

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

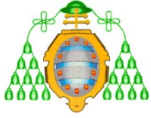
**“Producción de *films* y recubrimientos
utilizando nanocelulosa y proteína de sangre
de matadero”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

Esther González Tolivia

Julio, 2020





Master en Biotecnología Alimentaria

Universidad de Oviedo

C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España

PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Esther González Tolivia** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 14^a promoción curso 2019-2020.

Oviedo, 14 de Julio de 2020

D. (Tutor)

V^oB^o

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi familia su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida académica. Especialmente a mis padres que han estado a mi lado en todo momento.

En segundo lugar, mi agradecimiento a mi tutor Manuel Rendueles, por su disponibilidad y colaboración en la realización de este TFM, por animarme y respaldar mis decisiones en este fin de curso tan difícil y atípico.

A mi tutor Ismael Marcet por su ayuda, asesoramiento y paciencia, todo ello ha hecho posible la elaboración de este trabajo.

Y por último, a mi compañero de laboratorio Shihan, cuya colaboración ha sido determinante para la finalización de resultados en este TFM.

Índice

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	10
1.1. OBJETIVOS	11
2. <u>CONSIDERACIONES TEÓRICAS</u>	12
2.1. INTRODUCCIÓN DE CONCEPTOS Y PERSPECTIVA ACTUAL	12
2.2. PROPIEDADES DE LAS BIOPELÍCULAS	14
2.3. PRODUCCIÓN DE <i>FILMS</i> Y RECUBRIMIENTOS: MATERIAS PRIMAS	16
2.4. PLASMA BOVINO COMO MATERIA PRIMA	19
2.5. CARACTERÍSTICAS DE LA CELULOSA	20
2.5.1. CELULOSA NANOFIBRILADA COMO MATERIA PRIMA	21
2.6. CONSIDERACIONES LEGALES Y ÉTICAS DEL EMPLEO DE NANOTECNOLOGÍA	23
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	24
3.1. OBTENCIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO	24
3.1.1. PREPARACIÓN DEL PLASMA	24
3.2. OBTENCIÓN DE LA NFC	24
3.3. OBTENCIÓN DE <i>FILMS</i> DE NANOCELULOSA-PLASMA SANGUÍNEO	26
3.4. ENSAYOS DE CARACTERIZACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS	27
3.4.1. MEDIDAS DEL GROSOR DE LAS BIOPELÍCULAS	28
3.4.2. TRANSMISIÓN DE LUZ Y TRANSPARENCIA DE LAS BIOPELÍCULAS	28
3.4.3. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA	29
3.4.4. PROPIEDADES MECÁNICAS	31
3.4.5. ENSAYO DE SOLUBILIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS	32
3.4.6. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)	32
3.4.7. ENSAYO TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)	33
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	33
4.1. BIOPELÍCULAS OBTENIDAS	33
4.2. TRANSMISIÓN DE LUZ Y TRANSPARENCIA DE LAS BIOPELÍCULAS	34
4.3. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA	36
4.4. PROPIEDADES MECÁNICAS	38
4.5. SOLUBILIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS	39
4.6. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)	41
4.7. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)	43
5. <u>CONCLUSIONES</u>	45
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	47

Abreviaturas y Símbolos

A	Superficie en m ²
AOX	Compuestos orgánicos halogenados (<i>Adsorbable Organic Halides</i>)
BC	Celulosa bacteriana (<i>Bacterial Cellulose</i>)
°C	Grado centígrado
Cel	Celulosa
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
CNC	Nanocristales de celulosa (<i>Cellulose Nanocrystal</i>)
DBO ₅	Demanda Bioquímica de Oxígeno
D	Distancia recorrida por la sonda
ECF	Sin cloro elemental (<i>Elemental Chlorine Free</i>)
F _m	Máxima fuerza aplicada antes de la ruptura del <i>film</i> , expresada en Kg m/s ²
g	Gramo
h	Hora
G/t	Variación del peso en g/h
I+D	Investigación y desarrollo
kg	Kilogramo
kPa	Kilopascales
kV	Kilovoltio
M	Molaridad
m	Metro
m	Peso seco
m ²	Metro cuadrado
MEB	Microscopio electrónico de barrido
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
N	Newton
NCC	Celulosa nanocristalina (<i>nanocrystalline cellulose</i>)
NFC	Celulosa nanofibrilada (<i>nanofibrillated cellulose</i>)

nm	Nanómetro
P3HB	Poli-3-hidroxibutirato (<i>poly(3-hydroxybutyrate)</i>)
Pa	Pascales
PD	Deformación debido a la perforación
PLA	Ácido poliláctico (<i>polylactic acid</i>)
PS	Resistencia a la perforación
p/v	Peso/volumen
PVC	Cloruro de polivinilo (<i>polyvinyl chloride</i>)
R	Radio del orificio de los platos
RH	Humedad relativa (<i>Relative Humidity</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
S	Solubilidad de las biopelículas
s	Segundo
s ²	Segundo cuadrado
T ₆₀₀	Transmitancia (%)
TGA	Ensayo termogravimétrico
Th	Grosor de las biopelículas expresado en mm
UV	Luz ultravioleta
μm	micrómetros
v/v	Volumen/volumen
WVP	Permeabilidad al vapor de agua (<i>Water Vapor Permeability</i>)
WVTR	Tasa de transmisión de vapor de agua (<i>Water Vapor Transmission Rate</i>)
x	Grosor de las biopelículas expresado en mm

Resumen

En los últimos años, el uso de materiales plásticos derivados de compuestos petroquímicos ha generado un grave impacto medioambiental, acumulándose en los ecosistemas naturales y originando efectos negativos para la salud humana.

Debido a esto, la industria alimentaria está investigando el desarrollo de materiales elaborados con biopolímeros provenientes de fuentes renovables para sustituir a los plásticos sintéticos, de tal manera que estos nuevos materiales puedan estar en contacto con los alimentos protegiéndolos de manera eficaz, disminuyéndose la dependencia que esta industria tiene con los plásticos convencionales. Siguiendo este camino, en el presente trabajo se prepararon y caracterizaron biopelículas elaboradas a partir de proteínas de plasma bovino reforzadas con diferentes concentraciones de celulosa nanofibrilada (*nanofibrillated cellulose*, NFC). El estudio demostró que la adición de NFC a una concentración del 10% (peso NFC / peso proteína plasmática) mejoró las propiedades mecánicas del material preparado, además, la NFC a estas concentraciones mejoró la resistencia térmica de las biopelículas y disminuyó su solubilidad. A concentraciones de celulosa superiores (30% y 50% (p/p)) la solubilidad de las biopelículas siguió disminuyendo, pero se formaron agregados de biopolímeros en la matriz de los *films* que afectaron negativamente a su resistencia mecánica y térmica. Además, los *films* se volvieron menos transparentes a medida que se aumentó la concentración de NFC, aunque el material de refuerzo apenas tuvo efecto sobre las cualidades barrera a la luz y al vapor de agua de las biopelículas preparadas. En general, los resultados obtenidos muestran que la adición de NFC a *films* elaborados con plasma bovino mejora muchas de sus propiedades, aunque sólo hasta cierto punto, ya que concentraciones suficientemente altas de NFC son capaces de revertir sus efectos positivos.

Abstract

In recent years, the use of plastic materials derived from petrochemical compounds has generated a serious environmental impact, accumulating in natural ecosystems and causing negative effects on human health.

Due to this, the food industry is investigating the development of materials made with biopolymers from renewable sources to replace synthetic plastics, in such a way that these new materials can be in contact with food, effectively protecting them, reducing the dependency that this industry has with conventional plastics. Following this path, in the present work, biofilms made from bovine plasma proteins reinforced with different concentrations of nanofibrillated cellulose (NFC) were prepared and characterized. The study showed that the addition of NFC at a concentration of 10% (NFC weight / plasma protein weight) improved the mechanical properties of the prepared material, in addition, NFC at these concentrations improved the thermal resistance of biofilms and decreased their solubility. At higher cellulose concentrations (30% and 50% (w / w)) the solubility of the biofilms continued to decrease, but biopolymer aggregates were formed in the matrix of the films that negatively affected their mechanical and thermal resistance. Furthermore, the films became less transparent as the NFC concentration was increased, although the reinforcing material had little effect on the light and water vapor barrier qualities of the prepared biofilms. In general, the results obtained show that the addition of NFC to films made from bovine plasma improves many of its properties, although only to a certain extent, since sufficiently high concentrations of NFC are capable of reversing its positive effects.

Lista de Figuras

Figura 1. Características que deben cumplir los films para el empaquetamiento de los alimentos. Modificado de Rhim, Park, y Ha 2013	14
Figura 2. Tipos de Biopolímeros. Modificado de Chen et al. 2019	17
Figura 3. Estructura de la Celulosa.	20
Figura 4. Pretratamiento químico de la celulosa.	26
Figura 5. Ensayos de Caracterización Realizados a las Biopelículas.	28
Figura 6. Texturómetro.	31
Figura 7. Apariencia del gel de celulosa.	33
Figura 8. Biopelículas elaboradas. A) Films control; B) Films con 10% celulosa; C) Films con 30% celulosa; D) Films con 50% celulosa.	34
Figura 9. Transmitancia medida en los films analizados.	35
Figura 10. Sección transversal de las biopelículas. A) Film control; B) Film 10% celulosa; C) Film 30% celulosa; D) Film 50% celulosa	42
Figura 11. Curvas de TGA para cada Film. Film Control (—); Film 10% Celulosa (—); Film 30% Celulosa (—); Film 50% Celulosa (—).	44

Lista de Tablas

Tabla 1. Índice de Transparencia de las Biopelículas.	36
Tabla 2. Propiedades de Permeabilidad al Vapor de Agua (WVP).	36
Tabla 3. Propiedades Mecánicas de las Biopelículas.	39
Tabla 4. Grado de Solubilidad de las Biopelículas.	41

1. Introducción

En la actualidad los materiales plásticos se emplean cada vez más en actividades domésticas e industriales en las que su principal objetivo es la protección de los diversos productos que alberga o recubre, incrementando de este modo la vida útil de los mismos (Rodríguez-Perez et al. 2018). De hecho, son tantas sus aplicaciones en nuestro estilo de vida que la producción de estos materiales en 2016 fue de 335 millones de toneladas, en el siguiente año 348 millones de toneladas, y se estima que para 2020 se superen los 500 millones de toneladas anuales producidas.

La creciente demanda de estos plásticos plantea una serie de inconvenientes. En primer lugar, el agotamiento de la materia prima fuente de su fabricación (petróleo), y en segundo lugar, los efectos negativos que son resultado tanto de su producción como de su desecho, provocando la acumulación de residuos en entornos naturales y la generación de gases de efecto invernadero.

Debido a esto, numerosos países del mundo han adoptado nuevas políticas de reciclaje y hacen hincapié en realizar campañas de sensibilización hacia una sociedad que cada vez está más preocupada por la preservación del medio ambiente, la cual empieza a priorizar el consumo de productos obtenidos a partir de la agricultura ecológica, y que por tanto presentan un menor procesamiento industrial.

En esta línea y con el fin de mejorar y paliar parte de los efectos negativos antes mencionados, la industria alimentaria a nivel mundial se plantea nuevos objetivos y retos. Para ello se están desarrollando nuevas tecnologías y buscando nuevos materiales que sustituyan a los plásticos derivados de combustibles fósiles, apostando por la utilización de productos biodegradables obtenidos a partir de fuentes renovables que satisfagan nuestras necesidades presentes y futuras en el sector del envasado de alimentos.

Un polímero que ha adquirido un gran interés en estos últimos años para el desarrollo de biopelículas es la celulosa, principalmente debido a sus propiedades mecánicas, a su precio y a su carácter renovable. La celulosa blanqueada es un producto que por sí mismo tiene muy poco valor añadido, lo que obliga a las fábricas a generar y vender cientos de toneladas anualmente para poder obtener así beneficios. Ante esta situación se plantea la posible revalorización de la celulosa mediante la generación de derivados de este

polímero tecnológicamente más avanzados, y con una potencial gama de aplicaciones diferente a la de la celulosa convencional. En este sentido, y mediante la aplicación de esfuerzos de cizalla elevados y tratamientos químicos, es posible nanofibrilar la celulosa, resultando un material nuevo que presenta cualidades prometedoras y pueden ser aprovechadas por industrias como la alimentaria, la farmacéutica y la biomédica.

Otra de las materias primas potencialmente rentables para reemplazar a los plásticos sintéticos en la elaboración de las biopelículas podría ser el plasma sanguíneo proveniente de sangre de mataderos, debido a su alto contenido en proteínas y a que su precio es bajo por su condición de subproducto de la industria cárnica. Además, desde un punto de vista medioambiental supone una ventaja para los mataderos puesto que la sangre es uno de los subproductos más problemáticos por su elevada carga contaminante, la gran cantidad en la que se genera y al coste económico que conlleva su eliminación. De este modo, aprovechando la gran cantidad de proteínas que la componen y las propiedades funcionales que aportan, un interesante camino a seguir sería la recuperación de este subproducto de los mataderos para la elaboración de materiales de recubrimiento y embalaje.

1.1. Objetivos

Este trabajo pretende estudiar las características de nuevos materiales destinados al recubrimiento de alimentos para aumentar la conservación de los mismos y así sustituir en alguna medida el uso de plásticos no biodegradables (Panaitescu et al. 2018).

Así pues, los objetivos planteados en este trabajo se indican a continuación:

- Preparar celulosa nanofibrilada a partir de celulosa blanqueada y nunca secada proporcionada por ENCE, Navia.
- Elaborar biopelículas empleando plasma bovino y glicerol como plastificante.
- Desarrollar nuevas biopelículas compuestas por plasma bovino y celulosa nanofibrilada en distintas proporciones.
- Caracterizar y estudiar el comportamiento de los materiales producidos de acuerdo con las propiedades fundamentales que deben cumplir estos recubrimientos para ser útiles en la industria alimentaria.

