

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**MATERIALES POLIMÉRICOS
BIODEGRADABLES PREPARADOS MEDIANTE
PROCESADO TERMOMECÁNICO A PARTIR DE
MEZCLAS GLUTEN/PLASTIFICANTE**

LIDIA SOLEDAD ZÁRATE RAMÍREZ

Sevilla, Marzo de 2011

**MATERIALES POLIMÉRICOS
BIODEGRADABLES PREPARADOS MEDIANTE
PROCESADO TERMOMECÁNICO A PARTIR DE
MEZCLAS GLUTEN/PLASTIFICANTE**

Memoria que presenta Lidia Soledad Zárate Ramírez, Ingeniera Química, para aspirar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, Diciembre de 2010

Fdo.: Lidia Soledad Zárate Ramírez

La presente Memoria ha sido realizada en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sevilla, siendo dirigida por los profesores Dr. D. Antonio Guerrero Conejo y Dr. D. Pedro Partal López.

Sevilla, Diciembre de 2010

Fdo.: Antonio Guerrero Conejo

Fdo.: Pedro Partal López

Dr.D. Felipe Cordobés Carmona , Director del departamento de Ingeniería

Química de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que presenta Da. Lidia Soledad Zárate Ramírez ha sido realizada dentro del Programa de doctorado en Reología aplicada y tecnología de Fluidos complejos

Sevilla, Diciembre de 2010

Fdo.: Felipe Cordobés Carmona

Contenido

INTRODUCCIÓN	4
1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
1.1. PROTEÍNAS	9
1.1.1. Introducción	9
1.1.2. Estructura y composición de las proteínas	9
1.1.3. Estabilidad conformacional	15
1.1.4. Desnaturalización de Proteínas	17
1.1.5. Cambios de estructura durante el procesado de proteínas	18
1.1.6. Entrecruzamiento entre proteínas	19
1.2. GLUTEN DE TRIGO	20
1.2.1. Composición y estructura del gluten de trigo	21
1.2.2. Viscoelasticidad del gluten de trigo	22
1.2.3. Cambios físicos y químicos del gluten durante el procesado de bioplásticos	25
1.3. BIOPLÁSTICOS	31
1.3.1. Definición	31
1.3.2. Materiales usados en la elaboración de bioplásticos obtenidos de biopolímeros	32
1.3.3. Métodos empleados en la preparación de bioplásticos a partir de proteínas	33
1.3.4. Propiedades de los bioplásticos	35
1.3.5. Situación actual y desarrollo del mercado de bioplásticos	38
1.3.6. Aplicaciones de los bioplásticos	39
1.4. MODIFICACIÓN DE PROPIEDADES DE BIOPLÁSTICOS	41
1.4.1. Tratamientos usados para modificar las propiedades de películas y recubrimientos de proteínas	41
1.4.2. Compuestos empleados para modificar las propiedades de bioplásticos basados en proteínas	44

1.5.	DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES EN POLÍMEROS	50
1.5.1.	Clasificación de los polímeros según su estructura	50
1.5.2.	Comportamiento viscoelástico de los polímeros	52
1.5.3.	Comportamiento viscoso de polímeros fundidos.....	59
1.5.4.	Comportamiento de polímeros frente a la tracción.....	66
1.5.5.	Comportamiento térmico de polímeros	68
2.	EXPERIMENTAL.....	74
2.1.	MATERIALES EMPLEADOS.....	74
2.1.1.	Gluten de trigo (WG).....	74
2.1.2.	Glicerol (GL)	75
2.1.3.	Aldehídos	75
2.1.4.	Gomas.....	77
2.2.	FORMULACIÓN DE BIOPLÁSTICOS	79
2.3.	PREPARACIÓN DE BIOPLÁSTICOS POR EL MÉTODO TERMOMECÁNICO/TERMOPLÁSTICO.....	80
2.3.1.	Mezclado termoplástico discontinuo	80
2.3.2.	Moldeo por compresión	82
2.3.3.	Extrusión	82
2.3.4.	Acondicionamiento de las probetas	83
2.4.	MEDIDAS EXPERIMENTALES	84
2.4.1.	Seguimiento del proceso de mezclado	84
2.4.2.	Reometría capilar	84
2.4.3.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	85
2.4.4.	Análisis Dinámico Mecánico en Temperatura (DMTA).....	85
2.4.5.	Ensayos de tracción	86
2.4.6.	Absorción de agua.....	87
2.4.7.	Solubilidad en presencia de agentes desnaturalizantes y reductores (SDS y DTT)	88
3.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	89

3.1.	SISTEMA GLUTEN/GLICEROL/AGUA (WG/GL/agua).....	89
3.1.1.	Estudio del mezclado termoplástico.....	89
3.1.2.	Estudio del termomoldeo	99
3.1.3.	Estudio de la solubilidad	113
3.1.4.	Influencia de la Humedad Relativa sobre las probetas moldeadas	116
3.1.5.	Estudio de la influencia del pH.....	121
3.2.	ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE ALDEHÍDOS AL SISTEMA WG/GL/AGUA	136
3.2.1.	Comportamiento viscoso de masas WG/GL/aldehído/agua	136
3.2.2.	Ensayos de DSC en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/aldehído/agua	138
3.2.3.	Ensayos de DMA en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/aldehído/agua	140
3.2.4.	Ensayos de tracción en sistemas WG/GL/aldehído/agua.....	150
3.2.5.	Ensayos de absorción de agua en sistemas WG/GL/aldehído/agua....	153
3.2.6.	Estudio de solubilidad de los sistemas WG/GL/aldehído/agua	155
3.3.	ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE GOMAS AL SISTEMA WG/GL/AGUA	158
3.3.1.	Efecto del tipo y concentración de goma en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/Goma/agua.....	158
3.3.2.	Efecto del pH en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/Goma/agua	177
3.3.3.	Solubilidad de sistemas WG/GL/XG/agua	189
3.4.	EXTRUSIÓN.....	208
4.	CONCLUSIONES	247
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	253

INTRODUCCIÓN

El consumo mundial de plásticos es de aproximadamente 200 millones de toneladas con un incremento anual del 5% (Siracusa y col., 2008), siendo el petróleo una de las principales materias primas para su obtención. La disminución en las reservas y el incremento en el coste del crudo han generado la necesidad de explorar nuevas alternativas para la obtención de plásticos. De otro lado, el creciente interés de los ciudadanos y gobiernos por desarrollar tecnologías con impacto mínimo en el medio ambiente ha llevado a considerar a los biopolímeros como una opción para sustituir a los polímeros sintéticos, teniendo en cuenta su biodegradabilidad y su procedencia de materias primas renovables (Redl y col., 1999). En este sentido, el uso de materiales plásticos obtenidos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria supondría un acercamiento a soluciones más ecológicas (Moser, 1996).

Actualmente los bioplásticos sólo cubren una cuota entre un 5 y un 10% del mercado europeo de plásticos, siendo los principales campos de aplicación el uso de films para el envasado de alimentos, bolsas comerciales para transporte de productos distribuidos al por menor y para recogida de residuos, platos, vasos y en agricultura para bolsas y artículos compostables (Siracusa y col., 2008). Teniendo en cuenta la gran variedad de biopolímeros, es importante estudiar las propiedades de los bioplásticos obtenidos a fin de encontrar la aplicación más apropiada en un mercado en que, a pesar de presentar evidentes beneficios a nivel ecológico, se encuentran en desventaja debido a su relativamente alto coste en comparación con los plásticos sintéticos.

Las proteínas, polisacáridos y lípidos han sido utilizados como fuente de biopolímeros durante muchos años (De Graff, 2000; Irissin-Mangata y col., 2001). A finales del siglo 20, las proteínas adquirieron interés como materia prima de bioplásticos debido a su biodegradabilidad y a su procedencia de fuentes renovables, obtenidas en grandes cantidades como residuos de la agricultura (Pommet y col, 2003). A esto se suma el hecho de que los bioplásticos obtenidos a partir de proteínas presentan velocidades de

degradación superiores comparadas con los demás biopolímeros (Jerez y col, 2007). Así, el gluten es completamente biodegradable en 36 días en condiciones de fermentación aerobia y en 50 días en suelo de cultivo sin liberar productos tóxicos, convirtiéndose en un excelente candidato para el desarrollo de materiales biodegradables (Domenek y col., 2004; Sun y col., 2008).

Las proteínas son heteropolímeros compuestos por más de 20 aminoácidos diferentes, esta diversidad les da un gran potencial para la formación de enlaces y propicia el entrecruzamiento entre cadenas poliméricas. Los materiales poliméricos basados en proteínas se pueden definir como matrices macromoleculares tridimensionales, de ahí que en estos sistemas se pueda esperar un amplio intervalo de propiedades con respecto a los procesados a partir de homopolímeros (Pommet y col, 2003). Dentro de las proteínas, el gluten de trigo ha sido ampliamente estudiado como sustituto de polímeros sintéticos en numerosas aplicaciones debido a sus propiedades cohesivas, adhesivas (Payne y Corfield, 1979; Sun y col., 2008), viscoelásticas, de barrera, así como a su biodegradabilidad (Domenek y col., 2004; Sun y col., 2008) e insolubilidad, (Guilbert y col., 1997; Redl y col., 1999). El gluten es un complejo proteico que contiene principalmente dos tipos de proteínas, las poliméricas (gluteninas) y las monoméricas (gliadinas) (Pallos y col., 2006).

El procesado del gluten de trigo para producir films y bioplásticos se puede llevar a cabo mediante dos métodos: uno físico-químico, denominado casting, en el que la fracción soluble en etanol o ácido acético se somete a secado (Cuq y col., 2000; Gontard y col., 1993; Herald y col., 2005; Gennadios, 2002; Mangavel y col., 2004; Pommet y col., 2005; Roy y col., 1999; Sarwin y col., 1993; Strecker y col., 1995) y otro método, el termoplástico, en el que el bioplástico se obtiene mediante mezclado directo de gluten y plastificante. Eventualmente, el material así obtenido puede ser sometido a moldeo aplicando temperaturas y presiones altas. En este caso se produce lo que se denomina procesado termomecánico. (Jerez y col., 2005; Mangavel y col., 2004; Pallos y col., 2006; Sun y col., 2008; Redl y col., 1999; Pommet y col, 2003).

Varios tratamientos físicos, químicos y enzimáticos se han empleado para modificar las propiedades funcionales de films y envases obtenidos a partir de proteínas. La mayoría de ellos buscan promover el entrecruzamiento entre segmentos proteicos para favorecer la formación y reforzamiento de la estructura de los bioplásticos (Gennadios, 2002). Dentro de los tratamientos químicos, se destaca el uso de aldehídos que buscan aprovechar su capacidad de producir enlaces inter e intramoleculares en proteínas (Marquie, 2001; Micard y col., 2000; Pallos y col., 2006). Otra alternativa consiste en diseñar films con varios componentes para incorporar las ventajas de cada uno de ellos. Existen trabajos en los que se estudia la combinación de distintos tipos de biopolímeros entre los que se encuentran las proteínas y los polisacáridos, que puede contribuir a mejorar las propiedades de los films debido a la variedad de sus propiedades físicas y a sus interacciones (Aguilar-Mendez y col., 2008; Arvanitoyannis y Biliaderis, 1998; Arvanitoyannis y col., 1997; Ciesla y col., 2006; Coughlan y col., 2004; Erdohan y Turhan, 2005; Gounga y col., 2007; Jagannath y col., 2003; Lee y col., 2004; Parris y Coffin, 1997; Romero-Bastida y col., 2004; Turhan y col., 2007; Zuo y col., 2009). Asimismo, algunos autores han encontrado mejoras en las propiedades elongacionales y de permeabilidad al vapor de agua en films obtenidos a partir de gomas y proteínas (Osés y col., 2009, Zuo y col., 2009).

El procesado termoplástico de proteínas para la formación de films tiene un gran potencial para la producción a gran escala de envases alimentarios (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008). Según Redl y col. (1999), los materiales basados en el gluten solo podrán llegar a ser competitivos cuando se use una tecnología de procesado mediante extrusión, similar a la actualmente utilizada con los polímeros sintéticos. En este sentido, la combinación de extrusión y moldeo por compresión puede dar como resultado la formación de bioplásticos con un amplio intervalo de propiedades mecánicas y de barrera, lo que puede constituir una ventaja añadida para su uso (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008). Además, la incorporación de otros biopolímeros y/o aditivos puede alterar las propiedades de los bioplásticos de origen proteico, lo que podría resultar muy útil en determinadas aplicaciones.

A pesar de que se ha investigado la combinación de proteínas con otras sustancias en films formados por el método físico-químico, se ha hecho poco énfasis en estudios enfocados a promover el uso del método termomecánico. En este sentido, el objetivo del presente trabajo consiste en estudiar el efecto de la adición de diferentes agentes en la formulación de bioplásticos obtenidos a partir de gluten mediante mezclado y moldeo por compresión o extrusión, sobre las propiedades viscoelásticas, mecánicas y de absorción de agua de tales bioplásticos. Los resultados aquí obtenidos podrían contribuir a sentar las bases para futuras aplicaciones de estos materiales biodegradables. Para alcanzar este objetivo la investigación abordará los siguientes aspectos:

- La obtención de bioplásticos a partir de sistemas gluten/glicerol/agua: Análisis de la influencia de las condiciones de procesado termomecánico y almacenamiento sobre las propiedades de estos bioplásticos, como referencia para las siguientes etapas. Como variables se eligieron las condiciones de mezclado, temperatura de moldeo, pH y humedad relativa.
- El estudio del efecto de la adición de aldehydos al sistema gluten/glicerol/agua en bioplásticos obtenidos mediante procesado termomecánico: Se ha investigado la respuesta de estos bioplásticos por medio de técnicas de análisis dinámico mecánico en función de la temperatura (DMA), de determinación de propiedades mecánicas de resistencia a la tracción y de la capacidad de absorción de agua, comparando dichos resultados con los de los sistemas de referencia.
- Estudio del efecto de incorporación de distintos tipos de polisacáridos de origen vegetal (gomas) a la formulación de bioplásticos de sistemas gluten/glicerol/agua: Se han empleado distintos tipos de hidrocoloides de uso alimentario, comparando su comportamiento termoreológico (DMA), mecánico (tracción) y de absorción de agua con el correspondiente al sistema de referencia, exento de goma. Para este estudio se han utilizado gommas de carácter aniónico (xantana, metil-celulosa, carboximetilcelulosa) y no iónico (goma de garrofín).

- Evaluación de las condiciones de extrusión para sistemas seleccionados: Dentro de este estudio se eligieron los sistemas aditivo/gluten/glicerol/agua que presentaron mejores resultados para su procesado mediante extrusión (procesado termoplástico), buscando condiciones que permitan obtener bioplásticos con propiedades equiparables a las obtenidas en sistemas moldeados por compresión (procesado termomecánico).

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1. PROTEÍNAS

1.1.1. Introducción

Las proteínas son polímeros naturales formados por aminoácidos, que juegan un papel importante en los sistemas biológicos y de alimentos: como biocatalizadores (enzimas), componentes estructurales de tejidos y órganos (colágeno, keratina, elastina), proteínas contráctiles (actina, miosina y tubulina), hormonas (insulina, factor de crecimiento), proteínas de transporte (seroalbúmina, hemoglobina), quelación de metales (fosvitina, ferritina), anticuerpos (inmunoglobulinas), proteínas protectoras (toxinas y alérgenos) y proteínas de almacenamiento como fuente de nitrógeno y energía para embriones (Damodaran, 1997).

Las proteínas son altamente complejas y su diversidad funcional depende principalmente de su estructura química. Se puede obtener una cantidad innumerable de proteínas al variar la composición de aminoácidos (entre los 20 existentes) y su secuencia, impartiendo una multitud de conformaciones espaciales con diversas propiedades y funciones biológicas.

1.1.2. Estructura y composición de las proteínas

Las proteínas son polímeros formados de 19 α -aminoácidos diferentes y un imino ácido unidos vía enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes sólo difieren en la naturaleza química de la cadena lateral unida al átomo de carbono central (Carbono α). Este Carbono α se encuentra unido a cuatro grupos: un grupo amino básico (-NH₂), un grupo carboxílico ácido (-COOH), un átomo de hidrógeno y la ya mencionada cadena lateral (-R). Las propiedades fisico-químicas, tales como la carga, solubilidad y reactividad química de los aminoácidos, y por ende de las proteínas, dependen de su cadena lateral (Damodaran, 1997).

El comportamiento de las proteínas en los bioplásticos depende de su estructura. En general, existen cuatro niveles estructurales: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Figura 1.1.1):

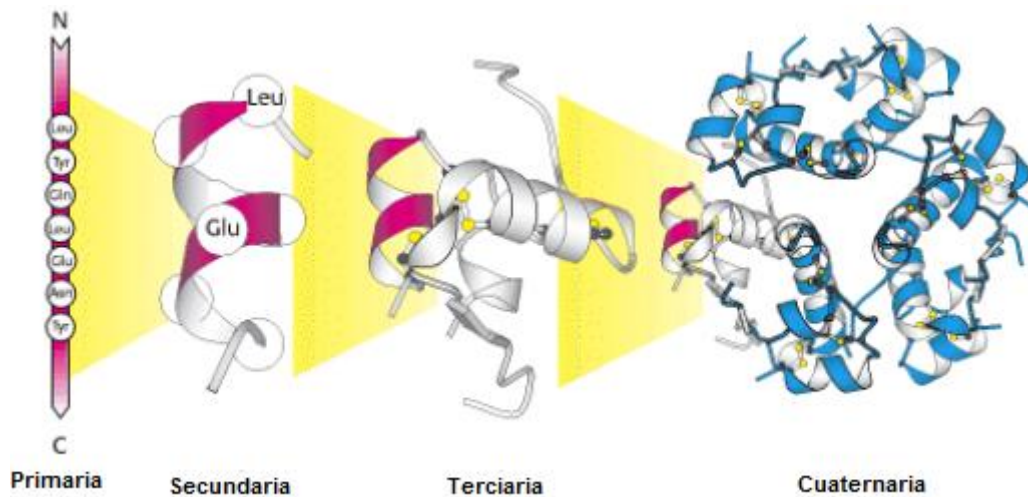


Figura 1.1.1. Niveles estructurales en las proteínas.

1.1.2.1. Estructura primaria

Las proteínas son polímeros lineales formados por enlaces del grupo α -Carboxil de un aminoácido con el grupo α -amino de otro aminoácido mediante el enlace peptídico (Figura 1.1.2).

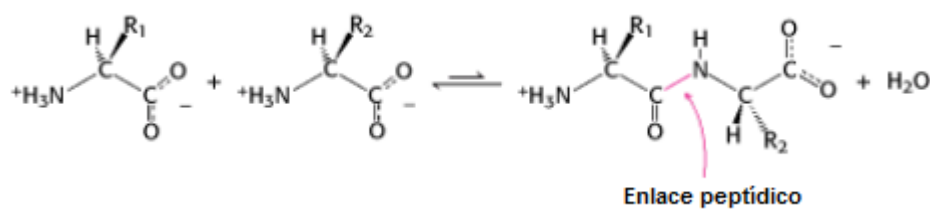


Figura 1.1.2. Enlace peptídico en proteínas.

La serie de aminoácidos unidos por los enlaces peptídicos forma la cadena polipeptídica y cada unidad de aminoácido dentro de la cadena se denomina residuo. Una cadena polipeptídica consta de una parte que se repite regularmente llamada cadena principal y una parte variable que comprende cadenas laterales distintivas. La cadena principal tiene un gran potencial para

los enlaces de hidrogeno. Cada residuo contiene un grupo carbonil, el cual es un buen receptor en los enlaces de hidrógeno y, con excepción de la prolina, un grupo NH que es un buen donante para los enlaces de hidrógeno. Estos grupos interactúan con los demás y con grupos funcionales de las cadenas laterales para estabilizar las estructuras.

1.1.2.2. Estructura secundaria

La larga cadena de aminoácidos puede tomar, en teoría, un número determinado de estructuras secundarias plegadas. La estructura más favorable (o nativa) está determinada por la rotación de los aminoácidos sobre la cadena principal de la proteína (que presenta enlaces sencillos) de tal modo que las cadenas laterales alcancen una distribución termodinámicamente estable. El tamaño y naturaleza de las cadenas laterales determinará si estas irán expuestas o por el contrario ocultas al medio, que usualmente es acuoso. Los grupos apolares quedarán expuestos, mientras que los polares estarán inmersos en la estructura interna de la proteína (Hall, 1996).

Las estructuras secundarias más comúnmente halladas en proteínas son la hélice- α y la lámina- β .

- Hélice- α : Esta estructura tiene forma de bastón. Una cadena principal altamente enrollada forma la parte interna del bastón y las cadenas laterales se ubican en el exterior de forma helicoidal. Esta estructura se estabiliza por puentes de hidrógeno entre los grupos NH y CO de la cadena principal. En particular, el grupo CO de cada aminoácido forma un enlace de hidrógeno con el grupo NH del aminoácido que está situado 4 residuos delante en la secuencia (Berg y col., 2006) (Figura 1.1.3).

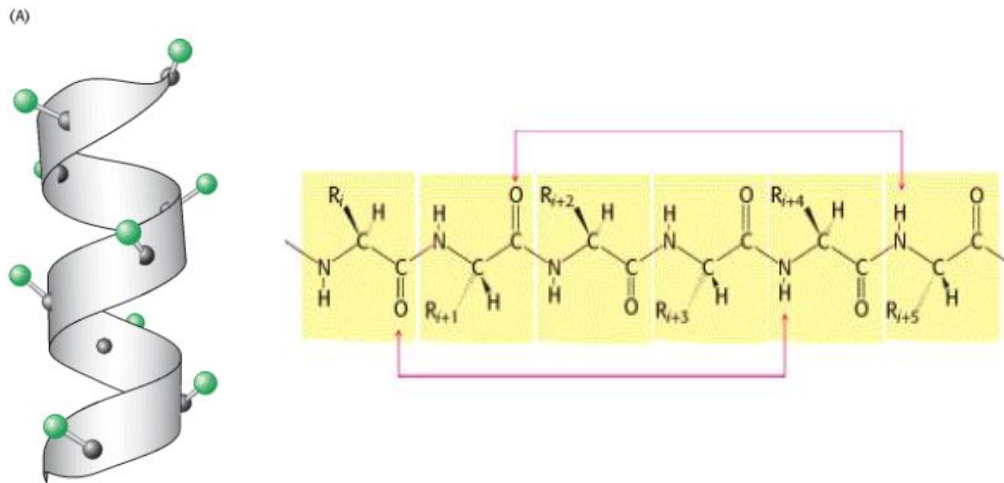


Figura 1.1.3. Estructura y enlaces de la hélice- α en proteínas.

Las estructuras de hélice en la proteína son predominantemente anfifílicas, es decir, que una parte de la superficie helicoidal es hidrofílica y la otra parte es hidrofóbica. En la mayoría de las proteínas nativas, la superficie hidrofóbica de la hélice se encuentra situada hacia el interior de la proteína, y está relacionada con las interacciones hidrofóbicas con otros grupos no polares en el interior. Estas interacciones contribuyen a la estabilidad de la forma plegada de la proteína (Damodaran, 1997).

- Lámina- β : Pueden ser relativamente planas o adoptar una forma algo curvada. En general, son estructuras extendidas dónde los grupos CO y NH se orientan de forma perpendicular a la dirección de la cadena principal. En esta configuración, los enlaces de hidrógeno sólo se pueden presentar entre láminas (Damodaran, 1997). Una cadena polipeptídica, llamada filamento- β , se une a uno o más filamentos- β por puentes de hidrogeno (Figura 1.1.4). Las cadenas adyacentes en las láminas β pueden dirigirse en direcciones opuestas (lámina- β antiparalela) o en la misma dirección (lámina- β paralela) (Berg y col., 2006).

Segmentos que contienen residuos aminoácidos alternativamente polares y apolares tienen una gran probabilidad de formar láminas- β . De

forma general, las proteínas con una conformación tipo lámina- β son más hidrofóbicas que las que tienen una configuración de hélice- α , exhibiendo altas temperaturas de desnaturalización (Damodaran, 1997).

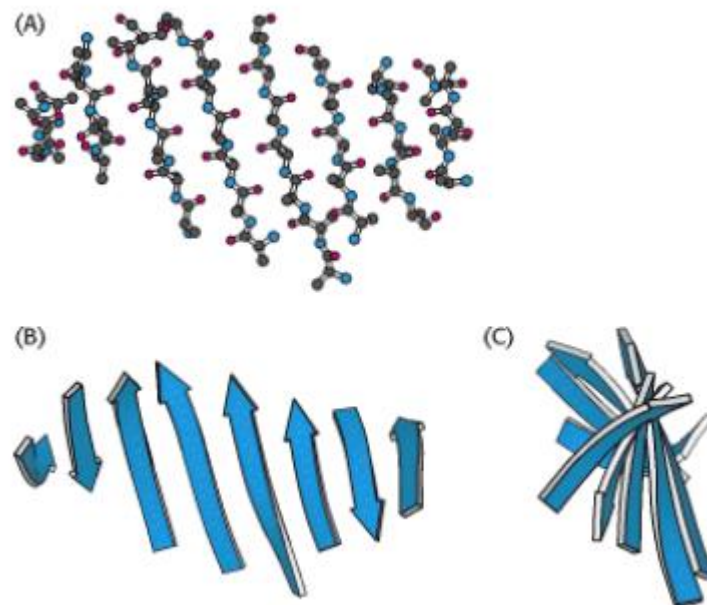


Figura 1.1.4. Estructura y conformación de la lámina- β en proteínas.

1.1.2.3. Estructura terciaria

Se refiere al ordenamiento espacial de una cadena polipeptídica completa, con segmentos de estructura secundaria, en una forma plegada tridimensional compacta. El proceso de formación de esta estructura está dirigido por los requisitos termodinámicos para minimizar la energía libre de la molécula a través de la optimización de varias interacciones no covalentes (interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno) entre varios grupos en la proteína. El reordenamiento más importante que ocurre durante la formación de la estructura terciaria es el traslado de los residuos no polares al interior y de los residuos hidrofílicos al exterior de la molécula de proteína (Damodaran, 1997). Esta distribución de los residuos revela un factor clave en la estructura de las proteínas: en medio acuoso, el plegamiento de las proteínas se determina por la fuerte tendencia de los grupos hidrofóbicos a ser excluidos del agua, así el sistema es más estable

termodinámicamente si los grupos hidrofóbicos están agrupados más que si se encuentran extendidos en el medio acuoso (Berg y col., 2006).

La distribución y fracción relativa de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos dentro de la secuencia de aminoácidos afecta varias propiedades físico-químicas tales como la forma, topografía superficial y solubilidad de la proteína. Proteínas con una gran cantidad de residuos hidrofílicos distribuidos uniformemente en su secuencia tienden a asumir una forma alargada de “bastón”. Por el contrario, las que tienen varios residuos hidrofóbicos suelen tomar forma esférica “globular”, de modo que los grupos hidrofóbicos quedan encerrados en el interior de la proteína (Damodaran, 1997).

Algunas cadenas polipeptídicas se pliegan en dos o más regiones que se conectan por un segmento flexible de la cadena polipeptídica. Estas unidades globulares compactas, llamadas dominios, pueden llegar a tener un tamaño que va desde de 30 hasta 400 residuos de aminoácidos (Berg y col., 2006). La diferencia en estabilidad de la estructura de los dominios puede causar desplegamiento de varias partes de la molécula de la proteína durante procesos de desnaturalización térmica o interfacial (Damodaran, 1997).

1.1.2.4. Estructura cuaternaria

Se relaciona con el ordenamiento espacial de una proteína que contiene varias cadenas polipeptídicas. Cada cadena polipeptídica se denomina subunidad y el complejo cuaternario es la estructura oligomérica. La formación de oligómeros es conducida termodinámicamente de forma que los residuos hidrofóbicos que no han podido situarse en el interior de la proteína interactúan con los residuos hidrofóbicos de otra proteína adyacente en la solución acuosa. Además de éstas, otras interacciones no covalentes (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno) en la interfase contribuyen a la estabilidad de la estructura cuaternaria. Muchas proteínas que se hallan en alimentos, como las proteínas de los cereales, tienen un contenido de residuos hidrofóbicos demasiado elevado como para que estén todos ubicados en el interior, por tanto presentan estructuras oligoméricas con varias subunidades (Damodaran, 1997).

1.1.3. Estabilidad conformacional

El plegamiento de las proteínas de su estructura lineal primaria hasta la compleja estructura cuaternaria es función de varias interacciones no covalentes (como los puentes de hidrógeno) e interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y fuerzas de van der Waals, además de aquellas interacciones que involucran el enlace de grupos prostéticos – ligantes. La estabilidad de la estructura plegada se expresa como la diferencia de energía libre entre los estados plegado y no plegado de la proteína, mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{D \rightarrow N} = \Delta G_H + \Delta G_{ele} + \Delta G_{H\phi} + \Delta G_{vdW} - T\Delta S_{conf} \quad (1.1.1)$$

Donde $\Delta G_{D \rightarrow N}$: Estabilidad neta

ΔG_H : Cambio en energía libre debida a los enlaces de hidrógeno

ΔG_{ele} : Cambio en energía libre de interacciones electrostáticas

$\Delta G_{H\phi}$: Cambio en energía libre de interacciones hidrofóbicas

ΔG_{vdW} : Cambio de energía libre por fuerzas de van der Waals

ΔS_{conf} : Cambio en entropía conformacional del polipéptido

Las proteínas presentan unos valores bajos de estabilidad neta (10 - 20kCal/mol) lo que indica que son metaestables y que pueden sufrir fácilmente alteraciones en su conformación con la ruptura de un bajo número de interacciones o enlaces. De ahí que cambios en el pH, fuerza iónica, temperatura y composición del medio en el que la proteína se encuentra, pueden inducir cambios conformacionales en esta, afectando sus propiedades biológicas y funcionales (Damodaran, 1997).

