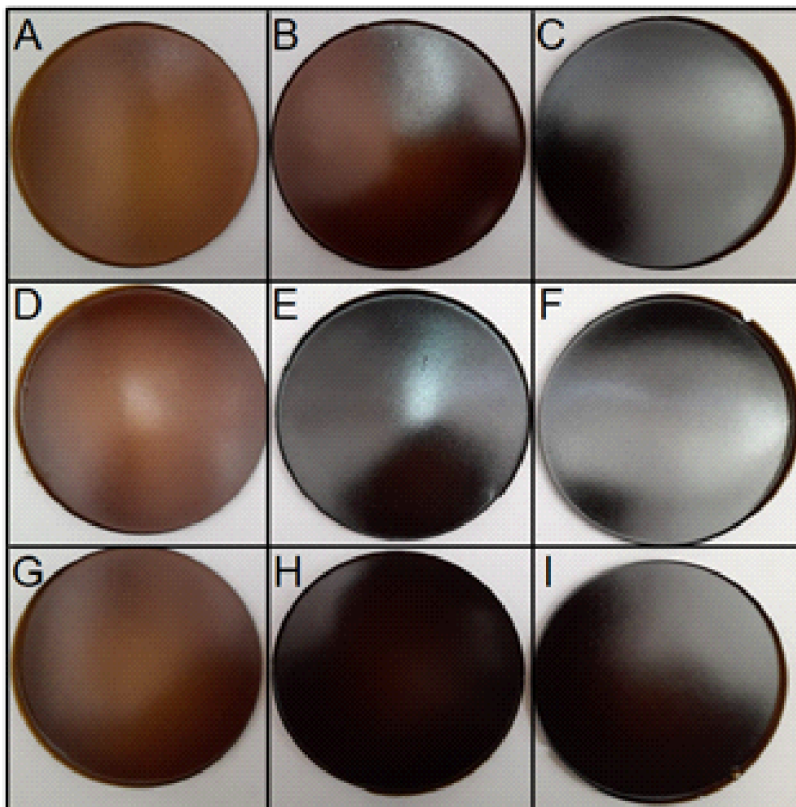


Figura 6.1. Películas a base de gelatina y almidón: (A): GAG2, (B) GAG2-MeFPIA1, (C) GAG2-MeFPIA2, (D) GAG5, (E) GAG5-MeFPIA1, (F) GAG5-MeFPIA2, (G) GAG 7, (H) GAG7-MeFPIA1, (I) GAG7-MeFPIA2.

6.4.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

Como se puede observar en la Figura 6.2, los espectros infrarrojos muestran las bandas de absorción de las películas de gelatina y almidón con los distintos porcentajes de ácido gálico, en presencia y ausencia de MeFPiAx. Considerando que se están analizando matrices similares a las analizadas en los Capítulos 4 y 5, podemos observar las mismas zonas y bandas ya mencionadas.

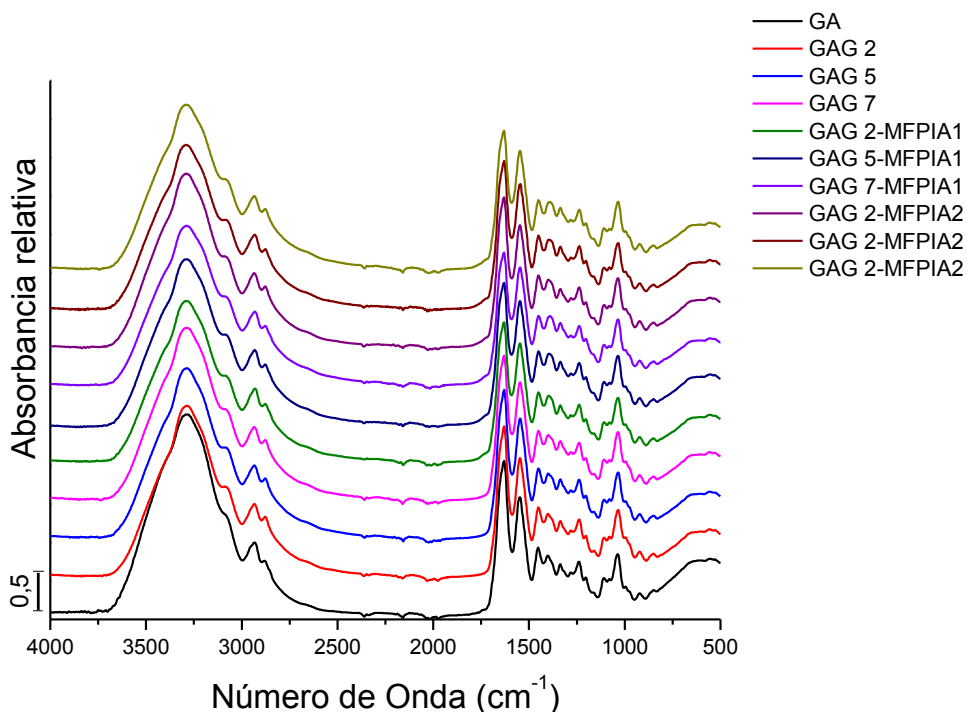


Figura 6.2. Espectros de infrarrojo por Transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) de las películas basadas en gelatina, almidón y ácido gálico.

6.4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Tal como se explicó previamente, las muestras de las películas fueron deshidratadas en un desecador que contenía en su interior sílica. En la Figura 6.3 se muestran los termogramas correspondientes al flujo total de calor relativo de las muestras. Las T_{gs} identificadas fueron confirmadas mediante el análisis del flujo de calor reversible dado por la modulación. Sus correspondientes temperaturas de transición se presentan en la Tabla 6.2. Las curvas DSC de estas películas presentan en todos los casos, sólo una T_g seguida de un pico endotérmico de relajación (T_{pico}) o fusión de los posibles cristales formados por

retrogradación del almidón, ya explicado en el capítulo anterior. Se presentan los valores de T_g que oscilan entre 64 °C y 79 °C. En ausencia de MeFPiAx, se puede observar la dependencia con la concentración de ácido gálico ya que a mayor concentración aumentó la T_g en comparación con la película control.

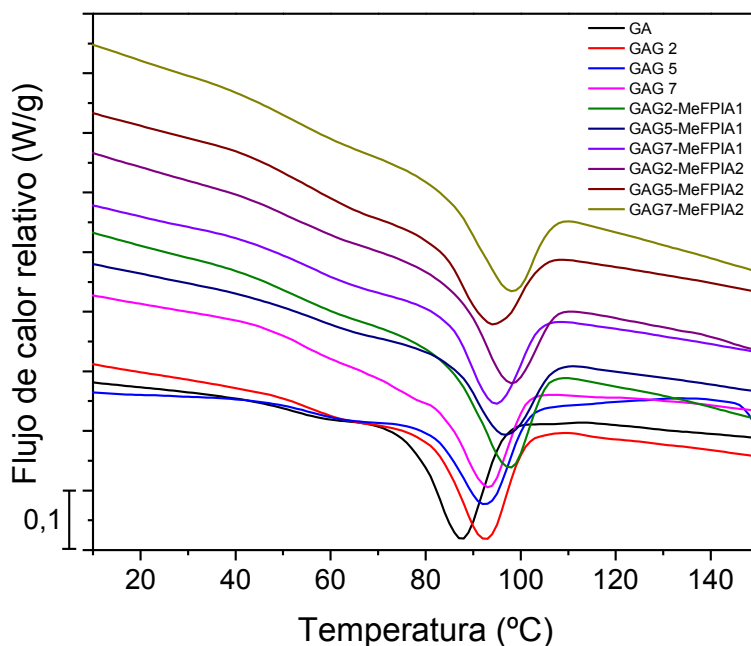


Figura 6.3. Termogramas de DSC de las películas de gelatina y almidón.

Tabla 6.2. Temperaturas de transición de las películas de gelatina y almidón. Error en la temperatura ± 1 °C

Películas	T_g (°C)	T_{pico} (°C)
GA	65	88
GAG 2	64	92
GAG 5	71	93
GAG 7	72	93
GAG2-MeFPiA1	72	97
GAG5-MeFPiA1	70	97
GAG7-MeFPiA1	71	95
GAG2-MeFPiA2	79	98
GAG5-MeFPiA2	61	94
GAG7-MeFPiA2	76	98

Estudios previos han demostrado la capacidad de refuerzo del ácido gálico en películas a base de proteínas y polisacáricos [1]. El aumento de las interacciones entre el ácido gálico

con la gelatina y el almidón provoca una reducción importante en la flexibilidad molecular de los materiales [2]. En presencia de MeFPiAx y ácido gálico, estos valores fueron aún mayores, ya que como se explicó anteriormente, la incorporación de polímero aumentó las fuerzas intermoleculares en la matriz, favoreciendo también la reducción de la movilidad molecular. Por lo tanto, al estar más reforzada la matriz, la T_g se desplaza hacia valores más altos.

6.4.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los resultados de los análisis termogravimétricos de las películas desarrolladas se presentan en la Figura 6.5. Los datos de las temperaturas se presentan en la Tabla 6.3. Se pueden observar tres zonas principales de degradación. Tal como se explicó en el Capítulo 4, se distinguen tres zonas de degradación. La primera (cerca de los 100 °C) asociada a la pérdida de humedad y posible volatilización de compuestos de bajo peso molecular. Una segunda zona (150-250 °C) asociada a la degradación parcial de las proteínas y la pérdida de glicerol. Por último, una tercera zona (cerca de los 300 °C) asociada a la degradación de los polisacáridos y la completa degradación de las proteínas y polímeros sintetizados.

Tabla 6.3. Temperaturas correspondientes a las temperaturas iniciales y máximas de degradación de las películas basadas en gelatina, almidón y ácido gálico

Películas	T_i (°C)	$T_{max 1}$ (°C)	$T_{max 2}$ (°C)
GAG	196	241	297
GAG2	208	246	304
GAG5	197	237	302
GAG7	195	234	307
GAG2-MeFPiA1	200	250	306
GAG5-MeFPiA1	197	250	305
GAG7-MeFPiA1	199	248	302
GAG2-MeFPiA2	200	251	305
GAG5-MeFPiA2	196	248	306
GAG7-MeFPiA2	209	244	303

En cuanto a las T_i , se puede observar cómo la incorporación de ácido gálico provoca un aumento en la misma cuando el contenido es del 2%, sin embargo, porcentajes mayores la reducen hasta alcanzar el valor de la película sin ácido gálico. Sucede lo mismo cuando se incorpora MeFPiAx en la película, aunque las diferencias no son muy significativas. Las

películas con 5 y 7% de ácido gálico, presentaron un evento térmico alrededor de 165 °C. Esto podría deberse a una degradación parcial del ácido gálico libre que no se encuentra interaccionando con la matriz [4].

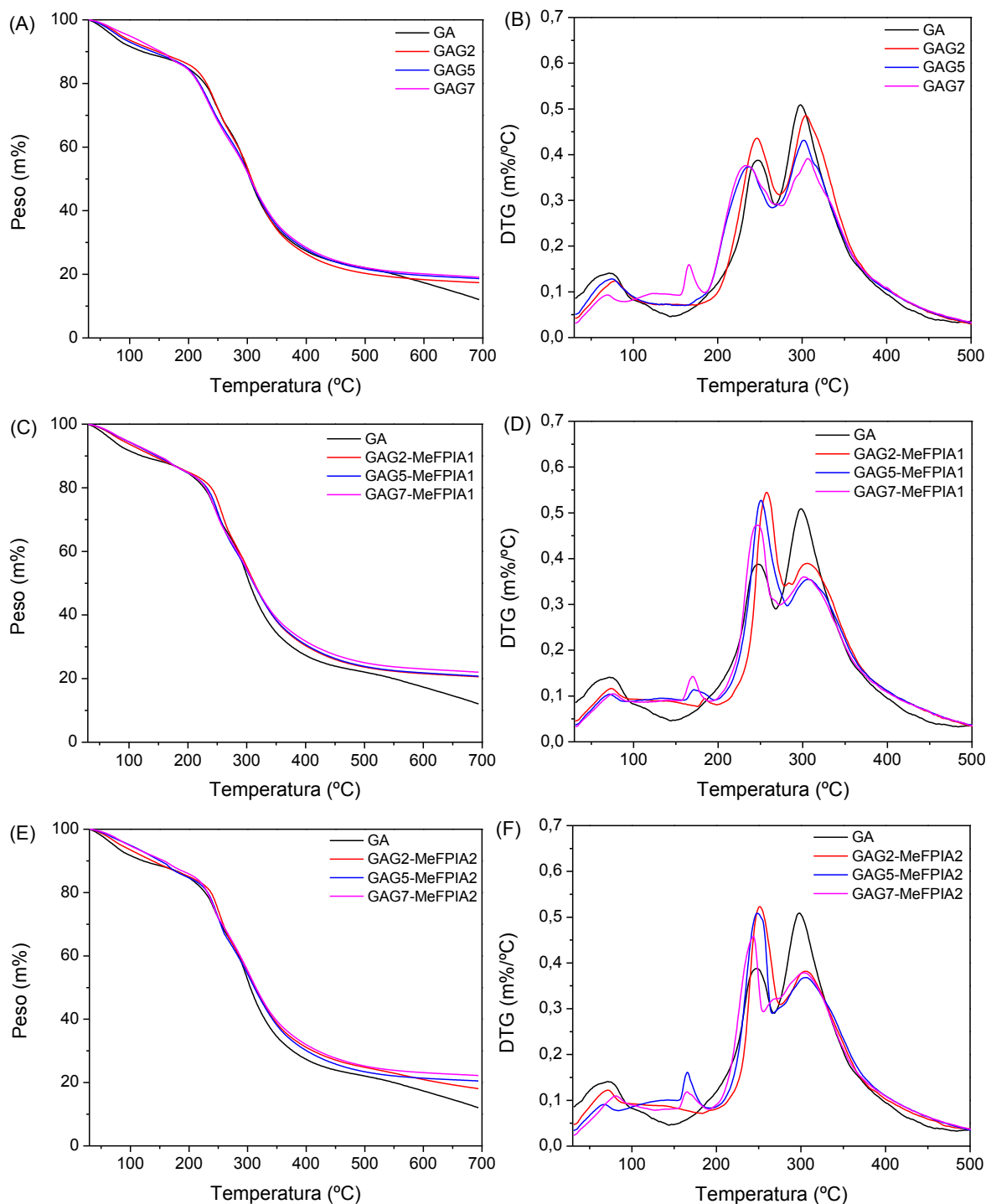


Figura 6.5. Curvas termogravimétricas de películas de gelatina y almidón: **(A)**, **(C)** y **(E)** Pérdida de peso en función de la temperatura, **(B)**, **(D)** y **(F)** Derivada del porcentaje del peso en función de la temperatura.