2. Consideraciones teóricas

2.1. Introducción de conceptos y perspectiva actual

En 2012 la generación de residuos plásticos en la Unión Europea dio lugar a 17 millones de toneladas, de las cuáles, 15 millones procedían de materiales de embalaje, lo que representa el 88% del total de los residuos plásticos (Rodríguez-Perez et al. 2018). Los envases son los recipientes que la sociedad ha utilizado para contener cualquier tipo de producto, en especial, alimentos, que permiten alargar la vida útil de los mismos y conservar mejor sus propiedades organolépticas. Mediante el empaquetado de los productos se consigue protegerlos frente a golpes o arañazos que su almacenamiento o transporte pudiesen acarrear, frente a cambios de temperatura y actuando de barrera ante la humedad y distintos gases como el oxígeno (Silva y Martínez 2009).

Durante las últimas décadas, y en la actualidad, el elemento principal empleado como material de recubrimiento y/o embalaje ha sido el plástico (Meriçer et al. 2016). Destaca por ser barato, ligero, y por presentar una buena calidad estética y adecuadas características físico-químicas (Shankar y Rhim 2018).

En el sector de la alimentación, los plásticos más usados son los siguientes: polietilén tereftalato, polietileno (de alta, mediana o baja densidad), cloruro de polivinilo (*polyvinyl chloride*, PVC), polipropileno, poliestireno, etc. encontrándose en gran variedad de formas en los mercados, desde películas, bolsas flexibles, rígidas y otros objetos de uso diario, que cuando se descartan persisten en el medio natural sin degradarse (Mohanty, Misra, y Hinrichsen 2000).

Estos materiales, como se ha mencionado anteriormente, son derivados de los combustibles fósiles, por lo que se conocen sus negativos impactos medioambientales (Fortunati et al. 2018). Para su síntesis se emplean compuestos tóxicos, se hace uso de energía y fuentes no renovables y se generan subproductos dañinos. Además, debido a la lenta tasa de degradación de los plásticos, presentan problemas en cuanto a su eliminación.

Las políticas de reciclaje y reutilización son escasas en muchos países y, si se considera que el reciclaje de estos materiales suele ser poco práctico desde el punto de vista tecnológico, además de económicamente inviable debido a que frecuentemente están recubiertos de restos de alimentos y sustancias biológicas, se hace aún más difícil su eliminación, y terminan por acumularse masivamente, agravándose su impacto sobre el medio ambiente.

Todos estos inconvenientes, unidos al incremento del coste de los combustibles fósiles y su futuro agotamiento, han obligado a modificar los hábitos de consumo, además de aumentar el interés científico, político y social por el desarrollo de materiales renovables o biodegradables sustitutivos del plástico convencional.

La alternativa más prometedora a la hora de sustituir en un futuro a los derivados petroquímicos es el uso de biopolímeros renovables para preparar materiales de envasado, siendo estos materiales ecológicos, seguros y no tóxicos (Fortunati et al. 2018, Panaitescu et al. 2018). Los biomateriales están formados por polímeros biodegradables como constituyentes de la matriz del material y por algún tipo de fibra natural, en la mayoría de los casos, como elemento de refuerzo. Puesto que ambos elementos son biodegradables se puede esperar que el compuesto total también lo sea (Mohanty et al. 2000). Sin embargo, presentan una serie de desventajas relacionadas con sus propiedades físicas y defectos de procesamiento frente a los materiales plásticos, lo que disminuye su utilización en el *packaging* de alimentos (Fortunati et al. 2018, Shankar y Rhim 2018).

Otro aspecto de gran controversia y, probablemente, la principal limitación en el uso de polímeros biodegradables es la gran diferencia existente en el precio de estos frente a los derivados del petróleo. La mayoría de los nuevos embalajes accedieron al público aproximadamente en la década de 1990, a partir de esa fecha, la producción mundial de materiales biodegradables se ha puesto en marcha. No obstante, solamente una producción a gran escala permitirá la reducción de los costes de estos polímeros, por lo que a través de la incentivación de políticas de I+D y la concienciación de la población se logrará la instauración de polímeros biodegradables y un equilibrio entre la oferta y la demanda, que, en un futuro no muy lejano, serán imprescindibles para no agravar la amenaza ambiental en la que nos encontramos (Mohanty et al. 2000).

2.2. Propiedades de las biopelículas

Los embalajes, como ya se ha comentado previamente, no sirven únicamente de recipiente o contenedor, sino que también actúan como barrera protectora con diferentes funciones (Rhim, Park, y Ha 2013). Conforme a esto, cualquier tipo de material empleado en la industria alimentaria del envasado ha de satisfacer una serie de características indispensables, las cuales se representan en la Figura 1.

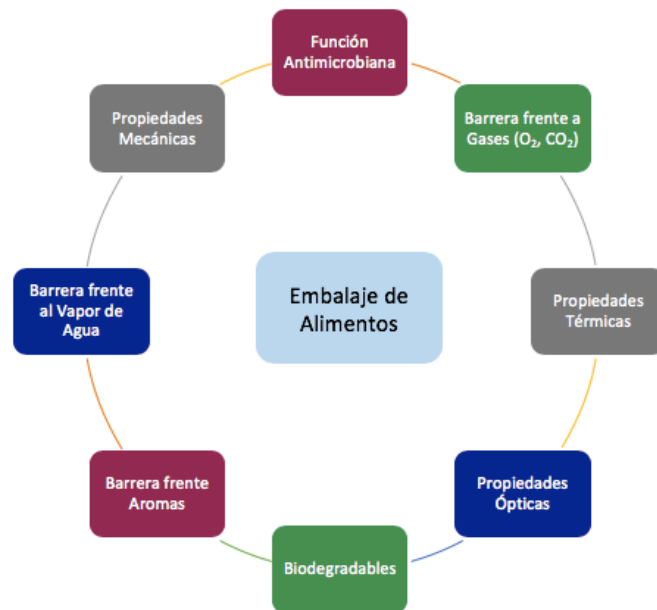


Figura 1. Características que deben cumplir los films para el empaquetamiento de los alimentos. Modificado de Rhim, Park, y Ha 2013

Por tanto, entre las características que deben cumplir los materiales poliméricos para usarse como envases alimentarios se encuentran la función antimicrobiana; el efecto barrera frente al vapor de agua, oxígeno, y otros compuestos volátiles; y, las buenas propiedades ópticas, mecánicas y térmicas (Suppakul et al. 2003, Marsh y Bugusu 2007). Según el tipo de materia prima polimérica utilizada para la fabricación de los envases se obtendrán mejores o peores resultados en las funciones de los embalajes, por lo que se hace fundamental el estudio y caracterización de las mismas, buscando en todo momento la más adecuada.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta a la hora de escoger una materia prima u otra son las posibles interacciones entre los biopolímeros y los componentes químicos de los

alimentos, siendo necesario evaluar cómo afectan a sus propiedades funcionales y organolépticas, así como a su vida útil. La elección también se verá condicionada por la función del material desarrollado, puesto que sus características deberán de variar según su función sea de actuar como envase primario, en contacto directo con el alimento; o terciario, dispuesto a proteger físicamente a un producto ya embalado dos veces.

El empleo de biopolímeros en los embalajes presenta, como ya se viene citando en anteriores apartados, una serie de limitaciones frente a los productos plásticos con homóloga función (Fortunati et al. 2018). La disminución de la resistencia térmica, el menor efecto barrera frente a gases y vapores, la fuerte afinidad por el agua, los problemas de procesamiento ocasionados por su alta hidrofiliidad, las propiedades mecánicas pobres y la reducida vida útil (debido al envejecimiento químico y físico) son varios de los impedimentos. Sin embargo, de todos ellos, el principal obstáculo radica en la naturaleza hidrofílica de los biopolímeros, lo que implica bajos efectos barrera contra la humedad originando deterioros químicos, físicos y microbiológicos en los alimentos que se contienen (Marsh y Bugusu 2007, Arora y Padua 2010).

Todos estos impedimentos han impulsado el interés en la comunidad científica, dando lugar a diversas investigaciones con el fin de paliarlos. Las propuestas se centran sobre todo en la modificación sintética de los biopolímeros.

La nanotecnología, que estudia el uso de materiales en la escala nanométrica (1-100 nm), se presenta en este caso como una alternativa muy prometedora para mejorar los atributos físicos y barrera de los materiales biopoliméricos, reduciendo de manera significativa los inconvenientes mencionados previamente (Rhim, Park, y Ha 2013, Fortunati et al. 2018). Esto es debido a la utilización de nanopartículas (Rallini y Kenny 2017), que presentan una gran área interfacial por el volumen, y dan lugar a mejores interacciones moleculares con la matriz polimérica, permitiendo la mejora en algunas cualidades de los materiales a desarrollar. De este modo, mediante la mezcla de nanomateriales y polímeros se consigue mejorar las características de los materiales producidos (mecánicas, térmicas, ópticas, eléctricas), adquiriendo estas cualidades más adecuadas según su sea su utilidad final (Marquis, Guillaume, y Chivas-Joly 2011).

Durante las últimas décadas, se han desarrollado diferentes tipos de nanomateriales (Marquis et al. 2011), por un lado, se encuentran los nanomateriales inorgánicos como las nanoarcillas, nanopartículas de plata, oro, sílice, nanotubos de carbono... (Shankar y Rhim 2018), y por otro, los orgánicos como las nanofibras o nanocilindros de celulosa, o las nanopartículas producidas con almidón o quitosano.

En resumen, estos nanocompuestos poliméricos en combinación con los materiales de empaquetado producidos con biopolímeros biodegradables, dan lugar a una nueva generación de biomateriales que presentan unas propiedades comparables con la de los materiales producidos con derivados petroquímicos. Esto permite una mejora/aumento de sus propiedades mecánicas, propiedades barrera, permeabilidad a los gases, resistencia química, cristalización...(Arora y Padua 2010, Rallini y Kenny 2017, Fortunati et al. 2018)

2.3. Producción de *films* y recubrimientos: materias primas

Como anteriormente se ha mencionado, los biopolímeros a utilizar pueden ser muy variados, entre los cuales cabría destacar aquellos que se muestran en la Figura 2.

Se distinguen tres grupos según su procedencia (Chen et al. 2019):

- Biopolímeros extraídos directamente a partir de biomasa como materia prima natural. Por lo general, para la elaboración de biopelículas los polímeros más empleados han sido los pertenecientes a este primer grupo, como son las proteínas, polisacáridos y lípidos. Estos se encuentran en abundancia en el medio natural y pueden ser aislados tanto de animales como de plantas.
- Los sintetizados a partir de monómeros producidos por microorganismos como pueden ser el ácido poliláctico (*polylactic acid*, PLA).
- Los polímeros directamente producidos por microorganismos como el poli-3-hidroxiбутирато (*poly(3-hydroxybutyrate)*, P3HB)

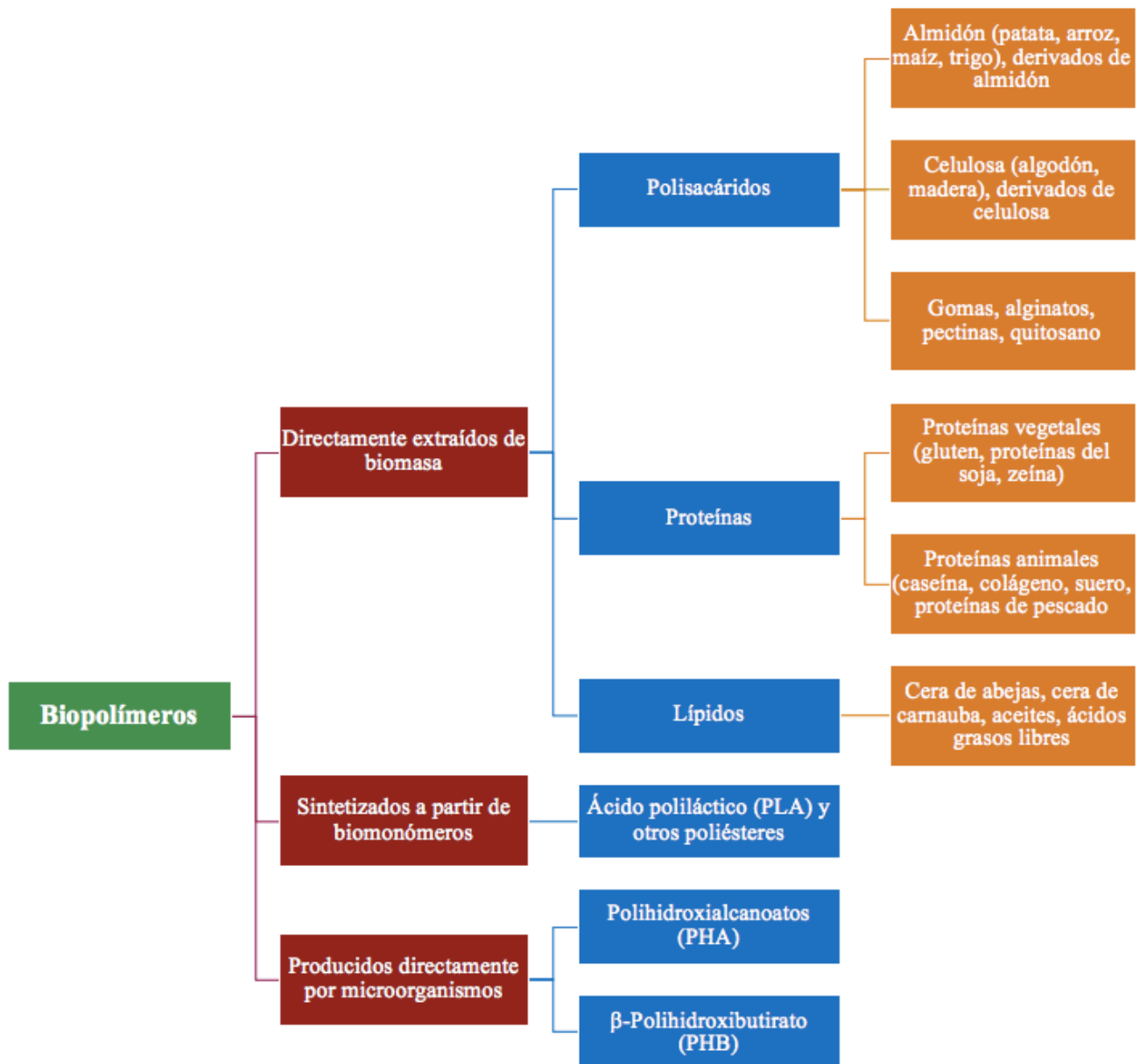


Figura 2. Tipos de Biopolímeros. Modificado de Chen et al. 2019

En este trabajo, se han investigado las propiedades de formación de biopelículas a partir de polímeros obtenidos de **biomasa natural**. Dentro de este grupo se pueden distinguir tres tipos de biopolímeros: polisacáridos, proteínas y lípidos. En primer lugar, dentro de los **polisacáridos** destacan el almidón, la celulosa, el quitosano, alginato y la pectina.