Como se mencionó antes, la estabilidad estructural de las proteínas se mantiene por varios tipos de interacciones y enlaces, de los cuales se comentan a continuación los principales.

- Enlaces de hidrógeno: existen predominantemente en la estructura secundaria de las proteínas, es decir en la hélice- α y la lámina- β de la cadena de polipéptido. Este tipo de puente intersegmento se presenta predominantemente entre cadenas laterales de glutamina y asparagina, por ejemplo en proteínas de gluten y legumbres las cuales son ricas en estos aminoácidos (Damodaran, 1997).
- Interacciones electrostáticas: se presentan entre grupos con carga opuesta (puentes de sal). Se ha encontrado que tales puentes parcialmente ocultos en un medio no polar contribuyen enormemente a la termoestabilidad de las proteínas (Biesecker y col., 1977).
- Interacciones hidrofóbicas: dentro de las interacciones no covalentes contribuyen en alto grado a la estabilidad de las proteínas. Son endotérmicas y conducidas por la entropía, su intensidad aumenta con la temperatura, jugando un papel esencial en la termoestabilidad de las proteínas (Baldwin, 1986; Scheraga y col., 1962).
- Puentes de azufre: En algunas proteínas la cadena principal esta entrecruzada. Los entrecruzamientos más comunes son los puentes de azufre, formados por la oxidación de un par de residuos de cisteína. La unidad resultante de cisteínas enlazadas se denomina cistina (Figura 1.1.5). Cuando dos residuos de cisteína se encuentran suficientemente próximos y en la orientación adecuada, tienen lugar los puentes de azufre que contribuyen a la estabilidad de la proteína al reducir la tendencia de la cadena polipeptídica a desplegarse. Las proteínas que requieren estabilidad estructural elevada en sistemas biológicos, especialmente en ambientes extracelulares, usualmente contienen puentes de azufre (Damodaran, 1997; Berg y col., 2006).

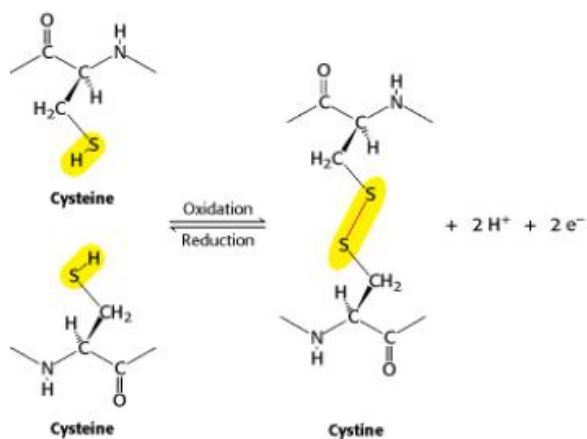


Figura 1.1.5. Entrecruzamiento. Formación de puentes de azufre a partir de dos residuos de cisteína en una reacción de oxidación.

1.1.4. Desnaturalización de Proteínas

Se define como el desplegamiento de la proteína desde su estado nativo estructurado a un estado desestructurado (parcialmente), sin o con poca estructura fija residual, que no está muy lejos de un enrollamiento aleatorio, puede ser reversible o irreversible (De Graaf, 2000). También se puede definir como una modificación en la conformación (secundaria, terciaria o cuaternaria) sin la ruptura de los enlaces polipeptídicos de la estructura primaria. Puede ser causada por varios agentes como el calor, la presión, fuerzas interfaciales, cizalla, valores extremos de pH, sales, detergentes, solventes orgánicos y plastificantes (Damodaran, 1997). Para aplicaciones en alimentos es importante que las proteínas estén en su estado nativo para así conservar su funcionalidad, sin embargo en muchos otros casos la desnaturalización es un prerrequisito para que en el procesado se puedan obtener productos con un buen rendimiento en una aplicación específica.

El calor es el agente físico que más comúnmente produce desnaturalización en las proteínas. La temperatura de desnaturalización (T_D) de la proteína depende del contenido de agua, frecuentemente decrece al aumentar el porcentaje de agua. En general, la desnaturalización ocurre en sistemas con un contenido de agua por encima de 5% y temperaturas mayores a los 75°C. Sin embargo la (T_D) puede variar debido al origen de la proteína, aditivos y

métodos de procesado (De Graaf, 2000). A pesar de que la mayoría de procesos de desnaturalización térmica en la naturaleza son irreversibles, se ha observado que ciertas proteínas pueden sufrir una desnaturalización reversible. Cuando una proteína se somete a un proceso de desnaturalización suave, al retirar el agente desnaturalizante recupera en cierto grado sus propiedades pero generalmente su estructura no vuelve a ser completamente idéntica a la que tenía en su forma nativa. La extensión de la reversibilidad depende de los criterios escogidos para definir la desnaturalización de la proteína y de la severidad del tratamiento (Damodaran, 1997).

1.1.5. Cambios de estructura durante el procesado de proteínas

Antes de que las proteínas lleguen a tener las propiedades deseadas en el producto deben sufrir una serie de cambios en su estructura. En general se pueden distinguir tres etapas en el procesado de proteínas para aplicaciones no alimentarias, cada una acompañada de modificaciones estructurales.

- Mezclado: Solubilización o dispersión de la proteína en agua u otros plastificantes, o mezclado de la proteína en polvo con tales plastificantes. El incremento de temperatura, cizalla y la presencia de desnaturalizantes es bastante común en esta etapa. Las interacciones moleculares y los puentes de azufre pueden romperse y producir cambios en la estructura (De Graaf, 2000).
- Formación de estructura: Reordenamiento de las moléculas. En el caso de materiales de extrusión, la cizalla favorece el alineamiento de las moléculas conduciendo a la formación de nuevas interacciones (Camire, 1991).
- Fijación de la estructura: Después de la orientación molecular y de dar forma al producto, la estructura formada debe fijarse, ya sea de forma física, química o por combinación de las dos. La fijación física o vitrificación es la reducción de la movilidad molecular por disminución de la temperatura (después de la extrusión) o reducción del contenido de agua (secado de cubiertas y adhesivos). La fijación química se puede

dar por ejemplo por la formación de puentes de azufre o por enlace covalente, entre grupos reactivos que no contienen azufre. Esto se puede conseguir adicionando agentes de entrecruzamiento y de este modo incrementar la fuerza y la resistencia al agua del material (De Graaf y Kolster, 1998).

1.1.6. Entrecruzamiento entre proteínas

Uno de los tipos de reacciones químicas que mayores consecuencias tiene en la funcionalidad de proteínas, tanto en su forma nativa como desnaturalizada, es el entrecruzamiento. El entrecruzamiento de proteínas se refiere a la formación de enlaces covalentes entre cadenas polipeptídicas dentro de la proteína (entrecruzamiento intramolecular) o entre proteínas (entrecruzamiento intermolecular) (Feeney y Whitaker, 1988). Las altas temperaturas, valores extremos de pH, exposición a condiciones de oxidación y la acción de enzimas, pueden provocar el entrecruzamiento entre proteínas. No todos los aminoácidos participan en las reacciones de entrecruzamiento y los que lo hacen tienen varios grados de reactividad bajo diferentes condiciones (Gerrard, 2002). Diferentes tipos de entrecruzamiento entre proteínas se pueden presentar dependiendo de su origen:

- **Puentes de azufre:** Son el tipo de enlace covalente más común y mejor caracterizado en proteínas. Se forman por acoplamiento oxidativo de dos residuos de cisteína adyacentes dentro de una matriz de proteína. Un oxidante acepta los átomos de hidrógeno de los grupos tiol de los residuos de cisteína, produciendo puentes de azufre (Gerrard, 2002). La habilidad de las proteínas para formar puentes de azufre intermoleculares durante los tratamientos térmicos se considera vital para la formación de geles de algunas proteínas alimentarias (Zayas, 1997).
- **Derivados de dehidroproteínas:** La exposición a condiciones alcalinas, particularmente cuando va acompañada de procesado térmico induce racemización de los residuos de los aminoácidos y la formación de

enlaces covalentes, tales como los de la dehidroalanina, lisinoalanina y lantionina (Friedman, 1999).

- Derivados de la tirosina: Debido a las estructuras primaria y secundaria de las proteínas del gluten podría tener lugar la formación de enlaces no covalentes intermoleculares entre 2 o 3 residuos de tirosina presentándose entrecruzamiento de tirosina en forma de isoditrosina o ditrosina. Recientemente se han identificado puentes de tirosina en el trigo y se ha detectado que juegan un papel importante en la formación de la matriz de proteínas del gluten (Tilley y col., 2001).
- Derivado de la reacción de Maillard: La reacción de Maillard comprende una serie compleja de reacciones, aparentemente iniciada por la condensación simple de una amina con un grupo carbonilo, frecuentemente dentro de un azúcar reductor o del producto de la ruptura de una grasa (Fayle y Gerrard, 2002). Durante el curso de la reacción de Maillard se generan varios intermedios reactivos como compuestos α -dicarbonilo y deoxisonas que conducen a la formación de un amplio rango de productos (Fayle y Gerrard, 2002). Se ha determinado que ocurre entrecruzamiento de proteínas alimentarias por la reacción de Maillard durante el procesado de alimentos (Gerrard, 2002; Gerrard y col., 2003; Hill y Easa, 1998), sin embargo la estructura química precisa de este entrecruzamiento aún no ha sido establecida del todo.
- Otros enlaces isopeptídicos: Un tratamiento térmico severo puede provocar la formación de enlaces isopeptídicos vía condensación del α -aminoácido de la lisina con el grupo amida de un residuo de asparagina o glutamina (Singh, 1991).

1.2. GLUTEN DE TRIGO

El trigo es el cereal más utilizado en la alimentación humana, la masa obtenida de su harina posee propiedades especiales que la hacen indispensable en muchos productos alimenticios. De igual modo, otras aplicaciones no

alimentarias pueden utilizar tales cualidades. Las propiedades únicas del trigo residen en las proteínas que forman el gluten de su endosperma. Las proteínas del gluten tienen propiedades viscoelásticas específicas (Veraverbeke y Delcour, 2002).

En contraste con las otras proteínas del trigo, las del gluten tienen baja solubilidad en agua o soluciones diluidas de sales. Algunos factores que contribuyen a su baja solubilidad son su bajo contenido de aminoácidos con cadenas laterales ionizables y sus altos contenidos de aminoácidos no polares y glutamina. Esta última tiene un alto potencial de formación de puentes de hidrógeno (Lagrain y col., 2010).

El gluten se prepara a partir de la masa obtenida de la harina de trigo sometiendo a lavado bajo una corriente de agua. Así se separa la mayoría del material soluble y partículas, dejando una masa de proteína que retiene su cohesividad al ser sometida a estiramiento. El gluten contiene 75% de proteína en base seca, el resto corresponde principalmente a almidón remanente y lípidos (Shewry y col., 2002).

1.2.1. Composición y estructura del gluten de trigo

La mayoría de proteínas presentes en el gluten son del tipo denominado prolaminas. Las prolaminas son un grupo de proteínas que se definieron inicialmente de acuerdo a su solubilidad en mezclas de etanol y agua, usualmente de 60–70% (v/v) de etanol. Esta definición se extendió a proteínas relacionadas, que en su estado nativo no son solubles en disoluciones de etanol y que poseen puentes de sulfuro intermoleculares para estabilizar la estructura de los polímeros que las forman. Las proteínas de gluten de trigo se componen principalmente de dos tipos de prolaminas: las gliadinas y las gluteninas, presentes en aproximadamente la misma proporción (Shewry y col., 2002).

Las gliadinas son proteínas monoméricas o de una sola cadena, su peso molecular se encuentra en el rango de 30 a 70 kDa (MacRitchie y Singh, 2004). Desde el punto de vista estructural, se pueden distinguir tres tipos de Gliadinas:

α , γ y ω . Los residuos de cisteína en las α -gliadinas (6) y en las γ -gliadinas (8) se localizan en posiciones altamente preservadas y están involucrados en los puentes de azufre intermoleculares. En contraste las ω -gliadinas carecen de residuos de cisteína y también tienen un bajo nivel de metionina (Shewry y Tatham, 1997; Shewry y col., 1986).

Las gluteninas son proteínas de varias cadenas, su peso molecular está por encima de 100 kDa y puede llegar a varios miles de kDa (MacRitchie y Singh, 2004). Mientras las gliadinas son solubles en soluciones acuosas de alcohol, las gluteninas son parcialmente insolubles en la mayoría de solventes debido a su gran tamaño. Sin embargo, sus subunidades tienen solubilidades comparables con las de las gliadinas. Las subunidades de glutenina se pueden obtener por tratamiento de la glutenina con agentes reductores como el β -mercapto-etanol o el ditioneitol (DTT), diferenciándose subunidades de glutenina de alto peso molecular (HMW-GS) y subunidades de bajo peso molecular (LMW-GS). Los residuos de cisteína se encuentran tanto en gliadinas como en gluteninas, presentes como grupos sulfidrilos libres (SH) que contribuyen en el enlace SS dentro de la misma cadena polipeptídica (enlaces SS intra-cadena) o entre diferentes cadenas (enlaces SS inter-cadenas) (Shewry y col., 1986; Lagrain y col., 2010).

1.2.2. Viscoelasticidad del gluten de trigo

Las proteínas del gluten forman masas viscoelásticas al ser hidratadas. Las unidades de gliadina se consideran responsables de conferir viscosidad, mientras que las propiedades elásticas se atribuyen a los polímeros de glutenina. El gran tamaño de estos últimos concede continuidad a la masa, prerequisite para la elasticidad. Se considera que la elasticidad de la glutenina depende del desplegamiento reversible de su conformación plegada, energéticamente más favorable (Veraverbeke y Delcour, 2002).

Los cambios precisos que sufre el sistema en el proceso de mezclado aún no han sido del todo definidos, pero generalmente se considera que el incremento en la extensibilidad de la masa es el resultado de la optimización de las

interacciones proteína – proteína dentro de la matriz de gluten (Shewry y col., 2002).

Actualmente está ampliamente aceptado que los puentes de azufre entre cadenas de glutenina proporcionan un esqueleto elástico al gluten, no obstante, estudios de espectroscopia (usando espectroscopia NMR y FTIR) de subunidades de proteína de alto peso molecular y del modelo basado en patrones de repetición de péptidos, sugieren que los enlaces no covalentes de hidrógeno entre subunidades de glutenina y polímeros también son importantes (Belton y col.,1995; Wellner, y col.,1996; Gilbert y col., 2000; Shewry y col., 2002). Estos estudios han mostrado que las proteínas en estado seco se encuentran desordenadas, pero al hidratarse, se incrementa su movilidad y se forman estructuras de lámina- β . Mayores cambios se presentan si continúa el proceso de hidratación, con un aumento adicional en la movilidad y la formación de estructuras curvadas a expensas de la lámina- β (Shewry y col., 2002).

Estas observaciones llevaron al desarrollo de un modelo de “loop and train” propuesto por Belton (1999), en el que se postula que en un estado de hidratación baja tienen lugar varias interacciones proteína – proteína, por medio de puentes de hidrógeno de los residuos de la glutamina y las estructuras espirales- β . Al aumentar el nivel de hidratación el sistema se plastifica, permitiendo la formación de estructuras similares a láminas- β a través de puentes de hidrógeno intercadenas. Un incremento adicional del nivel de hidratación conlleva la ruptura de algunos puentes de hidrogeno intercadenas que son reemplazados por puentes entre glutamina y agua, formando regiones curvadas “loops”. Sin embargo, no todos los puentes de hidrogeno intercadenas desaparecen sino que se forman unos nuevos, favorecidos por el aumento de solubilidad de la proteína. De este modo se generan regiones rectas “trains” de contacto entre cadenas (Figura 1.2.1) (Belton, 1999; Shewry y col., 2002).

El resultado final sería la formación de cadenas de proteína con zonas rectas interaccionando con otras cadenas, formando así una matriz. Al producirse el

alargamiento de la estructura, ésta se deformaría primero por las regiones curvas y luego por las regiones rectas, que se separarían. Al cesar la deformación, la estructura se relajaría buscando el equilibrio de las regiones curvas y rectas. La fuerza impulsora de este proceso es un término entrópico asociado a la entropía conformacional de las regiones curvas y a la entalpía de formación de los puentes de hidrógeno entre regiones rectas. Así la pérdida de entropía resultante de la formación de puentes de hidrógeno se compensa, en parte, por el incremento de entropía asociada a la liberación de moléculas de agua (Belton, 1999).

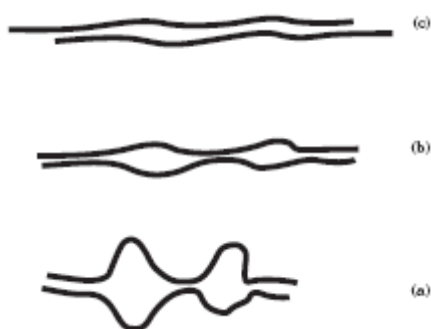


Figura 1.2.1. Modelo de “loop and train” propuesto por Belton (1999) para la hidratación de proteínas de gluten.

El anterior modelo sólo tiene en cuenta las subunidades de alto peso molecular de la glutenina, para explicar el comportamiento viscoelástico del gluten, Belton plantea una teoría que contempla dos tipos de proteínas: lineales y globulares. Las lineales interactuarían con otras por medio del mecanismo de “loop and train” y por puentes de azufre. Si el sistema es sometido a elongaciones repetidas se produciría el alineamiento de las proteínas lineales favoreciéndose la formación de polímeros enlazados por puentes de azufre entre las regiones terminales. Este hecho produciría un incremento en el peso molecular y por tanto del número de interacciones entre polímeros. Debido a que cada polímero lineal sería capaz de interactuar con una mayor parte de la matriz total, la resistencia a la deformación y la fuerza impulsora del mecanismo de restauración de la estructura aumentarían. Sin embargo, si el sistema es deformado lo suficiente para romper totalmente la estructura, se produciría una pérdida de resistencia, esta sería la causa de que se observe un máximo en la

resistencia de las masas de gluten durante su proceso de mezclado (Belton, 1999).

Por otro lado, las gliadinas actuarían como plastificantes que debilitarían las interacciones entre las cadenas de glutenina y por tanto incrementarían la viscosidad de la masa. Las gliadinas formarían una matriz en la cual tiene lugar la deformación crítica de las cadenas largas de moléculas poliméricas lineales y contribuirían a la resistencia a la extensión formando un medio viscoso, en el cual cualquier desplazamiento de las cadenas lineales obligaría al desplazamiento de las moléculas globulares. Un aumento en las interacciones entre los polímeros globulares produciría un incremento en su resistencia viscosa y por tanto, en la resistencia a la extensión. A su vez, también se produciría un retardo en la recuperación elástica debido a que el reestablecimiento del equilibrio entre 'loops' y 'trains' dependería de las velocidades de movimiento de los segmentos poliméricos en la matriz, las cuales son función de la viscosidad del medio (Belton, 1999; Veraverbeke y Delcour, 2002).

1.2.3. Cambios físicos y químicos del gluten durante el procesado de bioplásticos

Diferentes métodos y condiciones de procesado se centran en lograr una mayor polimerización y entrecruzamiento de las proteínas del gluten, valiéndose principalmente del tratamiento térmico, acompañado en algunas ocasiones de cizalla y presión. Los cambios en la estructura del gluten bajo tales efectos han merecido la atención de un gran número de estudios que intentan llegar a modelos que permitan mejorar el procesado en aplicaciones específicas, entre las cuales destacan los materiales biodegradables.

1.2.3.1. Efecto del calor sobre las propiedades físicas del gluten

El gluten y sus subfracciones, las gliadinas y gluteninas, presentan una transición vítrea, es decir, una transición del estado vítreo al gomoso que tiene lugar a una temperatura específica, la temperatura de transición vítrea (T_g). En la bibliografía se puede encontrar un amplio intervalo de valores de T_g para

gluten, gliadina y glutenina secos que va desde los 120 hasta los 180°C (Kokini y col., 1994; Micard y Guilbert, 2000; Toufeili y col., 2002). En sistemas con plastificantes, T_g disminuye al aumentar el contenido del mismo. Pueden existir tres estados en el gluten hidratado: el estado vítreo por debajo de T_g , el estado gomoso por encima de T_g y un intervalo dónde los polímeros entrelazados fluyen. A temperaturas superiores a T_g los polímeros del gluten adquieren la movilidad suficiente para reaccionar (Slade y col., 1989). Sin embargo, polímeros con un alto grado de entrecruzamiento pueden no fluir y permanecer en estado gomoso hasta que finalmente se degradan por efecto del calor.

En sistemas de gluten con contenidos de agua superiores al 20% y temperaturas por debajo de 40°C el tratamiento térmico afecta a la movilidad de las cadenas y a los puentes de hidrógeno pero no a la estructura química del gluten plastificado (Lefebvre y col., 2000). Al aumentar la temperatura se pueden inducir cambios químicos en las llamadas zonas de reacción. Para gluten hidratado a temperaturas mayores de 45°C, se ha observado un cambio en la hidrofobicidad (indicando desplegamiento de los polímeros del gluten), es decir, exposición de grupos hidrófobos y disminución de la solubilidad en presencia de agentes desnaturizantes. En la zona reactiva (de 50 a 130°C) se presentan reacciones de entrecruzamiento que producen disminución del carácter viscoso del gluten, aumentando la elasticidad del material (Guerreri y col., 1996; Kokini y col., 1994).

La reducción de la solubilidad en solventes que contienen agentes desnaturizantes, como el SDS o la urea, es tomada comúnmente como una medida del grado de agregación de la proteína (Domenek y col., 2003). La fracción de glutenina es más sensible a la pérdida de solubilidad durante el calentamiento que la de gliadina. A temperaturas superiores a los 55°C el peso molecular de las gluteninas aumenta y, por tanto, su solubilidad disminuye. A estas temperaturas elevadas, la pérdida de solubilidad de la proteína es función directa del aumento en la densidad de entrecruzamiento de la matriz (Booth y col., 1980; Lagrain y col., 2010). Las gliadinas también reaccionan con los polímeros de glutenina como agentes de entrecruzamiento y disminuyen drásticamente su movilidad. Junto a la incorporación de la gliadina, mediante

enlaces covalentes, también se ha sugerido que podría haber un entrelazamiento físico de la gliadina en la matriz de los polímeros de glutenina (Redl y col., 2003).

La cinética de agregación del gluten se puede describir por una simple ley de primer orden, donde la energía de activación para las reacciones de precipitación de las proteínas, completamente plastificadas a temperatura ambiente, es de 172 – 183kJ/mol (Domenek y col., 2002; Pence y col., 1953; Pommet y col., 2004). A temperaturas por encima de 130 -150°C, el polímero se degrada térmicamente como consecuencia de la ruptura molecular (Pommet y col., 2004).

La cizalla mecánica involucrada en el mezclado y extrusión del gluten con plastificantes también juega un papel importante en la polimerización de las proteínas del gluten. La cizalla o agitación incrementa la movilidad molecular de las proteínas y por consiguiente la exposición de enclaves activos, de este modo se incrementa la reactividad al entrecruzamiento y disminuye la dependencia con la temperatura en la agregación del gluten. A altas temperaturas, el esfuerzo de cizalla disminuye la energía de activación para el entrecruzamiento de las proteínas (Domenek y col., 2003; Redl y col., 2003). Se ha encontrado una dependencia de tipo Arrhenius para la pérdida de solubilidad con la temperatura en gluten mezclado con glicerol (30%) a 100 rpm, con una energía de activación de 33,7 kJ/mol, en lugar del valor de 100 kJ/mol encontrado para gluten sometido a calentamiento pero sin cizalla (Redl y col., 2003).

Las propiedades viscoelásticas y estructurales del gluten plastificado pueden cambiar de forma irreversible por una combinación de presión hidrostática y tratamiento térmico. La presión puede desplegar o desnaturalizar parcialmente las proteínas aún a temperatura ambiente. Aumentando la presión y el calentamiento se incrementa la resistencia del gluten, aunque eventualmente se puede llegar a una pérdida de cohesividad a 800 MPa y 60°C (Kieffer y col., 2007).

1.2.3.2. Efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades químicas del gluten

Las proteínas del gluten contienen una alta cantidad del aminoácido glutamina, el cual es responsable de gran parte de los enlaces por puentes de hidrógeno, dando lugar a uniones no-covalentes entre gliadinas y gluteninas en condiciones normales (Wrigley y col., 2006). Al calentar se rompen los puentes de hidrógeno e inicialmente se reduce el grado en que las gliadinas y gluteninas interactúan en el gluten. Los enlaces SS juegan un papel importante en la posterior polimerización y fijación térmica de la matriz de gluten durante el calentamiento (Guerrieri y col., 1996; Lagrain y col., 2010). Weegels y col. (1998), basándose en el aumento de enlaces SS encontrado con la temperatura, postulan que, a temperaturas por debajo de 100°C, la polimerización de la glutenina puede involucrar la oxidación de grupos SH. Sin embargo, también se han encontrado evidencias de reacciones de intercambio SH/SS (Weegels y Hamer, 1998; Lagrain, y col., 2005). El calentamiento hasta 90°C conduce a la formación de agregados de gliadina y glutenina por enlaces SS. A temperaturas mayores, la incorporación de la gliadina en la estructura de la glutenina ha sido descrita como un resultado del intercambio SH/SS (Lagrain y col., 2010; Singh y MacRitchie, 2004). Estas reacciones son catalizadas por grupos SH. Así, estos grupos SH libres llevan a cabo un ataque nucleofílico sobre un átomo de azufre del puente SS (Lagrain y col., 2010).

Lagrain y col. (2008) proponen un modelo para el entrecruzamiento de gliadinas y gluteninas a través de reacciones de intercambio SH/SS durante el tratamiento térmico en presencia de agua. En una primera etapa el calentamiento hasta una temperatura crítica T_c produciría cambios conformacionales exponiendo grupos SH libres que antes no estaban disponibles y la polimerización de la glutenina por oxidación de grupos SH. Continuando con el calentamiento hasta temperaturas superiores a T_c , la gliadina se uniría a la glutenina a través de reacciones de intercambio SH/SS y los grupos SH libres generados podrían continuar reaccionando con más gliadinas o gluteninas (Figura 1.2.2).

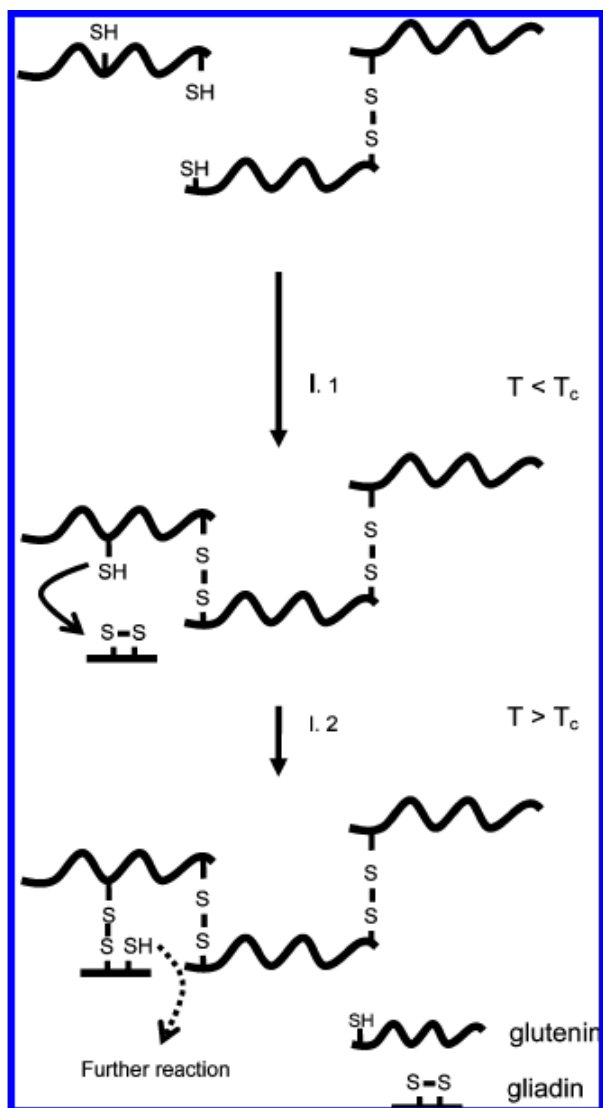


Figura 1.2.2. Modelo de Lagrain y col. (2008) para el entrecruzamiento de proteínas por reacciones de intercambio SH/SS durante el tratamiento térmico de gluten hidratado.