Tabla 6.3. Temperaturas correspondientes a las temperaturas iniciales y máximas de degradación de las películas basadas en gelatina, almidón y ácido gálico

Películas	T _i (°C)	T _{max 1} (°C)	T _{max 2} (°C)
GAG	196	241	297
GAG2	208	246	304
GAG5	197	237	302
GAG7	195	234	307
GAG2-MeFPIA1	200	250	306
GAG5-MeFPIA1	197	250	305
GAG7-MeFPIA1	199	248	302
GAG2-MeFPIA2	200	251	305
GAG5-MeFPIA2	196	248	306
GAG7-MeFPIA2	209	244	303

6.4.4. Propiedades Mecánicas

Los parámetros mecánicos se presentan en la Tabla 6.4. Al añadir solamente distintas concentraciones de ácido gálico (en ausencia de MeFPIAx), se observó un aumento en los valores de resistencia a la tracción (TS) y módulo de Young (MY) y, en consecuencia, una disminución en los valores de elongación a la rotura (e%). La resistencia a la tracción y la elongación a la rotura de las películas están inversamente relacionadas. Los grupos hidroxilo del ácido gálico (-OH) podrían interactuar con las cadenas proteicas de la gelatina aumentando las interacciones electrostáticas y formando puentes de hidrógeno, lo que refuerza la película al generar enlaces fuertes. Esta interacción aumenta la TS y el MY, lo que a su vez reduce la movilidad de las cadenas poliméricas y resulta en una menor elongación del material. Estos resultados son consistentes con estudios previos [5,6].

Al añadir MeFPIAx con diferentes concentraciones de ácido gálico, se observó un aumento en todos los parámetros mecánicos en comparación con las películas control. En este caso, la incorporación de ácido gálico tuvo un efecto positivo en la elongación del material. Curiosamente, la disminución de e% usualmente va acompañada de un aumento de la resistencia a la tracción (TS); sin embargo, esta generalidad entra en conflicto con algunos resultados informados por otros autores, donde se ha observado un aumento en ambos parámetros. Estas variaciones en los valores de e% se deben al efecto de introducir un agente reforzante en la matriz, por lo tanto, se pueden interpretar y justificar por diferentes razones. La concentración añadida del agente reforzante y la naturaleza de los

componentes formadores de película son elementos importantes que influyen de manera significativa en los valores de e% [7]. De esta manera, es importante resaltar que algunos agentes reforzantes podrían actuar tanto como agentes reforzantes y como plastificantes de la matriz, dependiendo de su concentración. En este estudio, el ácido gálico mejoró la elasticidad y la resistencia a la tracción, posiblemente porque a más altas concentraciones, el ácido gálico que no se encuentra interaccionando probablemente actúa como plastificante, reduciendo las interacciones entre las macromoléculas, con el consiguiente aumento de e%. Al ser una molécula pequeña, se inserta fácilmente en la red proteína-polisacárido-polímero de la película, aumentando la movilidad de las cadenas poliméricas [3]. Si bien estudios previos han informado sobre el uso de ácido gálico como agente entrecruzante para reforzar matrices biopoliméricas, también se ha informado que el ácido gálico puede tener un efecto plastificante al mejorar la elasticidad. En la mezcla de MeFPIAx y ácido gálico, se observó una mejora en la elasticidad de las películas sin afectar los valores de resistencia a la tracción (TS), que fueron más altos en comparación con las películas control. Resultados similares se obtuvieron al incorporar ácido gálico en películas a base de zeína [8,9].

Tabla 6.4. Parámetros mecánicos de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	TS (MPa)	MY (MPa)	e (%)
GA	11 ± 1 ^a	114 ± 8 ^a	86 ± 5 ^a
GAG2	22 ± 2 ^b	285 ± 21 ^b	71 ± 6 ^b
GAG5	21 ± 1 ^b	238 ± 19 ^c	76 ± 4 ^b
GAG7	22 ± 1 ^b	259 ± 8 ^{b,c}	71 ± 3 ^b
GAG2-MeFPIA1	20 ± 1 ^{b,c}	186 ± 38 ^{c,d}	114 ± 15 ^c
GAG5-MeFPIA1	18 ± 1 ^c	166 ± 3 ^d	110 ± 6 ^c
GAG7-MeFPIA1	19 ± 1 ^c	173 ± 22 ^d	109 ± 7 ^c
GAG2-MeFPIA2	23 ± 1 ^b	173 ± 12 ^d	113 ± 7 ^c
GAG2	19 ± 2 ^{bc}	152 ± 27 ^d	104 ± 8 ^c
GAG5	20 ± 1 ^{bc}	156 ± 26 ^d	104 ± 7 ^c

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey (P≥0,05).

6.4.5. Color

Las coordenadas L*, a* y b* se presentan en la Tabla 6.5, donde se observó un claro cambio en los valores de color con la adición de las distintas concentraciones de ácido

gálico. Estudios previos han reportado cambios de color en los materiales con la adición de agentes reforzantes. Por ejemplo, el entrecruzamiento del quitosano con ácido tánico mostró que la adición de este último desencadenaba los principales cambios de color en las películas obtenidas debido a su afinidad por la oxidación, lo que a su vez resultaba en películas de tonalidad parda [10]. De manera similar, el entrecruzamiento de proteínas con ácido cítrico resulta en películas de color marrón amarillento, especialmente cuando se exponen a altas temperaturas y/o durante períodos prolongados de tiempo [11]. En todos los casos la incorporación de ácido gálico produjo una disminución de la luminosidad, siendo este efecto aún mayor a más altas concentraciones. Con la incorporación de MeFPiAx se observó una tendencia al rojo y amarillo, sin embargo, a mayores concentraciones se observó una tendencia al verde y azul (disminución de los valores de a^* y b^* , respectivamente). Como se mencionó anteriormente, los materiales oscuros tienen sus beneficios dependiendo de la aplicación deseada.

El cambio de color ΔE^* es significativo en todos los casos y perceptible al ojo humano, como se puede apreciar en la Figura 6.1; este cambio fue más abrupto para el polímero con menor potencial negativo, MeFPiA1.

Tabla 6.5. Propiedades de color de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	L^*	a^*	b^*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
GA	$83 \pm 0,3^a$	$0,40 \pm 0,05^a$	$0,2 \pm 0,04^a$				
GAG2	$41,3 \pm 0,3^b$	$6,6 \pm 0,1^b$	$21,3 \pm 0,1^b$	-42	6	21	47
GAG5	$30,3 \pm 0,1^c$	$4,3 \pm 0,1^c$	$13,1 \pm 0,1^c$	-53	4	13	55
GAG7	$19,5 \pm 0,1^d$	$2,3 \pm 0,1^d$	$2,3 \pm 0,1^d$	-64	2	2	64
GAG2-MeFPiA1	$37,2 \pm 0,1^e$	$5,2 \pm 0,1^e$	$18,9 \pm 0,1^e$	-46	5	19	50
GAG5-MeFPiA1	$22,1 \pm 0,2^f$	$3,7 \pm 0,1^c$	$5,4 \pm 0,1^f$	-61	3	5	62
GAG7-MeFPiA1	$19,8 \pm 0,1^d$	$2,3 \pm 0,1^d$	$2,7 \pm 0,1^g$	-64	2	2	64
GAG2-MeFPiA2	$36,2 \pm 0,1^g$	$7,2 \pm 0,1^b$	$17,8 \pm 0,1^h$	-47	7	18	51
GAG5-MeFPiA2	$20,4 \pm 0,2^d$	$2,4 \pm 0,1^d$	$2,5 \pm 0,2^g$	-63	2	2	63
GAG7-MeFPiA2	$18,5 \pm 0,1^h$	$1,0 \pm 0,1^f$	$1,0 \pm 0,1^i$	-65	1	1	65

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

6.4.6. Permeabilidad al Vapor de Agua (P_w^{exp})

Los datos de P_w^{exp} se presentan en la Tabla 6.6. Si bien la adición de agentes entrecruzantes puede introducir un camino tortuoso para que las moléculas de agua se

transfieran a través de la matriz, como se puede observar la incorporación de ácido gálico, tanto en presencia como en ausencia de MeFPIAx, produjo un aumento en la permeabilidad de las películas. Considerando que la gelatina es muy hidrofílica y que el ácido gálico presenta tres grupos hidroxilo en su estructura, podría suceder que el ácido gálico que no está interaccionando aumente la hidrofilia de la matriz, aumentando los valores de P_w^{exp} . A su vez, a más altas concentraciones, aumenta la movilidad de los espacios entre las cadenas poliméricas, fomentando la difusividad de la película y acelerando la tasa de transmisión de vapor de agua.

No se observaron grandes diferencias en cuanto a los distintos porcentajes de ácido gálico incorporados (excepto en GAG7-MeFPIA2, donde se obtuvieron los valores más altos).

Tabla 6.6. Valores de la P_w^{exp} de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	P_w^{exp} (10^{-10} g s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹)
GA	4,90 ± 0,05 ^a
GAG2	5,75 ± 0,03 ^b
GAG5	5,76 ± 0,03 ^b
GAG7	5,57 ± 0,05 ^c
GAG2-MeFPIA1	6,05 ± 0,03 ^d
GAG5-MeFPIA1	6,17 ± 0,04 ^e
GAG7-MeFPIA1	5,95 ± 0,03 ^f
GAG2-MeFPIA2	5,96 ± 0,03 ^f
GAG5-MeFPIA2	5,98 ± 0,02 ^f
GAG7-MeFPIA2	6,85 ± 0,04 ^g

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

6.4.7. Evaluación de la cinética de hinchamiento de las películas

La Figura 6.7 muestra el comportamiento de hinchamiento de las diferentes películas en PBS a 25 °C. Como se mencionó en el capítulo anterior, las películas control sin MeFPIAx y sin ácido gálico mostraron un mayor grado de hinchamiento y fueron las más débiles, ya que con el tiempo de ensayo perdieron su integridad. Sin embargo, con la incorporación de ácido gálico, tanto en presencia como en ausencia de MeFPIAx, se observa un menor grado de hinchamiento debido a la interacción entre los grupos hidroxilo del compuesto fenólico y las cadenas proteicas de la gelatina. Al aumentar las interacciones intermoleculares, resultó en una disminución de la elasticidad del material al reducir los

espacios entre las cadenas poliméricas. Esto hace que el material sea menos flexible y, por lo tanto, disminuye su capacidad de deformarse e hincharse [12].

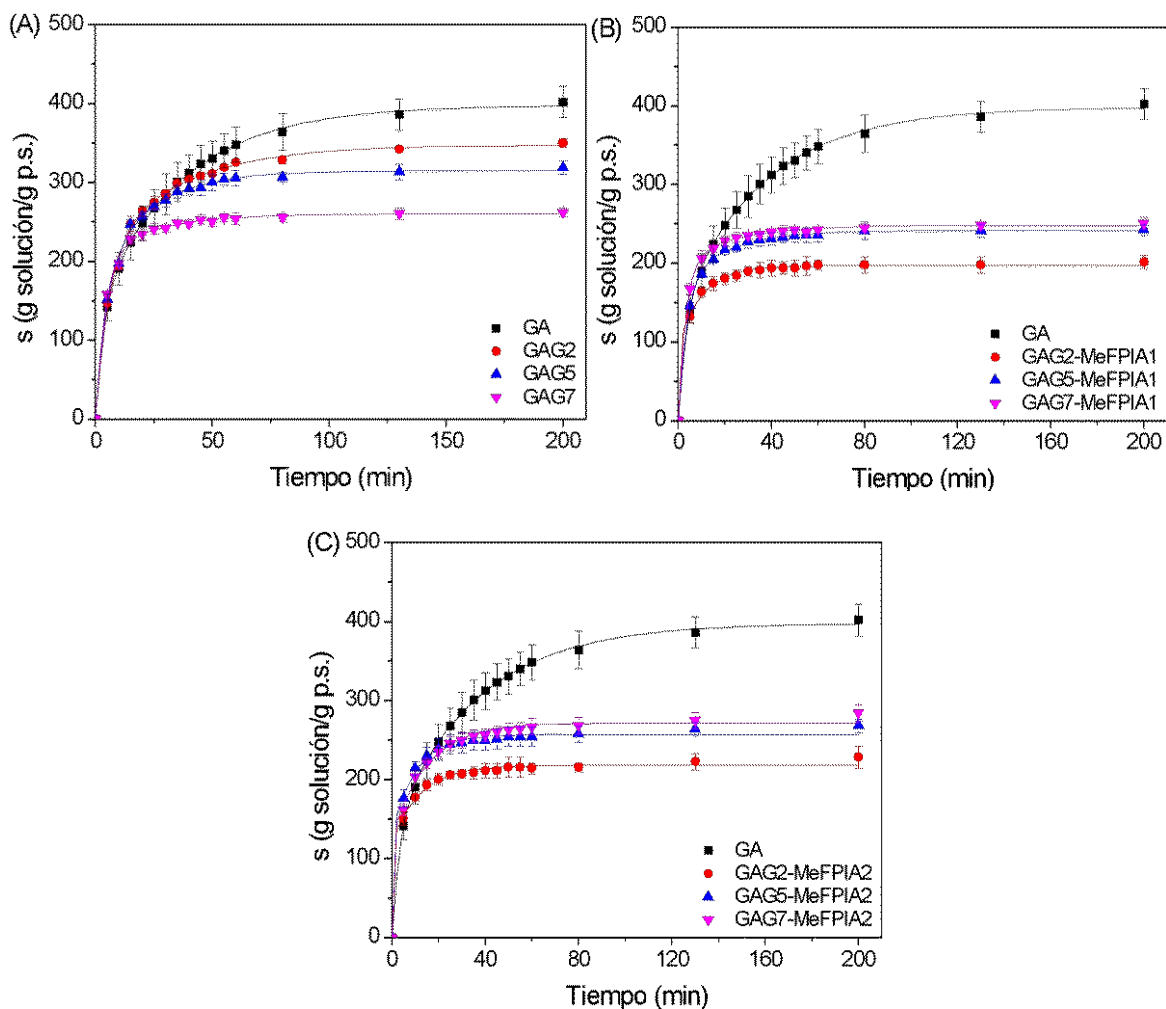


Figura 6.7. Curvas de hinchamiento de las diferentes películas a 25 °C en PBS: **(A)** GA, GAG2, GAG5, GAG7; **(B)** GA, GAG2-MeFPIA1, GAG5-MeFPIA1, GAG7-MeFPIA1, **(C)** GA, GAG2-MeFPIA2, GAG5-MeFPIA2, GAG7-MeFPIA2.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en propiedades mecánicas. En la Figura 6.7A se puede observar que, a mayor concentración de ácido gálico, menor es el grado de hinchamiento. Sin embargo, en las Figuras 6.7B y 6.7C, cuando se incorpora el polímero MeFPIAx, se obtuvo el menor grado de hinchamiento con la incorporación del 2% de ácido gálico. Con este porcentaje de compuesto fenólico, se logró un valor más alto de módulo de Young (un parámetro relacionado con la rigidez del material) debido a la aparición de nuevas interacciones entre los componentes. Como se mencionó anteriormente, al aumentar el porcentaje, parte del ácido gálico que no se encuentra

interactuando favorece el movimiento de las cadenas poliméricas, lo que ejerce un efecto plastificante. Por lo tanto, es lógico que se hayan obtenido valores de hinchamiento más altos.