Las principales ventajas que presentan las biopelículas elaboradas con polisacáridos son: la abundancia y disponibilidad de la materia prima, el bajo coste de los mismos, su no toxicidad y la capacidad de procesamiento térmico. Pero entre los inconvenientes que muestran se encuentra el alto carácter hidrofílico de los materiales producidos, dando lugar a una baja barrera frente al vapor de agua (Cazon et al. 2016, Chen et al. 2019).

Por otro lado, entre las **proteínas** que se han empleado para la síntesis de biopelículas, se encuentran las proteínas de origen vegetal como las del gluten, soja o la zeína, y, las de procedencia animal, como las proteínas séricas de la leche, las caseínas, colágeno y la gelatina. Estas presentan una alta abundancia relativa, buena capacidad de formación de biopelículas y alto valor nutricional. En comparación con los polisacáridos y también con los *films* elaborados a partir de lípidos, las biopelículas realizadas a partir de proteínas presentan mejores propiedades barrera frente a los gases, una baja permeabilidad al oxígeno, y mejores propiedades mecánicas (Kaewprachu et al. 2015, Chen et al. 2019). Estas ventajas son debidas a la estructura única de las proteínas, constituidas por 20 monómeros distintos, que pueden formar enlaces en posiciones distintas ofreciendo amplias posibilidades para formar numerosas interacciones.

No obstante, la principal desventaja radica en la baja resistencia al vapor de agua y su menor resistencia mecánica, lo que limita su utilización en el envasado de productos (Bourtoom 2009). Una alternativa consiste en la adición de otros biomateriales para reducir la sensibilidad frente a la humedad o en la incorporación de plastificantes naturales o biodegradables mejorando la viscoelasticidad y extensibilidad. Entre los plastificantes a añadir destaca el glicerol y otros polioles (Chen et al. 2019).

En cuanto a los **lípidos**, los compuestos más utilizados en el sector alimentario para la fabricación de *films* son: la cera de abejas y de carnaúba, aceites y ácidos grasos libres. El interés por los materiales lipídicos reside en su hidrofobicidad, lo que permite mejorar las propiedades barrera frente al vapor de agua de los materiales elaborados. Mayoritariamente se emplean como recubrimientos, puesto que las películas a base de lípidos son inelásticas y frágiles lo que conduce a una limitada durabilidad.

Como contraposición, hay estudios que muestran que los recubrimientos o películas lipídicas pueden dañar la apariencia y brillo de los alimentos envasados (Hassan et al. 2018, Chen et al. 2019).

A continuación, se describirán las principales características de las dos materias primas empleadas en este proyecto: proteínas obtenidas a partir de plasma animal y celulosa nanofibrilada.

2.4. Plasma bovino como materia prima

El plasma sanguíneo se revela como una potencial materia prima para la fabricación de películas o recubrimientos proteicos. Esto es debido a que está compuesto por una gran cantidad de proteínas diferentes y a que se puede obtener fácilmente a partir de la sangre de animales (procedentes de los mataderos), lo que a su vez supone el aprovechamiento de un subproducto industrial.

En la actualidad, los mataderos generan una enorme cantidad de residuos. De todos ellos, el principal subproducto es la sangre, que presenta una DBO₅ (Demanda Bioquímica de Oxígeno) comprendida entre 150000 y 200000 mg/L, lo que constituye una elevada carga contaminante. Además, este residuo se produce en grandes cantidades, entre 10 y 20 L aproximadamente por cabeza de ganado bovino. En consecuencia, la revalorización del mismo en otros procesos, como por ejemplo en la elaboración de embalajes, permitirá su aprovechamiento.

Se conoce que entre el 3-5% del peso de un animal es sangre. Además, la composición de esta varía ligeramente en función del animal de procedencia (cerdo, vaca, cordero...). En concreto, la sangre bovina está constituida aproximadamente por 80,9% de agua, 17,3% de proteínas, 0,23% de lípidos, 0,07% de carbohidratos, y, 0,62% de minerales. Se divide en dos partes: la fracción celular, que representa un 35-40% (v/v) y la plasmática con un 60-65% (v/v). Para su separación, una vez recogida la sangre en el matadero, se adicionan soluciones anticoagulantes que eviten su coagulación. Los más usados son el citrato de sodio, fosfato de sodio o potasio, etc...

El componente celular está compuesto por glóbulos rojos, blancos y plaquetas. Mientras que el plasma está formado por un 7,9% de proteínas, de las cuales, principalmente

abundan las inmunoglobulinas 4,2%; las albúminas 3,3% y el fibrinógeno 0,4%. (Ofori y Hsieh 2011).

2.5. Características de la celulosa

La celulosa es el polímero natural más abundante en nuestro planeta (Ferreira, Alves, y Coelho 2016, Fortunati et al. 2018). En la naturaleza, es el principal componente estructural de diversas plantas y otros microorganismos, confiriéndoles fuerza y estabilidad. En relación a la celulosa vegetal, esta se encuentra en las paredes celulares de las plantas, distribuyéndose de manera no homogénea a lo largo de la pared celular primaria y secundaria, siendo el componente mayoritario de la última, donde se halla en una proporción del 40-80% del peso total (Khalil et al. 2017).

Este polisacárido está compuesto por unidades de monómeros de glucosa. Las cadenas de D-glucopiranosas se encuentran unidas por enlaces β - 1,4 glucosídicos que permiten a los monómeros uniones fuertes a través de enlaces de hidrógeno dentro y entre las cadenas. Estas fibrillas elementales se asocian y dan lugar a microfibrillas compuestas por 30-100 moléculas de celulosa en cadena extendida que presentan un diámetro aproximado de entre 10-30 nm (Kalia et al. 2011). A su vez, las cadenas que las componen pueden disponerse de forma ordenada (cristalina) o desordenada (amorfa).

En la Figura 3 se muestra la estructura de las fibras de celulosa (Lavoine et al. 2012).

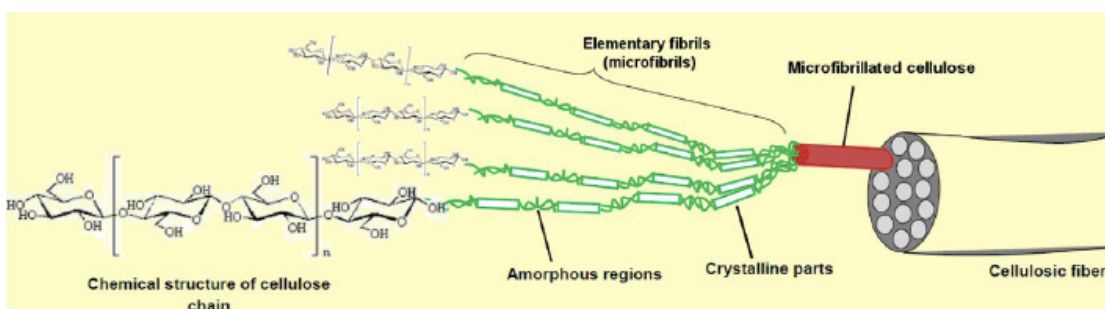


Figura 3. Estructura de la Celulosa.

En los últimos años, la madera de eucalipto ha sido una de las fuentes más importantes para la obtención de pulpas de celulosa blanqueadas en todo el mundo (Sevastyanova et al. 2012). Tradicionalmente la industria papelera ha empleado una serie de reactivos

en los procesos para el blanqueamiento de papel que ocasionaban problemas medioambientales. Debido a ello, en los últimos años, han desarrollado un nuevo procedimiento conocido como ECF (*Elemental Chlorine Free*) que reduce la liberación de gran cantidad de compuestos organoclorados (*Adsorbable Organic Halides*, AOX). Este proceso consta de tres etapas (D0, Ep0 y D1). Tras las cuáles, la celulosa D1 blanqueada es finalmente recogida.

2.5.1. Celulosa nanofibrilada como materia prima

Durante los últimos años se ha investigado el potencial uso de fibras de celulosa como material de refuerzo en la fabricación de distintos productos. Las razones para ello son que los compuestos poliméricos reforzados con celulosa ofrecen propiedades beneficiosas como una baja densidad, no toxicidad, biodegradabilidad y bajo coste.

Pese a ello, la sensibilidad al agua y la falta de buena adhesión superficial limitan su uso. Estudios recientes han demostrado que mediante distintos pretratamientos de las fibras celulósicas, que dan lugar en último término a su desempaquetamiento parcial, se puede conseguir un incremento en la resistencia y la rigidez del material celulósico resultante, aumentándose su potencial rango de aplicaciones (Kalia et al. 2011).

El término nanocelulosa agrupa una variedad de formas en las que puede encontrarse este material nanoestructurado. Por un lado, las pulpas de celulosa tratadas químicamente y homogeneizadas pueden desempaquetarse generándose una red tridimensional de fibras de celulosa de tamaño nano, a esta celulosa se le denomina celulosa nanofibrilada (*nanofibrillated cellulose*, NFC). Por otro, los cilindros de celulosa hidrolizados con ácidos reciben el nombre de celulosa nanocristalina (*nanocrystalline cellulose*, NCC) o nanocristales de celulosa (*cellulose nanocrystal*, CNC). Y, por último, se distingue celulosa bacteriana (*bacterial cellulose*, BC), producida a partir de microorganismos bacterianos (Wei et al. 2014).

La NFC consiste en haces de microfibrillas, que son los constituyentes básicos del polisacárido original, mientras que la CNC tiene relaciones de aspecto más bajas que las NFC como consecuencia de la hidrólisis parcial de las porciones amorfas de las microfibrillas.

Teniendo en cuenta la estructura de la celulosa presentada en el apartado 2.5., se puede obtener NFC mediante tratamientos mecánicos o químicos. Dependiendo del origen, aislamiento y procesos de obtención, el diámetro final de la nanocelulosa varía. En general, los tamaños de celulosas derivadas de madera se encuentran entre 10-40 nm cuando el proceso de fibrilación es mecánico, y de 4-10 nm y de 2-5 nm para la NFC aislada por métodos químicos y mecánicos (Wei et al. 2014).

Para la producción de NFC se han empleado mayoritariamente tratamientos mecánicos, estos incluyen etapas de refinado y homogeneización de alta presión. En la refinación, las fibras de celulosa son cortadas y deshilachadas entre dos discos dentados. Posteriormente, en el procedimiento de homogeneización, las fibras de celulosa son sometidas a una caída de presión con fuerzas de cizallamiento e impacto. La combinación de estas fuerzas da lugar a la fibrilación de la celulosa y permite obtener como producto final la NFC.

Otras técnicas para la obtención de nanofibrillas son los ultrasonidos, y otros sistemas como las picadoras y refinadoras que no sufren los problemas de atascamiento de los homogeneizadores y microfluidizadores (Mishra et al. 2012, Khalil et al. 2014).

Es importante tener en cuenta que cuanto más se desintegren las microfibras mejores serán los rendimientos finales. Por consiguiente, se ha investigado como aumentar el grado de fibrilación de la celulosa. Algunos autores obtuvieron una mejor desintegración mediante la homogeneización repetida, sin embargo, a partir de cierto número de homogeneizaciones el grado de fibrilación se detiene y no aumenta independientemente de la energía aportada. Debido a esto, otros investigadores optaron por el pretratamiento de la pulpa antes de la homogeneización mediante procedimientos químicos o enzimáticos para desintegrar más la nanocelulosa resultante y disminuir la energía requerida en el proceso (Wei et al. 2014).

Una opción se encuentra en tratar el material celulósico con endoglucanasas antes de la homogeneización (hidrólisis enzimática), pero, generalmente, resulta más efectivo el tratamiento químico de la celulosa mediante el empleo de la oxidación mediada por 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilradical (TEMPO) para la introducción de grupos carboxílicos en la superficie de la celulosa (Wei et al. 2014). Con ello se logra la disminución de la hidrofobicidad de las fibras, se mejora la dispersión homogénea de las mismas y la consiguiente formación de una matriz polimérica de nanofibrillas. El

pretratamiento con TEMPO de las fibras celulósicas consiste en la oxidación de los grupos hidroxilos del C6 de los monómeros de glucosas a grupos carboxilo (Coseri et al. 2013), lo que produce un efecto de repulsión entre las cargas negativas que favorece la separación de las fibras al aplicar, a continuación, el tratamiento mecánico de disgregación (Saito et al. 2007, Fukuzumi, Saito, y Isogai 2013).