Durante el mezclado y la extrusión se ha sugerido que las reacciones de intercambio SS son precedidas por radicales tiol formados de la ruptura por cizalla de los enlaces disulfuro del gluten. Los radicales tiol (en lugar de los grupos SH libres) realizarían el intercambio rápidamente y conducirían a la formación de enlaces SS intermoleculares adicionales entre las proteínas del gluten (Lagrain y col., 2010).

Cuando el gluten es sometido a tratamiento térmico prolongado, calentando a 110°C durante 18 horas, se ha comprobado la existencia de entrecruzamientos permanentes causados por reacciones diferentes a la formación de enlaces SS

adicionales, indicando que puede haber entrecruzamiento entre otros aminoácidos (Guerrieri y col., 1996). Tilley y col.(2001) encontraron un aumento en los niveles de enlaces de ditirosina después del horneado del pan. A valores de pH y temperatura altos (mayores de 8 y 70°C, repectivamente) se forma lisinoalanina (LAL). Normalmente, la formación de LAL tiene lugar a un pH muy alto (13) a través de reacciones entre residuos de dehidroalanina y lisina de las proteínas del gluten (Fujimaki y col., 1980). El calentamiento de las proteínas deshidratadas a pH neutro puede producir enlaces isopeptídicos entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y los grupos β - o γ -carboxamida de los residuos de asparagina y glutamina (Belitz y Grosch, 1999). Sin embargo, la existencia e importancia de la formación de enlaces isopeptídicos en el tratamiento térmico del gluten todavía no han sido esclarecidas.

Los agentes redox modifican la estructura y funcionalidad de las proteínas de gluten y pueden modificar su capacidad de asociación durante el calentamiento (Lagrain y col., 2010). Los agentes reductores (que contienen el grupo SH) causan pérdida de estructura en el gluten antes del calentamiento, sin embargo, durante este se promueve la formación de una matriz. Tal efecto se puede explicar por un incremento en el nivel de grupos SH libres que inicialmente aumenta la flexibilidad de cadenas de gluten disociadas pero que más tarde produce reacciones de entrecruzamiento a altas temperaturas. En todo caso, los grupos SH libres son intermediarios obligados en el intercambio con grupos SS (Lagrain y col., 2006). Los agentes oxidantes producen en la proteína una estructura más termoestable como resultado de la formación de enlaces SS (Hayta y Schofield, 2004). Al retirar antes del tratamiento térmico los grupos SH libres, por adición de un oxidante o bloqueándolos con otro agente, se reduce de manera drástica la insolubilidad que pueden llegar a tener las proteínas del gluten como consecuencia del calentamiento; mientras que, como se mencionó antes, incrementando los niveles de los grupos SH libres por adición de agentes reductores se tiene el efecto contrario (Lagrain y col., 2006, 2008).

El enfriamiento de gluten, después del calentamiento, favorece la formación de interacciones de baja energía como los puentes de hidrógeno (Lefebvre y col., 2000; Lagrain y col, 2010).

1.3. BIOPLÁSTICOS

1.3.1. Definición

Según la Asociación Europea de Bioplásticos hay dos conceptos importantes que se deben tener en cuenta en la definición del término:

- Plásticos compostables con la certificación EN13432 y basados en materias primas renovables y no renovables: El enfoque está en su “compostabilidad”. Esta propiedad tiene que ser probada por ensayos normalizados. Así, en Europa las normas EN 13432 o EN 14995, en Estados Unidos la ASTM D-6400 y en otros países la ISO 17088 sientan las bases legales para los estándares de compostabilidad de plásticos. Una gran cantidad de plásticos certificados como compostables contienen una alta proporción de materias primas renovables, no obstante también hay polímeros sintéticos que se catalogan como compostables de acuerdo con las normas y certificaciones mencionadas anteriormente (www.european-bioplastics.org).
- Plásticos obtenidos a partir de fuentes renovables: Se centra en la materia prima de la que proviene el producto. Para la manufactura de estos materiales se usan compuestos de carbono de fuentes renovables como azúcares, almidones, aceites vegetales o celulosa. La proporción de carbono renovable usada en el producto puede determinarse usando métodos analíticos como el descrito por la norma ASTM D-6866. Los materiales plásticos basados en fuentes renovables no son en todos los casos biodegradables o compostables (www.european-bioplastics.org).

1.3.2. Materiales usados en la elaboración de bioplásticos obtenidos de biopolímeros

Un material bioplástico típicamente está formulado por una matriz polimérica biodegradable, que en este caso procederá de fuentes renovables, y por un plastificante. A continuación se establecen las características de cada uno de estos:

1.3.2.1. Materias primas de fuentes renovables

Los materiales usados para la producción de bioplásticos provenientes de biopolímeros se dividen en cuatro categorías: hidrocoloides, lípidos, resinas y sistemas compuestos. Los hidrocoloides incluyen proteínas tales como la gelatina, keratina, colágeno, caseína, proteínas de soja, de suero de leche, de maíz, miofibrilares y gluten de trigo; y polisacáridos como almidón, derivados de celulosa y gomas vegetales. Dentro de los lípidos están las ceras y los ácidos grasos. En las resinas se cuentan las lacas y gomas de madera. Los materiales compuestos generalmente contienen lípidos e hidrocoloides en forma de doble capa o en emulsión (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008).

1.3.2.2. Plastificantes

Los plastificantes se adicionan para facilitar el procesado y para modificar las propiedades de la estructura final de los bioplásticos. Se suelen utilizar como plastificantes sustancias de bajo peso molecular y baja volatilidad (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008). Generalmente los plastificantes actúan situándose entre cadenas de biopolímeros, asociándose de forma fisicoquímica con el polímero, reduciendo la cohesión dentro de la matriz y de este modo extendiendo y liberando la estructura (Gennadios, 2002). El agua es el plastificante más efectivo para biopolímeros ya que reduce considerablemente la temperatura de transición vítrea del material, facilitando la deformación y el procesado. Sin la adición de agua, la región de temperatura de degradación térmica sería fácilmente alcanzada antes de que los bioplásticos se formaran (Tolstoguzov, 1993). Sin embargo, un exceso de agua, en procesos como la extrusión, puede producir un descenso en la viscosidad de la mezcla

conllevando una disminución del par de torsión del motor y de la energía mecánica suministrada cuyo resultado son bajas temperaturas en el producto que reducen el grado de transformación y las interacciones.

Además del agua también se utilizan como plastificantes monosacáridos (glucosa), oligosacáridos (sacarosa), polioles (glicerol, sorbitol), lípidos (ácidos oleico, palmítico, esteárico y linoleico) y derivados de estos (Sothornvit y Krochta, 2005; Gennadios, 2002).

Estudios de varias sustancias (con diferente grado de hidrofobicidad, clase y cantidad de grupos funcionales) empleadas como plastificantes en gluten de trigo, revelan como criterios para elegir un buen plastificante los siguientes: un bajo punto fusión, baja volatilidad, compatibilidad con la proteína, permanencia en los films y que la cantidad requerida de este en la preparación del bioplástico sea reducida (Pommet y col., 2005; di Gioia y Guilbert, 1999; Sothornvit y Krochta, 2005).

En general, el glicerol es un plastificante ampliamente utilizado en el procesado termoplástico de proteínas (Redl y col., 1999; Cunningham y col., 2000; Zhang y col., 2001; Pommet y col., 2003, 2005; Sothornvit y col., 2003, 2007; Hernandez-Izquierdo, 2007). Su efecto plastificante se atribuye a la facilidad del glicerol de insertarse y posicionarse dentro de la estructura tridimensional de los biopolímeros (di Gioia y Guilbert, 1999).

1.3.3. Métodos empleados en la preparación de bioplásticos a partir de proteínas

El procesado de films, recubrimientos o cualquier otro tipo de bioplásticos obtenidos a partir de proteínas requiere tres pasos fundamentales: ruptura de enlaces intermoleculares que estabilizan las proteínas para darles movilidad; reordenamiento y orientación de las cadenas móviles del polímero en la forma deseada; y, por último, formación de nuevos enlaces intermoleculares e interacciones que permitan la estabilización de la matriz tridimensional originada. De acuerdo a las etapas mencionadas se pueden procesar bioplásticos a partir de proteínas empleando tres métodos:

1.3.3.1. Método Físico-químico

Consiste en la utilización de agentes químicos para la ruptura de puentes de azufre, dispersión y solubilización de la proteína. Posteriormente, el sistema se somete a secado buscando la forma deseada en el bioplástico. Se suelen usar disoluciones de agua y disolventes orgánicos como etanol, acetona, metanol y alcohol isopropílico. El desarrollo de la estructura durante el secado involucra la formación de enlaces hidrofóbicos, iónicos y de puentes de hidrógeno. También se cree que los puentes de azufre intra e intermoleculares juegan un papel importante en la formación de películas de proteínas. El pH de las soluciones formadoras de la película se ajusta usualmente lejos del punto isoeléctrico para evitar la precipitación de la proteína. Factores como la temperatura, tiempo y humedad relativa en el secado afectan la estructura de los bioplásticos formados (Gennadios, 2002).

1.3.3.2. Método termoplástico

Se basa en el mezclado de proteína y plastificante para obtener una masa. Esta operación se puede llevar a cabo tanto en dispositivos discontinuos de tipo amasadora, o continuos, mediante el uso de extrusoras. Actualmente la técnica más importante de procesamiento de polímeros es la extrusión, consiste en alimentar continuamente material dentro de la extrusora que lo transporta por medio del movimiento de un husillo y expulsa el producto a través de una boquilla que da la forma al producto. Se pueden distinguir tres zonas principales en una extrusora (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008):

- Zona de alimentación donde se introduce el material.
- Zona de amasado con aumento de presión, temperatura y grado de llenado.
- Zona de calentamiento que da las propiedades al plástico. Es dónde se alcanzan los valores más altos de temperatura, velocidad de cizalla y presión.

La extrusión de bioplásticos es un proceso atractivo para la producción de estos a gran escala, que presenta varias ventajas sobre el método físico-químico. Así, puede citarse la extrusión de bioplásticos obtenidos a partir de colágeno, soja, caseína y gluten (Gennadios 2002; Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008).

1.3.3.3. Método termomecánico

Adicionalmente, tras un procesado termoplástico, las propiedades del material pueden ser modificadas mediante la combinación de presión y temperatura dando lugar al moldeo de la masa. El moldeo puede realizarse utilizando equipos propios del procesado de plásticos en termoformado, inyección, moldeo por compresión y extrusión (Jerez y col.,2007). El calentamiento de proteínas plastificadas por encima del punto de transición vítrea origina un material suave y gomoso que se puede moldear fácilmente. También puede ocurrir una polimerización, dependiendo de las condiciones de procesado y naturaleza del plastificante, que está relacionada con la desnaturalización de la proteína.

En el moldeo por compresión se combinan temperaturas y presiones altas, tiempos cortos y bajo contenido de humedad para la transformación de la mezcla proteína/plastificante en una masa viscoelástica que al enfriarse, mediante interacciones covalentes, iónicas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, da como resultado el bioplástico (Pol y col., 2002; Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008). Una vez que alcanzan la temperatura ambiente los productos gomosos se convierten en materiales rígidos con la forma deseada. (Pommet y col., 2003).

1.3.4. Propiedades de los bioplásticos

Generalmente, la caracterización de un material plástico típicamente se lleva a cabo a través de la evaluación de propiedades mecánicas, ópticas, de barrera, etc.:

1.3.4.1. Propiedades mecánicas

El esfuerzo y el porcentaje de elongación a la ruptura son las propiedades más comúnmente medidas (Gennadios, 2002). Las curvas de esfuerzo/deformación que resultan de los ensayos de tracción proporcionan información sobre la flexibilidad, resistencia y capacidad de elongación del material, y son útiles para la predicción del comportamiento durante la manipulación, almacenamiento y uso de los bioplásticos (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008). Los ensayos de tracción se realizan para determinar el esfuerzo a la ruptura (MPa), el porcentaje de elongación umbral (%), el porcentaje de elongación a la ruptura (%) y el módulo elástico (GPa) de materiales poliméricos para envase y embalaje. Estos valores son importantes para poder comparar los bioplásticos con los plásticos sintéticos comerciales, lo que se puede realizar siguiendo la norma ASTM D882-02. Los ensayos para propiedades al impacto se usan para determinar la energía requerida para causar un impacto sobre el material bajo condiciones controladas, y se llevan a cabo mediante la norma ASTM D1709-03. Los ensayos de compresión se realizan usualmente en muestras termoconformadas siguiendo la norma ASTM D642, el esfuerzo a la compresión será función del tipo de material y su aplicación (Siracusa y col., 2008).

1.3.4.2. Propiedades de barrera

Los requisitos específicos de permeabilidad del sistema de envasado dependen de las características del producto y del uso final previsto. Generalmente los plásticos son relativamente impermeables a moléculas pequeñas como las de gases, vapor de agua, vapores orgánicos y algunos líquidos, presentando un amplio espectro de características de transferencia de materia que permite catalogarlos de acuerdo a su capacidad como barrera. En aplicaciones para envases, el vapor de agua y el oxígeno son las principales moléculas estudiadas debido a que se pueden transferir desde el medio interno o externo a través de la pared del polímero afectando a la calidad del producto y a su vida útil. También ha aumentado el interés en el estudio del dióxido de

carbono debido a su utilización en la tecnología de envasado bajo atmósfera modificada.

La capacidad como barrera ante el oxígeno se cuantifica mediante el coeficiente de permeabilidad al oxígeno (OPC) que indica la cantidad de oxígeno que pasa por unidad de área y tiempo en un material de envasado. Un valor bajo en el OPC indica que la presión del oxígeno dentro del recipiente es baja lo que retarda la oxidación y favorece la conservación del producto. De igual manera se define el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua (WVPC) y al dióxido de carbono (CO₂PC) (Siracusa y col., 2008).

1.3.4.3. Propiedades Microestructurales y ópticas

En el caso de bioplásticos dependen de la formulación y condiciones de procesado y están íntimamente relacionadas con las propiedades mecánicas y de barrera que determinan la aplicación de los sistemas obtenidos. Para examinar la microestructura de bioplásticos obtenidos de proteínas se han empleado técnicas como la microscopía de fuerza atómica (AFM), la microscopía de barrido electrónico (SEM), la microscopía de emisión de campo y la óptica (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008).

Algunos bioplásticos tienen propiedades ópticas excelentes y son fácilmente moldeables, lo que los convierte en una buena opción para reemplazar materiales transparentes no biodegradables. Dentro de las propiedades ópticas de mayor interés se encuentran el índice de refracción, la transparencia, transmitancia, brillo, color y comportamiento en el espectro infrarrojo (Osswald y Menges, 2003).

1.3.4.4. Propiedades térmicas

Para poder predecir el funcionamiento de un bioplástico bajo diferentes condiciones de uso, desde la congelación hasta la cocción, es imprescindible estudiar la transición térmica de tales materiales. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis térmico dinámico (DMTA) han sido las técnicas más usadas para la determinación de las temperaturas de transición vítrea de varios

bioplásticos obtenidos a partir de proteínas (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008).

1.3.5. Situación actual y desarrollo del mercado de bioplásticos

Estudios realizados por el Grupo de Ciencia, Tecnología y Sociedad de la Universidad de Utrecht para la asociación Europea de Bioplásticos, estiman que la producción global de los bioplásticos obtenidos de fuentes renovables fue de 0,36 toneladas métricas durante el año 2007, que corresponde a un 0,3% del mercado total de plásticos, dominado por los de origen petroquímico. Sin embargo, el mercado de estos bioplásticos ha tenido un rápido crecimiento, desde 2003 hasta finales del 2007, experimentando un crecimiento anual promedio del 38% a nivel mundial y del 48% en Europa (Shen y col., 2009).

El máximo potencial técnico estimado de sustitución de los polímeros de origen petroquímico por bioplásticos es de 270 toneladas métricas, es decir de un 90% del mercado mundial de plásticos para el año 2007. Este grado de sustitución no se logrará a corto ni a mediano plazo debido a barreras económicas (costos de producción y disponibilidad de capital), dificultades en el escalado del proceso, disponibilidad a corto plazo de las materias primas provenientes de fuentes renovables y a la necesidad de cambiar el sector de los plásticos en función de los nuevos bioplásticos. Sin embargo, según dicho estudio, desde el punto de vista tecnológico hay grandes oportunidades para el reemplazo de los plásticos originados de petróleo por aquellos que lo son de fuentes renovables. Según anuncios de ciertas compañías sobre el inicio o expansión de la producción, se estima que para el año 2013 se llegará a una producción de 2,33 t de bioplásticos y para el 2020 este valor llegará 3,45 t (Shen y col., 2009).

Los países europeos con mayor desarrollo de mercado para bioplásticos son Inglaterra, Italia, Holanda y Alemania, seguidos de Bélgica, Francia, Austria, Suiza y la región escandinava (Siracusa y col., 2008). Existen diferentes aspectos que favorecen el mercado de bioplásticos. Por un lado hay una limitada e incierta disponibilidad de combustibles fósiles, por otro lado están las tendencias medioambientales que buscan disminuir las emisiones y ahorrar las

fuentes de energía no renovables. Desde el punto de vista tecnológico la innovación y la investigación (desde la fase de diseño hasta la de elaboración del producto y disposición de residuos) ofrecen buenas oportunidades para el desarrollo del mercado de bioplásticos. Sin embargo, es necesario realizar un mayor esfuerzo en los próximos años para mejorar la eficiencia de ciertos bioplásticos, disminuir los costos de producción y minimizar el uso de los bosques y tierras para la obtención de las materias primas a fin de evitar la competencia con el sector de los alimentos y disminuir el impacto en el entorno (Shen y col., 2009).

1.3.6. Aplicaciones de los bioplásticos

Los primeros bioplásticos artificiales se inventaron alrededor de 1860, desde entonces, numerosos nuevos compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales renovables se han desarrollado. La caseína fue usada en pinturas y pegamentos y, posteriormente, en formulaciones con formaldehído, como plástico para productos tales como botones, navajas y abre cartas. La proteína de soja se sometió a reacción con formaldehído y condensación con fenol o urea para producir plásticos que se emplearon por la Compañía Ford en la fabricación de partes de automóvil como volantes, puertas de guanteras y tapicería (Stevens, 2002; Pallos y col., 2006; Shen y col., 2009).

Actualmente, el principal campo de aplicación de bioplásticos lo ocupa el uso de películas de envasado para productos alimentarios, cubiertas para embalaje, artículos en contacto con alimentos como cubiertos desechables, copas, vasos, platos, films de recubrimiento, tapas, tazas, bolsas (para transporte o disposición de residuos orgánicos) y en agricultura y horticultura en bolsas y artículos compostables (Siracusa y col., 2008).

El almidón nativo, modificado o en mezclas con polímeros sintéticos se emplea ampliamente en la fabricación de productos de envase. La relativamente alta permeabilidad al vapor de agua de los bioplásticos obtenidos de almidón los hace de gran utilidad en envases antiempañantes para alimentos calientes. También se utilizan en el sector de envases de restauración, en agricultura como materiales de macetas y para la encapsulación y liberación controlada de

agentes activos agroquímicos. Otras aplicaciones emergentes incluyen el uso de bioplásticos de mezclas de almidón con polímeros sintéticos en pañales, como relleno de neumáticos y en el mercado de los plásticos de larga duración para cajas de discos compactos, cubiertas de artículos electrónicos, juguetes, envases cosméticos, muebles y construcción (Shen y col., 2009).

Los polímeros de celulosa tienen muchas aplicaciones en el campo de las películas. Los envoltorios de celofán se usan en el envasado de alimentos horneados, queso, café, caramelos y especias debido a que mejoran la apariencia del producto. Las películas de acetato de celulosa se emplean en cubiertas fotográficas, como ventanas transparentes, para decoración y como aislantes eléctricos. Este tipo de polímeros también tienen aplicación en los procesos de extrusión y moldeo para la fabricación de artículos electrodomésticos, picaportes, juguetes y partes de automóviles (Shen y col., 2009).

Relacionado con los bioplásticos obtenidos de proteínas se puede destacar el empleo de revestimientos de colágeno o proteínas de gluten y soja como cobertura de salchichas y embutidos, la fabricación de microcápsulas y geles de gelatina para la liberación de medicamentos, suplementos dietéticos y preparaciones herbales. También se han usado las películas de bioplásticos de distintas proteínas para recubrimiento, liberación de agentes antimicrobianos y fabricación de productos de envasado de alimentos (bolsas, sobres, cajas, etc.) (Hernandez – Izquierdo y Krochta, 2008; Gennadios, 2002).

El mercado del ácido poliláctico (PLA) ha ganado importancia en los últimos años. Los ejemplos de mayor aplicación son láminas de extrusión para productos termoformados, películas orientadas biaxialmente, botellas moldeadas por soplado, productos moldeados por inyección y fibras. Los sectores de aplicación del PLA incluyen el envasado (copas, bandejas, tazas, botellas), los textiles (ropa y muebles), pañales y productos de higiene personal, productos electrónicos (teléfonos móviles), de uso en agricultura y en construcción (espumas para aislamiento) (Shen y col., 2009).

Actualmente, se comercializan los polihidroxialcanoatos PHAs para moldeo por inyección, extrusión y como cubierta de papel. Dentro de los usos específicos de los PHAs se encuentran envases (cajas, bolsas y espumas), empuñaduras de maquinas de afeitar y cepillos de dientes, bolígrafos, fibras de tapetes y seda dental. Debido a su buena biocompatibilidad con el tejido humano, los PHAs se han aplicado en el campo médico incluyendo ingeniería de tejidos, curación de heridas, ortopedia y liberación de medicamentos (Shen y col., 2009).

1.4. MODIFICACION DE PROPIEDADES DE BIOPLÁSTICOS

1.4.1. Tratamientos usados para modificar las propiedades de películas y recubrimientos de proteínas

Son varios los tratamientos físicos, químicos y enzimáticos que se han empleado para modificar las propiedades funcionales de películas y recubrimientos obtenidos de proteínas mediante el método químico o casting. La mayoría de estos tratamientos buscan promover el entrecruzamiento dentro de la estructura del bioplástico para mejorar las propiedades mecánicas y de barrera y así igualar a los materiales de envasado sintéticos, generando mayor interés en la industria y los consumidores. A continuación se describen algunos de estos tratamientos.

1.4.1.1. Tratamientos físicos

Se han descrito cambios importantes en las propiedades de películas de proteínas al ser tratados térmicamente dentro de un rango de temperaturas de 55 a 140°C para tiempos de exposición que van de pocos minutos hasta 24 horas. El tratamiento térmico de proteínas promueve el entrecruzamiento intramolecular e intermolecular, que involucra principalmente los residuos aminoácidos de lisina y cisteína. En general, las películas sometidas a tratamiento térmico aumentan la resistencia a la tracción y disminuyen el porcentaje de elongación a la ruptura, la solubilidad en agua y la permeabilidad al vapor de agua (Gennadios, 2002; Micard y col., 2000). También se han descrito tratamientos mediante radiaciones con rayos UV y gamma sobre las

películas o las soluciones formadoras de película de gluten causando, en algunos casos, cambios en las propiedades mecánicas y de barrera por perturbación de la estructura proteica (Micard y col., 2000; Lee y col., 2005).

1.4.1.2. Tratamientos enzimáticos

Para favorecer el entrecruzamiento en películas de proteínas se han empleado dos tipos de enzimas, las peroxidasa y las transglutaminasas. El tratamiento con peroxidasa en la preparación de películas de proteína de soja desnaturalizada y gluten redujo la resistencia a la tracción y la elongación (Stuchell and Krochta, 1994; Michon y col., 1999). Los efectos de la transglutaminasa sobre películas de varias proteínas también han sido estudiados. Esta enzima cataliza el entrecruzamiento a través de enlaces isopeptídicos ϵ -(γ -glutamil)lisina. En el caso de las masas de gluten, la transglutaminasa aumenta la proporción de polímeros de alto peso molecular y fortalece la matriz de la proteína (Larré y col., 1998). La modificación de películas de gluten con transglutaminasa produjo una alta permeabilidad al vapor de agua y bajas propiedades mecánicas, atribuidas a la heterogeneidad de la matriz como consecuencia de la formación de poros por el entrecruzamiento (Lai y Chiang, 2006). Estudios sobre gluten deamidado tratado con transglutaminasa revelaron la formación de polímeros de alto peso molecular inducida por enlaces covalentes. Tales interacciones aumentaron la integridad, maleabilidad y capacidad para elongarse de las películas. La incorporación de diaminas aumentó la elongación manteniendo la resistencia a la tracción (Larré y col., 2000).

1.4.1.3. Películas compuestas

Estructuras compuestas por láminas de distintos materiales pueden permitir explotar en conjunto los beneficios de cada uno de los compuestos macromoleculares que las constituyen. Es el caso de proteínas de alto peso molecular, hidrófilas y dúctiles, cubiertas con compuestos de menor peso molecular e hidrofóbicos, como lípidos o algunos polisacáridos, que unidos en una misma estructura mejoran las propiedades mecánicas y de barrera de la película (Hernandez-Izquiero y Krochta, 2008). Una estrategia utilizada ha sido

la incorporación directa de lípidos en las disoluciones formadoras de película de proteína que, tras ser vertidas en moldes y secadas, permiten preparar películas bicompuestas o multicompuestas. La adición de aceite mineral a las soluciones formadoras de películas de gluten produjo un descenso en la permeabilidad al vapor de agua de las películas en un 25% como consecuencia del carácter hidrofóbico del aceite (Zhang y Mittal, 2010). Otra alternativa es depositar capas moldeadas de lípidos en películas preformadas de proteínas para preparar películas multicapas (Gennadios, 2002).

También se han empleado fibras naturales y partículas inorgánicas para modificar las propiedades mecánicas y la resistencia al agua de bioplásticos de proteínas (Song y col., 2008). Materiales basados en gluten y glicerol han sido reforzados con la incorporación de fibras naturales (quitina, celulosa y lignina) o partículas de arcilla de tamaño nanométrico. El gluten cumple el papel de matriz, las fibras el de relleno y el glicerol es el plastificante en el proceso de termomoldeo de la mezcla para inducir entrelazamientos de la estructura. El material compuesto resultante posee mayor resistencia a la tracción, menor capacidad de elongación y menor sensibilidad al agua que los bioplásticos que no tienen fibras añadidas (Song y col., 2008; Kunanopparat y col., 2008). En otras investigaciones se agregó arcilla de Montmorillonita a soluciones formadoras de películas de gluten para dificultar la pérdida de componentes volátiles y la migración de plastificantes y de este modo mejorar las propiedades de barrera frente a líquidos y gases; el resultado fue una marcada disminución en la permeabilidad al vapor de agua (Olabarrieta y col., 2006).

1.4.1.4. Tratamientos químicos

La capacidad de los aldehídos, principalmente los bifuncionales, para promover el entrecruzamiento covalente intramolecular e intermolecular en proteínas ha sido ampliamente documentada (Feeney y col., 1975). Varios estudios se han enfocado en los efectos del formaldehído y glutaraldehído sobre películas de proteína, ya sea por incorporación de los aldehídos en las soluciones formadoras de película o sometiendo las películas a vapores de aldehído (Marquié, 2001; Orliac y col., 2002; Micard y col., 2000). En general, los

tratamientos con aldehídos incrementan la resistencia a la tracción y disminuyen la elongación y la solubilidad en agua (Gennadios y col., 2002). Además de los aldehídos, se han empleado otros agentes químicos para modificar las propiedades de las películas de proteína como la epíclorhidrina, dodecilsulfato sódico, ácido cítrico, etc. (Parris y Coffin, 1997; Rhim y col., 2002, Krochta y col., 1994). La adición de agentes reductores como el sulfito de sodio y la cisteína, con la capacidad de romper puentes de azufre intermoleculares e intramoleculares entre las cadenas de proteína, aumentó la resistencia a la tracción en bioplásticos obtenidos de gluten (Gennadios y col., 1993; Sun y col., 2008). El tratamiento con cationes de calcio promovió entrecruzamiento en la estructura de películas de gluten, aumentando la resistencia a la tracción y a la permeabilidad al vapor de agua (Gennadios y col., 1993).

1.4.2. Compuestos empleados para modificar las propiedades de bioplásticos basados en proteínas

El gran número de grupos reactivos presentes en los residuos que comprenden las cadenas de proteínas ha permitido llevar a cabo varios estudios para producir entrecruzamiento y así aumentar las propiedades mecánicas y disminuir la solubilidad de películas obtenidas por el método químico. A continuación se presentan algunos compuestos de interés para el presente trabajo por su potencial como posibles agentes de entrecruzamiento en bioplásticos obtenidos a partir de gluten por el método termomecánico.

1.4.2.1. Aldehídos

El formaldehído y los α,ω - dialdehídos promueven el entrecruzamiento intermolecular e intramolecular en proteínas. Las moléculas de aldehídos son polimerizadas en su mayoría en forma de cadenas lineales de varias longitudes, así los enlaces formados entre las cadenas de proteína por entrecruzamiento con aldehído pueden ser relativamente largas. A pesar de formar una red rígida, tienden a incrementar la distancia entre las cadenas de proteínas y de esta forma previenen la formación de otros enlaces que también estabilizan la red (por ejemplo puentes de azufre). Es por esto que el material

se vuelve frágil por la presencia de cantidades elevadas de aldehído (Pallos y col., 2006).