Las gráficas correspondientes a la representación de $(W_t - W_0)/W_0$ frente a $t^{1/2}$ para analizar el comportamiento Fickiano se muestran en la Figura 6.8. Como se puede observar, las curvas de absorción de la solución de las películas para todas las formulaciones fueron no lineales hasta un aumento del 60% en la masa de hidrogel. Por lo tanto, como se puede ver en la figura, la mayoría de las diferentes formulaciones no siguieron la difusión Fickiana unidimensional, por lo que los valores que toma n deben ser diferentes a 0.5, y los datos deben ser ajustados por un proceso no fickiano o de difusión anómalo.

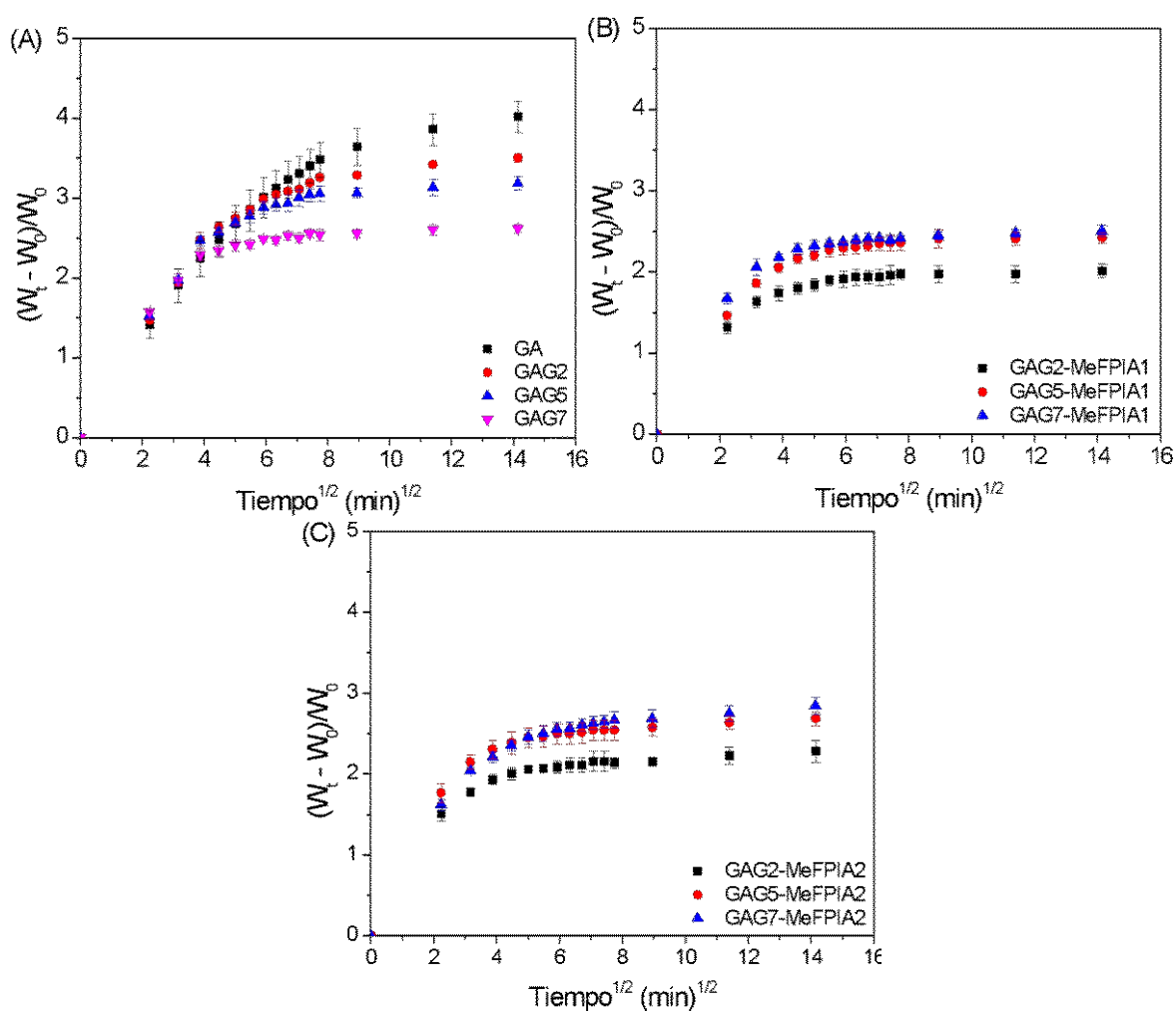


Figura 6.8. Representación de $(W_t - W_0)/W_0$ frente a $t^{1/2}$ a 25 °C en PBS: **(A)** GA, GAG2, GAG5, GAG7, **(B)** GAG2-MeFPiA1, GAG5-MeFPiA, GAG7-MeFPiA1, **(C)** GAG2-MeFPiA2, GAG5-MeFPiA2, GAG7-MeFPiA2.

Tal como se vio en el capítulo anterior, las películas presentan el mismo comportamiento anómalo. Consecuentemente, los datos experimentales se ajustaron usando una función biexponencial anteriormente descrita (ver parámetros cinéticos en la Tabla 6.7). Este modelo ajustó bastante bien los datos obtenidos según el comportamiento de las películas durante el hinchamiento (ver las líneas de la Figura 6.7).

Tabla 6.7. Parámetros cinéticos de hinchamiento para las diferentes películas a base de gelatina, almidón y ácido gálico a 25 °C.

Películas	s_{∞} (g/g)	Δs_1 (g/g)	τ_1 (min)	ϕ_1	Δs_2 (g/g)	τ_2 (min)	τ_2 (min)
GAG 2%	346 ± 40	206 ± 21	5,7 ± 0,8	0,60	140 ± 19	35 ± 6	0,40
GAG 5%	314 ± 51	182 ± 26	4,6 ± 0,8	0,58	132 ± 25	23 ± 4	0,42
GAG 7%	260 ± 26	205 ± 14	4,1 ± 0,4	0,79	55 ± 13	25 ± 7	0,21
GAG2-MeFPIA1	193 ± 2	193 ± 2	5,0 ± 0,4	1	--	--	--
GAG5-MeFPIA1	241 ± 14	171 ± 7	3,5 ± 0,2	0,71	70 ± 7	20 ± 2	0,29
GAG7-MeFPIA1	248 ± 12	201 ± 6	3,2 ± 0,2	0,81	47 ± 5	25 ± 4	0,19
GAG2-MeFPIA2	213 ± 2	213 ± 2	4,8 ± 0,4	1	--	--	--
GAG5-MeFPIA2	257 ± 27	133 ± 14	0,002 ± --	0,52	124 ± 13	11 ± 1	0,48
GAG7-MeFPIA2	278 ± 17	190 ± 9	3,4 ± 0,3	0,68	88 ± 8	28 ± 4	0,32

6.4.8. Actividad Antioxidante

La Figura 6.9 presenta los resultados de la actividad antioxidante de las películas utilizando dos métodos diferentes: ABTS y DPPH. Según los resultados obtenidos a partir del método ABTS, se observó una actividad antioxidante muy baja en las películas de gelatina y almidón. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que también informaron resultados similares. Sin embargo, al incorporar ácido gálico tanto en presencia como en ausencia de MeFPIAx, se obtuvieron valores elevados de RSA% en comparación con las películas control, lo que indica una alta actividad antioxidante de los materiales desarrollados. En ausencia de MeFPIAx, se observaron valores de RSA superiores al 90%, los cuales aumentaron aún más con mayor concentración de ácido gálico. En presencia de MeFPIAx, si bien se observó la misma tendencia (donde mayores concentraciones de ácido gálico resultaron en una mayor actividad antioxidante), con una incorporación del 2% de ácido gálico se obtuvieron valores cercanos al 50%, mientras que para concentraciones de

5% y 7%, estos valores superaron el 90% [13]. Como se mencionó en la sección anterior, al incorporar un 2% de ácido gálico, las películas presentaron menor hinchamiento, ya que el ácido gálico interactuó con la matriz, brindándole menor flexibilidad al material y liberando menos ácido gálico al medio. En cambio, con un 5% y un 7%, las películas presentaron un mayor hinchamiento debido al efecto plastificante del ácido gálico, lo que resultó en valores más altos de %RSA.

Los compuestos fenólicos emergen como fuertes agentes antirradicales en gran parte debido a sus propiedades redox, que los convierten en donantes eficientes de hidrógeno, agentes reductores y quelantes de metales. El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), es una molécula orgánica que pertenece a la familia de los ácidos fenólicos, es un compuesto de bajo peso molecular presente en la naturaleza que ha demostrado poseer fuertes actividades antioxidantes en numerosos estudios. Proporciona una protección eficaz contra el daño oxidativo causado por especies reactivas que se encuentran a menudo en los sistemas biológicos, incluyendo el radical hidroxilo (OH^\cdot), el superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el peróxido (ROO^\cdot), así como los no-radicales, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso (HOCl) [14]. El ácido gálico es una molécula plana, que consta de un anillo aromático, tres grupos hidroxilo fenólicos y un grupo ácido carboxílico. A nivel estructural, el ácido gálico consiste en un anillo de benceno con tres grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) unidos a los carbonos 3, 4 y 5, y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) unido al carbono 1. Estos grupos hidroxilo son responsables de las propiedades antioxidantes, ya que pueden donar electrones y neutralizar especies reactivas de oxígeno, protegiendo así contra el daño oxidativo. Se encuentra de forma natural en diversas fuentes vegetales, como las uvas, los frutos secos, las bayas y algunas plantas medicinales. Además de sus propiedades antioxidantes, el ácido gálico también ha mostrado potenciales efectos antitumorales, antimicrobianos y antiinflamatorios, lo que ha despertado interés en su aplicación en la medicina y la industria alimentaria [15]. Con respecto al método DPPH, puede observarse que si bien los valores no fueron tan altos como los obtenidos por el método ABTS, se observa la misma tendencia ya que a mayores porcentajes de ácido gálico incorporado se obtiene mejores valores de RSA (%).

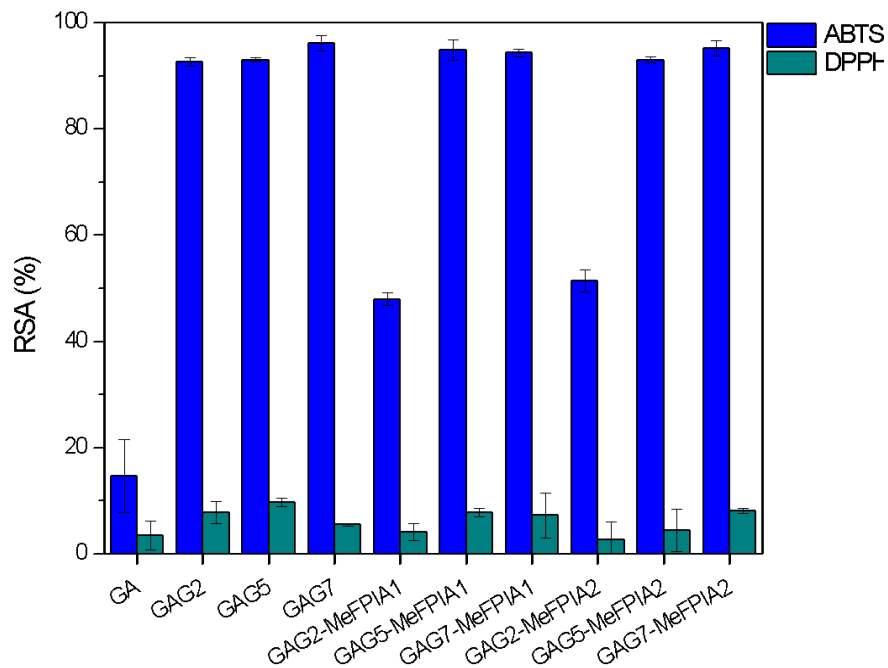


Figura 6.9. Actividad antioxidante de las películas por el método ABTS y DPPH.

6.4.9. Actividad Antimicrobiana

Los resultados presentados en la Figura 6.10 muestran la el porcentaje de reducción bacteriana (%) de las películas desarrolladas después de un período de incubación de 24 h a 37 °C con ligera agitación en contacto con bacterias de *S. aureus*. La muestra control (sin MeFPIAx y sin ácido gálico) no se muestra en el gráfico, ya que no mostró ninguna inhibición.

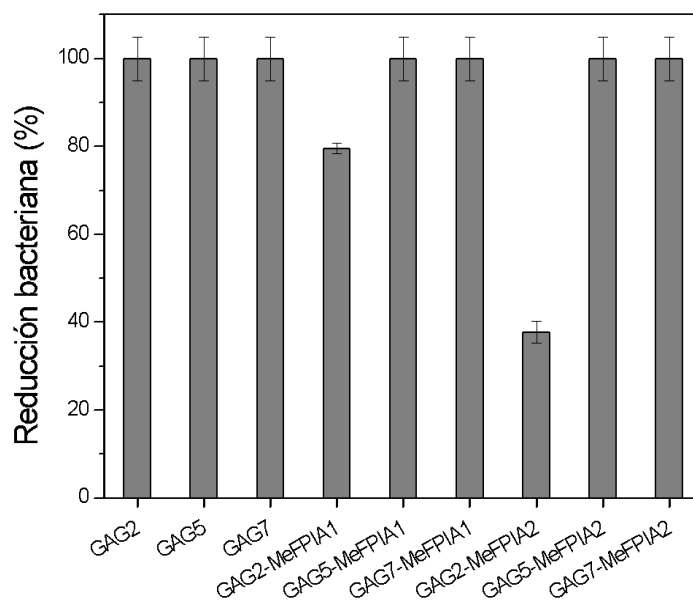


Figura 6.10. Porcentaje de reducción bacteriana frente a *S. aureus* de las diferentes películas.