En los últimos años, debido a las ventajas que presenta la celulosa nanofibrilada, como son su baja densidad (Bhatnagar y Sain 2016), sus buenas propiedades térmicas, la transparencia (Sorrentino, Gorrasi, y Vittoria 2007), su bajo coste, su biodegradabilidad y su capacidad para formar geles (Dong et al. 2013), han posibilitado su utilización en muy distintos campos con varias aplicaciones. Entre ellas, la elaboración de papel, donde la NFC es usada como elemento de refuerzo mejorando la fuerza de este material (Qing et al. 2013). Además, también tiene múltiples aplicaciones de interés en la industria biomédica y farmacéutica. Se puede emplear para regenerar tejidos u órganos dañados, para transportar proteínas (Weishaupt et al. 2015) y lípidos y para la fabricación de aerogeles de carbono que absorban aceites y solventes orgánicos del agua (Chen et al. 2016).

2.6. Consideraciones legales y éticas del empleo de nanotecnología

Los beneficios que tiene la implementación de la nanotecnología para la sociedad, a través del embalaje de los alimentos son innegables, logrando una disminución en la producción de residuos y reduciendo el consumo energético (Sorrentino et al. 2007).

Sin embargo, cualquier nueva tecnología conlleva una serie de responsabilidades éticas y políticas que garanticen las buenas aplicaciones de estas. Por lo que paralelamente al desarrollo de nuevas técnicas se espera la creación de directrices regulatorias para la venta y consumo de productos basados en nanotecnología.

Con respecto a los nanomateriales constituidos a base de sustancias no prohibidas en contacto con los alimentos, cabría esperar que no produjesen efectos perjudiciales, no obstante, son necesarios futuros estudios para conocer los efectos e interacciones de las NFC en la salud humana.

3. Materiales y métodos

Para la fabricación de las biopelículas a estudiar en este trabajo se utilizaron fundamentalmente dos materias primas: plasma bovino y NFC. El plasma se obtuvo a partir de sangre de vaca procedente de un matadero, Macelo de Asturias en Mieres y la nanocelulosa a partir de celulosa proporcionada por la papelera ENCE en Navia. En los siguientes apartados se comentarán los diferentes procedimientos y tratamientos que dieron lugar a las materias primas en las condiciones idóneas para la fabricación de los *films*.

3.1. Obtención del plasma sanguíneo

El plasma sanguíneo fue obtenido a partir de sangre procedente del matadero de Mieres, Asturias. Para ello, en primer lugar, se recogió la sangre inmediatamente después de que el animal fuese sacrificado para prevenir lo máximo posible la hemólisis sanguínea. A continuación, el líquido se almacenó en botes de plástico con 3 L de capacidad a los que se adicionó citrato sódico saturado al 2% (p/v) como anticoagulante.

Posteriormente se llevó a cabo un proceso de separación de las fracciones sanguíneas. El tratamiento consistió en someter al plasma bovino a una etapa de centrifugación a 10000 g durante 10 minutos y a 10 °C que, junto con la previa incorporación de anticoagulante, dió lugar a la separación de las dos fracciones de las que está compuesta la sangre, la celular y la plasmática. El sobrenadante del proceso, es decir, la fracción plasmática, se almacenó a una temperatura de -20 °C en tubos Falcon®, mientras que el sedimento se desechó.

3.1.1. Preparación del plasma

El plasma bovino se descongeló empleando un baño a 37 °C y después se sometió a un tratamiento de filtrado (diálisis) para eliminar las sales disueltas. Por último, se llevó a cabo un proceso de liofilización (Telstar Cryodos, Japón) a -80 °C. El plasma resultante liofilizado se empleó junto con la NFC para desarrollar distintas biopelículas.

3.2. Obtención de la NFC

De manera paralela a los métodos llevados a cabo con el plasma bovino se realizaron distintos procesos que permitieron la nanofibrilación de la celulosa. En primer lugar, se

utilizó celulosa blanqueada por el proceso industrial ECF procedente de madera de eucalipto cedida por la empresa ENCE, Navia, Asturias. La celulosa se suministró seca en bolsas de plástico. Esta se sometió a un pretratamiento químico, llevado a cabo a través de la reacción de oxidación con TEMPO, y a continuación a un tratamiento mecánico, para obtener finalmente la celulosa nanofibrilada (NFC).

Con este fin se pesaron y desmenuzaron 5 gramos de celulosa blanqueada, que se depositaron en un vaso, y a los cuales se añadieron 400 mL de agua destilada. Seguidamente se mantuvo la mezcla durante 12-24 horas sometida a una ligera agitación mecánica para facilitar la disgregación.

A continuación, se llevó a cabo el pretratamiento TEMPO para conseguir la oxidación de la celulosa. La reacción se desarrolló a 25 °C en el propio vaso de precipitados que contenía el polisacárido junto con el agua, y como instrumentos se emplearon un pH-metro y un agitador magnético. Los reactivos que se utilizaron fueron TEMPO (Sigma-Aldrich, EEUU), y NaBr (Panreac, España). En una balanza se pesaron 0,06 g del primero y 0,60 g del segundo y se añadieron al volumen de celulosa y agua destilada. Una vez que los reactivos se disolvieron manualmente con una espátula y con ayuda del agitador en 5 minutos, se inició la reacción añadiendo 100 mL de NaClO (6-14% de cloro activo, Merck, Alemania), lo que provocó un aumento del pH hasta valores de 12-13.

La mezcla se mantuvo en agitación a dicha temperatura durante 3 horas comprobando que el pH no descendiese de un valor de 10,0, en cuyo caso se evitaría empleando una disolución de NaOH 1,0 M. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción disminuyendo el pH a 7,0 mediante la adición de HCl 1,0 M. En la Figura 4 se muestra el dispositivo experimental.



Figura 4. Pretratamiento químico de la celulosa.

Posteriormente, para separar la celulosa del agua y los reactivos, se centrifugó la mezcla a 8000 rpm durante 1 hora a una temperatura de 8 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento (la celulosa) una vez con 1 L de agua destilada agitando para disgregar la celulosa, y, nuevamente, se centrifugó en las mismas condiciones (8000 rpm, 1 h, 8 °C), tras lo cual se desechó el sobrenadante.

La celulosa oxidada obtenida se disolvió en 400 mL de agua destilada y, a continuación, fue sometida a un tratamiento mecánico durante 15 minutos utilizando un homogeneizador SilentCrusher M (Heidolph, EEUU) a 15000 rpm. De este modo se consiguió la nanofibrilación de la celulosa, que, por último, fue centrifugada a 8000 rpm con una temperatura de 8 °C durante 110 minutos para eliminar el exceso de agua y obtener la NFC en el sedimento.

Antes de almacenar el gel de celulosa conseguido mediante los procedimientos anteriores, se realizó el análisis del contenido en sólidos a través del analizador de humedad HR73 Halogen Moisture Analyzer (Mettler Toledo, EEUU). Para ello, se depositaron aproximadamente 1,5 – 2 gramos de celulosa nanofibrilada en el instrumento y, tras 480 minutos a 105 °C, se obtuvo el contenido de agua de los distintos geles de celulosa previamente preparados. Finalmente, los geles obtenidos se conservaron a 4 °C en una cámara frigorífica hasta su utilización.

3.3. Obtención de *films* de nanocelulosa-plasma sanguíneo

En primer lugar, se preparó la solución formadora de las biopelículas control, es decir, aquellos *films* compuestos únicamente por plasma bovino y glicerol. Para ello, se disolvieron 3,06 gramos de proteína de plasma bovino liofilizado y 2,10 g de glicerol (Sigma-Aldrich, EEUU) como plastificante en 100 mL de agua destilada. Esta solución se sometió a agitación mecánica hasta que sus componentes resultaron completamente disueltos. La concentración de proteína en el plasma liofilizado se obtuvo usando el método de combustión de Dumas (Etheridge, Pesti, y Foster 1998). Para este propósito

se utilizó un CNHS/O Elementar Vario El Analyzer (Elementar, Alemania). El factor de conversión empleado fue 6,25 mg de proteína/mg de nitrógeno.

Posteriormente, la solución formadora de *films* fue sometida a un proceso de vacío para eliminar las burbujas contenidas, y de este modo evitar la aparición de irregularidades en los films producidos. Finalmente, por cada molde de silicona de 3 cm de diámetro se vertieron 3 mL de solución formadora, lo que supone que cada *film* contenía 0,091 g de proteína. Los *films* se obtuvieron tras la evaporación del solvente a 37 °C durante 24 h, pudiendo ser las biopelículas despegadas de los moldes de manera íntegra.

Para la elaboración de los *films* con diferentes proporciones de NFC y proteína de plasma bovino se repitió el mismo procedimiento experimental, sustituyéndose parte de la proteína en la solución formadora por NFC, por lo que la cantidad de biopolímero por film permaneció siempre constante (0,091 g por biopelícula). La NFC incorporada en la solución formadora se dispersó mediante agitación mecánica con el homogeneizador a 5000 rpm durante 5 minutos. Los porcentajes de NFC con respecto a la concentración de proteína evaluados fueron los siguientes:

- *Film* Control de plasma bovino sin celulosa.
- *Film* con un 10% celulosa; 90% proteína (*film* 10%C).
- *Film* con un 30% celulosa; 70% proteína (*film* 30%C).
- *Film* con un 50% celulosa y 50% proteína (*film* 50%C).

Todas las biopelículas obtenidas fueron almacenadas en desecadores y/o placas de Petri. Los desecadores, gracias a la disolución salina de $Mg(NO_3)_2$ (Sigma-Aldrich, EEUU) colocada en el fondo del recipiente, mantenían una humedad relativa controlada de $54 \pm 2\%$.

3.4. Ensayos de caracterización de las biopelículas

Los ensayos de caracterización consistieron en la evaluación de las propiedades físicas de las biopelículas preparadas. En la Figura 5 se muestran los distintos análisis que se realizaron para la investigación y caracterización de los *films*.

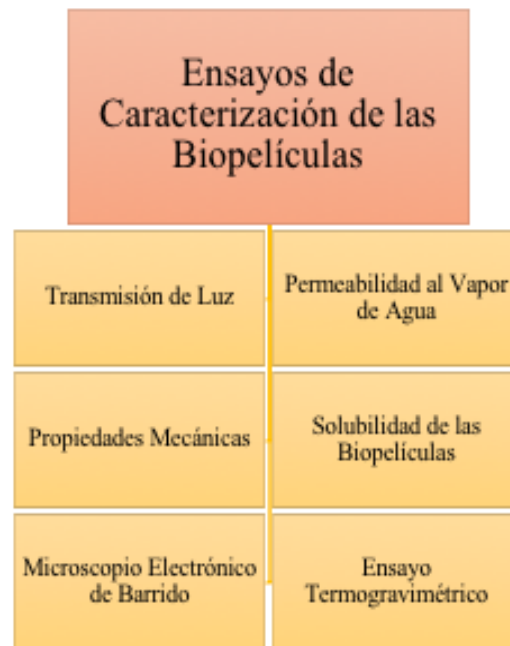


Figura 5. Ensayos de Caracterización Realizados a las Biopelículas.

3.4.1. Medidas del grosor de las biopelículas

La medición del grosor de las diferentes biopelículas fue necesario para los sucesivos ensayos de caracterización que se realizaron a los *films* y los cálculos asociados a estos. El grosor de los diferentes *films* fue medido empleando un micrómetro IP65 Métrico (Mitutoyo, Japón) con precisión de $\pm 1 \mu\text{m}$ y una resolución de 0,001 mm.

3.4.2. Transmisión de luz y transparencia de las biopelículas

Las propiedades barrera contra la luz visible y ultravioleta que presentaban los *films* se analizaron de acuerdo a la metodología propuesta por Hamaguchi et al. (2007). Previamente se midió el grosor de las biopelículas analizadas con un micrómetro.

La determinación de la transmitancia de luz se llevó a cabo a partir de secciones rectangulares con un tamaño aproximado de 10 mm de ancho por 25-30 mm de alto de las diferentes biopelículas, que fueron recortadas e introducidas en una cubeta de cuarzo. A estas se midió su absorbancia a distintas longitudes de onda, en el rango de 200 nm hasta los 600 nm. Para ello se utilizó un espectrofotómetro Analytik Jena Spekol® 1500 (LabWrench, Canadá) y, como blanco para el análisis se empleó la propia cubeta de cuarzo vacía.

La transparencia de los *films* fue calculada a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Transparencia} = \frac{(-\log T_{600})}{x} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde T_{600} es la transmitancia (%) de los *films* a 600 nm; y, la x es el grosor de las biopelículas medido en milímetros (mm).

A partir de los resultados obtenidos, se esperará que cuanto menor sea el valor de transparencia resultante de la ecuación superior (Ecuación 1), es decir, cuanto menor sea la absorbancia, mayor será la transparencia de la biopelícula.

3.4.3. Permeabilidad al vapor de agua

En los embalajes alimentarios una propiedad fundamental que determinará la estabilidad del producto al igual que su vida útil es la velocidad de transmisión del vapor de agua a través del propio envase. El estudio de la permeabilidad de las biopelículas al vapor de agua se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Rezvani et al. (2013). Para este ensayo, los *films* fabricados que no tuviesen burbujas ni ningún otro tipo de defecto se cortaron en círculos de diámetro ligeramente superior a 2,1 cm, cifra que presentaban los diámetros de los recipientes usados en el análisis. Estos tapones presentaban unas dimensiones de 1,6 cm de altura; 2,1 cm de diámetro exterior y, además, poseían una cavidad interior con un diámetro de 1,8 cm.

Posteriormente, se llenaron dichos recipientes con 2 mL de agua destilada y se colocaron encima las biopelículas recortadas. A continuación, mediante un pegamento adhesivo, se fijaron los *films* a los tapones y se depositaron en un desecador con sílica gel en el fondo, lo que permitió mantener unas condiciones de humedad del medio controladas (*Relative Humidity*, RH 0%).