- a) Formaldehído: tiene una clara especificidad de reacción y es capaz de entrecruzar el grupo amino de la lisina así como también las cadenas laterales de cisteína, tirosina, histidina, triptofano y arginina, promoviendo la formación de enlaces covalentes intra e intermoleculares (Hernández y col, 2004). Durante el termomoldeo, el formaldehído introduce varios enlaces de entrecruzamiento a lo largo de las cadenas moleculares de proteína al consumir los grupos amino, lo cual se refleja en la reducción en la absorción de agua. (Sun y col.,2007) Las formulaciones que emplean formaldehído producen un aumento del módulo de Young a concentraciones por debajo del 2%. Por encima de esta concentración los plásticos se vuelven muy frágiles y quebradizos. (Pallos y col., 2006).
- b) Glutaraldehído: puede reaccionar específicamente con lisina, cisteína, histidina y tirosina (Hernández y col, 2004) y tiene la misma acción en el termomoldeo que el formaldehído. El glutaraldehído reacciona de forma relativamente rápida con un gran número de grupos amino presentes en la molécula, enlazando covalentemente las cadenas de proteína (Jayakrishnan y Jameela, 1996). Entre los agentes de entrecruzamiento, el glutaraldehído es uno de los más usados debido a su gran eficiencia en la estabilización de materiales basados en proteínas, particularmente el colágeno. Las películas de proteína entrecruzadas con glutaraldehído se han empleado en envases de flores frescas y en cubiertas para agricultura (Pereda y col., 2010).
- c) Glioxal: ha sido usado en la industria de envasado de papel para reemplazar al formaldehído gracias a su menor volatilidad y precio. Se ha encontrado que en condiciones altamente alcalinas se favorece la formación de películas de gluten y glioxal, pero tales condiciones no son apropiadas para alimentos (Zhang y col., 2006). Hernández y col. (2004), aislaron la fracción de glutenina del gluten de trigo y sobre ella

se estudió el efecto de la adición de aldehídos sobre las propiedades del film resultante. El glioxal fue uno de los aldehídos incorporados, se obtuvo un incremento en la tensión en tracción, aunque menor que con la adición de formaldehído y glutaraldehído. La formación de films más resistentes sugiere la formación de nuevos enlaces covalentes entre las proteínas de la glutenina mediante reacción química entre el aldehído y el grupo reactivo del aminoácido de la cadena lateral (Hernández y col, 2004).

1.4.2.2. Hidrocoloides (Gomas)

Los hidrocoloides son moléculas de alto peso molecular que pueden ser usados para producir disoluciones, suspensiones altamente viscosas o geles con bajo contenido de sustancia seca. Muchas de las gomas habitualmente usadas son hidrofílicas y, por tanto, las películas que producen tienen limitaciones en términos de propiedades de barrera para la humedad. Sin embargo, suelen usarse en forma de gel, dado que pueden retrasar la pérdida de humedad durante periodos cortos de almacenamiento. En este caso, el gel actúa suministrando humedad más que como una barrera al vapor de agua (Kampf y Nussinovitch, 2000). En el campo alimentario, los hidrocoloides son utilizados para producir capas finas que recubren la superficie o que van dentro del alimento. Tales películas sirven como inhibidoras de la migración de humedad, gases, aroma y lípidos. También pueden incluir antioxidantes, conservantes u otros aditivos para preservar la integridad y calidad del alimento. Las gomas también son utilizadas en cubiertas de semillas, fibra de vidrio, lámparas fluorescentes, productos ópticos, de papel, textiles y latex (Nussinovitch, 2009).

A continuación se discuten algunas propiedades y aplicaciones de algunas gomas de interés para el presente estudio

- a) Goma de garrofín (LBG): se extrae de las semillas del árbol de algarrobo. Su estructura química se basa en un esqueleto de 1,4- β -D-manato el cual es solubilizado por residuos de cadenas laterales de 1,6-

α -D-galactosa (Figura 1.4.1). Se trata de un polímero no iónico usado como agente espesante de disoluciones en alimentos (Dakia y col., 2008). Controla la movilización de agua, afecta a la consistencia y ciclo de vida de sistemas acuosos de alimentos y permite la estabilización de emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite. La LBG puede interactuar con otras gomas, como la xantana, para formar geles y fortalecer la estructura tridimensional establecida (Wielinga, 2010).

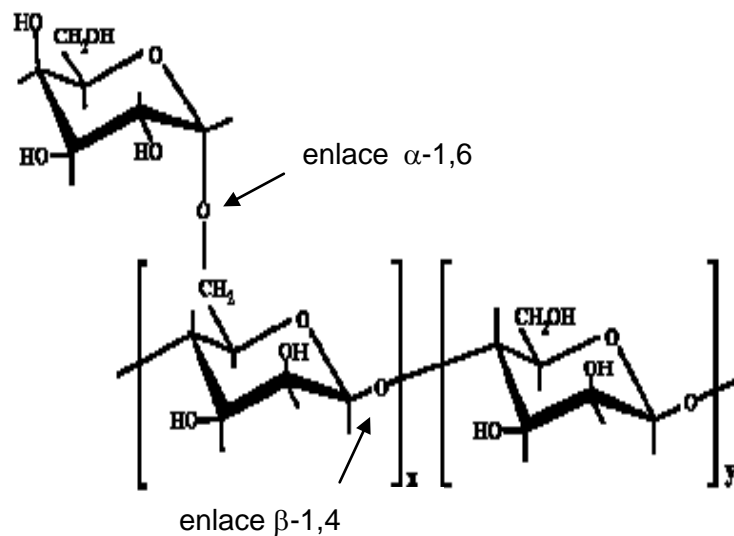


Figura 1.4.1. Estructura química de la goma de garrofín.

b) Goma xantana (XG): es un polisacárido extracelular secretado por la *Xanthomonas campestris*. La estructura química de la goma xantana se presenta en la Figura 1.4.2. Es un hidocoloide soluble en agua fría cuyas soluciones exhiben comportamiento pseudoplástico y cuya viscosidad es bastante estable en un amplio rango de pH y temperatura. Las soluciones de goma xantana pueden sufrir una transición conformacional durante el calentamiento asociada con el cambio de un estado ordenado rígido a baja temperatura a uno más flexible y desordenado a altas temperaturas. La alta viscosidad de las soluciones de goma xantana a bajas velocidades de cizalla le confieren la habilidad de proporcionar estabilidad a los sistemas coloidales, mientras que la reducción en la viscosidad en respuesta a las altas velocidades de cizalla la convierten en una ayuda durante el procesado. La goma

xantana es un polímero aniónico, los cambios de densidad de carga producidos por cambios de pH afectan a la asociación molecular entre las moléculas de XG y por tanto a su viscosidad (Sworn, 2009; 2010).

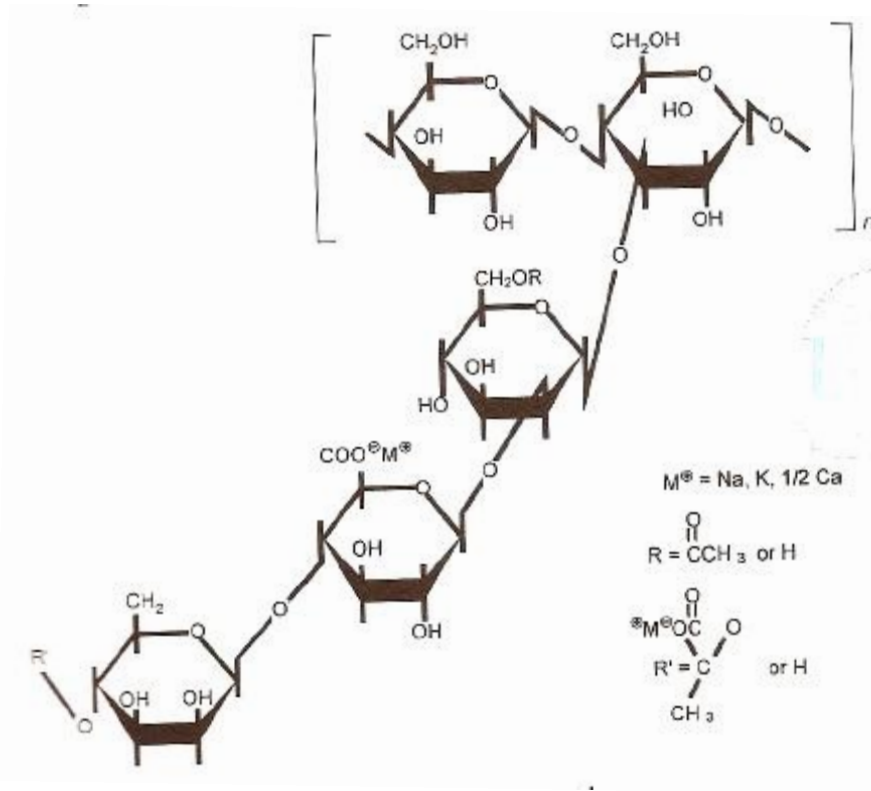


Figura 1.4.2. Estructura química de la goma xantana.

c) Carboximetilcelulosa (CMC) y metilcelulosa (MC): Son hidrocoloides derivados de la celulosa. La celulosa está compuesta de unidades repetitivas de β -glucopiranosas. Cada unidad está constituida de dos unidades de anhidroglucosa. El número de unidades de glucosa, unidas por enlaces β 1-4-o-glucosídico, es conocido como el grado de polimerización de la celulosa (DP). Cada unidad de anhidroglucosa contiene tres grupos hidroxil, que es donde tiene lugar la sustitución para formar los derivados de la celulosa. El número de grupos sustituidos se conoce como grado de sustitución (DS). La pulpa de celulosa se dispersa en disoluciones alcalinas para formar celulosa alcalina y luego es tratada, bajo condiciones controladas, con clorometano y ácido monocloroacético para producir MC y CMC, respectivamente (Murray, 2009; Cash y Caputo, 2010). En la Figura

1.4.3 se presentan las estructuras químicas de la celulosa y de una unidad idealizada de CMC con un grado de sustitución de 1,0.

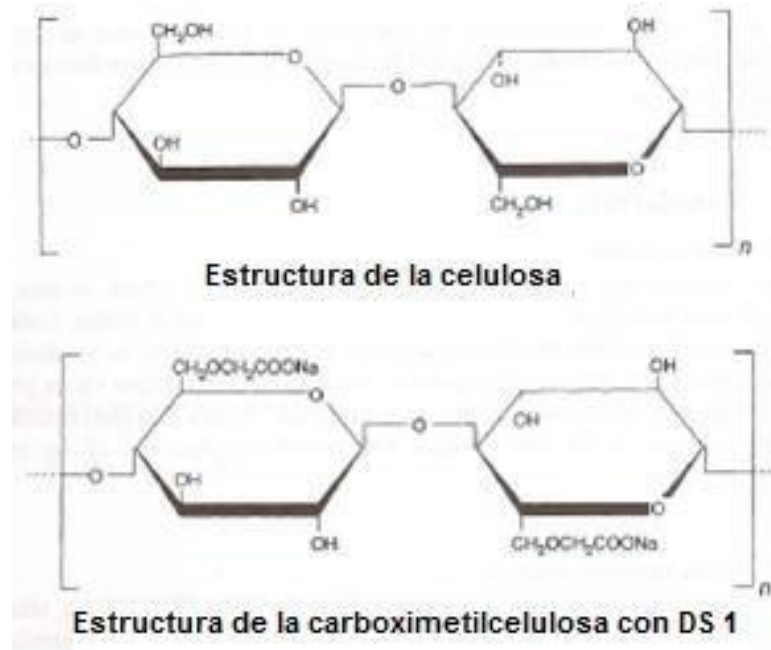


Figura 1.4.3. Estructura química de las unidades de celulosa y carboximetilcelulosa.

La carboximetilcelulosa es un derivado aniónico de la celulosa, soluble en agua. La viscosidad y comportamiento reológico de las dispersiones de CMC dependen tanto del DP como del DS. Una sustitución más baja o menos uniforme de los grupos de CMC conduce a un comportamiento asociativo (a través de puentes de hidrógeno) a lo largo de las regiones no sustituidas de la celulosa, produciendo una menor solubilidad y aumentando la viscosidad y la capacidad de retención de agua (Cash y Caputo, 2010). Debido a su naturaleza aniónica, la CMC interactúa con las cargas positivas de algunas proteínas, como las de la soja y caseína, en las cercanías del punto isoeléctrico, formando complejos estables (Murray, 2009). En el campo de los recubrimientos, se encuentran aplicaciones de CMC en películas compuestas con ésteres de ácidos grasos para recubrimiento de frutas. Tales películas pueden en algunos casos retardar la maduración, prolongar el tiempo de vida, prevenir el intercambio externo de algunos componentes o aumentar la resistencia a ataques de hongos en frutas y verduras (Nussinovitch, 2009).

La metilcelulosa es un eter de celulosa, no iónico, soluble en agua fría, con un amplio rango de viscosidades que depende del DS y DP. Presenta gelificación térmica con posible floculación del polímero a altas temperaturas y reversibilidad del gel con el enfriamiento, lo que le confiere un gran interés en el campo alimentario (Cash y Caputo, 2010). La MC es buena formadora de películas y exhibe actividad superficial. La principal aplicación de este hidrocoloide es de unión y retención de forma, formación de película y propiedades de barrera y para evitar la pérdida de estructura a alta temperatura. Algunos alimentos tienen bajas propiedades de cohesión y tendencia a desintegrarse con el calentamiento, la adición de MC ayuda a conservar la estructura como resultado de la gelificación durante el calentamiento (Murray, 2009). La MC ha sido usada como materia prima para la producción de películas con resistencia moderada, flexibilidad y transparencia. Otras propiedades esperadas incluyen la capacidad para servir como barreras para la humedad y el oxígeno. Las películas de MC son buenas barreras para la migración de grasas y aceites. La MC ha sido usada para fabricar películas compuestas con lípidos sólidos que se usan para reducir la pérdida de agua en productos alimenticios. Las películas de MC también reducen la absorción de grasa de alimentos preparados para freír. Además, las formulaciones con MC retardan el pardeamiento y aumentan el contenido de componentes volátiles que proporcionan aroma (Murray, 2009; Cash y Caputo, 2010).

1.5. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES EN POLÍMEROS

Los polímeros son materiales compuestos por moléculas de alto peso molecular, generalmente conocidas como macromoléculas. Las propiedades únicas de estos materiales y la versatilidad en sus métodos de procesado se atribuyen a su estructura molecular.

1.5.1. Clasificación de los polímeros según su estructura

Los polímeros pueden clasificarse como termoplásticos, termoestables o elastómeros. Los materiales termoestables y los elastómeros presentan

entrecruzamiento químico entre sus moléculas. En los termoplásticos y los elastómeros no vulcanizados no existe dicho entrecruzamiento químico, y por tanto, las moléculas se mueven relativamente libres con respecto a las que se encuentran en las cercanías.

A los termoplásticos corresponden aquellos polímeros que solidifican al enfriarse. En estos materiales las macromoléculas pierden movilidad con el enfriamiento. Sin embargo, al calentarse recuperan la capacidad para fluir, ya que las moléculas pueden deslizarse unas sobre otras con facilidad. A su vez, los polímeros termoplásticos se dividen en dos clases: amorfos y semi-cristalinos. En los amorfos, las moléculas continúan en desorden aún cuando son sometidos a enfriamiento, conduciendo a un material con una estructura bastante desordenada. Un polímero amorfo solidifica, o vitrifica, al ser enfriado por debajo de su temperatura de transición vítrea T_g . Por su parte, los termoplásticos semi-cristalinos solidifican con cierto grado de orden en su estructura. Así, al enfriarse por debajo de la que se conoce como temperatura de fusión, T_m , sus moléculas empiezan a tomar un orden regular. Las moléculas de polímeros semi-cristalinos que no se disponen en regiones ordenadas, permanecen como pequeñas zonas amorfas. Estas regiones amorfas dentro de los dominios semi-cristalinos pierden la capacidad de fluir por debajo de T_g . La mayoría de polímeros semi-cristalinos tienen T_g a temperaturas por debajo de cero, por consiguiente se comportan a temperatura ambiente como materiales gomosos.

Por otro lado, los polímeros termoestables solidifican por curado químico o térmico, en el cual las macromoléculas se entrecruzan químicamente entre sí durante el curado, dando como resultado una estructura en la que las moléculas no pueden desplazarse unas sobre otras. La formación de esta estructura provoca que el material pierda la capacidad de fluir, aún cuando se caliente de nuevo. El alto grado de entrecruzamiento hace que los materiales termoestables sean rígidos y quebradizos. Los termoestables exhiben una T_g que en algunos casos está cerca o por encima de la temperatura de degradación térmica.

Comparados con los termoestables, los elastómeros se caracterizan por estar solo ligeramente entrecruzados lo cual permite la casi completa extensión de las moléculas. Sin embargo, los enlaces entre moléculas dificultan que unas se deslicen sobre otras, haciendo la deformación reversible. Una característica común de los elastómeros es que la T_g suele estar muy por debajo de la temperatura ambiente. No obstante, su capacidad de fluir se puede perder tras un proceso extensivo de vulcanización. Puesto que los elastómeros entrecruzados a temperatura ambiente poseen una T_g muy baja, son sólidos elásticos bastante maleables y blandos (Osswald y Menges, 2003).

1.5.2. Comportamiento viscoelástico de los polímeros

Existen dos tipos de esfuerzos que pueden actuar sobre un material en equilibrio: esfuerzos normales y esfuerzos tangenciales, también llamados de cizalla. Un cuerpo está en equilibrio si lo están todos y cada uno de sus puntos y entonces las sumas de fuerzas y momentos actuando sobre él serán nulos. Considerando un cuerpo libre sobre el que se aplica una carga unidireccional se obtendrá una respuesta en el material que puede oscilar entre dos comportamientos extremos conocidos:

Viscoso: toda la fuerza aplicada sobre el material produce una deformación permanente. La energía suministrada se pierde en forma de calor.

Elástico: una vez que cesa la aplicación de la fuerza, desaparece la deformación inducida, recuperándose la forma a partir de la energía almacenada por el material (García-Martínez y col., 2004).

El comportamiento de los materiales reales se halla entre estos dos comportamientos ideales. A una temperatura y peso molecular específicos, un polímero puede comportarse como líquido (respuesta viscosa) o como sólido (respuesta elástica), dependiendo de la velocidad, o escala de tiempo, a la cual sus moléculas son deformadas. Este comportamiento, que varía entre el líquido y el sólido, generalmente se conoce como comportamiento viscoelástico o respuesta del material.

En este apartado se tendrá en cuenta el intervalo de viscoelasticidad lineal, válido para polímeros que son sometidos a bajas deformaciones. Bajo estas condiciones, los ensayos de relajación del esfuerzo, junto con el principio de superposición tiempo-temperatura y el principio de superposición de Boltzmann, se usan para explicar el comportamiento de los polímeros durante la deformación.

1.5.2.1. Ensayo de relajación del esfuerzo

En este ensayo un polímero es deformado en una cantidad fijada, ε_0 , y el esfuerzo requerido para mantener tal deformación es medido a lo largo del tiempo.

El módulo de relajación del esfuerzo se define por:

$$E_r(t) = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon_0} \quad (1.5.1)$$

dónde ε_0 es la deformación y $\sigma(t)$ es el esfuerzo medido. En estos ensayos resulta evidente que la relajación del esfuerzo es dependiente del tiempo y la temperatura, especialmente cerca de la T_g .

Es bien conocido que temperaturas altas conducen a tiempos de relajación molecular pequeños y temperaturas bajas a tiempos de relajación grandes. Esto se debe a que a temperaturas bajas el volumen libre entre las moléculas se reduce, restringiendo o retardando su movimiento. A temperaturas altas, el volumen es mayor y las moléculas pueden moverse con más facilidad. De ahí que cambiando la temperatura la forma de la curva obtenida del ensayo de relajación permanece constante y lo único que se produce es un desplazamiento horizontal hacia la izquierda o derecha, representando un tiempo de respuesta menor o mayor, respectivamente (Osswald y Menges, 2003).

1.5.2.2. Principio de superposición tiempo-temperatura

La equivalencia tiempo-temperatura observada en los ensayos de relajación del esfuerzo puede ser usada para reducir los datos de varias temperaturas a una curva maestra general para una temperatura de referencia, T_{ref} . Es así como las curvas de los ensayos a diferentes temperaturas se desplazan horizontalmente, manteniendo la curva de referencia estacionaria, hasta que las terminaciones de todas las curvas quedan superpuestas. La cantidad en la que cada curva fue desplazada se puede representar frente a la diferencia entre la temperatura de la curva y la de referencia. Tal cantidad se representa por la siguiente ecuación:

$$\log T - \log T_{ref} = \log \left(\frac{T}{T_{ref}} \right) = \log a_T \quad (1.5.2)$$

dónde a_T se conoce como el factor de superposición.

En general, el cambio horizontal, $\log a_T$, entre las respuestas de relajación a varias temperaturas con respecto a una de referencia, puede ser calculada con la ecuación de Williams-Landel-Ferry (WLF):

$$\log a_T = - \frac{C_1(T - T_{ref})}{C_2 + (T - T_{ref})} \quad (1.5.3)$$

dónde C_1 y C_2 son constantes que dependen del material. Asumiendo que $C_1=17.44$ y $C_2=51.6$, la ecuación de WLF se ajusta bastante bien a una gran variedad de polímeros, siempre que la temperatura de referencia elegida sea su T_g . Estos valores de C_1 y C_2 son frecuentemente usados como constantes universales.

Las curvas maestras de los ensayos de relajación tienen gran interés en la medida en que permiten seguir el comportamiento de los polímeros durante periodos de tiempo mucho más grandes que los que pueden ser determinados experimentalmente (Osswald y Menges, 2003).

Además del principio de superposición tiempo-temperatura, el principio de superposición de Boltzmann también es de gran importancia para la teoría de viscoelasticidad lineal.

1.5.2.3. El principio de superposición de Boltzmann

Establece que la deformación de un material es una consecuencia de la suma o superposición de todas las deformaciones que resultan de los diversos esfuerzos aplicados sobre el mismo a diferentes tiempos. Por consiguiente, se puede hallar la deformación de un polímero sobre el cual varias esfuerzos actúan en diferentes puntos a lo largo del tiempo, simplemente sumando todas las respuestas de deformación (Osswald y Menges, 2003). Matemáticamente este principio se puede escribir así:

$$\varepsilon = \sigma_0 J(t - t_0) + (\sigma_1 - \sigma_0) J(t - t_1) + \dots + (\sigma_i - \sigma_{i-1}) J(t - t_i) + \dots \quad (1.5.4)$$

dónde ε representa la deformación, σ el esfuerzo aplicado en un tiempo t y J la fluencia (ó módulo de fluencia) del material. Sin embargo, no todos los esfuerzos y deformaciones se producen a través de cambios finitos y, por tanto, la ecuación puede escribirse de forma integral:

$$\varepsilon(t) = \int_{\sigma(-\infty)}^{\sigma(t)} J(t - t') d\sigma(t') \quad (1.5.5)$$

la cual puede escribirse como

$$\varepsilon(t) = \int_{-\infty}^t J(t - t') \dot{\sigma}(t') dt' \quad (1.5.6)$$

dónde $\dot{\sigma}$ representa la velocidad de aplicación del esfuerzo que ocurre en un tiempo t' .

También puede invertirse y escribirse así:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G(t - t') \dot{\varepsilon}(t') dt' \quad (1.5.7)$$

dónde $G(t-t')$ se conoce como módulo de relajación y $\dot{\varepsilon}$ como velocidad de deformación.

1.5.2.4. Descripción del comportamiento viscoelástico lineal de los polímeros

Varias combinaciones de elementos elásticos y viscosos se han usado para aproximar el comportamiento de materiales poliméricos. La mayoría de estos modelos combinan amortiguadores y muelles, el más común es el modelo de Maxwell (Figura 1.5.1).

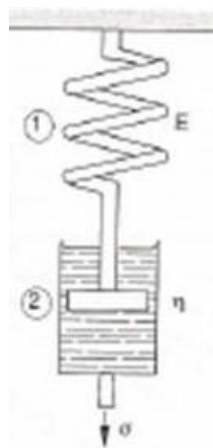


Figura 1.5.1. Sistema de muelle (1) y amortiguador (2) del modelo de Maxwell para la descripción del comportamiento viscoelástico lineal de materiales.

Para un sistema sencillo, la deformación total, ε , tiene una contribución elástica, ε_e , y una viscosa, ε_v , y puede representarse como sigue:

$$\varepsilon = \varepsilon_e + \varepsilon_v \quad (1.5.8)$$

De igual forma, las velocidades de deformación se pueden escribir como:

$$\dot{\varepsilon} = \dot{\varepsilon}_e + \dot{\varepsilon}_v \quad (1.5.9)$$

Suponiendo que el muelle sigue la ley de Hook, se mantiene la siguiente relación:

$$\dot{\varepsilon}_e = \frac{\dot{\sigma}}{E} \quad (1.5.10)$$

dónde E representa el módulo de elasticidad.

La componente viscosa, representada por el amortiguador, se representa como:

$$\dot{\varepsilon}_v = \frac{\sigma}{\eta} \quad (1.5.11)$$

dónde η representa la viscosidad

Combinando las ecuaciones 1.5.9 a 1.5.11, se tiene:

$$\dot{\varepsilon} = \frac{\dot{\sigma}}{E} + \frac{\sigma}{\eta} \quad (1.5.12)$$

Que puede expresarse como:

$$\sigma + \frac{\eta}{E} \frac{d\sigma}{dt} = \eta \frac{d\varepsilon}{dt} \quad (1.5.13)$$

La ecuación 1.5.13. usualmente se conoce como la ecuación diferencial del Modelo de Maxwell.

Aplicando al material una deformación constante, como en el ensayo de relajación, la ecuación diferencial se reduce a:

$$\sigma + \frac{\eta}{E} \dot{\sigma} = 0 \quad (1.5.14)$$

Integrando, se tiene:

$$\sigma = \sigma_0 e^{-t/\lambda} \quad (1.5.15)$$

dónde, λ , se conoce como tiempo de relajación.

Usando el principio de superposición de Boltzmann y la ecuación 1.5.15, se puede escribir la ecuación del modelo de Maxwell en forma integral:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t E e^{-(t-t')/\lambda} \dot{\epsilon} dt' \quad (1.5.16)$$

Para un análisis más realista el modelo de Maxwell no es suficiente. Así, para un mejor ajuste de los datos experimentales pueden usarse varios elementos de Maxwell (amortiguador-muelle) en paralelo. Tal configuración se conoce como el modelo de Maxwell generalizado.

Del modelo de Maxwell puede obtenerse ϵ_a , que es la deformación después de la relajación, definida por:

$$\epsilon_a = \frac{l_a - l_0}{l_0} = \frac{S_0}{1 - S_0} \quad (1.5.17)$$

Dónde l_a y l_0 representan la longitud de la muestra extendida y relajada, respectivamente, y S_0 representa la contracción total.

El modelo de Maxwell tal como se expresa en la ecuación 1.5.13, también puede emplearse para simular la respuesta dinámica de los polímeros. En un ensayo dinámico la deformación aplicada viene dada por:

$$\epsilon = \epsilon_0 \text{sen}(\omega t) \quad (1.5.18)$$

dónde ϵ_0 es la amplitud de la deformación y ω la frecuencia en rad/s. Derivando la ecuación anterior, combinándola con la ecuación 1.5.13 e integrando, se tiene:

$$\sigma = \left(\frac{E \epsilon_0 \omega \lambda}{1 + (\omega \lambda)^2} \right) (\omega \lambda \text{sen}(\omega t) + \cos(\omega t)) \quad (1.5.19)$$

para una respuesta en estado estacionario.

Dividiendo la ecuación 1.5.19 por la amplitud de la deformación aplicada se obtiene el módulo complejo, el cual está formado por un componente elástico, que está en fase con la deformación de entrada, y un componente viscoso. El componente elástico, generalmente llamado módulo de almacenamiento (E'), que se define mediante la siguiente ecuación:

$$E' = \left(\frac{E(\omega\lambda)^2}{1 + (\omega\lambda)^2} \right) \quad (1.5.20)$$

y el término viscoso, conocido como módulo de pérdida (E''), que se expresa mediante:

$$E'' = \left(\frac{E\omega\lambda}{1 + (\omega\lambda)^2} \right) \quad (1.5.21)$$

1.5.3. Comportamiento viscoso de polímeros fundidos

La viscosidad es el parámetro más ampliamente usado para determinar el comportamiento de un polímero durante el procesado.