Por otro lado, las películas sin MeFPiAx pero con ácido gálico en todas sus concentraciones mostraron una inhibición completa debido a la actividad antimicrobiana del compuesto fenólico [16]. Las películas que contenían MeFPiA1 y MeFPiA2 al 5% y 7% también presentaron una completa inhibición del microorganismo. Sin embargo, cuando se usó un 2% de ácido gálico, se obtuvieron valores menores. En presencia de MeFPiA1, se observó una reducción del $80 \pm 1\%$, mientras que con MeFPiA2 se obtuvo una reducción del $38 \pm 3\%$. Como se mencionó en la sección anterior, las películas con un 2% de ácido gálico presentaron un menor grado de hinchamiento debido a una mayor interacción entre los componentes de la matriz, lo que resulta en una menor movilidad de las cadenas poliméricas. Respecto a MeFPiA1, se obtuvieron valores similares a los reportados en el capítulo anterior. Sin embargo, en el caso de MeFPiA2, se observaron valores menores, posiblemente debido a interacciones adicionales. Si bien se esperaría que las muestras con MeFPiA2 presentaran valores más altos en comparación con MeFPiA1, debido al mayor grado de funcionalización (cuaternización) de este polímero y a una mayor cantidad de grupos catiónicos disponibles en la superficie de la película para la eliminación por contacto directo, los resultados obtenidos fueron menores. En el caso del 5% y 7%, el ácido gálico, al actuar como plastificante, se liberó más fácilmente en el medio, lo que permitió su actividad antimicrobiana y antioxidante.

6.4.10. Migración en simulantes alimentario graso y su cinética de liberación

En la Figura 6.11 se muestra la cinética de liberación del ácido gálico presente en las películas desarrolladas en contacto con el simulante alimentario graso (etanol al 50% v/v en agua destilada). Se puede apreciar una clara dependencia entre la concentración y la liberación de ácido gálico. Con una incorporación del 2%, se observa que la película GAG22 y la película GAG-MeFPiA1 presentan resultados similares, mientras que la película GAG2-MeFPiA2 muestra valores menores. Sin embargo, al aumentar las concentraciones de ácido gálico, se puede observar que los valores de migración correspondientes a las películas que contienen MeFPiAx en su formulación van aumentando en comparación con las películas de gelatina y almidón (GAG5 y GAG7).

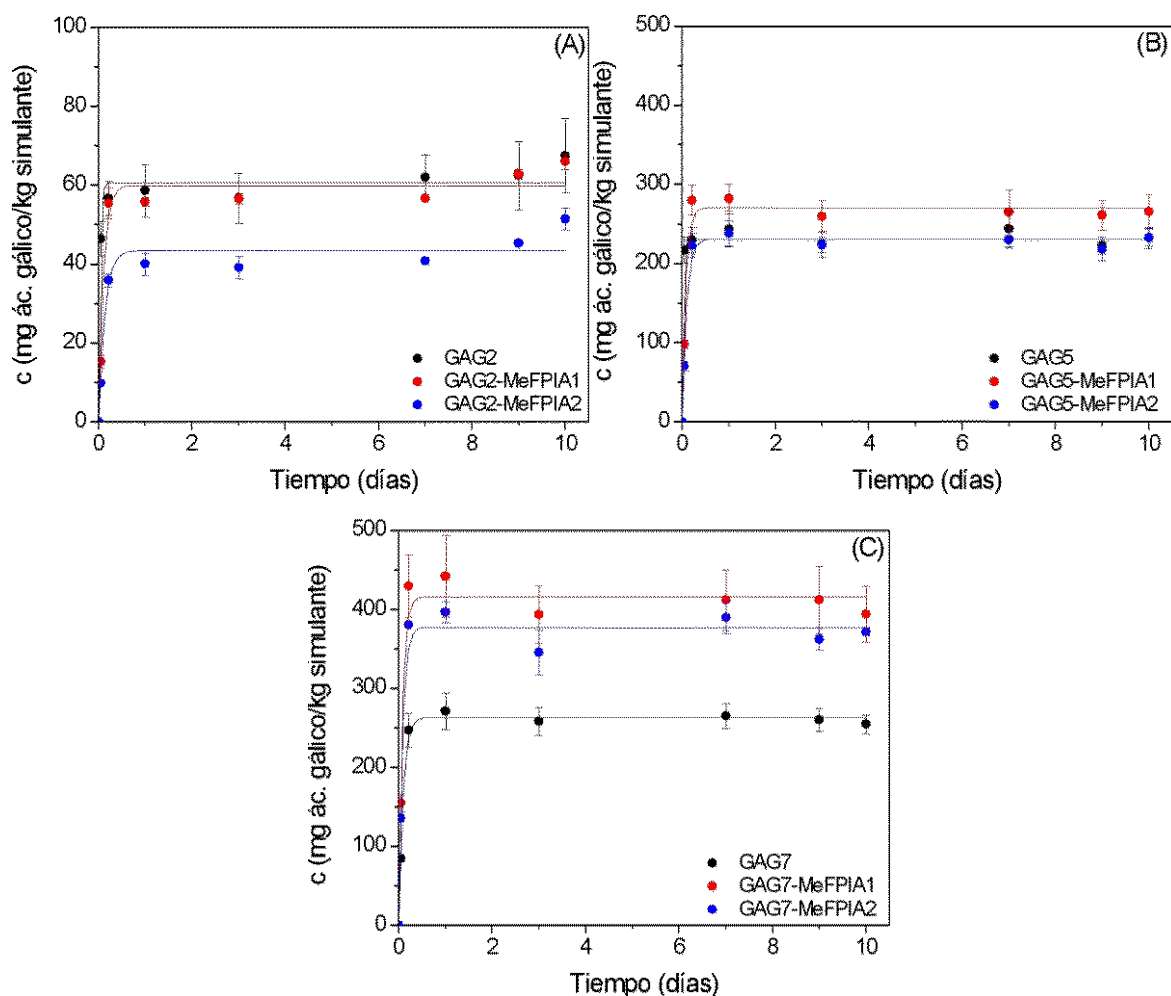


Figura 6.11. Cinética de migración de ácido gálico en simulante alimentario graso.

Tabla 6.8. Parámetros cinéticos de liberación de ácido gálico para las diferentes películas.

Películas	c_{∞} (g/g)	Δc_1 (g/g)	τ_1 (min)
GAG2	61 ± 2	61 ± 2	$0,03 \pm 0,006$
GA2-MeFPIA1	60 ± 2	60 ± 2	$0,11 \pm 0,025$
GAG2-MeFPIA2	43 ± 2	43 ± 2	$0,13 \pm 0,038$
GAG5	230 ± 5	230 ± 5	$0,004 \pm --$
GAG5-MeFPIA1	270 ± 7	270 ± 7	$0,08 \pm 0,01$
GAG5-MeFPIA2	230 ± 5	230 ± 5	$0,09 \pm 0,01$
GAG7	263 ± 4	263 ± 4	$0,09 \pm 0,01$
GAG7-MeFPIA1	416 ± 12	416 ± 12	$0,08 \pm 0,01$
GAG7-MeFPIA2	377 ± 11	377 ± 11	$0,08 \pm 0,01$

6.5. Conclusiones parciales

En conclusión, la incorporación del polímero y el ácido gálico demostró ser beneficioso al mejorar las propiedades mecánicas de los materiales estudiados. Aunque se observó un aumento en los valores de permeabilidad, se encontró una disminución en la capacidad de hinchamiento del material. Además, se destaca la excelente actividad antioxidante y antimicrobiana que se obtuvo a concentraciones más altas de ácido gálico. Asimismo, se observó un cambio de color más oscuro en las películas, lo cual puede tener implicaciones funcionales en diversas aplicaciones. Estos resultados resaltan la promisoría combinación de polímeros y ácido gálico para mejorar las propiedades y funcionalidades de los materiales.

6.6. Referencias

1. Bhatia, S.; Al-Harrasi, A.; Al-Azri, M.S.; Ullah, S.; Makeen, H.A.; Meraya, A.M.; Albratty, M.; Najmi, A.; Anwer, M.K. Gallic acid crosslinked gelatin and casein based composite films for food packaging applications. *Polymers* **2022**, *14*, 4065.
2. Zhang, X.; Do, M.D.; Casey, P.; Sulistio, A.; Qiao, G.G.; Lundin, L.; Lillford, P.; Kosaraju, S. Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1125–1132.
3. Limpisophon, K., & Schleining, G. (2016). Use of Gallic Acid to Enhance the Antioxidant and Mechanical Properties of Active Fish Gelatin Film. *J. Food Sci.* **2016**, *82*(1), 80–89.
4. Patil, D. B., Das, S. K., Das Mohapatra, P. K., & Nag, A. (2011). Physico-chemical studies and optimization of gallic acid production from the seed coat of Terminalia belerica Roxb. *Annals of Microbiology*, *61*(3), 649–654.
5. Singh, N.; Georget, D.M.; Belton, P.S.; Barker, S.A. Physical properties of zein films containing salicylic acid and acetyl salicylic acid. *J. Cereal Sci.* **2010**, *52*, 282–287.
6. Reddy, N.; Jiang, Q.; Yang, Y. Preparation and properties of peanut protein films crosslinked with citric acid. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *39*, 26–30
7. Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I., & Mohammadi, R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 687–707.
8. Alkan, D.; Aydemir, L.Y.; Arcan, I.; Yavuzdurmaz, H.; Atabay, H.I.; Ceylan, C.; Yemenicioglu A. Development of flexible antimicrobial packaging materials against

- campylobacter jejuni by incorporation of gallic acid into zein-based films. *J Agric. Food Chem.* **2011**, 59(20):11003–10.
9. Arcan, I.; Yemenicioglu, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Res. Int.* **2011**, 44(2):550–6.
 10. S. Rivero, M. García, A. Pinotti, Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films, *Carbohydr. Polym.* 82 (2) (2010) 270–276.
 11. C. Schramm, S.B. Vukusic, D. Katovic, Non-formaldehyde durable pressfinishing of dyed fabrics: evaluation of cotton-bound polycarboxylic acids. *Color. Technol.* **2002**, 118 (5), 244–249.
 12. Benítez, J.L.; Lárez-Velásquez, C.; Rojas de Gáscue, B. Kinetic absorption and transport of water on synthesized hydrogels from acrylamide and maleic anhydride. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* 2015, 35(2), 242-253.
 13. Nur Amila Najwa, I. S., Guerrero, P., de la Caba, K., & Nur Hanani, Z. A. (2020). Physical and antioxidant properties of starch/gelatin films incorporated with *Garcinia atroviridis* leaves. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100583.
 14. Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Advances* **2015**, 5(35), 27540–27557
 15. Fitzpatrick, L. R., & Woldemariam, T. Small-molecule drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Comprehensive Medicinal Chemistry III* **2017**, 495–510.
 16. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance* **2013**, 19(4), 256–265.

Capítulo 7: Diseño de Películas Activas a Base de Biomasa de Levadura con MeFPIA

El presente capítulo describe el desarrollo y caracterización de películas a base de biomasa de levadura al 10% p/p, con la incorporación de MeFPIAx 10%, glicerol al 25% y ácido gálico al 5%, elaboradas a pH 6 y pH 10.

7.1. Materiales

Levadura panadera (BL) comercial (Compañía Argentina de Levaduras S.A.I.C. ®), glicerol ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich®), hidróxido de sodio (NaOH, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), carbonato de potasio (K_2CO_3 , Sigma-Aldrich®), nitrato de magnesio ($Mg(NO_3)_2$, 98%, Sigma-Aldrich®), cloruro de bario ($BaCl_2$, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich®), buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich®), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)-sal de diamonio (ABTS, Sigma®), persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Sigma®), DPPH (Sigma®), etanol 96% vol. (Porta®), peptona (Britania®), agar bacteriológico (Britania®), caldo nutritivo (Britania®), prueba de β -glucanos (Megazyme®).

7.2. Determinación del contenido de β -glucanos y proteínas presentes en la biomasa de levadura

La determinación de los β -glucanos presentes en la biomasa de levadura se realizó por el método enzimático y espectrométrico que se fundamenta en cuantificar el contenido de (1-3:1-4)- β -D-glucanos utilizando un Kit ©Megazyme. Ver la metodología en el Anexo I. En cuanto a la determinación del contenido total de proteínas se realizó a través del método Kjeldahl el cual consta de tres etapas: digestión, destilación y valoración, utilizando un equipo automatizado FOSS®. Ver la metodología en el Anexo II.

7.3. Obtención de las películas por evaporación del solvente (*Casting*)

Se elaboraron seis formulaciones mediante *casting* de las dispersiones acuosas a base de biomasa de levadura panadera. Para la preparación de las películas por *casting* se preparó una dispersión de BL al 10% p/p. (10 g de materia/100 g de dispersión). A esta dispersión se le aplicó un tratamiento de ruptura por ultrasonido durante 15 minutos, 100% de amplitud y 40 °C. Posteriormente, se colocó en un baño térmico durante 20 minutos a 90 °C, se enfrió y se le realizó nuevamente el mismo tratamiento por ultrasonidos. Finalmente, se le incorporó el glicerol en un 25% p/p y se dividió la dispersión a la mitad, añadiendo poco a poco una solución de NaOH 1,0 M hasta alcanzar un pH de 6 y 10,

respectivamente. Posteriormente se incorporó el polímero correspondiente en un 10% p/p y el ácido gálico en un 5% p/p. Las dispersiones se vertieron en placas de Petri de 90 mm de diámetro, en una cantidad de 10 g de dispersión por placa y se dejaron secar en estufa a 40 °C durante 24 horas, aproximadamente. Las películas secas se despegaron de las placas y se acondicionaron durante una semana a 53% h.r. y 25 °C, previamente a su caracterización. Las películas sin agregado de MeFPiAx y ácido gálico se consideraron películas control. Se caracterizaron las propiedades físico-químicas de los nuevos materiales obtenidos mediante distintas técnicas analíticas.