El agua transferida a través de la película se determinó a partir del peso de los recipientes. Primero, se midieron en una balanza los pesos de los tapones con 2 mL de agua destilada, y tras depositarlos en el desecador con los *films* fijados se fueron tomando medidas de las

pérdidas de peso en intervalos de 1 h durante 6 horas, y después, a las 24 horas. Todo este procedimiento se repitió por triplicado para cada biopelícula.

La tasa de transmisión de vapor de agua (*Water Vapor Transmission Rate*, WVTR) se determinó de acuerdo con el método descrito en ASTM E96-95. Dicho parámetro indica la resistencia al paso del vapor de agua que ofrece el *film* y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$WVTR = \frac{G}{t \times A} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde *WVTR* es la tasa de transmisión de vapor de agua medida a través de la biopelícula expresada en g/hm²; *G/t* representa la variación en peso del recipiente con agua destilada por unidad de tiempo y se expresa en g/h; y, *A* es la superficie del hueco que contiene el agua destilada y viene referido en m².

A partir de la ecuación anterior y conocido el valor de la tasa WVTR se procedió a calcular el parámetro WVP (*Water Vapor Permeability*) que indica la permeabilidad al vapor de agua a través de la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{WVTR \times Th}{\Delta P} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde *Th* es el grosor de la biopelícula empleada en el ensayo expresado en mm; y ΔP es la diferencia entre las presiones parciales del vapor de agua en ambas caras del *film* (debajo de la biopelícula y encima de la misma) expresado en kPa.

En este caso, la presión parcial del vapor de agua debajo de la biopelícula se considera una temperatura de 20 °C como la del laboratorio, con un 100% de humedad relativa y, para la presión parcial del vapor de agua encima del *film* se supone una temperatura de laboratorio de 20 °C pero una humedad relativa de 0% dentro del desecador (Rhim, Gennadios, Weller, & Hanna, 2002; Mali, Grossmann, García, Martino, & Zaritzky, 2006).

3.4.4. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las biopelículas se evaluaron con un texturómetro TA.XT plus (Stable Microsystems, Reino Unido) empleando una celda de carga de 5 kg y una sonda P/5S de 5 mm de diámetro de acero inoxidable (Figura 6). Para llevar a cabo el ensayo, se depositó cada *film* en el sistema de agarre del instrumento, constituido por dos platos. Estos platos disponen de un orificio circular de 10 mm de diámetro de manera que la muestra, la biopelícula, quedaba expuesta a la sonda P/5S. Esta se programó para que descendiese a una velocidad de 1,0 mm/s, entrando en contacto con el *film* y ejerciendo una presión, estirándolo, hasta conseguir su rotura. La muestra previamente había sido fijada en el sistema de sujeción atornillado a los platos del texturómetro.



Figura 6. Texturómetro.

Las propiedades mecánicas de las biopelículas tratadas en este ensayo fueron la resistencia a la perforación (PS) y la deformación debido a la perforación (PD). Estas se obtuvieron a partir de las siguientes Ecuaciones 4 y 5:

$$PS = \frac{Fm}{Th} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$PD = \frac{(\sqrt{D^2 + R^2} - R)}{R} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde Fm , expresada en Kg m/s^2 , es la máxima fuerza aplicada antes de la ruptura del *film*, Th expresado en mm es el grosor de la propia biopelícula, D es la distancia recorrida por la sonda desde que entra en contacto con el *film* hasta que logra romperlo, también se expresa en mm, y, R en mm, es el radio del orificio de los platos.

Para conocer las propiedades mecánicas de las biopelículas el analizador TA.XT plus realiza la medición de tres parámetros: tiempo, fuerza de ruptura del film y distancia recorrida por la sonda, a partir de los cuales se podrán inferir las diferentes propiedades texturales (resistencia a la perforación y deformación debido a la perforación). El software del programa proporcionó las gráficas correspondientes, y a partir de estas

curvas, se determinó para cada biopelícula la fuerza necesaria (ejercida por el texturómetro) para romper los distintos *films*.

3.4.5. Ensayo de solubilidad de las biopelículas

Siguiendo el procedimiento propuesto por Blanco-Pascual et al. (2014) se determinó la solubilidad. Se recortaron triplicados circulares de las biopelículas empleando un sacabocados dando lugar a círculos de *films* de 1,9 cm de diámetro. Después, cada uno de ellos se depositó en recipientes que contenían 20 mL de una solución tamponada compuesta Trizma[®] hydrochloride solution pH 7,6 0,1 M (Sigma-Aldrich, EEUU), durante 24 horas. A continuación, una vez transcurrido este tiempo, la solución se sometió a un proceso de filtración por vacío utilizando papel Whatman N°1, lo que permitió recuperar los discos de biopelícula. El papel de filtro, previamente pesado antes de realizar la filtración, junto con los discos, fueron secados en una estufa a 97°C durante 24 horas. Además, trozos de papel de filtro también se secaron en las mismas condiciones para poder conocer el porcentaje de humedad que estos presentaban inicialmente.

Asimismo, de manera paralela, se secaron por triplicado biopelículas para cada proporción de celulosa (Control, 10%, 30% y 50% Celulosa), sin haber sido inmersas en la disolución, directamente en una estufa a 97°C durante 24 horas. Todo ello permitió conocer el porcentaje de materia seca contenida en dichas biopelículas. Finalmente, la siguiente ecuación se empleó para obtener el porcentaje de solubilidad de las diferentes biopelículas.

$$S(\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde m_1 , expresado en g, es el peso seco inicial de las biopelículas, y m_2 , expresado en g, el peso seco de la fracción que no se solubilizó.

3.4.6. Microscopio electrónico de barrido (MEB)

La microestructura de la sección transversal de los *films* se analizó usando un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JSM-6610LV, JEOL, USA) operando a 20 kV siguiendo el procedimiento llevado a cabo por Galus y Kadzińska (2016), con algunas

modificaciones. Inicialmente las muestras de las biopelículas se liofilizaron y, después, con la ayuda de un bisturí se cortaron en cuadrados de aproximadamente 1 cm².

Después, los recortes de los *films* se fijaron sobre unos soportes metálicos de manera que la región transversal de cada biopelícula fuera observable al microscopio. Para finalizar, las muestras se fotografiaron con un aumento de 350x.

3.4.7. Ensayo termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de las biopelículas se llevó a cabo empleando un analizador SDTA851e (Mettler Toledo, EEUU), desde los 25 °C hasta los 700 °C y con una tasa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera inerte de nitrógeno. En este caso se midió la pérdida de masa de los *films* conforme iba subiendo la temperatura.

4. Resultados y discusión

4.1. Biopelículas obtenidas

La apariencia del gel de celulosa nanofibrilada producido y empleado en la fabricación de los *films* se presenta en la Figura 7.



Figura 7. Apariencia del gel de celulosa.

En la Figura 8 se exponen algunas de las biopelículas elaboradas. Como se puede observar a simple vista, su aspecto variaba al cambiar su composición. Los *films* control (sin refuerzo con NFC) eran muy transparentes, al igual que los *films* 10% celulosa, pero al ir incrementando la cantidad de NFC se volvieron más opacos. Por otro lado, las biopelículas con carácter más pegajoso fueron los *films* control y aquellos con un 10% de

celulosa, ambos se despegaban con dificultad de los moldes, en cambio, los *films* 30% y 50% celulosa se recogían mejor de los moldes y presentaban menos burbujas. Sin embargo, a mayor cantidad de NFC, las biopelículas se volvían más quebradizas, como se apreció con los *films* del 50% celulosa. En cuanto a los grosores, la media que presentaban era de aproximadamente 0,13 mm para todos los *films*.

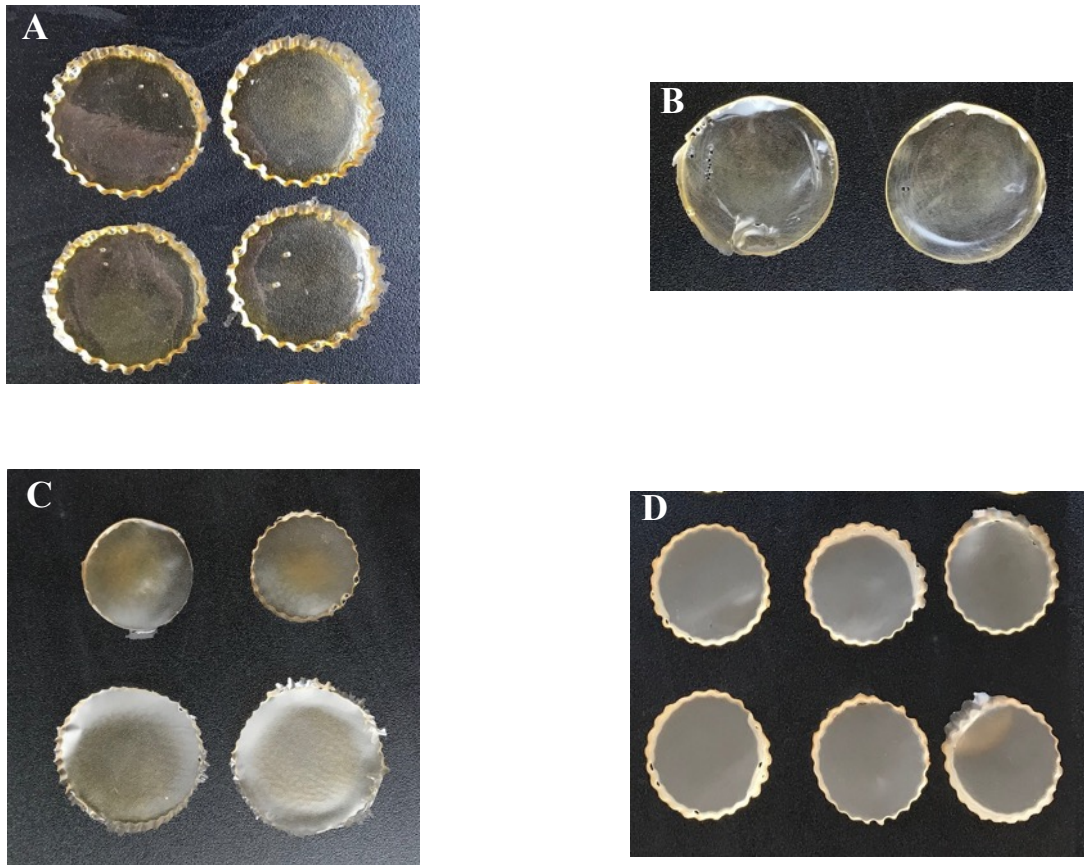


Figura 8. Biopelículas elaboradas. A) Films control; B) Films con 10% celulosa; C) Films con 30% celulosa; D) Films con 50% celulosa.

4.2. Transmisión de luz y transparencia de las biopelículas

El estudio del efecto que causan las propiedades de la luz sobre los materiales de empaquetamiento es necesario puesto que afectará a las propiedades organolépticas del producto alimenticio envasado, así como a su vida útil.

La transmitancia de luz (%T) de las biopelículas estudiadas en el rango de longitud de onda de 200-600 nm se muestra en la Figura 9.

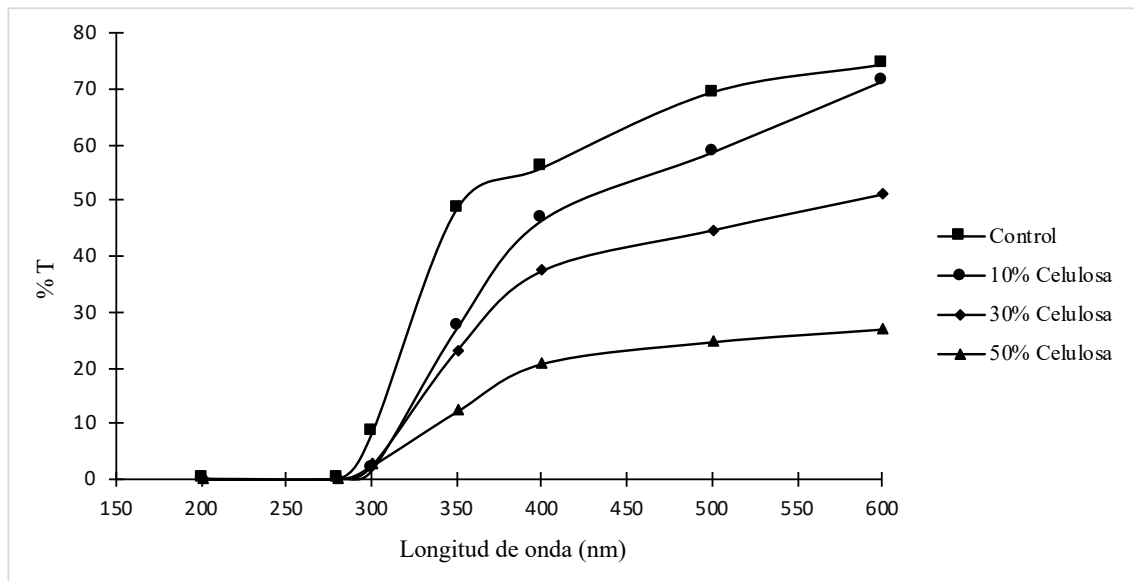


Figura 9. Transmitancia medida en los films analizados.

Todas las biopelículas presentaron un comportamiento similar. Los datos de la transmitancia aumentaron a partir de 300 nm y los valores más bajos se encontraron en el rango UV. Esto puede ser debido a la constitución proteica de los *films*, ya que la mayoría de las proteínas contienen un máximo de absorción a 280 nm como consecuencia de la presencia de aminoácidos aromáticos (grupo fenólico de la tirosina y grupo indólico del triptófano) en su estructura. Que los *films* muestren una baja transmitancia dentro del UV se puede considerar una cualidad deseable, ya que, por ejemplo, la luz UV puede promover la formación de radicales libres en los alimentos ricos en lípidos desencadenando reacciones oxidativas que generan sabores desagradables (enranciamiento). También, la luz UV puede degradar vitaminas o pigmentos, produciendo cambios en el color de los productos contenidos.