Cuando se analiza el flujo o deformación de polímeros durante el procesado se debe conservar un balance de masa, energía y fuerzas. Haciendo un balance sobre el elemento diferencial de la Figura 1.5.2, para un líquido incompresible, se tiene:

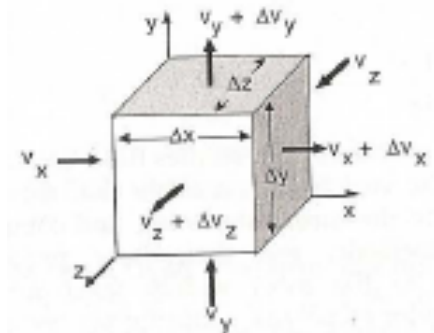


Figura 1.5.2. Elemento diferencial usado para el balance de materia en un líquido incompresible.

$$\nabla \cdot \underline{v} = 0 \quad (1.5.22)$$

dónde la ecuación 1.5.22 representa la divergencia del vector velocidad, que se puede expandir en coordenadas rectangulares así:

$$\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} + \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0 \quad (1.5.23)$$

Usando un elemento diferencial similar que se mueve con el fluido, como se muestra en la Figura 1.5.3, se tiene el siguiente balance de fuerzas:

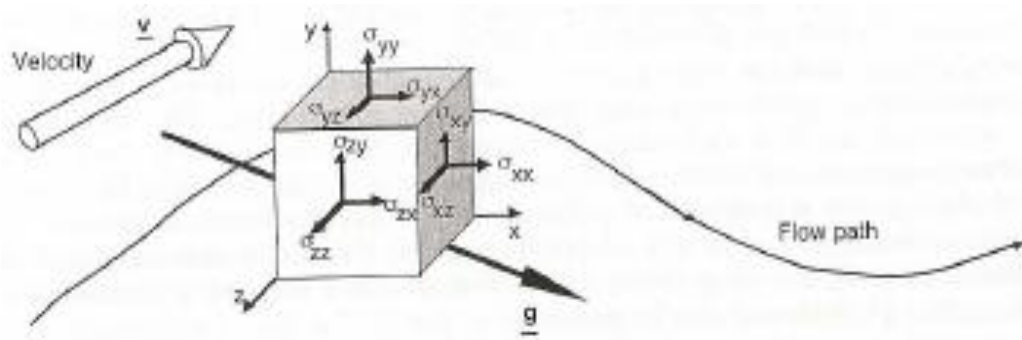


Figura 1.5.3. Elemento diferencial para el balance de fuerzas en un líquido incompresible.

$$\rho \frac{Dv}{Dt} = [\nabla \cdot \underline{\underline{\sigma}}] + \rho \underline{\underline{g}} \quad (1.5.24)$$

dónde el término del lado izquierdo representa la inercia del polímero fundido, el primer término de la derecha es la divergencia del tensor esfuerzo y representa las fuerzas viscosas y elásticas y el segundo término representa los efectos gravitacionales. El operador D/Dt es la derivada sustancial definida así:

$$\frac{D}{Dt} = \frac{\partial}{\partial t} + \underline{\underline{v}} \cdot \nabla \quad (1.5.25)$$

La cual, además de incluir una variación temporal, representa un marco convectivo o incrustado de referencia que se mueve con el material.

El esfuerzo, $\underline{\underline{\sigma}}$, a veces se puede referir como el esfuerzo total, que puede dividirse en dos términos, presión hidrostática, $\underline{\underline{\sigma}}_H$, y esfuerzo de cizalla, $\underline{\underline{\tau}}$. La presión hidrostática es un vector de esfuerzo que actúa sólo en la dirección normal a la superficie y puede ser representada como $-p\underline{\underline{\delta}}$, donde p es la presión y $\underline{\underline{\delta}}$ es un tensor unitario (Osswald y Menges, 2003). La ecuación del balance de momento se puede escribir:

$$\rho \frac{Dv}{Dt} = -\nabla p + [\nabla \cdot \underline{\underline{\tau}}] + \rho \underline{\underline{g}} \quad (1.5.26)$$

1.5.3.1. El fluido no Newtoniano:

La viscosidad de la mayoría de polímeros fundidos sufre el efecto pseudoplástico que consiste en la reducción de la viscosidad a altas velocidades de deformación. Este fenómeno ocurre debido a que a altas velocidades de deformación de las moléculas se estrechan lo que les permite deslizarse unas entre otras más fácilmente, de ahí que la viscosidad del polímero baje. Para tener en cuenta estos efectos no Newtonianos, es común usar una viscosidad que sea función de la velocidad de cizalla y de la temperatura para calcular el tensor esfuerzo en la ecuación 1.5.26:

$$\underline{\underline{\tau}} = \eta(\dot{\gamma}, T) \underline{\underline{\dot{\gamma}}} \quad (1.5.27)$$

dónde η es la viscosidad y $\underline{\underline{\dot{\gamma}}}$ la velocidad de deformación por cizalla o tensor de la velocidad de deformación definido por:

$$\underline{\underline{\dot{\gamma}}} = \nabla \underline{v} + \nabla \underline{v}^t \quad (1.5.28)$$

dónde $\nabla \underline{v}$ representa el tensor gradiente de velocidad. Este modelo describe el fluido no Newtoniano. En la ecuación 1.5.27, $\dot{\gamma}$ es la magnitud del tensor velocidad de deformación y puede escribirse como:

$$\dot{\gamma} = \sqrt{\frac{1}{2} II} \quad (1.5.29)$$

dónde II es la segunda invariante del tensor velocidad de deformación y se define como:

$$II = \sum_i \sum_j \dot{\gamma}_{ij} \dot{\gamma}_{ji} \quad (1.5.30)$$

Los componentes del tensor velocidad de deformación en la ecuación 1.5.30 se definen por:

$$\dot{\gamma}_{ij} = \frac{\partial v_i}{\partial x_j} + \frac{\partial v_j}{\partial x_i} \quad (1.5.31)$$

La dependencia con la temperatura de la viscosidad de los polímeros normalmente se factoriza como sigue:

$$\eta(T, \dot{\gamma}) = f(T)\eta(\dot{\gamma}) \quad (1.5.32)$$

dónde para unas pequeñas variaciones en la temperatura $f(T)$ puede aproximarse usando una función exponencial

$$f(T) = \exp(-a(T - T_0)) \quad (1.5.33)$$

dónde a representa una constante de la función exponencial y T_0 la temperatura de referencia.

Sin embargo, una variación en la temperatura corresponde con un cambio en la escala de tiempo, a través de una superposición tiempo - temperatura. Para polímeros semi-cristalinos se suele emplear la ecuación de Arrhenius:

$$a_T(T) = \frac{\eta_0(T)}{\eta_0(T_0)} = \exp\left(\frac{E_0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) \quad (1.5.34)$$

dónde E_0 es la energía de activación, T la temperatura y R la constante de los gases.

También se puede emplear la ecuación de Williams-Landel-Ferry (WLF) ecuación 1.5.3., descrita anteriormente.

Usando el factor de superposición, a_T , se pueden trasladar las curvas de viscosidad medidas a diferentes temperaturas para generar una curva maestra a una temperatura específica (Osswald y Menges, 2003).

1.5.3.2. Modelo de la ley potencial

Una de las tareas de la reología es encontrar modelos que se ajusten lo mejor posible a los datos para la viscosidad representada en la ecuación 1.5.27. Para el presente trabajo es de interés estudiar el modelo de la ley potencial.

Este es un modelo simple, propuesto por Ostwald y de Waale, y puede escribirse:

$$\eta = m(T)\dot{\gamma}^{n-1} \quad (1.5.35)$$

dónde m es el índice de consistencia y n el índice de la flujo.

El índice de consistencia puede incluir la dependencia de la viscosidad con la temperatura, como se representa en la ecuación 1.5.33, y el índice de flujo se relaciona con el comportamiento de flujo del polímero fundido. En los límites del modelo se tiene que cuando la viscosidad tiende a cero, la velocidad de deformación tiende a infinito y viceversa. La viscosidad infinita a velocidad de deformación de cero conduce a resultados erróneos, con problemas en las regiones dónde la velocidad de deformación es cero, como el caso del centro de un tubo (Osswald y Menges, 2003). Para evitar estos problemas el modelo se puede trincar así:

$$\begin{aligned} \eta &= m(T)\dot{\gamma}^{n-1} && \text{para} && \dot{\gamma} > \dot{\gamma}_0 \\ \eta &= m_0(T) && \text{para} && \dot{\gamma} \leq \dot{\gamma}_0 \end{aligned}$$

dónde m_0 representa la viscosidad a una velocidad de deformación de cero ($\dot{\gamma}_0$).

1.5.3.3. Viscosimetría capilar

El dispositivo más común para medir viscosidad de polímeros fundidos es el reómetro capilar. Su principal componente es un cilindro, en el que se calienta el material, con un orificio a través del cual fluye la muestra por acción de la presión ejercida por un pistón. El gradiente de velocidad o velocidad de deformación, y también la velocidad de cizalla, serán máximos en la pared y cero en el centro del tubo, siendo de tal modo un flujo no-homogéneo. A pesar de su simplicidad, los viscosímetros con capilares largos proporcionan los valores de viscosidad disponibles más aproximados. Otra de las ventajas, con respecto a otros reómetros, es que estos no tienen superficies libres en la zona

de medición. Cuando se mide una viscosidad dependiente de la velocidad de deformación en polímeros fundidos, el método sólo es satisfactorio a velocidades de cizalla menores a $10s^{-1}$. Esto es importante para procesos con altas velocidades de deformación, como el mezclado, extrusión e inyección. Gracias a la facilidad para acoplar reómetros capilares a la salida de las extrusoras, se convierten en herramientas importantes para las mediciones “en línea” de procesos a nivel industrial (Osswald y Menges, 2003).

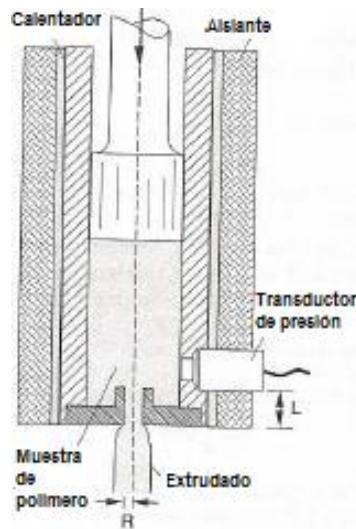


Figura 1.5.4. Esquema de un reómetro capilar.

En un reómetro capilar un tubo capilar de radio R y longitud L se conecta al fondo de un recipiente. La caída de presión y la velocidad de flujo a través del tubo son usadas para determinar la viscosidad. Para obtener la expresión de viscosidad, se deben hacer las siguientes suposiciones:

- No hay velocidad en las direcciones r y θ .
- El polímero es incompresible
- Flujo completamente desarrollado, estable, isotérmico y laminar.

El viscosímetro capilar se puede modelar usando la componente z de la ecuación de movimiento en términos del esfuerzo, τ , como:

$$0 = \frac{dp}{dz} + \frac{1}{r} \frac{d}{dr} (r \tau_{rz}) \quad (1.5.36)$$

dónde,

$$\frac{dp}{dz} = \frac{p_0 - p_L}{L} \quad (1.5.37)$$

Integrando para los términos de esfuerzo de cizalla se tiene:

$$\tau_{rz} = \frac{(p_0 - p_L)r}{2L} + \frac{C_1}{r} \quad (1.5.38)$$

$$\tau_{r=R} = \tau_w = \frac{R(p_0 - p_L)}{2L} = \frac{R \Delta p}{2L} \quad (1.5.39)$$

La ecuación 1.5.38 requiere que los capilares sean suficientemente largos para tener un flujo completamente desarrollado, dónde los efectos de salida son insignificantes. Sin embargo, debido a los efectos de salida, el perfil de presión a lo largo de la longitud del capilar exhibe una curvatura. Este efecto puede ser corregido por la ecuación de Bagley (1957) usando la corrección de salida, e, así:

$$\tau_w = \frac{1}{2} \frac{(p_0 - p_L)}{\left(\frac{L}{R} + e\right)} \quad (1.5.40)$$

El factor de corrección, e, a una velocidad específica de cizalla se puede hallar representando la caída de presión para varias relaciones L/D.

La ecuación para esfuerzo de cizalla puede entonces ser escrita así:

$$\tau_{rz} = \frac{r}{R} \tau_w \quad (1.5.41)$$

Para obtener la velocidad de cizalla en la pared, $\frac{dv_z}{dr}$, se puede usar la ecuación de Weissenberg-Rabinowitsch:

$$-\frac{dv_z}{dr} = \dot{\gamma}_w = \frac{1}{4} \dot{\gamma}_{aw} \left(3 + \frac{d(\ln Q)}{d(\ln \tau)} \right) \quad (1.5.42)$$

Dónde, $\dot{\gamma}_{aw}$ es la velocidad de cizalla Newtoniana en la pared y se escribe como:

$$\dot{\gamma}_{aw} = \frac{4Q}{\pi R^3} \quad (1.5.43)$$

La velocidad y el esfuerzo de cizalla en la pared son conocidos. Por lo tanto, usando los valores del caudal volumétrico, Q, y de la caída de presión, $p_0 - p_L$, la viscosidad puede ser calculada a partir de:

$$\eta = \frac{\tau_w}{\dot{\gamma}_w} \quad (1.5.44)$$

1.5.4. Comportamiento de polímeros frente a la tracción

A nivel industrial es de gran interés conocer la respuesta de un componente sometido a una carga, a corto y a largo plazo. Las propiedades para caracterizar la respuesta a corto plazo se obtienen mediante ensayos de tracción e impacto, mientras que las que corresponden a la respuesta a largo plazo, se encuentran usando los ensayos de relajación y dinámicos. En este apartado se examinará con detenimiento el ensayo de tracción.

Una de las formas más inmediatas de evaluar las características mecánicas de un material a bajas velocidades de deformación es someterlo a la acción de un esfuerzo unidireccional a velocidad controlada, generalmente en el modo de tracción. La principal ventaja de este tipo de ensayos es que permite seguir la evolución de la respuesta del material con el tiempo, ya que se realiza a bajas velocidades, en contraste con los ensayos instantáneos.

En los diagramas esfuerzo – deformación de este tipo de ensayos se observan algunas zonas características:

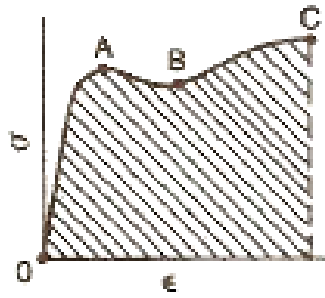


Figura 1.5.5. Diagrama esfuerzo – deformación característico de los ensayos de tracción en polímeros.

- Tramo OA: el esfuerzo sube bruscamente como consecuencia de la elevada resistencia inicial opuesta por el material. Es similar al de un comportamiento elástico y comprende el límite de elasticidad, esfuerzo hasta el cual el material es capaz de recuperarse si cesa la carga aplicada, sin mantener una deformación residual. En la mayoría de polímeros, debido a su carácter viscoelástico, este límite se ubica muy cerca del origen, determinándose el módulo de elasticidad en la primera zona de este tramo. También se encuentra en este tramo el límite de proporcionalidad, donde se cumple la ley de Hook, es decir, esfuerzos y deformaciones son proporcionales. Sin embargo al cesar la carga el material mantiene una deformación remanente.
- Límite de fluencia (punto A): Representa la carga específica a la cual comienza el estiramiento (flujo) del material, a partir de un nivel crítico de deformación.
- Tramo AB: región de fluencia del material, zona de alargamiento (deformación) a esfuerzo aproximadamente constante. Las macromoléculas se orientan en la dirección del esfuerzo, se caracteriza por la formación de un cuello de botella durante el estiramiento, mientras el esfuerzo permanece casi constante. A menores pesos moleculares y mayor amplitud en la distribución de estos, hay más posibilidad de ruptura del polímero en este tramo. A partir del comportamiento del material en esta zona, se puede tener una idea de su estructura. Así, materiales con una estructura rígida tendrán menos capacidad de

estiramiento y romperán en la etapa inicial de la aparición del cuello, por otro lado, materiales con una mayor capacidad de reorientación y ordenamiento molecular tridimensional tendrán mayor capacidad de deformación, mayor módulo y una elevada resistencia a la tracción en el punto de fluencia. La sección inicial dónde comenzó a fluir el material se reduce drásticamente y se propaga sucesivamente a toda la longitud de la probeta mientras tiene lugar la fluencia.

- Tramo BC: Al acabar el estiramiento se produce un aumento del esfuerzo hasta llegar a la rotura en el punto C, dónde se obtiene la resistencia a la tracción en el punto de rotura (García-Martínez y col., 2004).

Los principales parámetros obtenidos de las curvas esfuerzo-deformación de los ensayos de tracción están definidos por la norma ASTM 882. A continuación se describen aquellos de interés para el presente estudio:

- Esfuerzo máximo (σ_{max}): se calcula dividiendo la carga máxima antes de la ruptura por el área transversal original del espécimen, y se expresa en unidades de fuerza por unidad de área.
- Deformación máxima (ϵ_{max}): se calcula dividiendo la extensión en el momento de la ruptura por la longitud característica inicial de la probeta. Puede expresarse en términos de porcentaje.
- Módulo elástico o Módulo de Young: se obtiene trazando la tangente a la región lineal inicial de las curvas carga-elongación (porción inicial del tramo OA de la Figura 1.1.5) y calculando la pendiente de dicha línea tangente, es decir, seleccionado cualquier punto de la tangente y dividiendo el valor de esfuerzo por la deformación correspondiente.

1.5.5. Comportamiento térmico de polímeros

Dada la extrema sensibilidad de las fuerzas de cohesión molecular a los cambios de temperatura en polímeros, es de gran interés el estudio de los comportamientos mecánico y reológico de un material polimérico en función de

dicha variable. Se debe distinguir entre los ensayos mediante los cuales se estudia la influencia de la temperatura sobre una determinada propiedad y aquellos en los que se determina el valor de una propiedad térmica como tal. Al primer grupo corresponden los ensayos de temperaturas de reblandecimiento, flexibilidad, fragilidad, etc.; en el segundo se encuentran las medidas de calor específico, conductividad térmica, coeficientes de expansión térmica, entre otros.

Antes de continuar con las técnicas de medición de propiedades térmicas conviene retomar dos de ellas que resultan importantes para el presente estudio: Calor específico y temperatura de transición vítrea.

- Calor específico (C): representa la energía requerida para cambiar en un grado de temperatura una unidad de masa de material. Puede ser medido a presión constante (C_p) o volumen constante (C_v). Usualmente el calor específico no cambia de forma sensible en el rango de temperaturas de procesamiento y diseño de polímeros. Sin embargo, los termoplásticos semi-cristalinos presentan una discontinuidad en el calor específico en el punto de fusión de los cristales. Este salto en el calor específico incluye el calor requerido para la fusión de los cristales, típicamente llamado calor de fusión, que depende del grado de cristalinidad. La reacción química que tiene lugar durante la solidificación de termoestables también conlleva efectos térmicos considerables. En el estado de endurecimiento, sus datos térmicos son similares a los de los termoplásticos amorfos.
- Temperatura de transición vítrea (T_g): Si un polímero es mezclado con un plastificante, T_g puede bajar y puede predecirse por reglas de mezclas:

$$T_{gM} = \frac{\phi_p \alpha_{tp} T_{gp} - (1 - \phi_p) T_{gs}}{\alpha_{tp} \phi_p + (1 - \phi_p) \alpha_{ts}} \quad (1.5.45)$$

dónde α_{tp} y α_{ts} son los coeficientes de expansión térmica para el polímero y el plastificante, respectivamente; T_{gM} , T_{gp} y T_{gs} son las

temperaturas de transición vítreas de la mezcla, polímero y plastificante, respectivamente y, Φ_p , es la fracción en volumen de polímero en la mezcla. En este sentido, estabilizantes, plastificantes y agentes similares de uso en el procesado, actúan de forma similar.

Cuando se mezclan dos polímeros incompatibles, se obtienen dos T_g , las cuales son visibles cuando se miden los módulos elástico o viscoso de la mezcla de polímeros (Osswald y Menges, 2003).

El término Análisis Térmico (*TA*), se usa frecuentemente para describir técnicas experimentales analíticas que investigan el comportamiento de muestras en función de la temperatura. Esta definición es demasiado extensa y no responde al uso práctico del término. Las técnicas que normalmente se asocian a este término son: Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC), Análisis Térmico Diferencial (DTA), Termogravimetría (TGA), Análisis Termomecánico (TMA) y Análisis Dinámico Mecánico (DMA) (Jerez, 2007).

A continuación se describen las técnicas aplicadas en el presente estudio:

1.5.5.1. Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

Permite determinar las transiciones térmicas de polímeros en un rango de temperaturas de -180 hasta 600°C. En el dispositivo de DSC el polímero y un material inerte de referencia son depositados en cápsulas diferentes cerradas. Existe un termopar que medirá la diferencia de temperatura entre el recipiente que contiene la muestra y el de referencia, mientras que un horno va calentando todo el sistema según un programa de temperatura especificado (Haines, 2002).

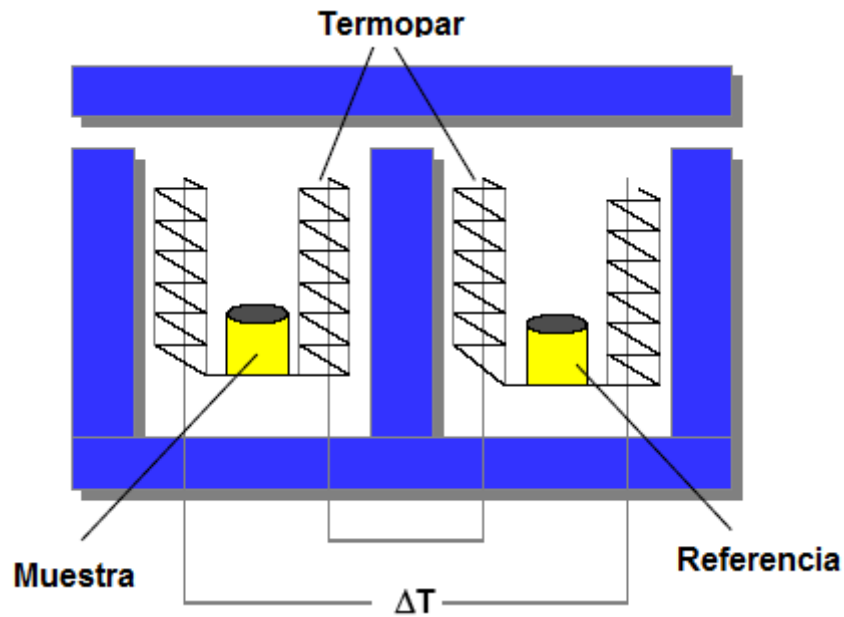


Figura 1.5.6. Esquema de las principales partes de un dispositivo de DSC.

En el caso de la calorimetría de barrido diferencial (DSC) existe una compensación de la potencia consumida por el equipo. Si se detecta una diferencia de temperatura entre los soportes de referencia y muestra, debido a un evento térmico (cambio de fase, cristalización, fusión, reacciones, etc) ocurrido en la muestra, se suministra energía hasta que la diferencia de temperaturas iguala a una tolerancia específica del equipo (normalmente 0,01 K). La energía suministrada por unidad de tiempo es registrada en función de la temperatura y el tiempo. Se puede considerar, simplificando las propiedades térmicas, que este suministro de energía es proporcional a la capacidad calorífica de la muestra (Hatakeyama y Hatakeyama; 2004).

En los diagramas obtenidos de DSC, el área comprendida entre la línea de tendencia y la línea base es una medida directa de la cantidad de calor, ΔH , necesaria para una transición. C_p , es una de las principales propiedades del material medidas por DSC. T_g es determinada como el punto de inflexión de la curva de calor específico. También se puede observar si hay degradación térmica del material, la cual suele ir acompañada por una reacción exotérmica. Otros eventos producidos mediante calentamiento, tales como entrecruzamientos o ruptura de cadenas, quedan también registrados en los diagramas de DSC (Osswald y Menges, 2003).

Una extensión de la técnica de DSC es la calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC). A diferencia de los analizadores térmicos convencionales, en MDSC se utiliza dos velocidades de calentamiento simultáneas, una velocidad de calentamiento lineal que brinda información similar al DSC estándar, y una velocidad de calentamiento modulada o sinusoidal que permite medir simultáneamente la capacidad calorífica de la muestra y diferenciar entre los eventos reversibles (dependientes de la capacidad calorífica) e irreversibles (dependientes del tiempo y la temperatura) que experimenta la muestra. Algunos ejemplos de eventos que son reversibles son las transiciones vítreas y la temperatura de fusión. Algunos ejemplos de eventos que son irreversibles son la cristalización, relajaciones entálpicas y las reacciones de curado o reticulación (Marcus y Blaine, 1994). MDSC permite la determinación de propiedades térmicas en un solo barrido, evitando una posible degradación térmica de la muestra, que puede presentarse empleando DSC convencional (Micard y col., 2001). Otra ventaja de utilizar MDSC es que pueden distinguirse, por su carácter reversible o irreversible, eventos térmicos que se solapan en una misma región (Marcus y Blaine, 1994).

1.5.5.2. Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

Este ensayo involucra la aplicación de una deformación oscilatoria a la muestra. El esfuerzo sinusoidal resultante es medido y correlacionado con la deformación impuesta, de este modo se miden simultáneamente las propiedades viscosas y elásticas de la muestra. Si el material se comporta como un sólido, el esfuerzo resultante es proporcional a la amplitud de la deformación y, por tanto, el esfuerzo y la deformación están en fase. Si la muestra se comporta como un fluido, el esfuerzo es proporcional a la velocidad de deformación, o derivada de la deformación. En este caso, la señal del esfuerzo tiene un desfase de 90° con la deformación.

Las respuestas viscosa y elástica pueden relacionarse con las propiedades a través de la relación esfuerzo-deformación o módulos. Los módulos obtenidos de este ensayo son:

- Módulo de almacenamiento (E'): representa la habilidad del material para almacenar energía elásticamente
- Módulo de pérdida (E''): medida de la habilidad para disipar energía
- Módulo complejo (E^*): resistencia promedio de un material a la deformación.

Tales módulos, al igual que la descripción del comportamiento viscoelástico de los polímeros, ya han sido definidos en el apartado 1.5.2.4. Sólo cabe definir otro parámetro de importancia en este ensayo: la tangente de pérdidas ($\tan \delta$).

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad (1.5.46)$$

La tangente de pérdida o tangente del ángulo de desfase entre el esfuerzo y la deformación, representa la relación entre las componente viscosa y elástica del material. Esta propiedad es un indicador de cómo el material pierde energía debido a reordenamientos moleculares y fricciones internas.

Para realizar los ensayos de DMA, se puede contar con dispositivos que controlan la deformación aplicada a la muestra. En este caso, el equipo mueve un vástago fijado a la muestra una distancia y hace uso de un dinamómetro y un transductor para medir el esfuerzo. Estas piezas están normalmente localizadas en partes distintas del equipo, y requiere grandes motores, de modo que la fuerza disponible en cada momento del ensayo sea siempre mayor a la requerida. La realización de este tipo de ensayos se suele llevar a cabo en el modo de flexión en tres puntos (*Bending Mode*), el cual consiste en aplicar una oscilación a la muestra, a una frecuencia prefijada, mientras se realiza un barrido de temperatura. Es así como se puede obtener la respuesta reológica del material en un amplio intervalo de temperatura (Jerez, 2007).

2. EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES EMPLEADOS

El objeto de estudio del presente trabajo es un sistema formado por proteína y plastificante. La proteína escogida es gluten de trigo y como plastificante se usa una mezcla de glicerol y agua. Para inducir modificaciones en las propiedades del sistema de partida se adicionan otros componentes en menor proporción, como es el caso de aldehídos y distintos tipos de gomas. A continuación se detallan las sustancias empleadas.

2.1.1. Gluten de trigo (WG)

Para el presente estudio se utiliza como materia prima Gluten de trigo, conocido comercialmente como “Glutenflor Supervital”, adquirido a Riba S.A. (España), las especificaciones de WG suministradas por el fabricante se presentan en la Tabla 2.1.1.

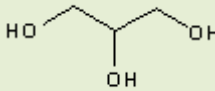
Tabla 2.1.1. Ficha técnica del gluten de trigo.

Nombre	Gluten de trigo		
Aspecto	Polvo fino de color marrón claro	Residuo a la calcinación	1 % aprox.
Pérdida a la desecación	8 % máx.	Retención de agua	160 % aprox.
Materias proteicas	83 mín.	Valor energético	1564 kJ (368 kCal)
Granulometría (Partículas sobre 200 µm)	1 % máx.	Gérmenes aerobios	50 000 / g máx.
Almidón	10 % aprox.	Recuento de levaduras	500 / g máx.
Lípidos extraíbles	3 % aprox.	Recuento de mohos	500 / g máx.
Materias celulósicas	0,5 aprox.	Escherichia coli	Ausencia en 1 g

2.1.2. Glicerol (GL)

Fue suministrado por Panreac (España) y presenta las características, facilitadas por el proveedor, que aparecen en la Tabla 2.1.2.

Tabla 2.1.2. Ficha técnica del glicerol.

Nombre	Glicerol
Fórmula	 $C_3H_8O_3$
Peso molecular	92,10
Riqueza ($C_3H_8O_3$) calc. s.p.s	99,0-101,0%
Identidad según Farmacopeas	s/e.
Densidad relativa a 25°C/25°C	1,249
Índice de refracción n^{20}_D	1,470-1,475
Punto de fusión	17,8 °C
Punto de ebullición	290 °C
Temperatura de Ignición	429 °C
Punto de Inflamación	176 °C
Viscosidad a 20 °C	1400 mPas
Características	Líquido transparente e incoloro, viscoso, miscible con agua e higroscópico

2.1.3. Aldehídos

Se emplean soluciones de distinta riqueza de formaldehído, glutaraldehído y glioxal, adquiridas de Panreac Química S.A. (España). Las especificaciones, suministradas por el fabricante, para cada aldehído aparecen en las Tablas 2.1.3 a 2.1.5.