7.4. Caracterización de las películas activas

7.4.1. Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis por FTIR se llevó a cabo en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.1 del Capítulo 4 (página 58).

7.4.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis por TGA se llevó a cabo en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.3 del Capítulo 4 (página 58).

7.4.3. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los materiales se evaluaron en las mismas condiciones que las indicadas en la sección 4.3.4 del Capítulo 4 (página 59).

7.4.4. Color

El color de las películas se midió según se describió en la sección 4.3.5 del Capítulo 4 (página 59).

7.4.5. Permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp})

La permeabilidad al vapor de agua se determinó bajo las mismas condiciones explicadas en la sección 4.3.6 del Capítulo 4 (página 60).

7.4.6. Hidratación

La hidratación de las películas se determinó bajo las mismas condiciones explicadas en la sección 4.3.7 del Capítulo 4 (página 61).

7.4.7. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las películas se llevó a cabo siguiendo los procedimientos detallados en la sección 5.3.8 del Capítulo 5 (página 95).

7.4.8. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas se determinó siguiendo el procedimiento detallado en la sección 4.3.10 del Capítulo 4 (página 64).

7.4.9. Migración específica y cinética de liberación de ácido gálico en simulante alimentario graso

En este capítulo se midió la migración específica del ácido gálico en las películas. Para ello, se cortaron probetas rectangulares de 6×1 cm y cada muestra se puso en contacto con 10 mL de simulante alimentario en tubos de ensayo tapados, manteniendo la relación de $6 \text{ dm}^2/\text{L}$ de simulante, condición según norma europea EN 13130-01. Se evaluaron tres probetas por cada formulación. El simulante alimentario utilizado fue etanol al 50% v/v en agua destilada como simulante alimentario graso. Las condiciones de contacto fueron de 10 días a 22°C . A determinados intervalos de tiempo (0, 1, 5, 24 h, 7, 9 y 10 d) se tomaron alícuotas de $100 \mu\text{L}$, se reemplazaron por $100 \mu\text{L}$ de simulante fresco y se cuantificó el ácido gálico liberado por espectroscopia UV a una λ de 272 nm. Se preparó una curva de calibrado utilizando patrones de ácido gálico entre 2,5 y 15 mg/L, los cuales se midieron también a una λ de 272 nm. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por kg de simulante.

La concentración de dopamina c en función del tiempo, $c(t)$, se ajustó con la solución de la Ley de Fick de transporte diferencial de masa, para una difusión de agua unidireccional en una placa plana infinita, según el modelo de Crank, como se puede observar en la Ecuación 7.1.

$$c(t) = c_{\infty} \left\{ 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp \left[-D_w (2n+1)^2 \frac{\pi^2 t}{4L^2} \right] \right\} \quad (7.1)$$

donde c_{∞} es el contenido de agua en el equilibrio, L es el espesor de la película y D_w es el coeficiente de difusión aparente en unidades de $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$.

7.4.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo según lo indicado en la sección 4.3.13 del Capítulo 4 (página 66).

7.5. Resultados y Discusión

La Tabla 7.1 muestra los nombres y la descripción de cada película elaborada; aquellas sin agregado de polímero y ácido gálico fueron consideradas películas control.

Tabla 7.1. Descripción de las películas a base de biomasa de levadura.

Películas	Descripción
BL	Película a base de biomasa de levadura y glicerol.
BL-MeFPIA1	Película a base de biomasa de levadura, glicerol y MeFPIA1.
BL-MeFPIA2	Película a base de biomasa de levadura, glicerol y MeFPIA2.
BLG	Película a base de biomasa de levadura, glicerol y ácido gálico.
BLG-MeFPIA1	Película a base de biomasa de levadura, glicerol, MeFPIA1 y ácido gálico
BLG-MeFPIA2	Película a base de biomasa de levadura, glicerol, MeFPIA2 y ácido gálico

Tal y como se observa en las Figuras 7.1 y 7.2 las películas resultaron uniformes, flexibles, lisas y no se observaron grietas ni poros, a simple vista. Puede observarse el cambio en la coloración de las películas a pH 10, siendo estas más oscuras, posiblemente a la reacción de Maillard, que se ve favorecida a pH alcalino. Esto se detallará más adelante,

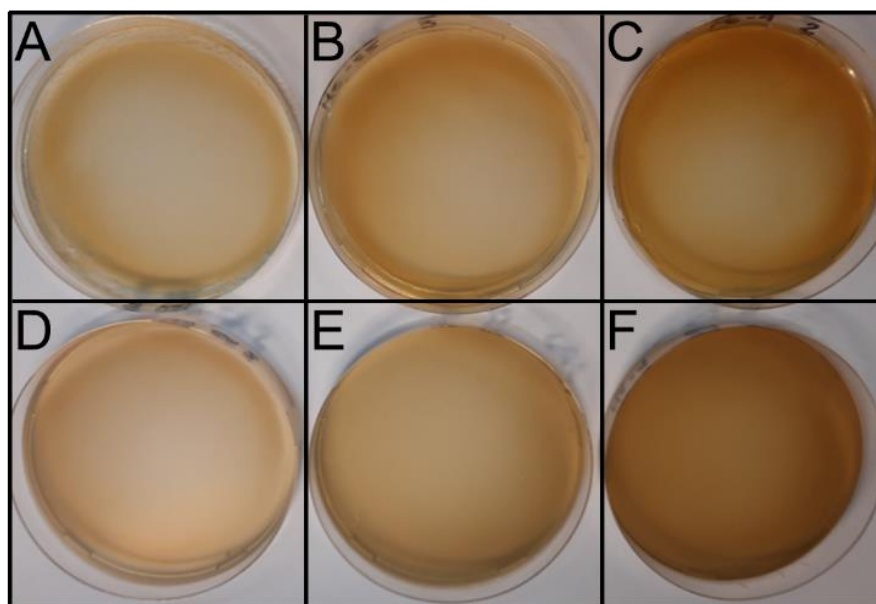


Figura 7.1. Películas a base de BL a pH 6: **(A)** BL, **(B)** BL-MeFPIA1, **(C)** BL-MeFPIA2, **(D)** BLG, **(E)** BLG-MeFPIA1, **(F)** BLG-MeFPIA2

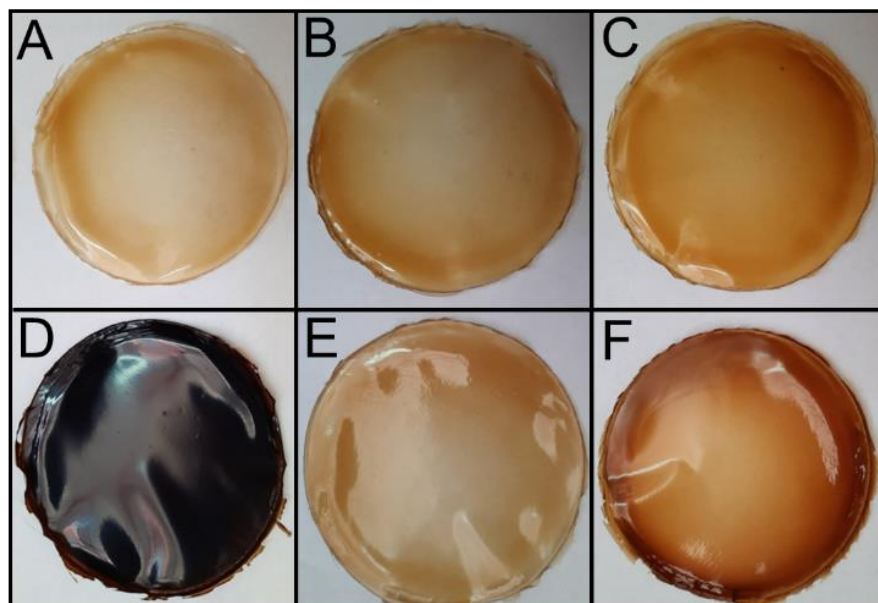


Figura 7.2. Películas a base de BL a pH 10: **(A)** BL, **(B)** BL-MeFPIA1, **(C)** BL-MeFPIA2, **(D)** BLG, **(E)** BLG-MeFPIA1, **(F)** BLG-MeFPIA2.

7.5.1. Determinación del contenido de β -glucanos y proteínas presentes en la biomasa de levadura.

Como se explicó anteriormente, los polisacáridos y las proteínas se utilizan generalmente por su capacidad para establecer interacciones poliméricas y crear una red continua responsable de las propiedades funcionales de las películas biodegradables [1,2]. Hasta hace poco tiempo, la biomasa de levadura tradicionalmente no ha sido considerada una fuente integral de biopolímeros para formar películas, pero se ha demostrado que ciertos tratamientos adecuados permiten formar películas con propiedades interesantes sin necesidad de tener que aislar sus componentes [3]. Por lo tanto, es importante cuantificar el contenido de polisacáridos y proteínas presentes. Estudios realizados con levadura panadera comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) revelan que la pared celular representa entre un 10% a un 25% del total de materia seca, y de dicha pared entre el 85% al 90% son polisacáridos, el resto son proteínas. En este estudio, el contenido de glucanos totales encontrados en la biomasa de levadura fue de $12,6\% \pm 0,1$ (1,1% α -glucanos y 11,5% β -glucanos). Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores reportados y el valor obtenido podemos decir que se encuentra dentro de lo esperado. En cuanto al contenido de proteínas fue de $51,6 \pm 0,2\%$. Los valores obtenidos fueron algo más altos a los reportados por otros autores donde se ha informado un contenido de proteínas de $41,2 \pm 0,4\%$ [4].

7.5.2. Caracterización de las Películas

7.5.2.1. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)

La Figura 7.3A muestra los espectros de las películas a base de biomasa de levadura con y sin MeFPiAx a pH 6. Como se puede observar, los espectros FTIR son representativos del material como se ha reportado anteriormente [5]. Los espectros mostraron una banda de absorción alrededor de 1150 cm^{-1} correspondiente a la tensión de los enlaces C-C y C-O-C. La gran banda de absorción centrada en 1032 cm^{-1} y los hombros en 1074 y 993 cm^{-1} podrían atribuirse a la vibración de tensión de los grupos laterales C-OH y al anillo de los azúcares. Las muestras mostraron una banda a 918 cm^{-1} debido a la vibración de tensión del C-OH del glicerol [6,7]. A partir de los espectros, es posible confirmar la presencia de proteínas en la pared celular mediante la aparición de las bandas de amida I y II a 1624 y 1539 cm^{-1} , respectivamente. La banda amplia centrada en 3269 cm^{-1} indica la vibración de tensión de los grupos hidroxilos (polisacáridos y glicerol) y agua. Las bandas a 2924 y 2875 cm^{-1} corresponden a los movimientos de vibración en tensión de CH, CC y CH₂. El aumento en las bandas de absorción entre 1450 y 1230 cm^{-1} corresponde a la presencia de glicerol [8]. Se observó una banda a 1726 cm^{-1} en todas las muestras y puede asociarse al carbonilo de los fosfolípidos y de los polímeros MeFPiAx.

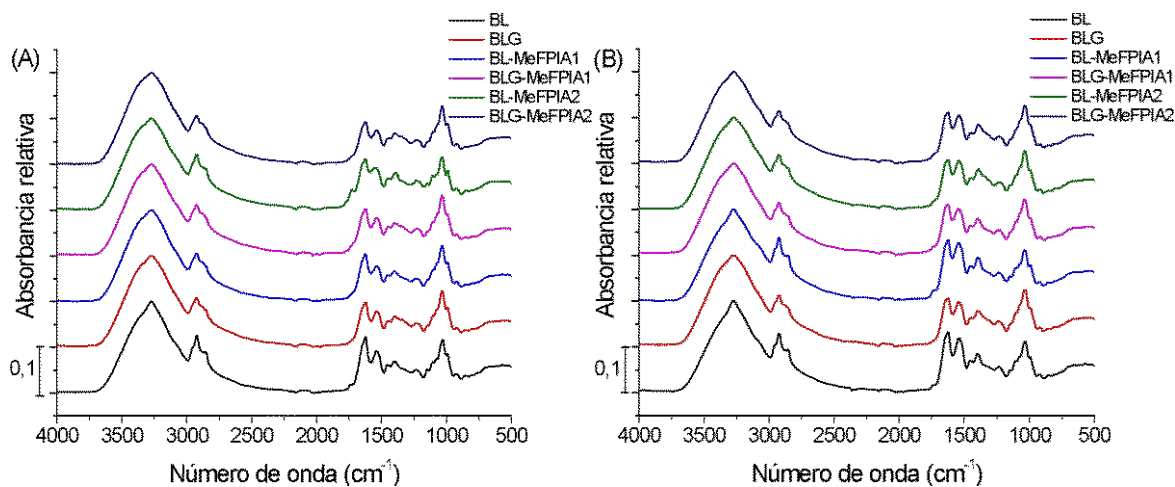


Figura 7.3. Espectro de infrarrojo por Transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) de las películas basadas en BL: **(A)** pH 6, **(B)** pH 10.

La Figura 7.3B muestra los espectros de las películas a base de biomasa de levadura con y sin MeFPiAx a pH 10. El cambio más relevante se puede asociar con el aumento en la intensidad de la banda correspondiente a la amida II y amida III ($1250\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$), las cuales se incrementaron con el aumento de pH. Esto reflejaría modificaciones en la

estructura de las proteínas, probablemente aumentando las interacciones entre los componentes de la película. Por lo tanto, el cambio de pH favorecería nuevas interacciones lo que también afecta la intensidad de las amidas [9,10].

7.5.2.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los resultados de los análisis termogravimétricos de las películas desarrolladas a pH 6 y pH 10 se presentan en las Figuras 7.4 y 7.5, respectivamente. Los datos correspondientes a las T_i y T_{max} se presentan en la Tabla 7.2.