Además del efecto pantalla frente a la luz UV, se debe estudiar la transparencia de las biopelículas preparadas, que permite evaluar el grado en el que el material posibilita ver a través de él. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. El valor menor de transparencia corresponde para los *films* control, siguiendo una relación creciente para el resto de los recubrimientos y alcanzando el valor mayor para el *film* 50% Celulosa. Es decir, se observa una tendencia a disminuir la transparencia de las películas a medida que se añade NFC. Todo ello concuerda con la apariencia de los *films* obtenidos.

Tabla 1. Índice de Transparencia de las Biopelículas.

Biopelícula	Transparencia
<i>Film Control</i>	0,90
<i>Film 10% Celulosa</i>	1,14
<i>Film 30% Celulosa</i>	2,11
<i>Film 50% Celulosa</i>	5,70

En resumen, los resultados de la medición de la transmisión de luz en las películas desarrolladas en este trabajo en el intervalo de longitudes de onda 200-600 nm revelaron que la adición de NFC en un *film* con una matriz proteica no mejora de manera sensible el comportamiento de los materiales frente a la radiación ultravioleta. No obstante, de manera paralela, el relleno a base de celulosa conlleva la disminución de la transparencia de los *films*.

Las propiedades ópticas previamente comentadas son de gran interés para las industrias de envasado de alimentos puesto que los embalajes han de cumplir una doble función respecto a este aspecto: garantizar la conservación del alimento y sus propiedades sin afectarles la luz UV, y, desde el punto de vista estético permitir a los consumidores ver aquel producto que compran (Farris, Introzzi, y Piergiorganni 2009).

4.3. Permeabilidad al vapor de agua

Los resultados obtenidos de las biopelículas para los ensayos de permeabilidad al vapor de agua se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de Permeabilidad al Vapor de Agua (WVP).

Biopelícula	WVP ($\frac{g \times mm}{h \times m^2 \times kPa}$)
<i>Film Control</i>	2,50 ± 0,52
<i>Film 10% Celulosa</i>	3,86 ± 0,15
<i>Film 30% Celulosa</i>	3,84 ± 1,15
<i>Film 50% Celulosa</i>	2,72 ± 0,67

Durante los últimos años se han propuesto varios métodos para mejorar las propiedades barrera de los *films* proteicos como pueden ser: la adición de plastificantes, la alteración de pH, la agregación de lípidos, la reticulación de proteínas y el empleo de

nanocompuestos como refuerzo (Wihodo y Moraru 2013). En este trabajo, las propiedades barrera, como la permeabilidad al vapor de agua, dependerán de la cantidad de plastificante y NFC utilizada y de las propias características de las proteínas del plasma bovino.

El plastificante y la cantidad añadida a cada biopelícula fue la misma, por lo que no se espera obtener variaciones en el WVP con respecto a este factor. La incorporación de plastificantes, en este caso glicerol, reduce las interacciones proteína-proteína e induce la movilidad de las cadenas poliméricas confiriendo flexibilidad (Wihodo y Moraru 2013) a la biopelícula y aumentando la permeabilidad al vapor de agua, ya que el plastificante tiene propiedades hidrofílicas que favorecerán la transferencia más rápida de vapor en la superficie del *film* en comparación con la no adición de glicerol a los recubrimientos (Wahyuningsih, Iriani, y Fahma 2016).

Por otro lado, con relación a la incorporación de NFC, se espera que la presencia de fibras de nanocelulosa favorezcan la tortuosidad del camino, dificultando el paso del vapor de agua y dando lugar a procesos de difusión más lentos y una menor permeabilidad. Este efecto barrera es descrito por varios autores, los cuales resaltan una disminución de la velocidad de transmisión del vapor de agua a través de biopelículas poliméricas según se añada NFC (Savadekar y Mhaske 2012, Savadekar et al. 2012).

Sin embargo, en este trabajo y según los resultados expuestos en la Tabla 2, no se observa tal efecto, ya que la adición de NFC apenas tuvo impacto sobre este parámetro, y de tenerlo atendiendo a las medias, su efecto fue negativo, produciéndose un aumento en la permeabilidad al vapor de agua de los *films* reforzados con respecto al control.

Algunos autores han reportado que el WVP de las biopelículas está determinado por dos factores opuestos: los cambios perjudiciales en la estructura morfológica, y el aumento de la longitud del camino a recorrer por el agua (Pereda et al., 2011). El segundo aspecto se ha mencionado previamente.

Con respecto a la estructura morfológica, varios investigadores (Pereda et al. (2011)) han evaluado los cambios en la microestructura de los *films* tras incorporar NFC en comparación con los *films* no reforzados. Estos últimos muestran una superficie lisa y

homogénea, mientras que la adición del relleno conduce a superficies rugosas y onduladas incrementándose la rugosidad a medida que se adiciona NFC. La existencia de estas crestas y rugosidades contribuye a formar un camino tortuoso, por lo que el vapor de agua tardará más tiempo en atravesar la biopelícula y se obtendrá una menor permeabilidad.

Sin embargo, los autores también han descrito la presencia de poros o burbujas en todos los *films* como consecuencia del aire atrapado. La aparición de burbujas porosas en las superficies de los *films* origina cambios perjudiciales en la estructura de las biopelículas facilitando una difusión más rápida del vapor a través de ellas. La tendencia de estos poros era creciente (aumento de tamaño y número) a medida que se incrementaba la concentración de relleno debido probablemente a que la NFC actuaba como sitios de nucleación para la proliferación de burbujas, las cuales pueden facilitar la evaporación del agua a través de la sección del *film*.

Otros aspectos que también condicionan la permeabilidad al vapor de agua son: el grado de dispersión del NFC en la matriz, ya que una falta de homogeneidad en la distribución podría incrementar los valores de WVP; una alta relación de aspecto; y, el comportamiento de absorción de todos los constituyentes del *film* (Pereda et al. 2011).

4.4. Propiedades mecánicas

El estudio de las propiedades mecánicas es un factor determinante en la industria alimentaria, puesto que los envases han de ser adecuados y deben mantener su integridad durante su almacenamiento, transporte y manipulación.

Las propiedades mecánicas para las biopelículas control, 10%, 30% y 50% de NFC se han analizado a partir de los datos proporcionados por el texturómetro. Los valores obtenidos de PS (*puncture strength*, resistencia a la perforación) y PD (*puncture deformation*, deformación debido a la perforación) se presentan en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Propiedades Mecánicas de las Biopelículas.

Biopelícula	PS ($\frac{Kg \times m}{s^2 \times mm}$)	PD (%)
<i>Film</i> Control	15,01 ± 8,61	10,63 ± 5,04
<i>Film</i> 10% Celulosa	48,33 ± 8,44	17,86 ± 4,01
<i>Film</i> 30% Celulosa	28,99 ± 12,18	14,86 ± 2,23
<i>Film</i> 50% Celulosa	18,68 ± 11,40	10,07 ± 3,06

La resistencia a la perforación para las biopelículas control (sin refuerzo de nanocelulosa) fue de $15,01 \pm 8,61$ N/mm y el % de deformación debido a la perforación fue de $10,63 \pm 5,04$. Al comparar los valores de PS del resto de *films* se observó que la adición de nanocelulosa contribuye a mejorar esta resistencia. El valor máximo de PS se alcanzó para el 10% de Celulosa, a partir de este porcentaje se obtiene una tendencia de valores decrecientes para este parámetro. Esto sugiere que el papel del nanomaterial para actuar como relleno de refuerzo tiene una capacidad limitada. Todo ello puede ser debido a que un exceso en la adición de relleno en la matriz de proteínas pueda causar una mala separación de fases y una distribución heterogénea de fibras de nanocelulosa, originando aglomeraciones del material nanofibrilado y malos rendimientos en las propiedades mecánicas.

Por lo tanto, la elaboración de biopelículas constituidas por proteínas plasmáticas y nanocelulosa puede dar lugar a estructuras con mayor resistencia mecánica en función de la concentración del material de refuerzo, pero sólo hasta cierto punto.

Por otro lado, el PD debido a la perforación presenta unos valores que se podrían considerar similares para todas las biopelículas.

4.5. Solubilidad de las biopelículas

La solubilidad de las biopelículas es una propiedad importante a tener en cuenta en el estudio de los embalajes. En función del grado de solubilidad que presenten los materiales se limitará su uso en la industria alimentaria, ya que es un factor que está relacionado con la resistencia a la humedad y la permeabilidad al vapor de agua (Marcet et al. 2018).

Por lo general, debido a la naturaleza hidrofílica de las proteínas, los *films* elaborados a base de este polímero presentan una alta solubilidad en agua, incluso en algunas ocasiones pueden llegar a perder su integridad total, deshaciéndose completamente, lo cual reducirá su aplicabilidad cuando su finalidad sea el envasado de productos alimentarios con cierto grado de humedad. Sin embargo, existen procedimientos que permiten reducir la solubilidad de las biopelículas en agua. Un ejemplo de esto es la utilización de entrecruzantes químicos como el glutaraldehído, formaldehído, etc.. Estos agentes permitirán el desarrollo de una mejor reticulación en la matriz de proteínas del *film* debido al establecimiento de un mayor número de enlaces covalentes. No obstante, el inconveniente de la incorporación de estos entrecruzantes químicos radica en su toxicidad, por lo que no es viable utilizarlos en la industria alimentaria (Ustunol y Mert 2006, Wihodo y Moraru 2013).

Como ya se ha mencionado en la introducción, una alternativa para mejorar las propiedades de las biopelículas es la adición de un material de refuerzo. En concreto, para mejorar la resistencia a la humedad, Da Silva, Pereira, y Druzian (2012) emplearon nanocristales de celulosa como refuerzo a la matriz de almidón para reducir la solubilidad en agua de los *films* fabricados (Hubbe et al. 2017). Por otro lado, Qazanfarzadeh y Kadivar (2016) comprobaron que la adición de altos contenidos de nanocelulosa (7,5% en peso) obtenida a partir de avena, conducía a disminuir la solubilidad de las biopelículas cuya matriz estaba formada por proteínas de suero lácteo.

En este trabajo, el porcentaje de solubilidad de las biopelículas preparadas a partir de plasma bovino, NFC y glicerol se muestran en la Tabla 4. La cantidad de glicerol añadida a los *films* influirá en la solubilidad de las biopelículas elaboradas puesto que se trata de una molécula hidrófila, es decir, que a mayor concentración de glicerol mayor será la solubilidad de la biopelícula resultante (Ramos et al. 2013). Sin embargo, en este aspecto, todos los *films* producidos tenían la misma cantidad de glicerol, por lo que se puede suponer que este factor no intervendrá en la solubilidad obtenida.

A partir de los datos mostrados en la Tabla 4 se puede comprobar que la adición de NFC mejora las propiedades de las biopelículas puesto que disminuye la solubilidad. En primer lugar, los *films* control, constituidos por proteínas de suero bovino y glicerol presentaron una solubilidad de aproximadamente 83,86%, es decir, muy poca resistencia al agua, lo

que se observó durante el desarrollo del procedimiento experimental, puesto que estos *films* se deshicieron completamente al poco tiempo tras haberse sumergido en la disolución acuosa. Comparando este valor con los obtenidos al incorporar NFC, se observó una disminución de la solubilidad a medida que se incrementaba la cantidad de este material celulósico, ya que los *films* reforzados con un 10, 30 y 50% de NFC, especialmente los dos últimos, pudieron recogerse prácticamente de manera íntegra de la solución acuosa tras las 24 horas de ensayo. Estos resultados sugieren el establecimiento de interacciones entre la propia celulosa nanofibrilada, y posiblemente entre las proteínas y la celulosa, disminuyéndose la solubilidad del conjunto.

Tabla 4. Grado de Solubilidad de las Biopelículas.

Biopelícula	Solubilidad de la Biopelícula (%)
<i>Film</i> Control	83,86 ± 4,62
<i>Film</i> 10% Celulosa	78,70 ± 9,95
<i>Film</i> 30% Celulosa	52,51 ± 1,66
<i>Film</i> 50% Celulosa	5,87 ± 3,62

4.6. Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Las micrografías de las áreas transversales de las biopelículas se presentan en la Figura 10.

Como se puede observar, la apariencia de la microestructura varía a medida que se incorpora NFC. Sin embargo, por lo general, todos los *films* muestran un aspecto fibroso debido a la agregación de las proteínas plasmáticas. En la Figura 10 A) se expone la sección transversal de la biopelícula control sin refuerzo de nanocelulosa, siendo su aspecto el más homogéneo de entre todas las muestras evaluadas.

Por otro lado, la incorporación de NFC originó cambios en la microestructura de la matriz proteica de los *films*. La micrografía de la Figura 10 B) muestra la biopelícula con un 10% de NFC, en ella apenas se observaron estructuras granulares de agregados de proteínas, permitiendo una buena dispersión de NFC. Todo ello indica una fuerte adhesión interfacial entre la matriz proteica y el refuerzo, y concuerda con los resultados

obtenidos para las propiedades mecánicas, donde los *films* 10% celulosa presentaron las mayores resistencias.

La estructura correspondiente a los *films* con un 30% y un 50% de nanocelulosa se indican en la Figura 10 C) y D). Se puede comprobar que a medida que se incorporaba NFC, se incrementaba la presencia de aglomerados, especialmente, en la biopelícula con un 50% de NFC. El aumento del número de aglomeraciones puede ser debido a la tendencia natural de los rellenos celulósicos a autoasociarse mediante enlaces de hidrógeno a medida que aumenta su concentración (Sánchez-García, Hilliou, y Lagarón 2010). Estos aglomerados internos podrían disminuir la solubilidad global de la biopelícula, ya que en su interior los biopolímeros quedarían más compactados y menos accesibles al agua, pero a cambio se originarían poros más grandes (espacios entre los aglomerados) que afectarían negativamente a las propiedades mecánicas de los *films*. Por lo tanto, a partir de las micrografías se pueden respaldar los resultados previamente obtenidos en los apartados anteriores, en los que se intuye que, a un determinado valor de NFC, la función como refuerzo de este material no es tan efectiva.