Tabla 2.1.3. Ficha técnica del formaldehído.

Nombre	Formaldehído solución 37%
Fórmula	HCHO
Peso molecular	30,03
Concentración	37 (p/p)% en H ₂ O
Impurezas totales	10-15% Metil alcohol
Densidad	1,09 g/mL at 25 °C (lit.)
Densidad de vapor	1,03 (vs aire)
Presión de vapor	52 mmHg (37 °C)
Temperatura de autoignición	572 °F

Tabla 2.1.4. Ficha técnica del glutaraldehído.

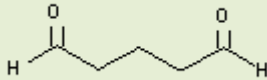
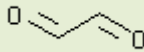
Nombre	Glutaraldehído solución 50%
Fórmula	$C_5H_8O_2$ 
Peso molecular	100,12
Riqueza mínima (Oximoacidim.)	49 %
Densidad relativa a 20°C/4°C	1,125-1,130
Punto de fusión	-7 °C
Punto de ebullición	189 ° C
Presión de vapor (a 20°C)	22 hPa
Punto de Inflamación	71 ° C
Características	Líquido transparente e incoloro, miscible

Tabla 2.1.5. Ficha técnica del glioxal.

Nombre	Glioxal solución 40%
Fórmula	 $C_2H_2O_2$
Peso molecular	58,04
Riqueza (Acidim.)	39-41 %
Densidad a 20/4	1,268-1,273
Punto de fusión	-14 ° C
Punto de ebullición	104 °C
Presión de vapor (a 26°C)	378 hPa
Temperatura de ignición	285°C
Características	Líquido transparente, miscible con agua

2.1.4. Gomas

En el presente estudio se utilizan goma Xantana, goma de garrofín, carboximetilcelulosa y metil-celulosa, todas ellas suministradas por Sigma-Aldrich, (St.Louis, MO), las especificaciones de cada una aparecen en las tablas 2.1.6 a 2.1.9.

Tabla 2.1.6. Ficha técnica de la goma de garrofín.

Nombre	Goma de garrofín
Fuente biológica	Semillas de <i>Ceratonia siliqua</i>
Apariencia	Polvo color amarillo claro con fragmentos canela
Pérdidas en secado	11%
Cenizas	0,4%
Viscosidad en caliente 1%	2700 cP

Tabla 2.1.7. Ficha técnica de la goma xantana.

Nombre	Goma xantana
Fuente biológica	<i>Xanthomonas campestris</i>
Apariencia	Polvo color canela claro
Viscosidad (Brookfield)	1160 cP (Solución 1%)

Tabla 2.1.8. Ficha técnica de la metil-celulosa.

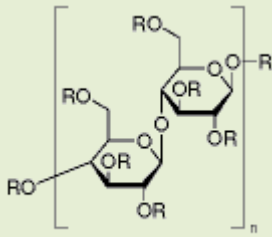
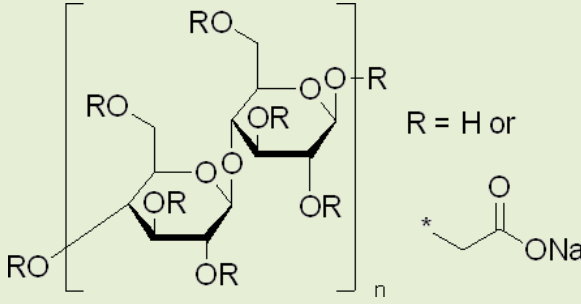
Nombre	Metil-celulosa
Fórmula	
Apariencia	Polvo blanco, imparte una coloración de transparente a amarillo claro a las soluciones viscosas en agua 20mg/mL
Viscosidad solución 2% en agua	4040 cP

Tabla 2.1.9. Ficha técnica de la carboximetilcelulosa.

Nombre	Carboximetilcelulosa sal de sodio
Fórmula	
Apariencia	Polvo blanco o amarillo
Viscosidad solución 1% en agua	1500 - 3000 cP

2.2. FORMULACIÓN DE BIOPLÁSTICOS

El sistema de partida denominado 50/18 tiene la siguiente composición: 50% de Gluten, 18% de glicerol y el porcentaje restante de agua. El pH de los sistemas se ajusta agregando disoluciones de NaOH o HCl 2M. En los casos en que se incorpora uno o más compuestos adicionales, el porcentaje de estos se resta al del agua y se adiciona a ésta previamente al mezclado en la cámara.

En los sistemas en que se agrega goma, se sigue el protocolo estándar de dispersión de la respectiva goma en agua (Sworn, 2009; Garnier y col., 1995; Murray, 2009) y posteriormente se alimenta a la cámara de amasado con los demás componentes. En la Tabla 2.2.1 se presenta la nomenclatura para los sistemas preparados.

Tabla 2.2.1. Formulación de los sistemas de bioplástico estudiados.

Sistema	Composición
WG/GL/agua 50/18	Gluten 50%, glicerol 18% y agua 32%; pH nativo del sistema (6 aprox.)
WG/GL/agua 50/18 pH3	Gluten 50%, glicerol 18% y agua (32% aprox.); pH 3
WG/GL/agua 50/18 pH9	Gluten 50%, glicerol 18% y agua (32% aprox.); pH 9
WG/GL/Formaldehído/agua	Gluten 50%, glicerol 18%, formaldehído (1 a 4% con respecto al gluten) y agua (32% aprox.); pH nativo del sistema (6 aprox.)
WG/GL/Glutaraldehído/agua	Gluten 50%, glicerol 18%, glutaraldehído (1 a 3% con respecto al gluten) y agua (32% aprox.); pH nativo del sistema (6 aprox.)

WG/GL/Glioxal/agua	Gluten 50%, glicerol 18%, glioxal (1 a 3% con respecto al gluten) y agua (32% aprox.); pH nativo del sistema (6 aprox.)
WG/GL/LBG/agua	Gluten 50%, glicerol 18%, goma de garrofín (1 a 4,5% con respecto al gluten) y agua (32% aprox.); pH nativo del sistema (6 aprox.) o modificado por adición de HCl (pH 3) o NaOH (pH 9)
WG/GL/XG/agua	Gluten 50%, glicerol 18%, goma xantana (0,5 a 1,5% con respecto al gluten) y agua (32% aprox.); pH nativo del sistema (6 aprox.) o modificado por adición de HCl (pH 3) o NaOH (pH 9)
WG/GL/MC/agua	Gluten 50%, glicerol 18%, metil-celulosa (0,5 a 1,5% con respecto al gluten) y agua (32% aprox.); pH nativo del sistema (6 aprox.)
WG/GL/CMC/agua	Gluten 50%, glicerol 18%, carboximetilcelulosa (0,5 a 1,5% con respecto al gluten) y agua (32% aprox.); pH nativo del sistema (6 aprox.)
WG/XG/GL/agua (1/4) pH9	Gluten 40%, goma xantana 10%, glicerol 18% y agua (38% aprox.); pH 9
WG/XG/LBG/GL/agua (0,5/0,5/4) pH9	Gluten 40%, goma xantana 5%, goma de garrofín 5%, glicerol 18% y agua (38% aprox.); pH 9
WG/XG/LBG/Glioxal/GL/agua pH9	Gluten 40%, goma xantana 5%, goma de garrofín 5%, glioxal (3% con respecto a la mezcla de gluten y gomitas) glicerol 18% y agua (38% aprox.); pH 9

2.3. PREPARACIÓN DE BIOPLÁSTICOS POR EL MÉTODO TERMOMECÁNICO/TERMOPLÁSTICO

2.3.1. Mezclado termoplástico discontinuo

El proceso de mezclado se ha llevado a cabo en un sistema HAAKE PolyLab de *Thermo-Haake* (Alemania), compuesto por una cámara amasadora de polímeros Rheomix 3000p y un reómetro de par de torsión, *Polylab Rheocord*

(Figura 2.3.1.). La sección de mezclado consiste en una doble cámara cilíndrica con dos rodillos amasadores que giran en sentido contrarrotatorio con una relación de velocidades de 3:2. Para el presente estudio se han utilizado dos tipos de mezcladores: “roller” y “delta”. La cámara de mezclado funciona con un porcentaje de llenado de entre 75-90% para asegurar el buen funcionamiento del sistema. El sistema permite un mezclado adiabático o isotérmico, fijando la temperatura inicial igual o superior a la ambiente con una unidad eléctrica de calentamiento. Para el presente estudio se realiza mezclado adiabático con temperatura inicial de 25°C e isotérmico a 60 y 90°C. La velocidad de agitación se ha establecido en todos los casos en 50 rpm y el tiempo de agitación en 20 minutos. El reómetro permite la medición simultánea del par de torsión y de la temperatura a lo largo del proceso.

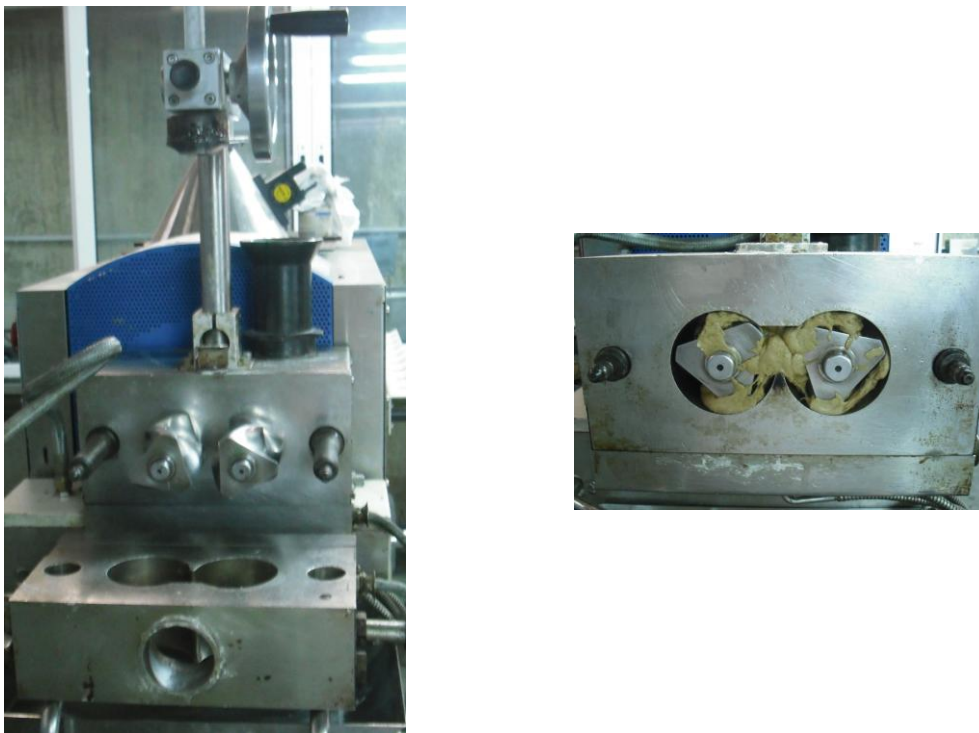


Figura 2.3.1. Sistema de mezclado para el procesado termomecánico. Rheomix 3000p Thermo-Haake.

2.3.2. Moldeo por compresión

Las probetas de bioplástico se preparan a partir de la masa resultante del mezclado, después de haber sido sometida a un proceso de troceado y reducción de tamaño, mediante moldeo térmico por compresión aplicando una presión de 9MPa y temperatura constante durante 10 minutos. Las temperaturas de termomoldeo están por encima de la temperatura de salida del proceso de amasado (38°C) y por debajo de la temperatura de degradación de las mezclas (140°C aproximadamente).

Para realizar el proceso de moldeo se utiliza el sistema MTS Insight 10kN de MTS Systems (USA) en modo de compresión, acoplado a dos moldes y una cámara de calentamiento. Los dos tipos de moldes que se emplean son uno rectangular de dimensiones 50x10x3 mm y otro correspondiente a una probeta tipo IV definida por la norma ASTM D638 para la determinación de propiedades de plásticos en ensayos de tracción (ASTM, 2000).

2.3.3. Extrusión

Algunos sistemas seleccionados, se someten a mezclado termoplástico en el sistema descrito anteriormente y después de haber seguido un proceso de reducción de tamaño, se alimentan a una extrusora de un husillo Rheomex 302p, perteneciente al grupo de Ingeniería de Fluidos complejos de la Universidad de Huelva (Figura 2.3.2.). La extrusora se acopla al sistema HAAKE PolyLab de *Thermo-Haake* (Alemania) para hacer una medición de par de torsión, temperatura y caída de presión en la boquilla. El diámetro del barril del husillo de la extrusora es de 19 mm con una longitud total de 830 mm, la boquilla empleada es de geometría en lámina. La extrusora Rheomex 302p cuenta con un sistema de calefacción eléctrica en cuatro zonas, una de las cuales está en la zona de alimentación, otra en la boquilla y las dos restantes repartidas en la zona de mezcla, permitiendo manejar diferentes perfiles de temperatura en el proceso. La velocidad de giro del husillo empleada es de 30 rpm para todos los sistemas. El material obtenido se somete a troquelado para obtener las mismas probetas que en el proceso de moldeo por compresión.

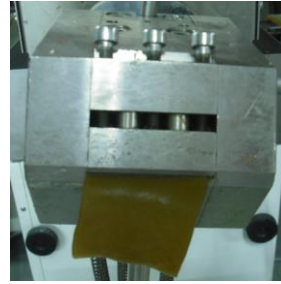
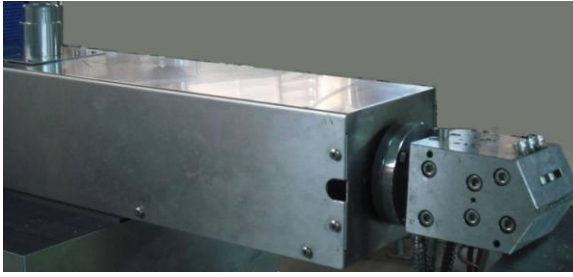


Figura 2.3.2. Sistema de extrusión. Extrusora Rheomex 302p Thermo-Haake.

2.3.4. Acondicionamiento de las probetas

Antes de realizar los ensayos de caracterización de las probetas, estas son depositadas, a temperatura ambiente, en recipientes con disoluciones de sales, durante al menos dos semanas, para alcanzar el equilibrio a una humedad relativa determinada, a temperatura ambiente. En la mayoría de ensayos la humedad establecida es de 53%. En la Tabla 2.3.1 se presentan las sales empleadas y la humedad relativa correspondiente:

Tabla 2.3.1. Sales empleadas para el acondicionamiento de probetas a diferentes porcentajes de humedad relativa.

Sal	Humedad relativa (%)
P_2O_5	0
KOH	8,23
CH_3COOK	23
$MgCl_2$	33
KCO_3	43
$Mg(NO_3)_2$	53
NaCl	75
KCl	84

2.4. MEDIDAS EXPERIMENTALES

2.4.1. Seguimiento del proceso de mezclado

El par de torsión generado y la temperatura de la muestra se registran continuamente durante el proceso de mezclado utilizando el software de control del reómetro HAAKE PolyLab de *Thermo-Haake* (Alemania) (Figura 2.3.1.), obteniendo perfiles del par de torsión y temperatura frente al tiempo.

2.4.2. Reometría capilar

La viscosidad de las mezclas obtenidas después de la etapa de amasado se determina en un reómetro capilar de alta presión de un cilindro, Rheocap de *Thermo-Haake* (Alemania) (Figura 2.4.1). La masa permanece en el cilindro durante 10 minutos sometida a calentamiento a la temperatura de medición. A continuación, un pistón empuja el material fundido a través del orificio del capilar. Las temperaturas de medida escogidas son 60, 90 y 120°C y se emplean capilares con distinta relación longitud/diámetro (L/D) a fin de realizar las correcciones de Bagley y Weissenberg–Rabinowitsch a los datos obtenidos (Bagley, 1957; Ralston y Osswald, 2008).

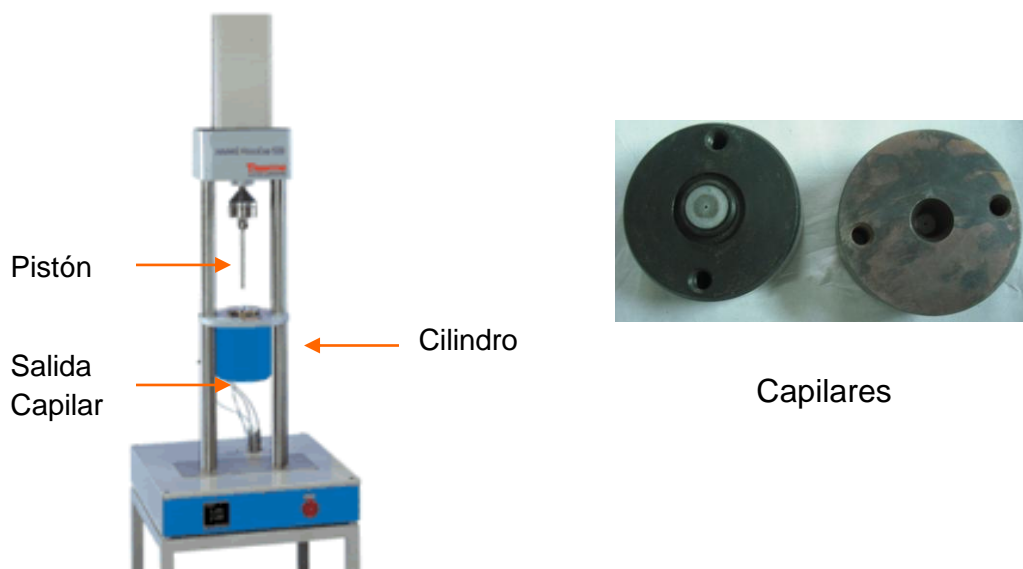


Figura 2.4.1. Reómetro capilar. Rheocap Thermo-Haake.

2.4.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para examinar el comportamiento térmico de los bioplásticos se ha empleado la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido modulado (MDSC). Las medidas se llevan a cabo en un calorímetro DSC Q100 de TA Instruments (USA) (Figura 2.4.2), perteneciente al grupo de Ingeniería de Fluidos complejos de la Universidad de Huelva. Para cada experimento, se depositan aproximadamente 10mg de bioplástico en una cápsula de aluminio herméticamente cerrada. Los ensayos fueron llevados a cabo con un periodo de oscilación de 60s, una amplitud de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y una velocidad de calentamiento es de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La muestra se purgó con una corriente de nitrógeno de 50mL/min y el intervalo de medición fue de -50 hasta 200°C .



Figura 2.4.2. Calorímetro empleado para los ensayos de DSC. Q100 TA instruments.

2.4.4. Análisis Dinámico Mecánico en Temperatura (DMTA)

Para poder medir las propiedades viscoelásticas de las probetas en su intervalo viscoelástico lineal y obtener información relacionada con su estructura, así como los cambios de propiedades de las mismas producidos durante el calentamiento, se emplea el DMTA. Estos ensayos se realizan con un reómetro RSA3 de TA instruments (USA), operando bajo el modo dinámico oscilatorio en un barrido de temperatura.

El RSA3 es un equipo de deformación controlada, en el cual el motor aplica una deformación a la probeta mientras un transductor mide la fuerza generada por esta. En este tipo de transductor, un sensor de posición detecta el movimiento y un motor lineal mide la fuerza de reacción requerida para conducir el soporte que contiene a la probeta a su posición inicial. La gran

ventaja de este sistema es que permite medir dentro de un amplio intervalo de esfuerzos con buena sensibilidad y poca inercia. Para controlar la temperatura en los ensayos se combinan un horno y un dispositivo de enfriamiento criogénico que se encuentran acoplados al reómetro (Figura 2.4.3).



Figura 2.4.3. Reómetro empleado para los ensayos de DMA. RSA3 TA instruments.

Las mediciones se hacen utilizando la geometría “dual cantilever” en la que las probetas se sujetan por los extremos mientras se someten a flexión en el centro, aplicando de este modo una oscilación a la muestra, a una frecuencia prefijada, mientras se realiza un barrido de temperatura (Figura 2.4.3). Todos los ensayos se llevan a cabo por triplicado empleando probetas de bioplástico con dimensiones de 50×10×3 mm a frecuencia constante (1 Hz) y deformación dentro de la región viscoelástica lineal. El intervalo de temperaturas es de -30 a 160°C y la velocidad de calentamiento seleccionada es de 3 °C/min. Las probetas se equilibran a una humedad relativa constante y se cubren con aceite de silicona para evitar pérdidas de agua durante las mediciones.

2.4.5. Ensayos de tracción

Para determinar las propiedades mecánicas de los bioplásticos se realizan ensayos de elongación hasta la ruptura de las probetas, de acuerdo a la norma ASTM D638 (ASTM, 2000), empleando la máquina de ensayos universal Insight 10 kN de MTS (USA). Este equipo consiste en un bastidor rectangular con una célula de carga sujeta a un miembro transversal, una base y dos columnas verticales. El cabezal con la célula de carga se desplaza verticalmente entre las dos columnas. Las probetas se sujetan al sistema por dos mordazas (Figura 2.4.4). Al iniciar el ensayo el extremo inferior de la

probeta queda fijo, conectado a la base por la mordaza inferior, mientras el extremo superior es arrastrado por el cabezal sujeto a la otra mordaza, extendiendo así la probeta. Cuando el equipo detecta el umbral de ruptura el ensayo se detiene. Durante el ensayo se mide carga y desplazamiento en función del tiempo. Los ensayos de tracción se realizan sobre al menos 4 especímenes por sistema, empleando probetas tipo IV definidas por la norma ASTM D638 y una velocidad extensional de 20 mm/min a temperatura ambiente.

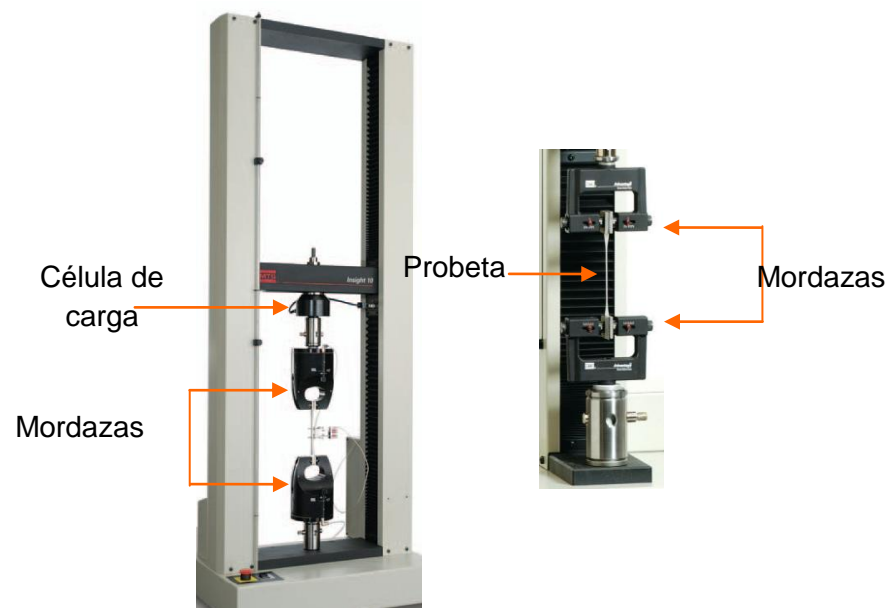


Figura 2.4.4. Máquina universal empleada para los ensayos de tracción.
Insight 10 kN MTS.

2.4.6. Absorción de agua

La capacidad de absorción de agua de los bioplásticos se mide de acuerdo con la norma ASTM D570, método estandarizado para la determinación de absorción de agua en plásticos (ASTM, 2005). Para tal fin se utilizan probetas rectangulares de 50×10×3 mm. Los especímenes se someten a secado (acondicionamiento) en estufa a $50 \pm 3^\circ \text{C}$ para determinar su peso en seco, luego se introducen en agua destilada y se pesan a las 2 y 24 horas de inmersión. Por último, se someten de nuevo a secado (re-acondicionamiento) y se pesan para determinar la pérdida de material soluble. Todos los ensayos se realizan por triplicado a temperatura ambiente.

De acuerdo a la metodología seguida, la capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble se determinan mediante las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{Absorción } H_2O = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco inicial}}{\text{peso seco inicial}} \times 100 \quad (2.4.1)$$

$$\% \text{Pérdida material soluble} = \frac{\text{peso seco inicial} - \text{peso seco final}}{\text{peso seco inicial}} \times 100 \quad (2.4.2)$$

2.4.7. Solubilidad en presencia de agentes desnaturizantes y reductores (SDS y DTT)

La solubilidad en agentes reductores o desnaturizantes se emplea como una medida del grado de agregación de la proteína y de este modo brinda una visión sobre el grado de entrecruzamiento y tipos de enlaces que pueden producirse en la misma (Lagrain y col., 2010). De este modo, en el presente estudio, muestras de gluten en polvo, masas obtenidas de la etapa de mezclado y probetas de bioplástico son sometidas a un proceso de dispersión en diferentes medios: agua, una disolución con un agente desnaturizante (Método A) y una disolución que contiene un agente reductor, además del desnaturizante (Método B).

Las muestras se someten a un proceso de reducción de tamaño y se dispersan en el medio elegido durante 2 horas mediante agitación magnética a 400 rpm aproximadamente, a temperatura ambiente. En el método A se utiliza una disolución tampón con una concentración de 0,086 M Tris-base, 0,045 mM de glicina, 2 mM de EDTA y 1% de dodecilsulfato de sodio (SDS). En el método B, se emplea la misma disolución tampón pero se adiciona un 1% de ditiotreitól (DTT). Para el presente estudio se trabaja con tres valores de pH: 3, 6 y 9. El pH de las soluciones tampón se ajusta a tales valores. Las dispersiones se centrifugan a 10,000xg durante 10 minutos a una temperatura de 15 °C. La fracción de proteína soluble se determina usando el método de Lowry modificado (Peterson, 1979) y a partir de estos resultados se calcula el porcentaje de proteína soluble en el sobrenadante.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. SISTEMA GLUTEN/GLICEROL/AGUA (WG/GL/agua)

El uso de plastificantes produce el descenso del valor de la temperatura de transición vítrea de las proteínas del gluten. Este hecho es interesante y permite que pueda considerarse la utilización de procesos termoplásticos como la extrusión y amasado en la preparación de materiales a partir de proteínas de gluten de trigo evitando la degradación térmica (Irisin-Mangata y col., 2001). Por otro lado, durante el procesado de gluten y glicerol se ha encontrado que la viscosidad del “fundido de proteínas” incrementa con la temperatura debido a las reacciones de entrecruzamiento y restringe así las condiciones de operación (Jerez, 2007). Como alternativa al glicerol, se ha propuesto agregar una mezcla de plastificantes, agua/glicerol (Redl y col., 1999; Jerez, 2007).

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, se elige como sistema de referencia el sistema 50/18, compuesto por 50% de gluten, 18% de glicerol y 32% aproximadamente de agua. Como método de procesado se ha seleccionado mezclado y termomoldeo por compresión. El plastificante, mezcla de agua y glicerol, se mezcla con el gluten en una proporción de 0,5, similar a las utilizadas en otros estudios relacionados con este tipo de procesado (Pallos y col, 2008; Jerez y col., 2007; Redl y col., 1999).

En este apartado se discute el efecto del procesado, humedad relativa y pH sobre las propiedades del sistema denominado 50/18, que se define como sistema de referencia a partir del cual se evaluará el efecto de determinados tratamientos o aditivos en las propiedades de los bioplásticos resultantes.

3.1.1. Estudio del mezclado termoplástico

3.1.1.1. Evolución del par de torsión y de la temperatura

En primer lugar es interesante determinar la variabilidad en la medición de los parámetros durante el mezclado termoplástico. De este modo, se puede establecer si el cambio en una variable produce diferencias significativas.

La Figura 3.1.1 muestra la evolución del perfil del par de torsión y de la temperatura, obtenida por cuadruplicado, durante el proceso de mezclado del sistema WG/GL/agua denominado 50/18, para una velocidad de agitación de 50 rpm y una temperatura inicial de 25°C.