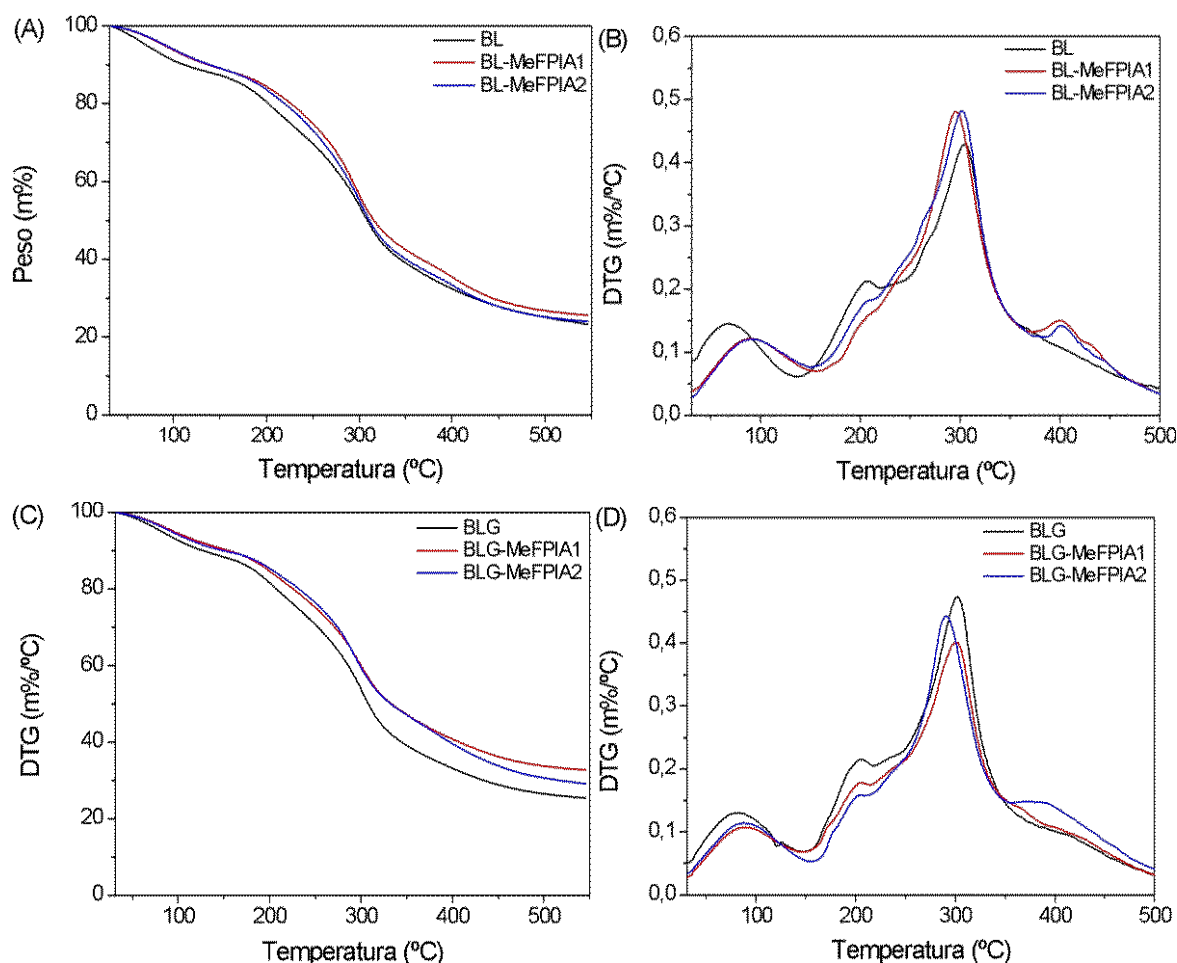


Figura 7.4. Curvas termogravimétricas de las películas de BL a pH 6: **(A)** y **(B)** Pérdida de peso en función de la temperatura, **(C)** y **(D)** Derivada del porcentaje del peso en función de la temperatura.

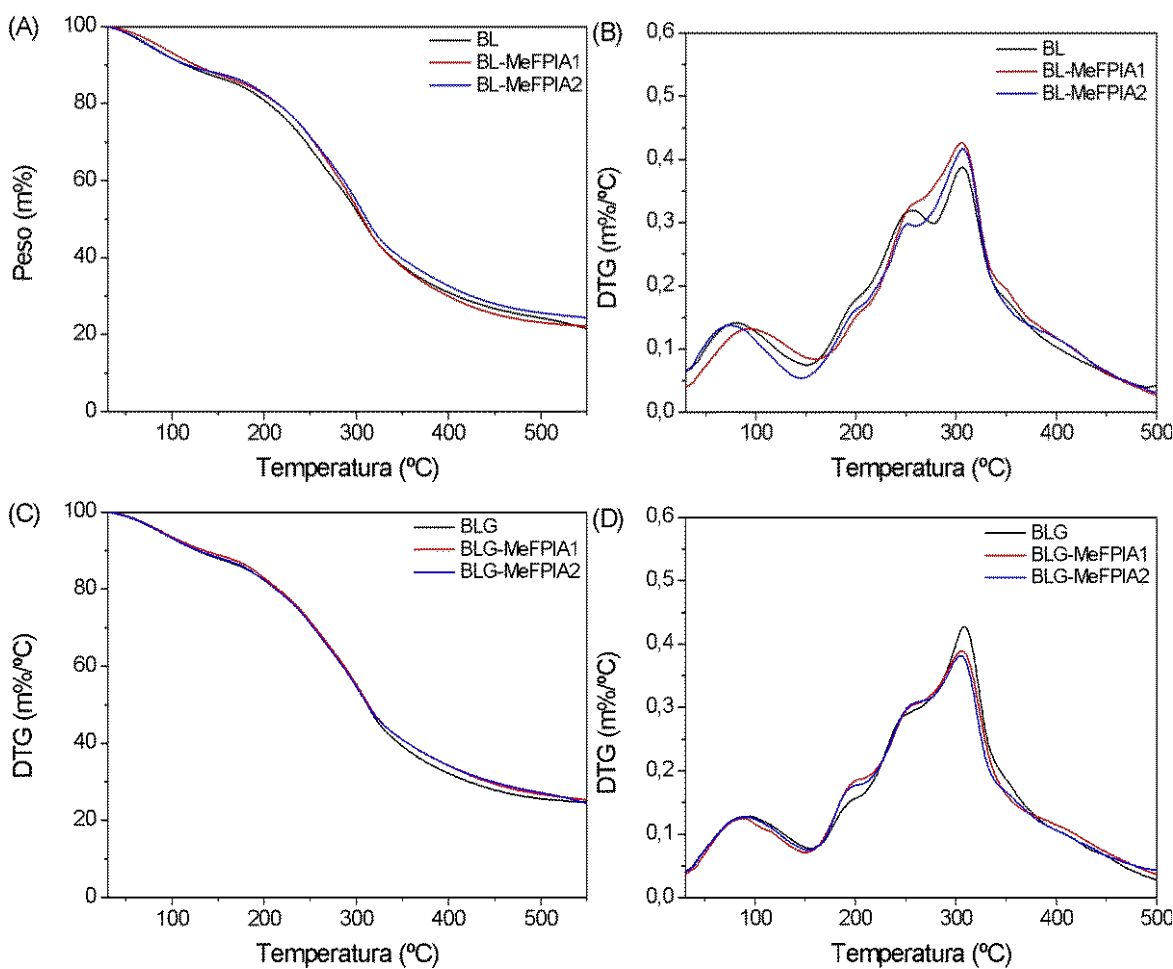


Figura 7.5. Curvas termogravimétricas de películas de BL pH 10: **(A) y (B)** Pérdida de peso en función de la temperatura, **(C) y (D)** Derivada del porcentaje del peso en función de la temperatura.

Tabla 7.2. Temperaturas correspondientes a las temperaturas iniciales y máximas de degradación de las películas basadas en gelatina y almidón.

Películas	pH 6		pH 10	
	T _i (°C)	T _{max} (°C)	T _i (°C)	T _{max} (°C)
BL	173	304	171	306
BL-MeFPIA1	196	295	179	305
BL-MeFPIA2	191	301	184	306
BL-GA	182	302	182	310
BL-MeFPIA1-GA	198	301	188	306
BL-MeFPIA2-GA	201	291	184	306

Los termogramas se dividieron en cuatro zonas según los diferentes eventos que ocurrieron en el proceso de degradación. La primera zona, entre 30 °C y 150 °C, está principalmente relacionada con la evaporación de agua y compuestos volátiles [11]. La temperatura de degradación inicial, tanto con la incorporación de MeFPIAx como de ácido gálico, se desplazó ligeramente a temperaturas más altas, indicando una mayor termorresistencia de los materiales. En la segunda zona, entre 150 y 275 °C, ocurre la degradación de proteínas y la descomposición térmica del glicerol, tal y como se describe en estudios previos [12]. En la tercera zona, entre temperaturas de 275 a 350 °C, ocurre la reacción de pirólisis del β -glucano, la degradación masiva de la cadena central de proteínas y otras moléculas orgánicas [12,13]. La temperatura máxima de degradación se registró alrededor de 300 °C. Finalmente, la última región (cuarta zona) comenzó a 350 °C y continuó hasta el final del intervalo de temperaturas estudiado.

En el caso de las películas sin ácido gálico, la incorporación de MeFPIAx provoca una sutil mejora en la estabilidad térmica con respecto al control. Sin embargo, dichas diferencias son muy pequeñas cuando se incorpora ácido gálico a la mezcla. En el caso de las películas preparadas a pH 10 es prácticamente inapreciable.

7.5.2.3. Propiedades Mecánicas

Los valores correspondientes a la resistencia a la tracción (TS), el módulo de Young (MY) y la elongación a la rotura (e%) de las películas a pH 6 y pH 10 se presentan en las Tablas 7.3 y 7.4, respectivamente. A ambos pHs, se puede observar que al añadir tanto el polímero MeFPIAx como el ácido gálico, todos los parámetros aumentaron en comparación con las películas control. La biomasa de levadura contiene proteínas y polisacáridos, que representan aproximadamente la mitad de su peso seco, capaces de interactuar y formar la matriz que da origen a la película. Con la incorporación de MeFPIAx, los grupos carboxílicos podrían interactuar con las cadenas proteicas y los grupos hidroxilo de los β -glucanos, aumentando las interacciones electrostáticas y formando puentes de hidrógeno que refuerzan la película. Además, como se mencionó anteriormente, el ácido gálico es una molécula pequeña que se inserta fácilmente en la matriz y puede interactuar con los diferentes componentes, mejorando los valores de TS y MY. Por otro lado, el ácido gálico “en exceso” atrapado en la matriz y que no interactúa aumenta la distancia entre las cadenas poliméricas, lo que incrementa la movilidad de las mismas y, en consecuencia, aumenta los valores de e%.

Tabla 7.3. Parámetros mecánicos de las películas a base de BL a pH 6.

Películas	TS (MPa)	MY (MPa)	e (%)
BL	1,0 ± 0,3 ^a	27,6 ± 8,5 ^{a,b}	8,3 ± 2,7 ^a
BL-MeFPIA1	1,5 ± 0,3 ^{a,b}	29,4 ± 6,6 ^{a,b}	12,4 ± 4,4 ^{a,b}
BL-MeFPIA2	1,7 ± 0,3 ^b	27,2 ± 5,4 ^a	16,4 ± 5,1 ^b
BL-GA	1,6 ± 0,2 ^b	26,4 ± 2,0 ^a	13,7 ± 2,3 ^b
BL-MeFPIA1-GA	1,9 ± 0,2 ^b	35,0 ± 6,6 ^{a,b}	13,1 ± 2,4 ^{a,b}
BL-MeFPIA2-GA	1,8 ± 0,2 ^b	38,8 ± 3,9 ^b	8,8 ± 1,9 ^a

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey (P≥0,05).

Tabla 7.4. Parámetros mecánicos de las películas a base de BL a pH 10.

Películas	TS (MPa)	MY (MPa)	e (%)
BL	1,2 ± 0,1 ^a	16,8 ± 2,2 ^a	13,3 ± 2,5 ^a
BL-MeFPIA1	3,4 ± 0,1 ^b	42,9 ± 4,2 ^b	21,3 ± 2,2 ^b
BL-MeFPIA2	3,5 ± 0,2 ^b	45,1 ± 5,5 ^b	21,8 ± 1,7 ^b
BL-GA	1,7 ± 0,1 ^c	23,5 ± 2,2 ^c	13,8 ± 2,5 ^a
BL-MeFPIA1-GA	2,5 ± 0,1 ^d	27,9 ± 3,2 ^c	27,5 ± 2,2 ^c
BL-MeFPIA2-GA	3,7 ± 0,6 ^b	50,4 ± 11 ^b	16,6 ± 2,4 ^a

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey (P≥0,05).

Si bien los parámetros mecánicos mejoraron tanto a pH 6 como a pH 10, estos últimos fueron aún mejores. Algunos autores han informado del efecto del pH en dispersiones filmogénicas utilizando diferentes fuentes de polímeros naturales. Se reportó un aumento de e% en películas de proteína de soja con el aumento del pH de la dispersión, siendo del 20% a pH 4,6 al 140% a pH 10 [14]. La misma tendencia se observó en otros trabajos [15], utilizando películas de aislado de proteína de soja a pH ácido (1-2), donde TS fue 33% más baja que a pH 11, y e% aumentó de 34% a 187% a pH 1-2 y pH 11, respectivamente. También se describen mejoras en las propiedades mecánicas de las películas de aislado de proteína de suero a valores de pH alcalinos [16].

Este comportamiento podría explicarse debido a los cambios en los enlaces inter e intramoleculares en ambos pHs. Se ha descrito que los enlaces disulfuro establecidos a valores de pH alcalinos son responsables de las mejoras en las propiedades mecánicas de las películas de aislado de proteína de soja [14]. En cuanto a otros estudios en matrices de levadura, demostraron cambios en las propiedades de los materiales desarrollados a distintos pHs. Estos autores explicaron que la solubilización de una fracción de β-glucano

podría contribuir a una mejor dispersión y, por lo tanto, a una mejor interacción entre los polímeros, mejorando consecuentemente los parámetros [9].

7.5.2.4. Color

Las películas a base de biomasa de levadura tienen un color ámbar, al igual que otras películas reportadas en la literatura [17,18]. Como se explicó anteriormente, estos materiales podrían utilizarse cuando la observación del producto no es un aspecto clave o cuando el producto debe ser protegido de la luz. Las propiedades de color de las películas a pH 6 se muestran en la Tabla 7.5.

La presencia de MeFP1A1 y MeFP1A2 en la formulación provocó cierta disminución de la luminosidad (disminución de los valores de L*) con una tendencia al amarillo (aumento de los valores de b*), mientras que no se observaron diferencias significativas en cuanto a los valores de a*. En presencia de ácido gálico se observó una menor luminosidad (disminución de los valores de L*), con una tendencia al rojo y amarillo (aumento de los valores de a* y b*), en comparación con las películas control.