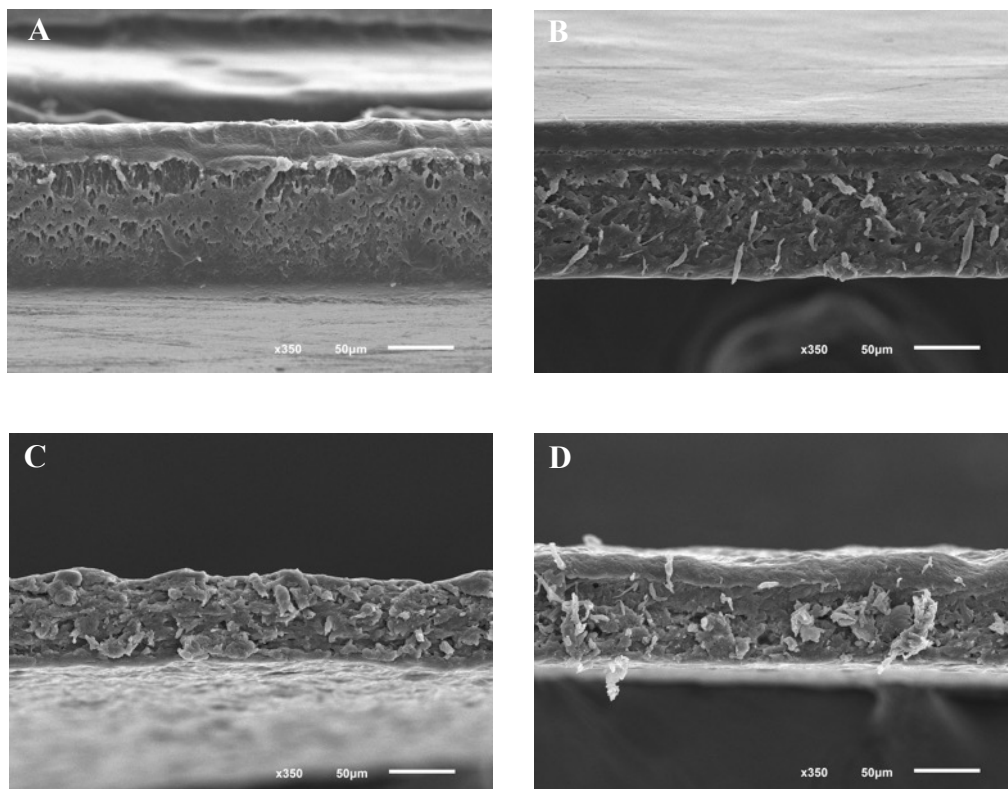


Figura 10. Sección transversal de las biopelículas. A) Film control; B) Film 10% celulosa; C) Film 30% celulosa; D) Film 50% celulosa

4.7. Análisis termogravimétrico (TGA)

Una de las técnicas más empleadas para determinar el comportamiento térmico de materiales poliméricos es el análisis termogravimétrico, en el que se mide la variación del peso de la muestra mientras es sometida a un aumento programado de temperatura. Por lo general, se lleva a cabo en ambientes inertes, como es el nitrógeno. La estabilidad térmica de las biopelículas es una propiedad muy importante en la industria del embalaje alimentario, donde la obtención de valores altos para esta característica permiten un amplio rango de aplicaciones (Marcet et al. 2018).

Las curvas termogravimétricas para las biopelículas elaboradas en este trabajo se muestran en la Figura 11. Al analizar los perfiles obtenidos para los distintos *films* se aprecian diferencias en las curvas. No obstante, todas las biopelículas mostraron un comportamiento en el que la pérdida de peso con el incremento de la temperatura se podía dividir en tres etapas (Marcet et al. 2017).

La primera fase se corresponde con la pérdida de masa representada por la humedad presente en la muestra. Esta disminución tuvo lugar entre los 40 a 150-160 °C aproximadamente, donde el agua adsorbida y ligada a la matriz proteica fue evaporada (Shakeri y Radmanesh 2013). En la segunda región, comprendida entre los 150-160 a 270-280 °C, se produce la volatilización del glicerol (Ge et al. 2015).

Por último, la tercera etapa comienza a partir de 270-280 °C y está relacionada con la degradación térmica de los biopolímeros donde se descompone la matriz de proteínas y los compuestos de nanocelulosa (Mondragon et al. 2015, Marcet et al. 2018). En este intervalo de temperaturas inicialmente se rompen los enlaces glucosídicos de la celulosa y, a medida que se incrementa la temperatura, se degrada el biopolímero (Deepa et al. 2011).

Al observar en la Figura 11 las curvas correspondientes a las biopelículas control y, especialmente, a los *films* 10% Celulosa, representados a color gris y naranja respectivamente, se puede comprobar que la fase de descomposición del glicerol aparece fusionada con la de los biopolímeros (proteína y NFC). Esto podría ser debido a un aumento de la compatibilidad entre el glicerol y la proteína (en el caso del control). Este

efecto se potencia, como se muestra en la curva del *film* 10% Celulosa, cuando se incorpora NFC a las biopelículas, lo cual sugiere una alta integración del plastificante con los biopolímeros que forman la matriz del *film* (Marcet et al. 2017).

Sin embargo, cuando se compara este resultado con las otras biopelículas probadas, *films* 30% y 50% Celulosa, se observa la desaparición de la fusión de los perfiles de degradación del plastificante y de los biopolímeros, dando lugar a que el efecto de compatibilidad se revierta. Es decir, al analizar las curvas verde (*Film* 30% Celulosa) y azul (50% Celulosa) de la Figura 11 se advierte como en primer lugar se evapora de manera abrupta el glicerol, aproximadamente entre los 100-150 a 240-270 °C y, posteriormente, se descomponen los biopolímeros a partir de 240-270 °C.

Estos resultados parecen sugerir que la adición de NFC como refuerzo a las biopelículas ofrece resultados positivos aumentando la compatibilidad entre el plastificante y la matriz proteica y presentando mayor estabilidad térmica hasta un cierto valor (en este caso 10% NFC) a partir del cual, la incorporación de NFC disminuye dicha compatibilidad.

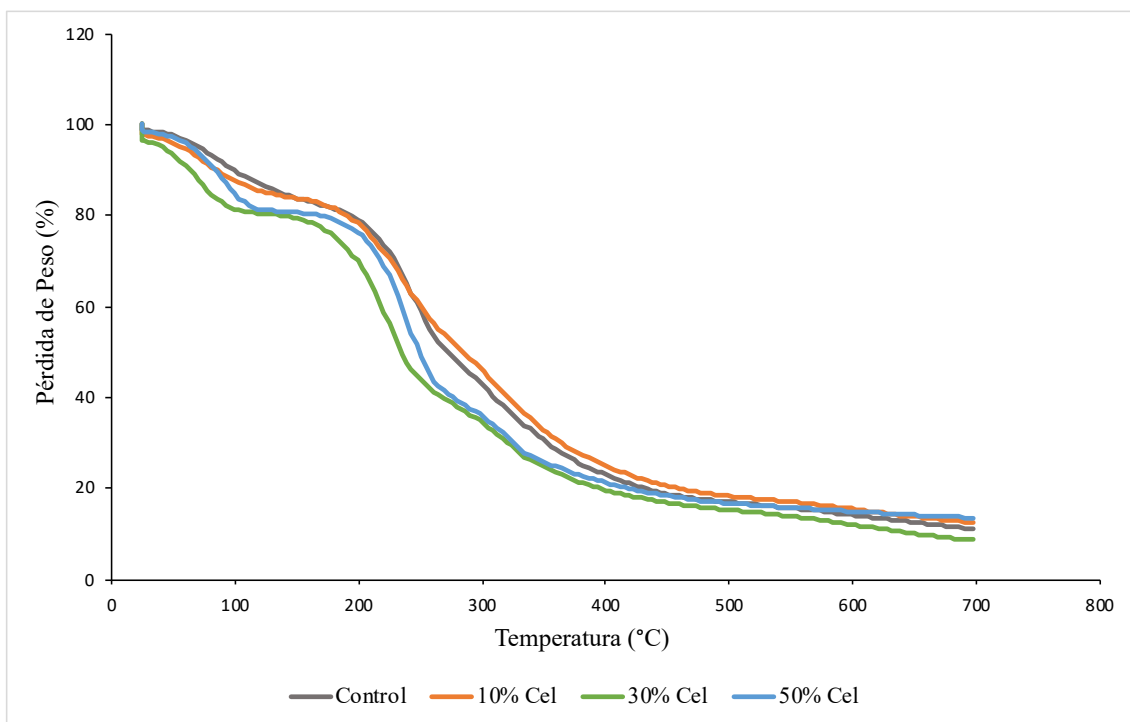


Figura 11. Curvas de TGA para cada Film. Film Control (—); Film 10% Celulosa (—); Film 30% Celulosa (—); Film 50% Celulosa (—).

5. Conclusiones

1. En este trabajo se desarrollaron biopelículas compuestas por plasma bovino, NFC y glicerol. Los *films* obtenidos presentaron buenas propiedades barrera frente a la luz UV, lo que es deseable para evitar el deterioro de los productos alimenticios que recubren. Sin embargo, la adición de NFC a la matriz proteica no mejoró de manera sensible el comportamiento de los materiales de NFC/Proteínas ante la radiación ultravioleta.
2. El estudio de transparencia también permitió comprobar que a medida que se adicionaba NFC, se disminuía esta propiedad, lo que, desde un punto de vista estético, no es del todo útil, puesto que a los consumidores les interesa ver el producto que adquieren.
3. La adición de NFC a los *films* elaborados con plasma bovino apenas afectó a la capacidad barrera al vapor de agua de las biopelículas preparadas.
4. El ensayo de las propiedades mecánicas permitió constatar que las biopelículas reforzadas con NFCs adquirirían mayor resistencia mecánica que las elaboradas únicamente con proteínas. La mayor resistencia se consiguió adicionando un 10% de celulosa, aunque esta mayor resistencia se revertió cuando se incorporaron concentraciones mayores de NFC. Este hecho sugiere que el papel de la nanocelulosa como refuerzo es limitado.
5. La resistencia a la solubilidad se vio incrementada a medida que se incorporaba NFC a la matriz proteica de los *films*. Lo cual, es un aspecto muy importante en aquellos envases destinados a recubrir productos con cierto grado de humedad.
6. La estabilidad térmica de las biopelículas se incrementó con la adición de un 10% de Celulosa, valor a partir del cual a medida que se añadió NFC, se redujo la compatibilidad entre los biopolímeros y el plastificante, dando lugar a la disminución de la estabilidad térmica.
7. Mediante la microscopía electrónica de barrido se comprobó que a mayor % de NFC, mayor era el número de aglomeraciones de nanocelulosa en los *films* elaborados. La presencia de estos aglomerados es indeseable puesto que conduce a una estructura desigual que repercute en la reducción de las propiedades de las biopelículas.
8. La cantidad de NFC añadida como material de refuerzo parece afectar a todas las propiedades estudiadas, por lo que un estudio aún más amplio sobre las interacciones que se dan entre la celulosa y las proteínas del plasma en la matriz

de las biopelículas estudiadas podría ser un interesante camino por el que continuar investigaciones futuras. Además, otro aspecto atractivo de estudio sería intentar conseguir una buena dispersión homogénea de la NFC en la matriz de los *films*, ya que probablemente se conseguiría ahondar en la mejora de las propiedades antes mencionadas.

6. Bibliografía

- Arora, Amit, y G. W. Padua. 2010. «Review: Nanocomposites in Food Packaging». *Journal of Food Science* 75(1):R43-49.
- ASTM (1995). Standard test methods for water vapor transmission of materials. En A. b. o. A. standards (Ed.), ASTM (Vol. PA: ASTM E 96-95, pp. 697-704). Philadelphia.
- Bhatnagar, A., y M. Sain. 2016. «Processing of Cellulose Nanofiber-Reinforced Composites»: *Journal of Reinforced Plastics and Composites*.
- Blanco-Pascual, Nuria, P. Montero, y M. Gomez-Guillen. 2014. «Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*». *Food Hydrocolloids* 37:100–110.
- Bourtoom, T. 2009. «Edible protein films: Properties enhancement». *International Food Research Journal* 16:1-9.
- Cazon, Patricia, Gonzalo Velazquez, José Ramírez de León, y Manuel Vázquez. 2016. «Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review». *Food Hydrocolloids*.
- Chen, Hongbo, Jingjing Wang, Yaohua Cheng, Chuansheng Wang, Haichao Liu, Huiguang Bian, Yiren Pan, Jingyao Sun, y Wenwen Han. 2019. «Application of Protein-Based Films and Coatings for Food Packaging: A Review». *Polymers* 11(12).
- Chen, Wenshuai, Qi Zhang, Kojiro Uetani, Qing Li, Ping Lu, Jun Cao, Qingwen Wang, Yixing Liu, Jian Li, Zhichao Quan, Yongshi Zhang, Sifan Wang, Zhenyu Meng, y Haipeng Yu. 2016. «Sustainable Carbon Aerogels Derived from Nanofibrillated Cellulose as High-Performance Absorption Materials». *Advanced Materials Interfaces* 3(10):1600004.
- Coseri, Sergiu, Gabriela Biliuta, Bogdan C. Simionescu, Karin Stana-Kleinschek, Volker Ribitsch, y Valeria Harabagiu. 2013. «Oxidized Cellulose—Survey of the Most Recent Achievements». *Carbohydrate Polymers* 93(1):207-15.
- Da Silva, Jania B. A., Fabiano V. Pereira, y Janice I. Druzian. 2012. «Cassava Starch-Based Films Plasticized with Sucrose and Inverted Sugar and Reinforced with Cellulose Nanocrystals». *Journal of Food Science* 77(6):N14-19.