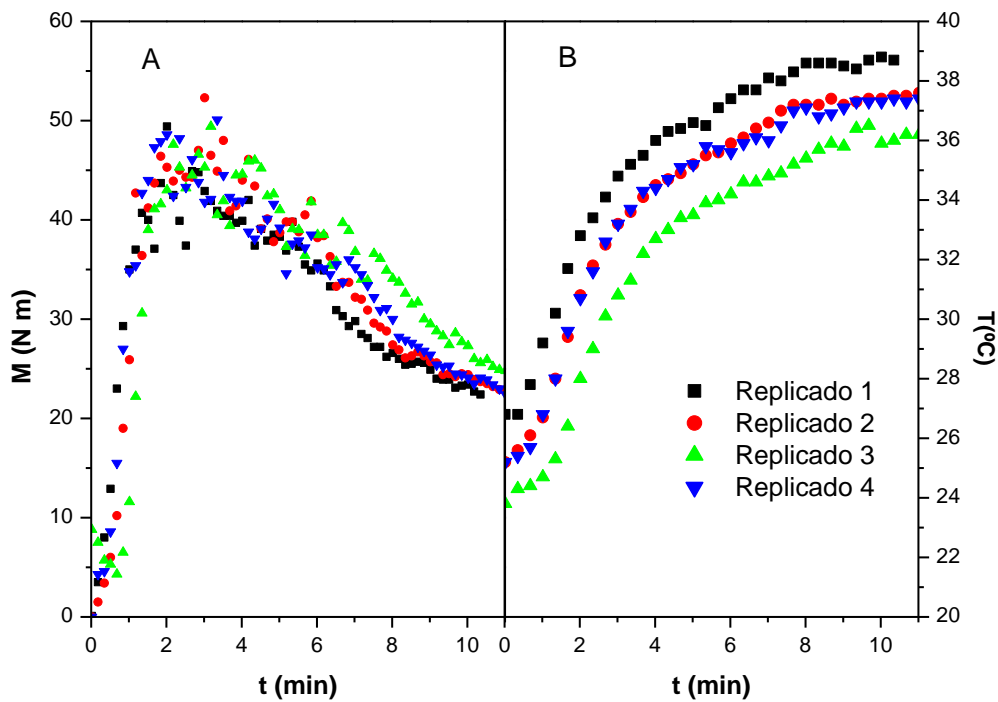


Figura 3.1.1. Evolución del par de torsión (A) y la temperatura (B) para cuatro replicados de mezclado termoplástico del sistema 50/18 (50 rpm, temperatura inicial 25°C).

Inicialmente se produce un importante aumento en el par de torsión hasta un valor máximo que se alcanza en un corto espacio de tiempo de mezclado. A continuación, se produce un descenso con una tendencia asintótica hacia un valor de equilibrio del par de torsión. En cuanto al perfil de temperatura, se produce un aumento exponencial seguido de una rápida inflexión hasta una zona de clara tendencia asintótica. Como resultado se obtienen un aumento notable de temperatura. Este tipo de comportamiento es similar al descrito en otros estudios para mezclado de sistemas WG/GL (Redl y col., 1999; Jerez y col, 2005). Sin embargo, estos autores encontraron tiempos de mezclado y

temperaturas más altas que las obtenidas cuando se incorpora agua como plastificante.

A partir de las curvas de par de torsión frente al tiempo de mezclado se puede calcular la Energía Mecánica Específica consumida durante el procesado. El valor de Energía Mecánica Específica (SME, expresada en kJ/kg) se calcula, de acuerdo con el procedimiento descrito por Redl y col.(1999), usando la siguiente ecuación:

$$SME = \frac{\omega}{m} \int_0^{t_{mix}} M(t) dt \quad (3.1.1)$$

Donde ω es la velocidad de mezclado (en rad/s), m es la masa de la muestra (en gramos), M es el par de torsión (en N•m) en el instante t_{mix} correspondiente al tiempo de mezclado (en segundos).

En la Tabla 3.1.1 se presentan los parámetros estadísticos correspondientes a las variables par de torsión, Energía Mecánica Específica (SME) y temperatura, para el máximo en el par de torsión y al final del mezclado. Dichos parámetros se obtienen de los perfiles de la Figura 3.1.1.

Tabla 3.1.1. Parámetros estadísticos del mezclado termoplástico^a.

	\bar{x}^b	σ	Coefficiente variación
t_{max} (min)^c	2,26 ± 0,30	0,31	0,14
M_{Max} (N•m)^c	48,65 ± 1,23	1,25	0,03
SME_{Max} (kJ/kg)^c	75,62 ± 12,08	12,33	0,16
T_{Max} (°C)^c	31,3 ± 1,00	1,02	0,03
M_{Final} (N•m)^d	22,48 ± 0,50	0,51	0,02
SME_{Final} (kJ/kg)^d	470,58 ± 10,35	9,15	0,02
T_{Final} (°C)^d	37,6 ± 0,91	0,92	0,02

^a Mezclador tipo sigma ^b Valor promedio ± un intervalo de confianza de 95%, ^c Valor de la variable en el máximo del par de torsión, ^d Valor de la variable al final del proceso de mezclado

Frente al procesado adiabático, descrito en la Figura 3.1.1, dónde no se intervino para modificar la temperatura de la cámara y se observó cómo evolucionaba la temperatura de la masa, a continuación se analiza el mezclado termoplástico manteniendo la temperatura de la cámara de mezcla aproximadamente constante. Para ello, se somete al sistema de referencia a distintos procesos de mezclado, bajo condiciones adiabáticas a una temperatura inicial de 25°C e isotérmicas a las temperaturas iniciales de 60 y 90°C. La Figura 3.1.2 muestra la evolución del perfil del par de torsión y de la temperatura durante el proceso de mezclado, llevado a cabo a 50rpm para el sistema WG/GL/agua identificado como 50/18, bajo diferentes condiciones térmicas.

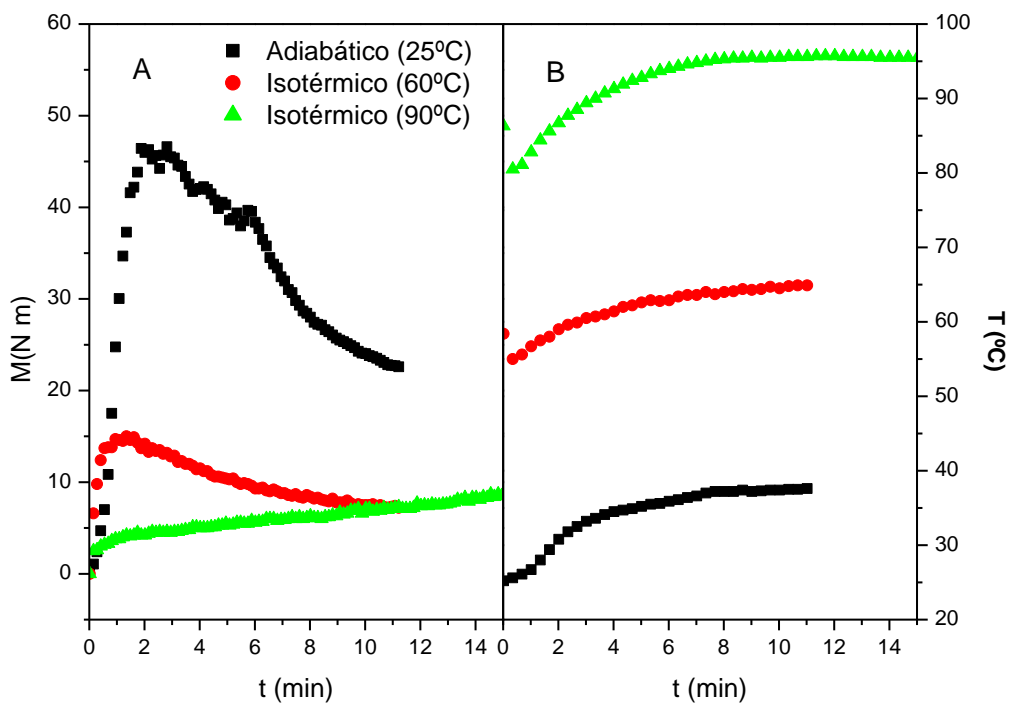


Figura 3.1.2. Perfiles de par de torsión (A) y temperatura (B) durante el proceso de mezclado del sistema 50/18, para diferentes condiciones térmicas a 50 rpm.

A pesar de que las condiciones de procesado son diferentes, el perfil de par de torsión llega a ser similar en las muestras procesadas a 25 y 60°C. Tal y como se mencionó anteriormente, se produce un aumento inicial en el par de torsión

hasta un valor máximo, seguido de un descenso hasta un valor asintótico de este. Estudios similares para mezclado de sistemas WG/GL (Redl y col., 1999; Jerez y col., 2005) mostraron el mismo tipo de comportamiento, pero con la aparición de un periodo de inducción previo al incremento en el par de torsión. En cambio, Pommet y col. (2003) no hallaron periodo inducción en el proceso de mezclado a temperaturas mayores de 40°C. En el presente estudio, la presencia de agua en el sistema parece producir el mismo efecto de la temperatura, evitando la aparición del periodo de inducción. Un comportamiento diferente puede encontrarse en el sistema amasado a 90°C, en el cual se presenta un crecimiento continuo, aunque moderado, del par de torsión hasta que finalmente se alcanza el mismo nivel que para el sistema mezclado a 60°C. Este mismo comportamiento fue descrito por Pommet y col. (2003), para mezclado termoplástico de un sistema WG/GL a 80°C. El crecimiento continuo del par de torsión, dada la presencia de agua, puede ser ocasionado por secado del sistema a lo largo del tiempo, por tal razón, no se realiza amasado a temperaturas mayores.

Los valores de tiempo de mezclado, par de torsión y SME se presentan en la Tabla 3.1.2, tanto para el valor máximo de par de torsión (identificado con el subíndice max) como para el tiempo total de amasado (identificado con el subíndice final). Los valores de T_{Mix} y t_{Mix} en la tabla representan la temperatura inicial del mezclado (adiabático o isotérmico) y el tiempo total de amasado.

Tabla 3.1.2. Parámetros de mezclado obtenidos bajo diferentes condiciones térmicas.

T_{Mix}	t_{Mix}	M_{Final}	T_{Final}	SME_{Total}	t_{Max}^c	M_{Max}^c	T_{Max}^c	SME_{Max}^c
25^a	11,3	22,5	37,6	470,58	2,26	48,6	31,3	75,62
60^b	11,3	7,1	64,8	144,13	1,33	15,2	57,5	20,17
90^b	20	10,8	95,3	175,76	0,2	3,4	83	0,51

^a Mezclado adiabático, ^b Mezclado isotérmico, ^c Correspondientes al valor máximo de par de torsión

Como puede observarse, un incremento en la temperatura de procesado de 25 a 60°C produce valores más bajos de SME. El valor final de SME a la temperatura de amasado más alta (90°C) se desvía de este comportamiento ya que el tiempo de mezclado es más prolongado (20 min). Sin embargo, si el tiempo se limita a 11,3 min, el sistema muestra la misma evolución, con un valor de SME de 76,80 kJ/kg. Como se puede observar en la Tabla 3.1.2 (y la Figura 3.1.2.A) al aumentar la temperatura de mezclado se alcanzan los valores máximo y asintótico del par de torsión en periodos de tiempo más cortos. En cualquier caso, temperaturas iniciales de mezclado bajas conducen a valores de par de torsión altos y en consecuencia a un mayor consumo de energía mecánica.

En los dos procesos de mezclado isotérmico, los perfiles de temperatura mostrados en la Figura 3.1.2.B presentan un descenso inicial que corresponde al periodo requerido por la muestra para alcanzar la temperatura del proceso (20 s aproximadamente). Después de este tiempo, el perfil muestra una forma sigmoideal para las tres temperaturas de mezclado, alcanzando un valor aproximadamente constante, tal como describen Pommet y col.(2003) y Redl y col.(1999). Los perfiles de par de torsión y temperatura indican que se produce un fenómeno de disipación de energía mecánica, pero además deben tener lugar reacciones exotérmicas de entrecruzamiento de proteínas. Estas reacciones pueden producirse incluso a temperaturas moderadas, tal como han sugerido anteriormente Jerez y col. (2007). De hecho, el mezclado a 25°C conduce a un mayor aumento de temperatura. Así, de acuerdo con Pommet y col.(2003), a pesar de que el entrecruzamiento en el gluten es un fenómeno controlado por la temperatura, las altas velocidades de cizalla, involucradas en el proceso de mezclado termoplástico, pueden reducir la energía de activación necesaria para el entrecruzamiento, llevando a cambios sustanciales en la conectividad de las mezclas WG/GL. Adicionalmente, tanto la desnaturalización de las proteínas de gluten como las reacciones de entrecruzamiento de distintos segmentos de proteína, que dependen del tiempo, pueden resultar favorecidas a temperaturas altas (Bengoechea y col., 2007; Schofield y col., 1983).

3.1.1.2. Comportamiento viscoso de mezclas

En la Figura 3.1.3 se presentan las curvas de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla, obtenidas tras la aplicación de las correcciones de Bagley (Bagley, 1957) y Weissenberg–Rabinowitsch (Ralston y Osswald, 2008) para dos masas obtenidas bajo las mismas condiciones de mezclado (proceso adiabático con temperatura inicial de 25°C, agitación a 50 rpm), utilizando dos geometrías de amasado diferentes (sistema tipo rodillo o “Roller” y tipo Delta).

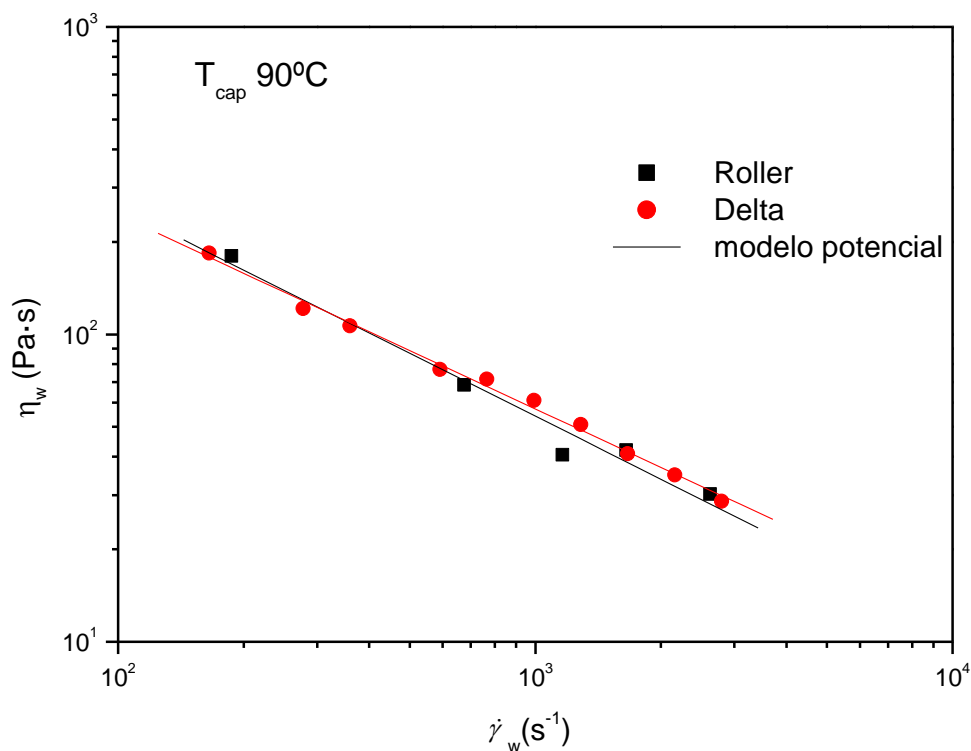


Figura 3.1.3. Valores de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para la mezcla WG/GL/agua 50/18. Condiciones de mezclado adiabáticas con temperatura inicial de 25°C, agitación a 50rpm, temperatura del capilar 90°C.

Las mezclas exhiben un comportamiento pseudoplástico que puede ajustarse a una ecuación potencial entre la viscosidad aparente (η_w) y la velocidad de cizalla ($\dot{\gamma}_w$), en la que ambas variables corresponderían a los valores

alcanzados en la pared del capilar, después de realizar las correcciones mencionadas anteriormente. Dicha ecuación potencial puede expresarse así:

$$\eta_w = \eta_{1000} \cdot \left(\frac{\dot{\gamma}_w}{1000} \right)^{n-1} \quad (3.1.2)$$

donde η_{1000} es la viscosidad capilar a una velocidad de cizalla de 1000 s^{-1} y n es el índice de flujo.

Como puede apreciarse en la figura, ambos sistemas conducen a masas con propiedades de flujo viscoso muy similares, que no pueden considerarse significativamente diferentes. En la Tabla 3.1.3 aparecen los valores de la media, intervalos de confianza, desviación estándar (σ) y coeficiente de variación tanto para η_{1000} , como para el índice de flujo de las mezclas representadas en la Figura 3.1.3. Como puede verse, las viscosidades obtenidas son bastante coincidentes y no se han encontrado diferencias significativas entre los valores del índice de flujo.

Tabla 3.1.3. Parámetros estadísticos de la ecuación potencial para viscosidad capilar.

	\bar{x}^a	σ	Coeficiente de variación
n (-)	0,333 ± 0,001	0,001	0,001
η_{1000} (Pa·s)	54,45 ± 3,81	2,75	0,051

^a Valor promedio ± un intervalo de confianza de 95%

En la Figura 3.1.4 se comparan las curvas de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para mezclas WG/GL/agua preparadas bajo diferentes condiciones térmicas. Dichas masas provienen de los procesos de mezclado termoplástico descritos en el apartado anterior y presentados en la Figura 3.1.2. La temperatura del capilar en estas medidas (T_{cap}) es de 90°C .

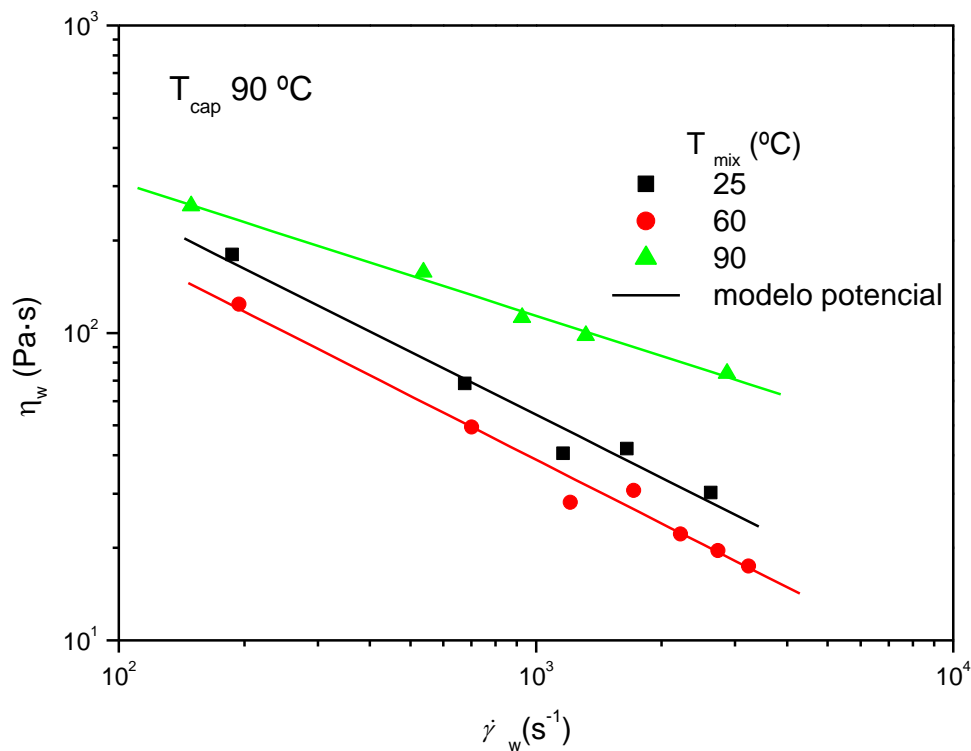


Figura 3.1.4. Valores de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para la mezcla WG/GL/agua 50/18, usando diferentes condiciones térmicas (temperatura de capilar 90°C).

Los valores de los parámetros de la ecuación 3.1.2 se presentan en la Tabla 3.1.4 para las tres temperaturas de amasado (T_{mix}). No se evidencian diferencias significativas para el índice de flujo de las masas mezcladas a temperaturas iniciales de 25°C y 60°C. Sin embargo, se puede apreciar una reducción importante en la pendiente de la curva de viscosidad, que corresponde a un aumento en el índice de flujo, para el sistema mezclado a 90°C. También puede resultar inesperado que se produzca un aumento de viscosidad a 90°C, dando lugar a un valor mínimo de viscosidad aparente a 60°C. Este efecto puede estar relacionado con una combinación de dos eventos: uno térmico, debido al efecto de secado mencionado anteriormente (que tiene lugar a temperaturas elevadas de mezclado); y otro inducido por la cizalla, generado en el propio proceso de mezclado, que daría lugar al entrecruzamiento entre segmentos de proteína, tal como se indicó en el apartado anterior. En cualquier caso, en el proceso de mezclado llevado a

cabo a 90°C se obtiene una masa que presenta una apariencia visual bastante heterogénea.

Tabla 3.1.4. Parámetros del modelo potencial para las curvas de flujo capilar de la mezcla 50/18, en función de la temperatura de mezclado (T_{mix}) y de la temperatura del capilar (T_{cap}).

T_{mix} (°C)	T_{cap} (°C)	n (-)	η_{1000} (Pa·s)
25	90	0,333	54,45
60	90	0,311	38,7
90	90	0,565	113,7
25	60	0,410	70,8
25	90	0,333	54,45
25	120	0,266	54,9

La Figura 3.1.5 muestra las curvas de viscosidad capilar de una masa de WG/GL/agua obtenida mediante mezclado adiabático (temperatura inicial de 25°C) para diferentes temperaturas del capilar. Un aumento en la temperatura de la medida produce una reducción en la viscosidad capilar obtenida, sin embargo, este cambio es menos acusado por encima de los 90°C. Este descenso es menor que el esperado de acuerdo con el comportamiento general de la función viscosidad con la temperatura (por ejemplo a partir de la ecuación de Williams-Landel-Ferry). Esto se podría deber a la aparición de fenómenos de entrecruzamiento inducidos por la temperatura. Este efecto inducido térmicamente es probablemente el responsable de la disminución en el índice de flujo (n) que tiene lugar al aumentar la temperatura, cuya variación

es inversa al de las pendientes de las curvas (1-n) mostradas en la Figura 3.1.5.

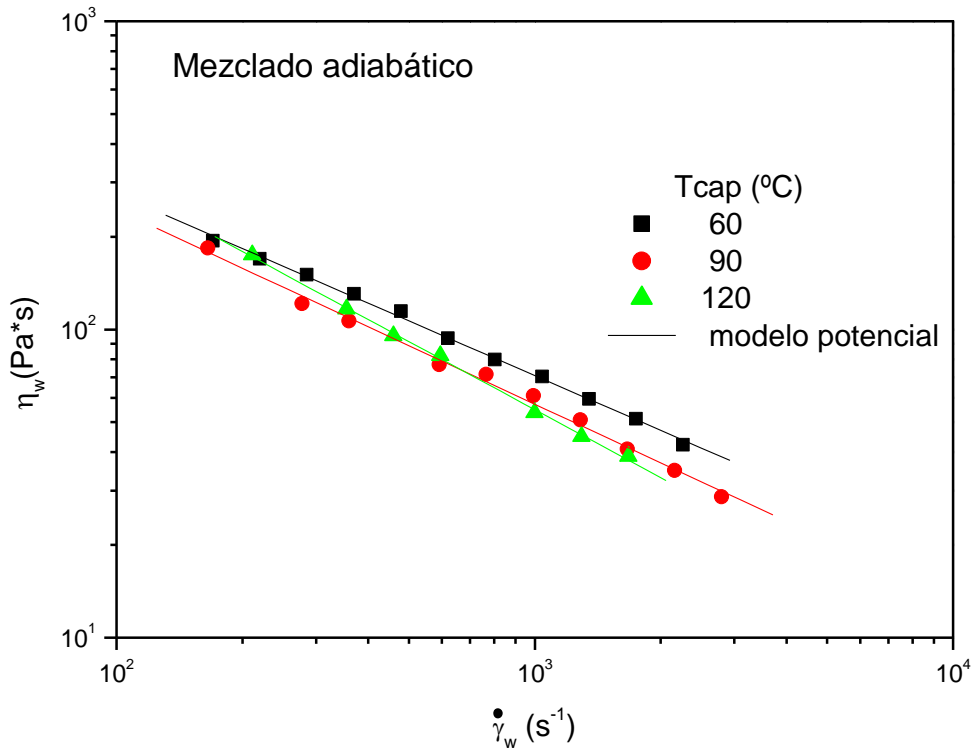


Figura 3.1.5. Valores de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para la mezcla WG/GL/agua 50/18 en función de la temperatura de capilar (T_{cap}). Mezclado adiabático con temperatura inicial de 25°C y agitación a 50 rpm.

3.1.2. Estudio del termomoldeo

3.1.2.1. Estudio estadístico del proceso de termomoldeo

Para poder determinar si el cambio de una variable es significativo, se considera necesario hacer un estudio estadístico de la variabilidad asociada a la preparación de las probetas y a las medidas obtenidas de los ensayos de DMA, tracción y absorción de agua. Con tal fin, se procedió al cálculo de la media y los intervalos de confianza, la desviación estándar y el coeficiente de variación para los principales parámetros de dichos ensayos, utilizando probetas del bioplástico 50/18, obtenidas mediante mezclado y termomoldeo.

Las condiciones de procesado de las probetas fueron las de referencia tanto para el mezclado (25°C, 50 rpm), como para el termomoldeo (9 MPa y 130°C).

A continuación se presentan los valores de partida para el análisis y los parámetros estadísticos mencionados anteriormente, tanto interlotes como intralotes. Se considera interlotes a aquellas probetas preparadas a partir de masas obtenidas mediante distintos procesos de mezclado e intralotes a aquellas probetas obtenidas a partir de la misma masa. Los parámetros seleccionados para los ensayos DMA, que se presentan en las Tablas 3.1.5 y 3.1.6, fueron el módulo elástico (E') y la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) para diferentes regiones térmicas, dentro del intervalo de medición: -10, 50 y 120°C.

Tabla 3.1.5. Resultados ensayos DMA sobre probetas de bioplásticos de diferentes lotes de la mezcla 50/18, termomoldeo a 130°C y 9MPa.

Lote	Replicado	$E'_{-10^{\circ}\text{C}}^{\text{a}}$	$\tan \delta_{-10^{\circ}\text{C}}$	$E'_{50^{\circ}\text{C}}^{\text{a}}$	$\tan \delta_{50^{\circ}\text{C}}$	$E'_{120^{\circ}\text{C}}^{\text{a}}$	$\tan \delta_{120^{\circ}\text{C}}$
A	1	252,43	0,30	5,80	0,39	1,01	0,19
A	2	255,15	0,30	5,37	0,37	1,11	0,17
A	3	221,10	0,29	5,22	0,42	1,04	0,15
B	1	197,33	0,34	5,61	0,38	1,25	0,17
B	2	177,44	0,30	5,48	0,37	1,21	0,16
B	3	168,54	0,30	5,41	0,36	0,99	0,14
C	1	187,97	0,33	5,98	0,35	1,26	0,14
C	2	163,72	0,31	4,08	0,37	1,30	0,14
C	3	175,39	0,32	4,98	0,35	1,04	0,13

^a Valor de E' en MPa

Tabla 3.1.6. Valores de los parámetros estadísticos para ensayos de DMA sobre probetas de bioplásticos de diferentes lotes de la mezcla 50/18, termomoldeo a 130°C y 9MPa.

		$E'_{-10^{\circ}\text{C}}^{\text{a}}$	$\tan \delta_{-10^{\circ}\text{C}}$	$E'_{50^{\circ}\text{C}}^{\text{a}}$	$\tan \delta_{50^{\circ}\text{C}}$	$E'_{120^{\circ}\text{C}}^{\text{a}}$	$\tan \delta_{120^{\circ}\text{C}}$
Interlotes	\bar{X}	199,90	0,31	5,32	0,37	1,13	0,15
	Intervalo ^b	±21,57	±0,01	±0,34	±0,01	±0,08	±0,01
	σ	33,01	0,01	0,52	0,02	0,12	0,02
	Coefficiente	0,17	0,05	0,10	0,05	0,10	0,12
Intralotes	\bar{X}	199,90	0,31	5,32	0,37	1,13	0,15
	Intervalo ^b	±34,49	±0,01	±0,25	±0,02	±0,07	±0,02
	σ	30,48	0,01	0,22	0,01	0,06	0,01
	Coefficiente	0,15	0,03	0,04	0,04	0,06	0,09

\bar{X} valor promedio, σ desviación estándar, ^a Valor de E' en MPa, ^b Intervalo de confianza de 95%

Para el análisis de variabilidad en los ensayos de tracción se eligieron el módulo de Young (E), los valores máximos del esfuerzo (σ_{max}) y la deformación (ε_{max}) antes de la ruptura, que se presentan en las Tablas 3.1.7 y 3.1.8 junto al porcentaje de humedad absoluta de las probetas tras el equilibrado a 53% de RH.

Tabla 3.1.7. Resultados de los ensayos de tracción sobre probetas de bioplásticos de diferentes lotes de la mezcla 50/18 termomoldeada a 130°C y 9MPa.