Tabla 7.5. Propiedades de color de las películas a base de BL a pH 6.

Películas	L*	a*	b*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
BL	77 ± 1 ^a	-0,7 ± 0,1 ^a	15,8 ± 1,3 ^a	--	--	--	--
BL-MeFP1A1	74 ± 1 ^c	-0,8 ± 0,2 ^a	19,3 ± 1,0 ^b	-3	-0,1	4	4
BL-MeFP1A2	72 ± 1 ^c	-1,0 ± 0,3 ^a	25,6 ± 0,8 ^d	-5	-0,3	10	11
BL-Ag	69 ± 2 ^b	1,2 ± 0,3 ^b	14,9 ± 1,4 ^a	-8	1,9	-1	8
BL-MeFP1A1-Ag	66 ± 1 ^d	-0,2 ± 0,1 ^b	18,2 ± 0,4 ^c	-11	0,5	2	11
BL-MeFP1A2-Ag	61 ± 1 ^e	1,6 ± 0,3 ^c	23,5 ± 0,2 ^d	-16	2,3	7	18

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey (P≥0,05).

Las propiedades de color de las películas a pH 10 se muestran en la Tabla 7.6. La presencia de MeFP1A1 provocó una leve disminución de la luminosidad (disminución de los valores de L*), aunque no significativa, con una tendencia al verde y al amarillo (disminución de los valores de a* y aumento de los valores de b*). La presencia de MeFP1A2 provocó una disminución de la luminosidad (disminución de los valores de L*), con una tendencia al rojo y al amarillo (aumento de los valores de a* y b*). La misma tendencia se observó con la incorporación de ácido gálico.

Tabla 7.6. Propiedades de color de las películas a base de BL a pH 10.

Películas	L*	a*	b*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
BL	73 ± 0,4 ^a	-0,6 ± 0,1 ^a	17 ± 0,5 ^a	--	--	--	--
BL-MeFPiA1	72 ± 1,1 ^a	-1,7 ± 0,1 ^b	20 ± 1,0 ^b	-1	-1,0	3	4
BL-MeFPiA2	67 ± 0,3 ^b	-0,1 ± 0,1 ^c	28 ± 0,2 ^c	-7	0,5	12	14
BL-Ag	17 ± 0,2 ^c	1,6 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,1 ^d	-56	2,2	-16	58
BL-MeFPiA1-Ag	66 ± 0,9 ^b	0,6 ± 0,2 ^a	19 ± 0,5 ^b	-8	1,3	3	8
BL-MeFPiA2-Ag	56 ± 1,5 ^d	5,6 ± 0,7 ^d	26 ± 0,3 ^d	-17	6,2	9	20

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

Hay que destacar que los valores L^* de las películas disminuyeron con la incorporación de ácido gálico y aún más hacia valores de pH alcalino; estos resultados concuerdan con resultados previamente reportados [9]. Dado que el valor L^* está relacionado con la luminosidad del material, reflejó el desarrollo de productos oscuros debido posiblemente a la reacción de Maillard o reacción de pardeamiento no enzimático. Las reacciones entre un compuesto que contiene un grupo carbonilo (como azúcar reductor) y un compuesto que contiene un grupo amino (como aminoácido, péptido o proteína) produce una variedad compleja de compuestos coloreados (desde amarillo claro hasta café oscuro) conocidos como productos de reacción de Maillard [19]. La velocidad de reacción de Maillard se ve fuertemente influenciada por los cambios de pH, entre otros factores. Se observa un incremento en la velocidad a medida que aumenta el pH, alcanzando su punto máximo alrededor de un pH de 10 [20]. Estos cambios contribuyen a obtener películas más amarronadas y a aumentar los valores de ΔE . El parámetro ΔE permite evaluar si los cambios en el color de las películas son significativos para el ojo humano. Cuando ΔE es menor que 2 ó 3, las variaciones no son fácilmente percibidas por los observadores [21]. En este estudio, todos los cambios fueron perceptibles.

7.5.2.5. Permeabilidad al Vapor de Agua (P_w^{exp})

Los datos de P_w^{exp} de las películas a pH 6 y pH 10 se presentan en la Tabla 7.7. A pH 6, la incorporación de polímero MeFPiA1 no provocó diferencias, mientras que la incorporación de MeFPiA2 redujo los valores de permeabilidad. Si bien ambos polímeros aumentan el contenido de grupos hidrofílicos en la matriz, también aumentan las interacciones entre los distintos componentes de las películas, lo que se refleja en una mayor barrera al vapor de agua. Al reforzar la matriz, las cadenas poliméricas tienen una

menor movilidad, lo que dificulta el paso del vapor de agua a través de ellas. Ahora bien, al incorporar ácido gálico aumenta la cantidad de grupos hidroxilo que tienden a retener más agua en la matriz debido a su carácter higroscópico y, por lo tanto, el aumento de agua de hidratación. Esta agua también actúa como plastificante en las películas hidrofílicas, lo que produce una modificación en la estructura del material y la exposición de grupos afines al agua [22]. Este comportamiento es común en materiales hidrófilos y también se observó en otras películas a base de proteínas y polisacáridos [23-26].

Tabla 7.7. Valores de la P_w^{exp} de las películas a base de gelatina y almidón.

Películas	pH 6	pH 10
	$P_w^{\text{exp}} (10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1})$	$P_w^{\text{exp}} (10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1})$
BL	4,03 ± 0,04 ^a	4,76 ± 0,01 ^a
BL-MeFPIA1	3,99 ± 0,04 ^a	5,84 ± 0,02 ^b
BL-MeFPIA2	3,54 ± 0,03 ^b	4,09 ± 0,02 ^c
BL-GA	4,52 ± 0,05 ^c	4,52 ± 0,02 ^d
BL-MeFPIA1-GA	4,50 ± 0,05 ^c	5,25 ± 0,02 ^e
BL-MeFPIA2-GA	4,73 ± 0,03 ^d	3,86 ± 0,02 ^f

La misma letra en cada columna indica que no hay diferencias significativas aplicando la prueba de Tukey ($P \geq 0,05$).

A pH 10 con la incorporación de ácido gálico, tanto en presencia como en ausencia de MeFPIA2, se observó una disminución de la permeabilidad. Como se explicó anteriormente, al aumentar el pH se contribuye a una mejor dispersión y, por lo tanto, a una mejor interacción entre los polímeros, obteniéndose una matriz más densa que dificulta el paso del vapor de agua a través de ella. No sucede lo mismo cuando se incorpora MeFPIA1 debido a su mayor contenido en grupos ácidos en su cadena macromolecular; que a pH 10 hace que compitan con el ácido gálico en la formación de la red y, por tanto, queden sin reaccionar, lo que puede producir una mayor higroscopia.

7.5.2.6. Hidratación

La cinética de absorción de agua con una humedad relativa del 90% de las películas preparadas a pH 6 se muestra en la Figura 7.6. Como se puede apreciar, el valor de hidratación sigue una tendencia exponencial con el tiempo, es decir, sigue la ley de Fick. Ajustando a un modelo de Crank se obtienen los valores de difusividad (Ecuación 4.7).

Como se mencionó anteriormente, el D_w^{eff} se calculó indirectamente teniendo en cuenta los valores de P_w^{exp} y S_w^{eff} . En la Tabla 7.8 se pueden observar los valores de S_w^{eff} y D_w^{eff} correspondientes a cada película. Se pudo determinar que los valores de D_w^{eff} fueron

menores con la incorporación de MeFPIA2 (BLG-MeFPIA2), sin cambios significativos con la incorporación de MeFPIA1. Sin embargo, la incorporación de ácido gálico produjo un aumento de los valores de P_w^{exp} , tanto en presencia como en ausencia de MeFPIAx. Esto se debe a que los valores de D_w^{eff} fueron mayores en aquellas películas con ácido gálico añadido a su formulación. Este efecto se debe, como se mencionó en el apartado anterior, a que el ácido gálico posiblemente actúa como plastificante, lo cual aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas, facilitando la difusión.

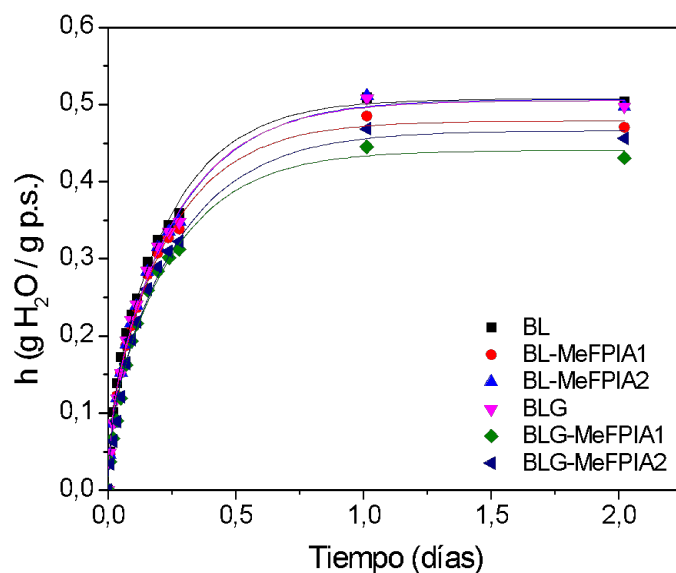


Figura 7.6. Cinética de sorción de agua a 90% h.r. de películas a base de BL a pH 6.

Tabla 7.8. Valores de los parámetros cinéticos de hidratación a 90% h.r. obtenidos por el ajuste con el modelo de Crank, para las películas de BL con ventilación a pH 6 y de S_w^{eff} y D_w^{eff} .

Películas	Modelo de Crank				
	R^2	h_{∞} (g H ₂ O/g p.s.)	D_w (10^{-14} m ² s ⁻¹)	S_w^{eff} (g m ⁻³ Pa ⁻¹)	D_w^{eff} (10^{-13} m ² s ⁻¹)
BL	0,996	0,51 ± 0,01	7,2 ± 0,3	303 ± 1	13,3 ± 0,3
BL-MeFPIA1	0,995	0,48 ± 0,01	7,6 ± 0,4	297 ± 5	13,5 ± 0,3
BL-MeFPIA2	0,995	0,51 ± 0,01	5,5 ± 0,3	340 ± 6	10,5 ± 0,2
BLG	0,994	0,50 ± 0,01	7,5 ± 0,4	308 ± 6	14,7 ± 0,3
BLG-MeFPIA1	0,987	0,44 ± 0,01	8,8 ± 0,7	267 ± 7	16,8 ± 0,7
BLG-MeFPIA2	0,987	0,47 ± 0,01	7,4 ± 0,6	295 ± 9	16,0 ± 0,5

7.5.2.8. Actividad Antioxidante

Las Figuras 7.7 A y B muestran los resultados de la actividad antioxidante de las películas a pH 6 y pH 10, respectivamente, utilizando los métodos ABTS y DPPH. A pH 6 se puede observar la dependencia de la actividad antioxidante con la presencia del ácido gálico, ya que se obtuvieron valores considerablemente más altos con ambos métodos. En cuanto a las películas a pH 10, también se observan mejores resultados con la presencia de ácido gálico. Sin embargo, estos resultados fueron aún mejores por el método ABTS en comparación con el método DPPH, donde los valores obtenidos fueron menores. Como se explicó en el capítulo anterior, se han reportado estudios que demuestran la capacidad antioxidante de películas a base de proteínas con ácido gálico [27,28], el cual juega además un papel muy importante como agente entrecruzante, al ser un compuesto fenólico pequeño que puede insertarse fácilmente en la matriz. Se debe considerar que, en ocasiones, se requiere la capacidad de liberación de antioxidantes desde el envasado hacia los alimentos para poder lograr un material activo antioxidante que prolongue la vida útil del mismo [29]. Considerando los resultados obtenidos, una concentración de 5% p/p con respecto al peso seco de la biomasa de levadura es suficiente para obtener buenos valores de actividad antioxidante. Investigadores han informado que películas a base de proteínas con extracto de polifenoles en un rango de 2 a 4 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de película puede retardar la oxidación de lípidos en la carne durante 7 días de almacenamiento [30].

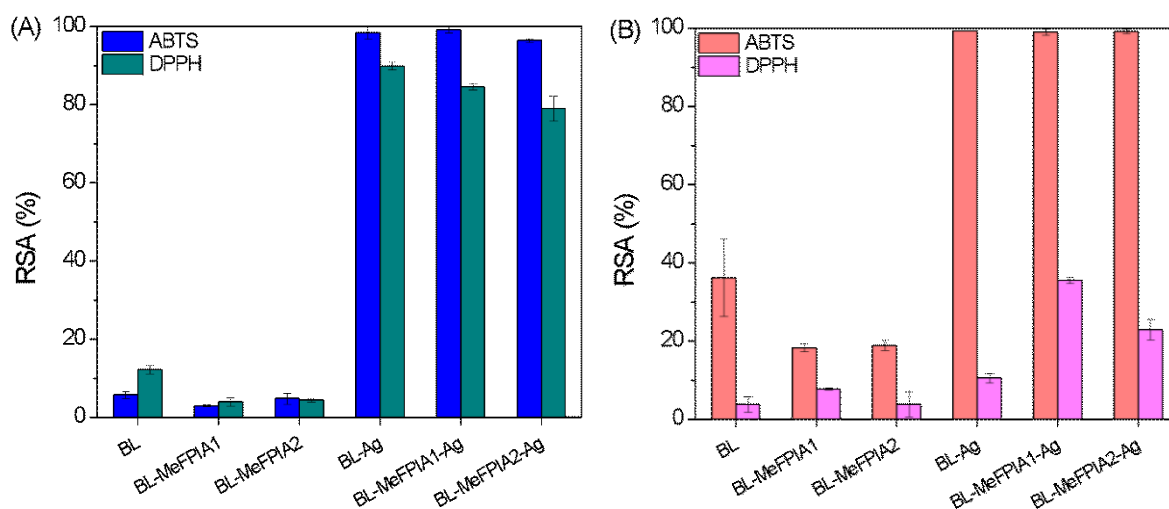


Figura 7.7. Actividad antioxidante de las películas de BL por el método ABTS y DPPH: (A) pH 6, (B) pH10.