- Deepa, B., Eldho Abraham, Bibin Mathew Cherian, Alexander Bismarck, Jonny J. Blaker, Laly A. Pothan, Alcides Lopes Leao, Sivoney Ferreira de Souza, y M. Kottaisamy. 2011. «Structure, Morphology and Thermal Characteristics of Banana Nano Fibers Obtained by Steam Explosion». *Bioresource Technology* 102(2):1988-97.
- Dong, Hong, James F. Snyder, Kristen S. Williams, y Jan W. Andzelm. 2013. «Cation-Induced Hydrogels of Cellulose Nanofibrils with Tunable Moduli». *Biomacromolecules* 14(9):3338-45.
- Etheridge, R. D., G. M. Pesti, y E. H. Foster. 1998. «A Comparison of Nitrogen Values Obtained Utilizing the Kjeldahl Nitrogen and Dumas Combustion Methodologies (Leco CNS 2000) on Samples Typical of an Animal Nutrition Analytical Laboratory». *Animal Feed Science and Technology* 73(1):21-28.
- Farris, Stefano, Laura Introzzi, y Luciano Piergiovanni. 2009. «Evaluation of a bio-coating as a solution to improve barrier, friction and optical properties of plastic films». *Packaging Technology and Science* 22:69-83.
- Ferreira, Ana R. V., Vítor D. Alves, y Isabel M. Coelho. 2016. «Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications». *Membranes* 6(2).
- Fortunati, Elena, Francesca Luzi, Weijun Yang, José M. Kenny, Luigi Torre, y Debora Puglia. 2018. «Chapter 4 - Bio-Based Nanocomposites in Food Packaging». Pp. 71-110 en *Nanomaterials for Food Packaging, Micro and Nano Technologies*, editado por M. Â. P. R. Cerqueira, J. M. Lagaron, L. M. Pastrana Castro, y A. A. M. de Oliveira Soares Vicente. Elsevier.
- Fukuzumi, Hayaka, Tsuguyuki Saito, y Akira Isogai. 2013. «Influence of TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibril Length on Film Properties». *Carbohydrate Polymers* 93(1):172-77.
- Galus, Sabina, y Justyna Kadzińska. 2016. «Whey Protein Edible Films Modified with Almond and Walnut Oils». *Food Hydrocolloids* 52:78-86.
- Ge, Liming, Xinying Li, Run Zhang, Tianhan Yang, Xiaowei Ye, Defu Li, y Changdao Mu. 2015. «Development and Characterization of Dialdehyde Xanthan Gum Crosslinked Gelatin Based Edible Films Incorporated with Amino-Functionalized Montmorillonite». *Food Hydrocolloids* 51:129-35.

- Hamaguchi, Patricia Yuca, Weng WuYin, y Munehiko Tanaka. 2007. «Effect of PH on the Formation of Edible Films Made from the Muscle Proteins of Blue Marlin (Makaira Mazara)». *Food Chemistry* 100(3):914-20.
- Hassan, Bilal, Shahzad Ali Shahid Chatha, Abdullah Ijaz Hussain, Khalid Mahmood Zia, y Naseem Akhtar. 2018. «Recent Advances on Polysaccharides, Lipids and Protein Based Edible Films and Coatings: A Review». *International Journal of Biological Macromolecules* 109:1095-1107.
- Hubbe, Martin A., Ana Ferrer, Preeti Tyagi, Yuanyuan Yin, Carlos Salas, Lokendra Pal, y Orlando J. Rojas. 2017. «Nanocellulose in Thin Films, Coatings, and Plies for Packaging Applications: A Review». *BioResources* 12(1):2143-2233.
- Kaewprachu, Pimonpan, Kazufumi Osako, Soottawat Benjakul, Wirongrong Tongdeesontorn, y Saroat Rawdkuen. 2015. «Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A Comparative Study». *Packaging Technology and Science* 29(2):77-90.
- Kalia, Susheel, Alain Dufresne, Bibin Cherian, Balbir Singh Kaith, Luc Avérous, James Njuguna, y Elias Nassiopoulos. 2011. «Cellulose-Based Bio- and Nanocomposites: A Review». *International Journal of Polymer Science* 2011.
- Khalil, Abdul, Yalda Davoudpour, Md Nazrul Islam, Asniza Mustapha, Kumar Sudesh, Rudi Dungani, y Mohammad Jawaid. 2014. «Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review». *Carbohydrate Polymers* 99:649-65.
- Khalil, Abdul, Chaturbhuj Saurabh, Asniza Mustapha, Ying Tye, M. Fazita, Muhammad Izzuddin, Hashim Fizree, Abdul Yusra, Mohamad Haafiz, Mohd Kassim, y Noorul Suraya. 2017. «Nanofibrillated cellulose reinforcement in thermoset polymer composites». Pp. 1-24 en *Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*.
- Lavoine, Nathalie, Isabelle Desloges, Alain Dufresne, y Julien Bras. 2012. «Microfibrillated Cellulose – Its Barrier Properties and Applications in Cellulosic Materials: A Review». *Carbohydrate Polymers* 90(2):735-64.

- Mali, Suzana, Maria Grossmann, María García, Miriam Martino, y Noemi Zaritzky. 2006. «Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources». *Journal of Food Engineering* 75:453-60.
- Marcet, Ismael, Carlos Álvarez, Benjamín Paredes, Manuel Rendueles, y Mario Díaz. 2018. «Transparent and Edible Films from Ultrasound-Treated Egg Yolk Granules». *Food and Bioprocess Technology* 11(4):735-47.
- Marcet, Ismael, Sara Sáez Orviz, Manuel de la Vega, y Mario Díaz. 2017. «Edible films from residual delipidated egg yolk proteins». *Journal of Food Science and Technology* 54:1-10.
- Marquis, Damien, Eric Guillaume, y Carine Chivas-Joly. 2011. «Properties of Nanofillers in Polymer». en *Nanocomposites and Polymers with Analytical Methods*.
- Marsh, Kenneth, y Betty Bugusu. 2007. «Food Packaging? Roles, Materials, and Environmental Issues». *Journal of food science* 72:R39-55.
- Meriçer, Çağlar, Matteo Minelli, Maria G. De Angelis, Marco Giacinti Baschetti, Augusto Stancampiano, Romolo Laurita, Matteo Gherardi, Vittorio Colombo, Jon Trifol, Peter Szabo, y Tom Lindström. 2016. «Atmospheric Plasma Assisted PLA/Microfibrillated Cellulose (MFC) Multilayer Biocomposite for Sustainable Barrier Application». *Industrial Crops and Products* 93:235-43.
- Mishra, Shree, Anne-S. Manent, Bruno Chabot, y Claude Daneault. 2012. «Production of nano-cellulose from native cellulose - Various options utilizing ultrasound». *Bioresources* 7:422-36.
- Mohanty, A. K., M. Misra, y G. Hinrichsen. 2000. «Biofibres, Biodegradable Polymers and Biocomposites: An Overview». *Macromolecular Materials and Engineering* 276-277(1):1-24.
- Mondragon, G., C. Peña-Rodríguez, A. González, A. Eceiza, y A. Arbeláiz. 2015. «Bionanocomposites Based on Gelatin Matrix and Nanocellulose». *European Polymer Journal* 62:1-9.
- Ofori, Jack, y Peggy Hsieh. 2011. «Blood-derived products for human consumption». *Revelation Sci* 1.
- Panaiteescu, Denis Mihaela, Eusebiu Rosini Ionita, Cristian-Andi Nicolae, Augusta Raluca Gabor, Maria Daniela Ionita, Roxana Trusca, Brindusa-Elena Lixandru, Irina

- Codita, y Gheorghe Dinescu. 2018. «Poly(3-hydroxybutyrate) Modified by Nanocellulose and Plasma Treatment for Packaging Applications». *Polymers* 10(11).
- Pereda, Mariana, Guillermina Amica, Ilona Rácz, y Norma E. Marcovich. 2011. «Structure and Properties of Nanocomposite Films Based on Sodium Caseinate and Nanocellulose Fibers». *Journal of Food Engineering* 103(1):76-83.
- Qazanfarzadeh, Zeinab, y Mahdi Kadivar. 2016. «Properties of Whey Protein Isolate Nanocomposite Films Reinforced with Nanocellulose Isolated from Oat Husk». *International Journal of Biological Macromolecules* 91:1134-40.
- Qing, Yan, Ronald Sabo, J. Y. Zhu, Umesh Agarwal, Zhiyong Cai, y Yiqiang Wu. 2013. «A Comparative Study of Cellulose Nanofibrils Disintegrated via Multiple Processing Approaches». *Carbohydrate Polymers, Volume 97, 2013; Pp. 226-234.* 97:226-34.
- Rallini, M., y J. M. Kenny. 2017. «3 - Nanofillers in Polymers». Pp. 47-86 en *Modification of Polymer Properties*, editado por C. F. Jasso-Gastinel y José M. Kenny. William Andrew Publishing.
- Ramos, Óscar L., Isabel Reinas, Sara I. Silva, João C. Fernandes, Miguel A. Cerqueira, Ricardo N. Pereira, António A. Vicente, M. Fátima Poças, Manuela E. Pintado, y F. Xavier Malcata. 2013. «Effect of Whey Protein Purity and Glycerol Content upon Physical Properties of Edible Films Manufactured Therefrom». *Food Hydrocolloids* 30(1):110-22.
- Rezvani, Elham, Gerhard Schleining, Güls Sümen, y Ali Taherian. 2013. «Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films». *Journal of Food Engineering* 116.
- Rhim, Jong W., Aristippos Gennadios, Curtis L. Weller, y Milford A. Hanna. 2002. «Sodium Dodecyl Sulfate Treatment Improves Properties of Cast Films from Soy Protein Isolate». *Industrial Crops and Products* 15(3):199-205.
- Rhim, Jong-Whan, Hwan-Man Park, y Chang-Sik Ha. 2013. «Bio-Nanocomposites for Food Packaging Applications». *Progress in Polymer Science* 38(10):1629-52.
- Rodriguez-Perez, Santiago, Antonio Serrano, Alba A. Pantión, y Bernabé Alonso-Fariñas. 2018. «Challenges of Scaling-up PHA Production from Waste Streams. A Review». *Journal of Environmental Management* 205:215-30.

- Saito, Tsuguyuki, Satoshi Kimura, Yoshiharu Nishiyama, y Akira Isogai. 2007. «Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation of Native Cellulose». *Biomacromolecules* 8(8):2485-91.
- Sánchez-García, María Dolores, Loic Hilliou, y José María Lagarón. 2010. «Morphology and Water Barrier Properties of Nanobiocomposites of κ/ι -Hybrid Carrageenan and Cellulose Nanowhiskers». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(24):12847-57.
- Savadekar, N. R., V. S. Karande, N. Vigneshwaran, A. K. Bharimalla, y S. T. Mhaske. 2012. «Preparation of Nano Cellulose Fibers and Its Application in Kappa-Carrageenan Based Film». *International Journal of Biological Macromolecules* 51(5):1008-13.
- Savadekar, N. R., y S. T. Mhaske. 2012. «Synthesis of Nano Cellulose Fibers and Effect on Thermoplastics Starch Based Films». *Carbohydrate Polymers* 89(1):146-51.
- Sevastyanova, Olena, Annbritt Forsström, Eva Wackerberg, y Mikael Lindström. 2012. «Bleaching of eucalyptus kraft pulps with chlorine dioxide: Factors affecting the efficiency of the final D stage». *Tappi Journal* 11:43-53.
- Shakeri, Alireza, y Sattar Radmanesh. 2013. «Preparation of Cellulose Nanofibrils by High-Pressure Homogenizer and Zein Composite Films». *Advanced Materials Research* 829:534-38.
- Shankar, Shiv, y Jong-Whan Rhim. 2018. «Bionanocomposite Films for Food Packaging Applications».
- Silva, Mónica Lucia Hernández, y Boris Guzmán Martínez. 2009. «Biopolymers Used in the Manufacture of Food Packaging». *Publicaciones e Investigación* 3(1):103-29.
- Sorrentino, Andrea, Giuliana Gorrasi, y V. Vittoria. 2007. «Potential Perspectives of Bio-Nanocomposites for Food Packaging Applications». *Trends in Food Science & Technology* 18:84-95.
- Suppakul, Panuwat, Joseph Miltz, K. Sonneveld, y S. W. Bigger. 2003. «Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and Its Applications». *Journal of Food Science* 68:408-20.
- Ustunol, Zeynep, y B. Mert. 2006. «Water Solubility, Mechanical, Barrier, and Thermal Properties of Cross-linked Whey Protein Isolate-based Films». *Journal of Food Science* 69:FEP129-33.

Wahyuningsih, K., Evi Iriani, y Farah Fahma. 2016. «Utilization of cellulose from pineapple leaf fibers as nanofiller in polyvinyl alcohol-based film». 16:181-89.

Wei, Haoran, Katia Rodriguez, Scott Renneckar, y Peter J. Vikesland. 2014. «Environmental Science and Engineering Applications of Nanocellulose-Based Nanocomposites». *Environmental Science: Nano* 1(4):302-16.

Weishaupt, Ramon, Gilberto Siqueira, Mark Schubert, Philippe Tingaut, Katharina Maniura-Weber, Tanja Zimmermann, Linda Thöny-Meyer, Greta Faccio, y Julian Ihssen. 2015. «TEMPO-Oxidized Nanofibrillated Cellulose as a High Density Carrier for Bioactive Molecules». *Biomacromolecules* 16(11):3640-50.

Wihodo, Mila, y Carmen I. Moraru. 2013. «Physical and Chemical Methods Used to Enhance the Structure and Mechanical Properties of Protein Films: A Review». *Journal of Food Engineering* 114(3):292-302.