7.5.2.7. Actividad Antimicrobiana

Las muestras control, tanto a pH 6 como a pH 10, no mostraron actividad antimicrobiana. Sin embargo, tampoco se observó actividad en aquellas películas que contenían MeFPiAx en su formulación, incluso no se observaron diferencias en presencia de ácido gálico. Los recuentos realizados demostraron un incremento en las UFC/mL mayor al valor inicial en todos los casos, sugiriendo que los microorganismos podrían estar utilizando a la película de levadura como una fuente nutricional para su crecimiento. Si bien se hubiera esperado un efecto sinérgico entre los polímeros MeFPiAx y el ácido gálico, al ser sistemas multicomponentes es posible que los grupos amonio cuaternario, responsables de la actividad antimicrobiana, no estén disponibles dadas las interacciones generadas en la matriz.

7.5.2.8. Migración en simulante alimentario y su cinética de liberación

En la Figura 7.8 se muestra la cinética de liberación del ácido gálico presente en las películas desarrolladas a pH 6 y pH 10 en contacto con el simulante alimentario (etanol al 50% v/v en agua destilada) y en la Tabla 7.9 se reúnen los parámetros obtenidos en el ajuste de los datos a una cinética de primer orden. Se puede apreciar una clara dependencia entre el pH de la solución filmogénica y la liberación de ácido gálico. Tanto a pH 6 como a pH 10, las películas sin agregado de MeFPiAx fueron las que menos ácido gálico liberaron al medio. Sin embargo, a pH 6 no hubo grandes diferencias entre las películas que contenían MeFPiA1 en comparación con las que contenían MeFPiA2. En cambio, a pH 10 la presencia de MeFPiAx redujo los valores de ácido gálico liberado, siendo este efecto más notorio con la incorporación de MeFPiA2. Como se había visto en el apartado anterior, el polímero que tiene más grupos sin modificar, es decir, con grupos carbonilo, MeFPiA1, es capaz de absorber más cantidad de agua, lo que facilita la liberación del ácido gálico. La importancia de aplicar un modelo matemático en el diseño de un material activo es que permite dilucidar el comportamiento de liberación de compuesto activo añadido, especialmente durante la vida útil del producto. Los datos experimentales se ajustaron correctamente al modelo y se pudo calcular el coeficiente difusivo de la liberación del ácido gálico en cada una de las condiciones estudiadas. De manera similar, Khan y col. demostraron valores más altos de coeficientes de difusión de ácido gálico incorporado en películas de caseinato y goma guar en etanol 95% como simulante (entre 4.5 y $8,10 \times 10^{-12}$ m²/s), esto puede deberse a diferencias en la interacción del compuesto activo con las cadenas poliméricas de cada matriz y su solubilidad con el simulante [31,32].

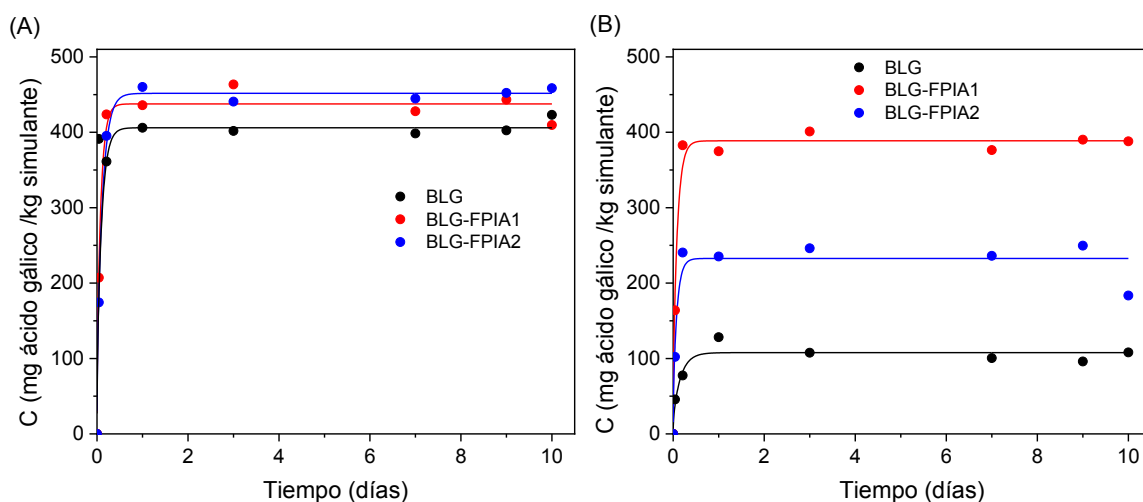


Figura 7.8. Cinética de migración de ácido gálico en simulante alimentario graso de las películas de BL: **(A)** pH 6, **(B)** pH 10.

Tabla 7.9. Parámetros cinéticos de liberación de ácido gálico para las diferentes películas.

Películas	pH	c_{∞} (g ác. gálico/kg simulante)	D (m^2/s)
BLG		406 ± 7	1.91×10^{-13}
BLG-MeFPIA1	6	438 ± 10	2.66×10^{-13}
BLG-MeFPIA2		452 ± 7	1.69×10^{-13}
BLG		107 ± 5	1.18×10^{-13}
BLG-MeFPIA1	10	387 ± 9	2.27×10^{-13}
BLG-MeFPIA2		233 ± 11	2.11×10^{-13}

7.6. Conclusiones parciales

En resumen, se puede afirmar que la adición de MeFPIAx junto con el ácido gálico demostró una mejora en las propiedades mecánicas de estos materiales, especialmente a un pH alcalino. Sin embargo, se observó un efecto negativo en la permeabilidad al vapor de agua. Aunque no se detectó actividad antimicrobiana, la incorporación del ácido gálico tuvo un impacto significativo en las propiedades antioxidantes de los materiales. Además, se observó un cambio de color más oscuro en las películas, especialmente a un pH alcalino, lo cual puede ofrecer varias aplicaciones funcionales, como se explicó previamente. Estos resultados resaltan la prometedora combinación de polímeros y ácido gálico para mejorar tanto las propiedades como las funcionalidades de los materiales.

7.7. Referencias

1. Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein based films containing active agents. *Journal of Food Science*, 76(3), R90–R102.
2. Giancone, T., Torrieri, E., Masi, P., & Michon, C. (2009). Protein–polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin–soy flour mixture. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1263–1269.
3. Delgado, J.F.; Lopes, F.G.; Peltzer, M.A. Antioxidant and Antimicrobial Characterization of Active Films Based on Yeast Biomass and Thymol. *Food Biophysics* **2022**, 17, 473-483.
4. Delgado, J. F., Sceni, P., Peltzer, M. A., Salvay, A. G., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2016). Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 83–91.
5. Peltzer, M. A., Salvay, A. G., Delgado, J. F., de la Osa, O., & Wagner, J. R. (2018). Use of Residual Yeast Cell Wall for New Biobased Materials Production: Effect of Plasticization on Film Properties. *Food and Bioprocess Technology*.
6. Wu, C., Chu, B., Kuang, L., Meng, B., Wang, X., Tang, S., & Wu, C. (2013). Synthesis of β -1,3-glucan esters showing nanosphere formation. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 807–812.
7. Ahmed, M. K., McLeod, M. P., Nézivar, J., & Giuliani, A. W. (2010). Fourier transform infrared and near-infrared spectroscopic methods for the detection of toxic diethylene glycol (DEG) contaminant in glycerin based cough syrup. *Spectroscopy*, 24(6), 601–608.
8. Arrieta, M. P., Peltzer, M., Garrogoz, M. C., & Jimenez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486–494.
9. Delgado, J. F., Salvay, A. G., Osa, O., Wagner, J. R., & Peltzer, M. A. (2021). Impact of the film-forming dispersion pH on the properties of yeast biomass films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(13), 5636–5644.
10. Nur Amila Najwa, I. S., Guerrero, P., de la Caba, K., & Nur Hanani, Z. A. (2020). Physical and antioxidant properties of starch/gelatin films incorporated with *Garcinia atroviridis* leaves. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100583.

11. Barth A, Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1767:1073–1101 (2007).
12. Yoo S and Krochta JM, Whey protein–polysaccharide blended edible film formation and barrier, tensile, thermal and transparency properties. *J Sci Food Agric* 91:2628–2636 (2011).
13. Shi G, Rao L, Xie Q, Li J, Li B and Xiong X, Characterization of yeast cells as a microencapsulation wall material by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Vib Spectrosc* 53:289–295 (2010).
14. Guerrero, P.; de la Caba, K. Thermal and Mechanical Properties of Soy Protein Films Processed at Different pH By Compression. *J. Food Eng.* **2010**, 100, 261–269.
15. Jiang J, Xiong YL, Newman MC and Rentfrow GK, Structure-modifying alkaline and acidic pH-shifting processes promote film formation of soy proteins. *Food Chem* 132:1944–1950 (2012).
16. Anker M, Stading M and Hermansson AM, Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents, and glass transition temperatures of whey protein films. *J Agric Food Chem* 47:1878–1886 (1999).
17. H. Wu, J. Lu, D. Xiao, Z. Yan, S. Li, T. Li, X. Wan, Z. Zhang, Y. Liu, G. Shen, S. Li, Q. Luo, *Food Hydrocoll.* 110, 106138 (2021)
18. Delgado, J.F.; Lopes, F.G.; Peltzer, M.A. Antioxidant and Antimicrobial Characterization of Active Films Based on Yeast Biomass and Thymol. *Food Biophysics* **2022**, 17, 473-483.
19. Amarowicz, R. (2009). Antioxidant activity of Maillard reaction products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 109–111.
20. Kchaou, H., Benbettaieb, N., Jridi, M., Nasri, M., & Debeaufort, F. (2019). Influence of Maillard reaction and temperature on functional, structure and bioactive properties of fish gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 105196.
21. Singh BR ed, *Infrared Analysis of Peptides and Proteins: Principles and Applications*. American Chemical Society, Washington, DC (1999).
22. Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Wagner, J. R., & Salvay, A. G. (2018). Hydration and water vapour transport properties in yeast biomass based films: a study of plasticizer content and thickness effects. *European Polymer Journal*, 99, 9–17.

23. Gennadios, A., Weller, C. L., & Gooding, C. H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21(4), 395–409.
24. Coupland, J. N., Shaw, N. B., Monahan, F. J., O'Riordan, D. E., & O'Sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43(1), 25–30.
25. Bertuzzi, M. A., Castro Vidaurre, E. F., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 972–978.
26. Jost, V., Stramm, C. (2016). Influence of plasticizers on the mechanical and barrier properties of cast biopolymer films. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2), 42513 (1-9).
27. Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll* 25(8):1813–27.
28. Limpisophon, K., & Schleining, G. (2016). Use of Gallic Acid to Enhance the Antioxidant and Mechanical Properties of Active Fish Gelatin Film. *Journal of Food Science*, 82(1), 80–89.
29. Gómez-Estaca J, López-de-Dicastillo C, Hernández-Muñoz P, Catalá R, Gavara R. 2014. Advances in antioxidant active food packaging. *Trends Food Sci Technol* 35(1):42–51.
30. Oussalah M, Caillet S, Salmi'eri S, Saucier L, Lacroix M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Agricul Food Chem* 52(18):5598–605.
31. Khan, M. R., Volpe, S., Salucci, E., Sadiq, M. B., & Torrieri, E. (2022). Active caseinate/guar gum films incorporated with gallic acid: Physicochemical properties and release kinetics. *Journal of Food Engineering*, 335, 111190.
32. Dede, S., & Lokumcu Altay, F. (2019). Nanofibre encapsulation of limonene and modelling its release mechanisms. *Acta Alimentaria*, 48(1), 56-64.

Capítulo 8: Conclusiones

- Se logró sintetizar polímeros a partir de la polimerización vía radical convencional de ácido itacónico (PIA), funcionalizados y cuaternizados, llevando a cabo la reacción a dos temperaturas diferentes (MFPIAx). Luego de su caracterización por ¹H-RMN y FTIR-ATR, se concluye que al aumentar la temperatura de reacción se favoreció la funcionalización del PIA, lo que provocó la obtención de dos polímeros con grado de funcionalización, además se demostró que la cuaternización se logró en su totalidad en ambos casos. El potencial ζ también confirmó una mayor carga positiva cuanto mayor es el grado de modificación. Estos polímeros demostraron tener actividad antimicrobiana moderada, obteniéndose valores de MIC que oscilan entre 0,5 y 8 mg/mL, convirtiéndose así en prometedores sistemas activos para ser incorporados en distintas matrices poliméricas.
- Se demostró que es factible incorporar los polímeros biobasados MeFPIAx en películas a base de gelatina y almidón y que no solo mejoró las propiedades mecánicas de los materiales, sino que también disminuyó la capacidad de absorción de las moléculas de agua durante el proceso de hinchamiento, debido a una mayor interacción entre las cadenas poliméricas. Además, la inclusión de dopamina fue clave para mejorar la actividad antimicrobiana y antioxidante de las películas. Por tanto, la incorporación de los polímeros MeFPIAx y agentes activos como la dopamina en sistemas poliméricos podría considerarse como una opción prometedora para desarrollar materiales novedosos con aplicaciones en el campo de alimentos y/o medicina.
- La incorporación de los polímeros MFPIAx y el ácido gálico demostró ser beneficioso al mejorar las propiedades mecánicas de los materiales estudiados. Se destaca la excelente actividad antioxidante y antimicrobiana que se obtuvo a concentraciones más altas de ácido gálico. Se puede considerar una promisorio combinación de los polímeros sintetizados y el ácido gálico para mejorar las propiedades y funcionalidades de los materiales.
- La adición de MeFPIAx junto con el ácido gálico en películas a base de levadura fue posible y se demostró una mejora en las propiedades mecánicas de estos materiales, especialmente a un pH alcalino. Sin embargo, se observó un efecto negativo en la permeabilidad al vapor de agua. Aunque no se detectó actividad antimicrobiana, la incorporación del ácido gálico tuvo un impacto significativo en las

propiedades antioxidantes de los materiales. Los resultados resaltan la prometedora combinación de polímeros y ácido gálico para mejorar tanto las propiedades como las funcionalidades de los materiales.

- Considerando las mejoras significativas logradas en estos materiales y el continuo avance en investigación y desarrollo, se espera poder ofrecer soluciones más eficientes y seguras en el campo de la alimentación y el cuidado de la salud. Estos avances abren nuevas posibilidades para desarrollar materiales con propiedades mejoradas, como mayor resistencia y capacidad. Con estas mejoras, se espera satisfacer las necesidades crecientes de la industria alimentaria y médica, proporcionando productos más eficientes, seguros y respetuosos con el medioambiente, para el beneficio de los consumidores y los pacientes.