Lote	Replicado	E ^a	σ_{\max} ^b	ϵ_{\max} ^c	%Humedad
A	1	5,64	1,80	1,96	13,51
A	2	6,07	1,40	1,12	14,02
A	3	7,08	1,10	0,73	13,59
B	1	12,74	2,50	2,03	15,21
B	2	10,57	2,40	1,67	14,98
B	3	9,53	2,10	1,67	14,85
C	1	4,40	0,75	1,10	23,91
C	2	5,82	0,84	1,05	18,71
C	3	5,09	0,57	0,64	20,94
C	4	4,87	0,72	0,93	

^a Módulo de Young en MPa, ^b Tensión máxima en MPa, ^c Elongación máxima (mm/mm)

Tabla 3.1.8. Valores de los parámetros estadísticos para ensayos de tracción sobre probetas de bioplásticos de diferentes lotes de la mezcla 50/18 termomoldeada a 130°C y 9MPa

	E^a	σ_{max}^b	ϵ_{max}^c	%Humedad
\bar{x}	7,18	1,42	1,29	16,64
Intervalo Confianza ^d	$\pm 1,65$	$\pm 0,43$	$\pm 0,30$	$\pm 2,28$
Interlotes				
σ	2,66	0,70	0,48	3,49
Coeficiente variación	0,37	0,49	0,37	0,21
\bar{x}	7,42	1,50	1,33	16,64
Intervalo Confianza ^d	$\pm 2,88$	$\pm 0,75$	$\pm 0,40$	$\pm 3,69$
Intralotes				
σ	2,55	0,66	0,35	3,26
Coeficiente variación	0,34	0,44	0,27	0,20

^a Módulo de Young en MPa, ^b Tensión máxima en MPa, ^c Elongación máxima (mm/mm),

^dIntervalo de confianza de 95%

En cuanto a los ensayos de absorción de agua, como variables para el análisis estadístico se seleccionaron los porcentajes de agua absorbida a las 2 y 24 h tras la inmersión de las probetas y la pérdida de materia soluble al final de las 24 h. Los resultados experimentales se resumen en la Tabla 3.1.9 y los parámetros estadísticos se presentan en la Tabla 3.1.10.

Tabla 3.1.9. Resultados de los ensayos de absorción de agua en probetas de bioplásticos de diferentes lotes de la mezcla 50/18, termomoldeo a 130°C y 9MPa.

Lote	Replicado	Absorción 2h(%)	Absorción 24h(%)	Pérdida solubles(%)
A	1	43,93	76,59	22,56
A	2	41,79	68,28	22,59
A	3	39,04	71,48	22,49
B	1	40,13	74,14	22,51
B	2	46,80	62,78	28,65

Tabla 3.1.10. Valores de los parámetros estadísticos para ensayos de absorción de agua en probetas de bioplásticos de diferentes lotes de la mezcla 50/18, termomoldeo a 130°C y 9MPa.

		Absorción 2h(%)	Absorción 24h(%)	Pérdida solubles(%)
Interlotes	\bar{x}	42,34	70,65	23,76
	Intervalo	±2,43	±4,22	±2,14
	σ	2,78	4,81	2,45
	Coficiente	0,07	0,07	0,10
Intralotes	\bar{x}	42,53	70,29	24,06
	Intervalo	±1,30	±2,53	±2,10
	σ	0,94	1,83	1,52
	Coficiente	0,02	0,03	0,06

^a Intervalo de confianza de 95%

Para el cálculo de parámetros estadísticos interlotes se emplearon los resultados experimentales de todas las probetas. En el estudio intralotes se usaron las medias de cada lote para la determinación de dichos parámetros.

A partir de los resultados presentados en este apartado puede deducirse que la menor variabilidad corresponde a los ensayos de absorción de agua, seguidos por los ensayos DMA, que presentan coeficientes de variación moderados, salvo a baja temperatura. La mayor variabilidad corresponde a los ensayos de tracción con coeficientes de variación mucho mayores que los anteriores. En cualquier caso, como cabía esperar, los coeficientes de variación interlotes son mayores que los intralotes en la mayoría de los parámetros analizados. No obstante, esta diferencia es generalmente pequeña, lo cual sugiere que la mayor variabilidad debe estar asociada al proceso de termomoldeo.

3.1.2.2. Influencia de la temperatura de moldeo

La Figura 3.1.6 presenta los valores del módulo elástico (E') y la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) obtenidos a partir de ensayos de DMA en rampas de temperatura para muestras de bioplásticos del sistema WG/GL/agua 50/18, equilibradas a una humedad relativa de 53 % RH. Estas muestras fueron sometidas a mezclado adiabático previamente y moldeadas a 9 MPa y diferentes temperaturas, comprendidas entre 38 y 145°C.

El módulo elástico, E' , experimenta en todos los casos una gran reducción al aumentar la temperatura de medida alcanzando un valor mínimo o plateau por encima de los 80°C, dependiendo de la temperatura de moldeo de la probeta. El módulo viscoso, E'' , presenta un comportamiento similar, aunque sus valores son significativamente más bajos que los de E' . Además, un incremento en la temperatura de moldeo produce un claro aumento de E' y E'' , así como una importante evolución en los perfiles E' , E'' -temperatura, donde el mínimo de ambas funciones viscoelásticas tiende a desaparecer. La presencia de un mínimo en E' con la temperatura ha sido asociada a que las propiedades reológicas y microestructurales del material son aun susceptibles de ser mejoradas mediante procesado a mayor temperatura (Jerez y col., 2007). Se habla en este caso de que el material presenta cierto potencial de termoendurecimiento. Es lo que sucede con las probetas moldeadas a 110°C o temperaturas inferiores. Por el contrario, la región plateau, que se puede apreciar en la zona de altas temperaturas para las probetas moldeadas a 130 y

145°C, revela que ya no presentan ningún potencial remanente de termoendurecimiento.

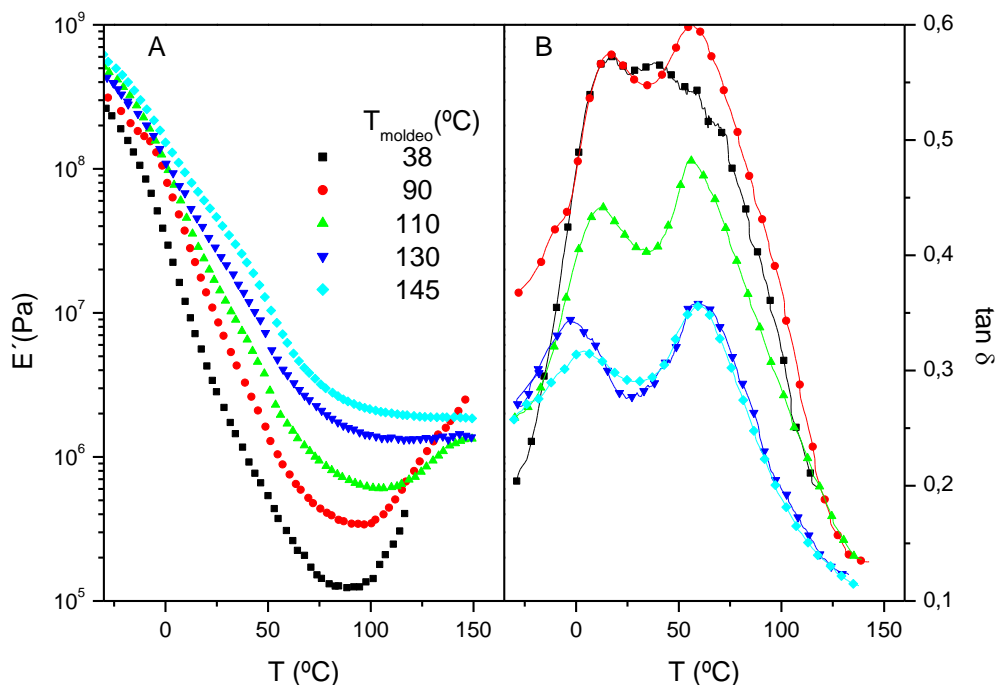


Figura 3.1.6. Dependencia del módulo E' (A) y de la tangente de pérdidas $\tan \delta$ (B) con la temperatura en función de la temperatura de moldeo para los bioplásticos WG/GL/agua obtenidos después de mezclar a 25°C y 50 rpm.

Como se puede observar en la Figura 3.1.6.B, los perfiles de $\tan \delta$ describen dos picos: a 0°C y 60°C aproximadamente, con independencia de la temperatura a la que se llevó a cabo el proceso de moldeo. En estudios previos (Jerez y col., 2005; 2007) realizados también sobre sistemas de WG/GL se identificaron dos picos. El primer pico, $T_{\alpha 1}$, aparece entre -30 y -50°C y fue relacionado con la transición vítrea de la glicerol, mientras que el segundo pico, $T_{\alpha 2}$, se atribuyó a la transición vítrea del gluten plastificado (Jerez y col., 2007; Sun y col., 2007; 2008).

En este caso, usando una mezcla glicerol/ agua como plastificante, el pico localizado cerca de los 0°C estaría principalmente asociado a la transición vítrea ($T_{\alpha 1}$) característica de la mezcla de plastificante afectada por algunas

fracciones del aislado de la proteína de gluten. Cabe resaltar que las probetas preparadas a la temperatura más baja de moldeo (38°C), reflejan mayor grado de compatibilidad entre la proteína y el agua, dónde $T_{\alpha 1}$ se solapa con $T_{\alpha 2}$. Sin embargo, las dos fases se vuelven más incompatibles al aumentar la temperatura de moldeo, lo cual se puede deducir por la separación de los picos, más evidente para $T_{\alpha 1}$.

La Figura 3.1.7 muestra los perfiles de flujo de calor total y de la derivada de la capacidad calorífica obtenidos de las medidas de DSC llevadas a cabo sobre probetas del sistema WG/GL/agua sometido a mezclado termoplástico, seguido de moldeo a 130°C y 9 MPa y equilibrado a 53%HR.

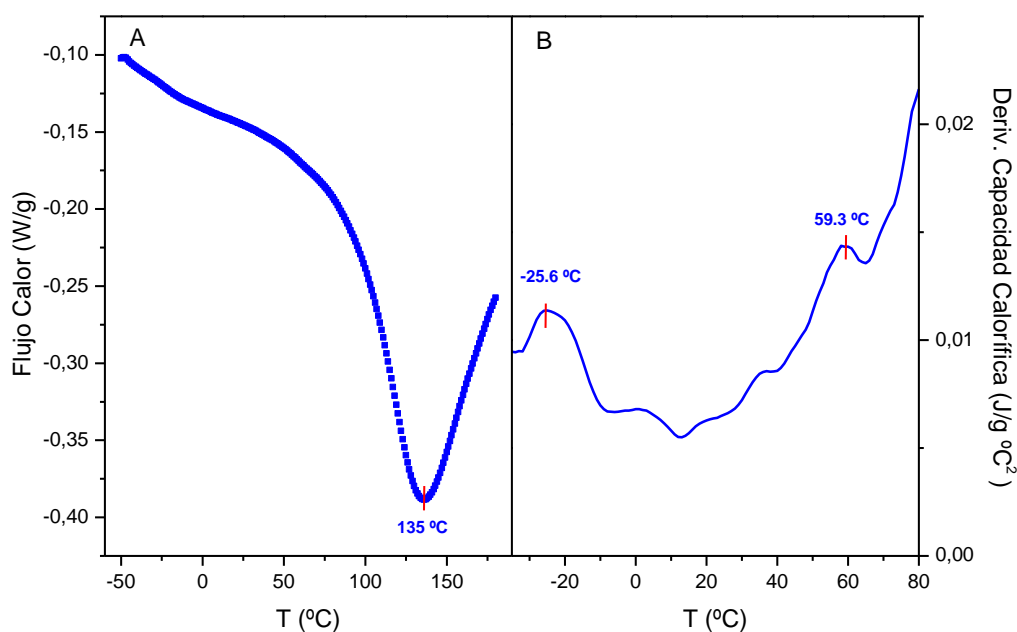


Figura 3.1.7. Perfil de DSC para bioplásticos WG/GL/agua obtenidos mediante mezclado a 25°C seguido de termomoleo a 130°C y 9 MPa (53%HR) (A) Flujo de Calor Total; (B) Derivada de la capacidad calorífica.

En la Figura 3.1.7.A no se observa la presencia de ningún cambio irreversible por debajo de 60°C. Sin embargo, un pico endotérmico de gran tamaño, que puede asociarse a la desnaturalización de la proteína, tiene lugar a una temperatura de 135°C, aproximadamente. Este valor indica que todavía se

puede alcanzar cierto grado de mejora en la estructura de la matriz, aumentando la temperatura de moldeo. A partir de estos resultados, se puede inferir que temperaturas de 130°C, o mayores, pueden ser consideradas óptimas para el proceso de moldeo con temperatura.

En el perfil de la Figura 3.1.7.B se confirma la presencia de los eventos de transición vítrea descritos para los ensayos de DMA. En este sentido, los picos observados corresponderían a los valores de T_g para la mezcla glicerol/agua ($T_{\alpha 1}$) y gluten plastificado ($T_{\alpha 2}$) respectivamente. Como se puede ver, el último valor de T_g coincide bastante bien con aquellos obtenidos para gluten plastificado a partir de los ensayos de DMA. Al igual que en este caso, en un estudio previo, citado anteriormente, también se encontró un valor de $T_{\alpha 1}$ mayor que el encontrado para glicerol puro que corresponde a -93°C (Jerez y col., 2005). Dicho aumento es probablemente causado por algunos dominios de gluten que podrían ser miscibles con la mezcla glicerol/agua, lo que daría como resultado un incremento en T_g debido a un incremento en el peso molecular promedio de esta fracción (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2009).

3.1.2.3. Influencia de la temperatura de mezclado sobre el moldeo

Una vez seleccionada la temperatura óptima de moldeo (130°C), parece interesante evaluar la influencia de la temperatura del proceso de mezclado previo al moldeo, sobre las probetas de bioplástico obtenidas finalmente. Las masas del sistema WG/GL/agua preparadas mediante mezclado a 25, 60 y 90°C (estudiadas en el apartado 3.1.1) se someten a moldeo a 130°C y 9 MPa durante 10 minutos. Los ensayos de DMA realizados sobre las probetas obtenidas bajo dichas condiciones se presentan en la Figura 3.1.8. A medida que aumenta la temperatura de mezclado se produce un ligero incremento de E' . Este efecto también puede apreciarse en la Tabla 3.1.11., en la que se presentan, entre otros parámetros, los valores de E' en la región plateau, E'_{\min} , (dónde tal incremento es más patente) y la temperatura a la cual se alcanza el mínimo, T_{\min} , en función de la temperatura de mezclado.

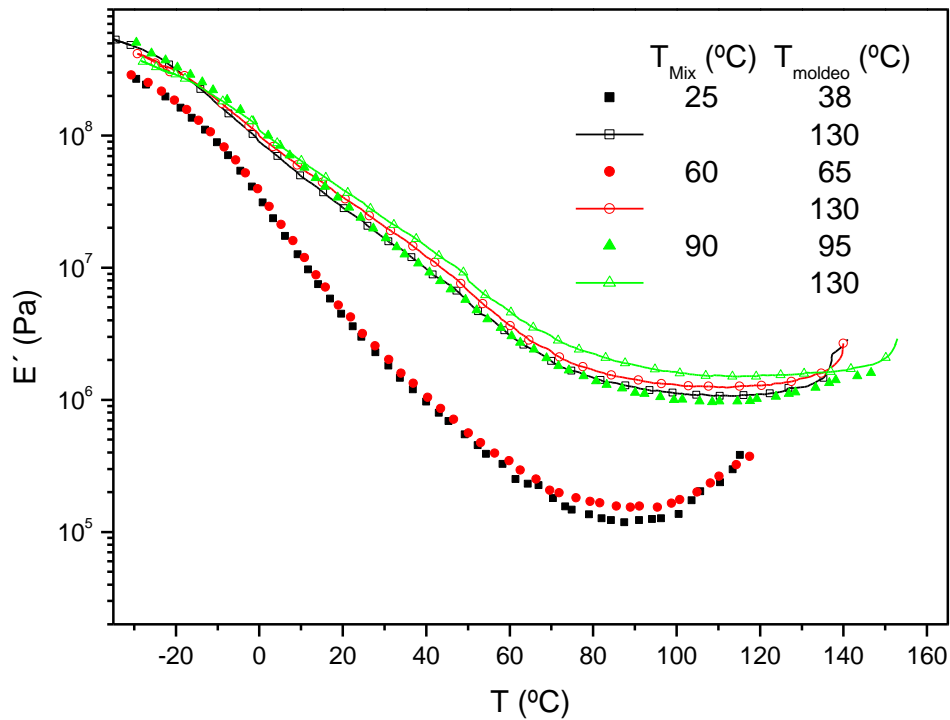


Figura 3.1.8. Dependencia del módulo E' con la temperatura para los bioplásticos WG/GL/agua en función de la temperatura de mezclado (T_{Mix}) y de la temperatura de moldeo (T_{moldeo}), valores obtenidos a partir de ensayos de DMA.

La Figura 3.1.8 y la Tabla 3.1.11 muestran también los resultados de las medidas de DMA para las probetas obtenidas bajo las condiciones descritas anteriormente, pero realizando el moldeo a la temperatura final alcanzada en el proceso de amasado. Como se puede observar, E' no presenta diferencias significativas cuando ambas temperaturas, de mezclado y de moldeo, son moderadas (25-60°C y 38-65°C, respectivamente). Sin embargo, cuando las dos temperaturas aumentan hasta 90 y 95°C, E' sufre un aumento considerable, llegando al nivel de los sistemas moldeados a 130°C. Además, comparando los valores de E' de los bioplásticos moldeados a las temperaturas finales de mezclado con aquellos de las probetas moldeadas a 130°C, se puede ver que la diferencia se reduce al subir la temperatura de mezclado. Así, esta diferencia es cercana a un orden de magnitud para las temperaturas de mezclado bajas (25 y 60°C) pero se reduce a casi un 50% cuando el proceso

de mezclado se efectúa a 90°C. Estos resultados indican que el entrecruzamiento se produce principalmente en la etapa de moldeo, cuando el mezclado se realiza por debajo de los 60°C. En cambio, si se mezcla a temperaturas más altas, la mayoría de las reacciones de entrecruzamiento tienen lugar en la etapa de amasado.

Tabla 3.1.11. Parámetros de DMA para bioplásticos en función de la temperatura de mezclado y de la temperatura de termomoldeo.

T_{Mix} (°C)	T_{moldeo} (°C)	E' _{min} (MPa)	T_{min} (°C)
25	130	1,067	110
60	130	1,238	112
90	130	1,501	114
25	38	0,118	87,5
60	65	0,151	89,6
90	95	0,946	109

La Figura 3.1.9 muestra los resultados de los ensayos de tracción en los que se somete a cada probeta a un esfuerzo de tensión uniaxial hasta que se produce la rotura de la misma. Las probetas sometidas a estos ensayos de tracción fueron preparadas mediante un proceso de mezclado termoplástico seguido de termomoldeo a 9 MPa, empleando como temperatura de moldeo tanto la final de la etapa de mezclado (38, 65 o 95°C) como la temperatura de referencia (130°C). Las probetas fueron sometidas en todos los casos a un periodo de equilibrado a humedad relativa constante de 53%.

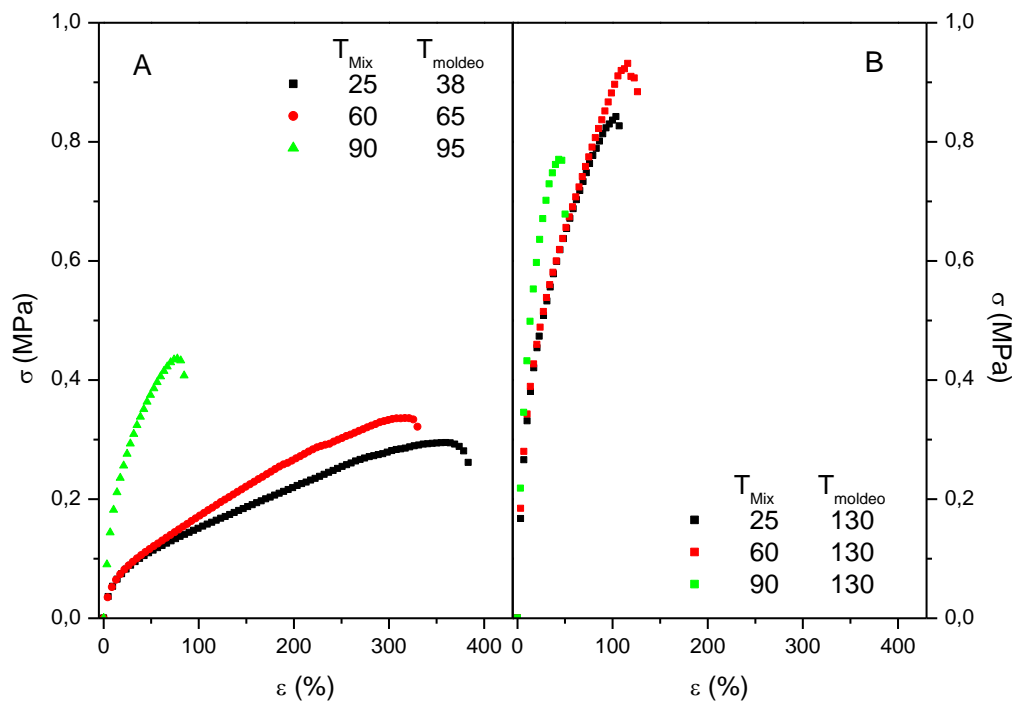


Figura 3.1.9. Curvas esfuerzo – deformación para los bioplásticos WG/GL/agua en función de la temperatura de mezclado (T_{Mix}) y de la temperatura de moldeo (T_{moldeo}), obtenidas de los ensayos de tracción. (A) Termomoldeo a la temperatura final del mezclado. (B) Termomoldeo a 130°C.

Todas las curvas esfuerzo – deformación presentan una considerable pendiente inicial, relacionada con una buena resistencia a valores de deformación bajos, seguida por un descenso progresivo de la pendiente esfuerzo – deformación hasta que alcanza un valor constante, que finalmente conduce a la ruptura de las probetas. Este punto de ruptura se caracteriza por una caída súbita en el valor del esfuerzo. Los valores inmediatamente anteriores a la ruptura proporcionan los parámetros denominados esfuerzo y deformación máximos (σ_{max} y ε_{max}). Las muestras procesadas a temperaturas de mezclado bajas presentan perfiles similares independientemente de la temperatura de moldeo usada. Sin embargo, como puede observarse en la Tabla 3.1.12, un incremento en la temperatura de mezclado conduce a un aumento en la resistencia del material a la elongación, produciendo valores de

esfuerzo máximo (σ_{\max}), así como a módulos de Young más altos (E) y a una anticipación de la deformación a la que se produce el punto de ruptura (ϵ_{\max}).

Es importante puntualizar que esta evolución en los parámetros de los ensayos de tracción con la temperatura de mezclado tiene lugar también para las probetas moldeadas a 130°C, aún cuando estas presentan perfiles en los ensayos de DMA muy similares para todas las temperaturas de amasado. En cualquier caso, una disminución en la temperatura de moldeo conduce a materiales considerablemente menos resistentes (menor σ_{\max}), que presentan mayor ductilidad (mayor ϵ_{\max}), especialmente si la temperatura de mezclado es también moderada. Así, por ejemplo, para una temperatura de mezclado de 25°C, una reducción de la temperatura de moldeo de 130 a 38°C produce una reducción de σ_{\max} del orden del 60% y un aumento de ϵ_{\max} de casi el 300%.

Tabla 3.1.12. Parámetros de los ensayos de tracción y absorción de agua de bioplásticos en función de la temperatura de mezclado y de la temperatura de termomoldeo.

T_{Mix} (°C)	T_{moldeo} (°C)	E MPa	σ_{\max}^a MPa	ϵ_{\max}^a (%)	Absorción de agua 24h (%)
25	130	7,5	0,72±0,09	92,9±17,6	62,78
60	130	8,5	0,92±0,10	118,1±16,0	54,56
90	130	10,2	0,64±0,13	30,4±9,2	47,19
25	38	1,27	0,28±0,07	370,8±33,9	81,2
60	65	1,32	0,36±0,03	353,4±55,6	74,28
90	95	3,9	0,38±0,07	57,2±17,1	48,08

^a Valor promedio ± intervalo de confianza de 95%

En resumen, los mayores valores de σ_{\max} corresponden a la temperatura de moldeo de 130°C y, entre estos, a la temperatura de mezclado de 60°C. En cambio, se pueden alcanzar mayores valores de deformación antes de la ruptura (ϵ_{\max}) empleando temperaturas de mezclado y moldeo moderadas (25°C y 38°C, respectivamente). Además, en estas mismas condiciones se obtiene también la mayor capacidad de retención de agua (Tabla 3.1.12).

Por consiguiente, se puede deducir que el uso de temperaturas de mezclado moderadas parece ser conveniente para aquellas aplicaciones que requieran materiales que exhiban una alta absorción de agua, pero que permitan conservar unas propiedades mecánicas adecuadas. En cambio, una temperatura de moldeo elevada resultará conveniente para aplicaciones que requieran materiales con un mayor grado de entrecruzamiento, de mayor resistencia mecánica pero también de menor ductilidad. Este efecto va acompañado de una reducción en la absorción de agua del orden de 20%, excepto para las probetas obtenidas de la mezcla a 90°C, en las cuales no hay diferencias significativas.

3.1.3. Estudio de la solubilidad

Es bien conocido que el tratamiento térmico conduce a una mejora en la densidad del entrecruzamiento entre segmentos de proteína a través de puentes de azufre (Schofield y col., 1983; Sun y col., 2008; Gerrard, 2002). Además, según Hernández-Izquierdo y Krotcha (2008), el uso de temperaturas de termomoldeo altas promovería una desnaturalización más extensa en la proteína lo que conduciría a un mayor entrecruzamiento y reducción de la solubilidad de la matriz de proteína. De hecho, la solubilidad de las muestras en diferentes medios proporciona una información muy útil sobre la naturaleza de las interacciones entre los segmentos de proteína inducidas por los procesos de mezclado y termomoldeo.

La Figura 3.1.10 muestra los valores del porcentaje de proteína soluble para muestras de gluten en polvo, de masa 50/18 de WG/GL/agua y de probetas de bioplástico del sistema 50/18 procesadas mediante termomoldeo a 9 MPa y

130°C. Los valores del porcentaje de solubilidad que aparecen en la figura se han calculado en relación a la cantidad total de proteína en diferentes medios de extracción (agua, solución tampón de SDS al 1% o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%).

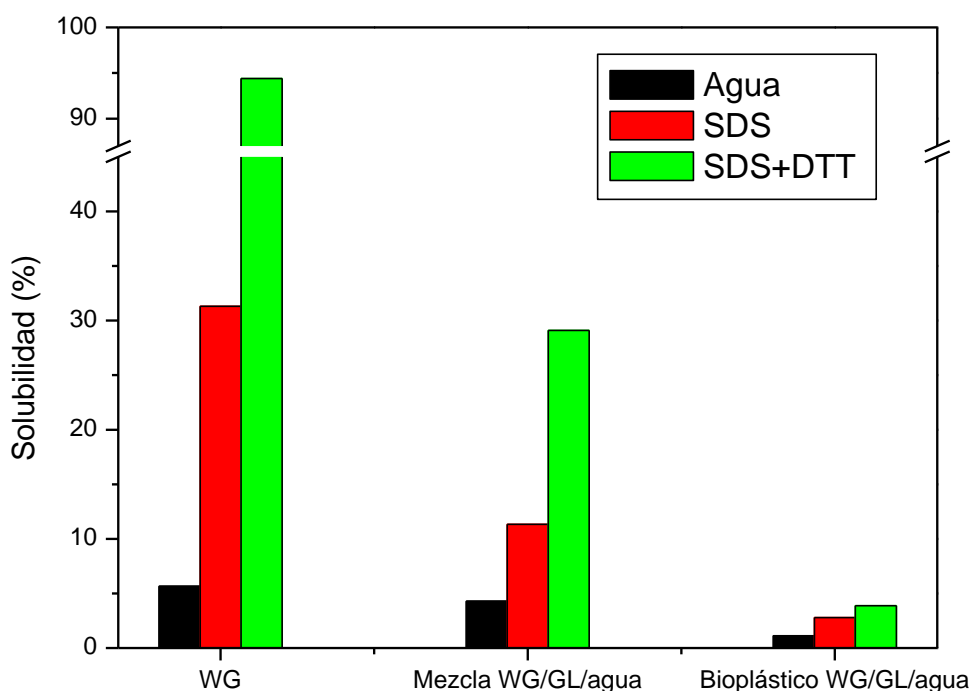


Figura 3.1.10. Comparación de resultados de solubilidad para gluten en polvo (WG), masa y probeta de bioplástico del sistema WG/GL/agua 50/18 en diferentes medios: agua, disolución tampón de SDS al 1% y disolución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%.

3.1.3.1. Solubilidad del gluten de trigo

La adición de un agente desnaturante, como el SDS, al gluten en polvo, produce un marcado aumento en la solubilidad (de 5,7 a 31,3%). Este efecto es más pronunciado si el SDS se agrega en combinación con un agente disociante como el DTT, lo que conlleva una solubilización de casi el 95% de la proteína. Los agentes desnaturantes afectan a la conformación de la proteína, ejerciendo un efecto disruptivo sobre enlaces no covalentes tales como las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Gorstein y col, 1996).

Además, el SDS también mejora la accesibilidad a los enlaces S-S, facilitando su ruptura por la acción del agente reductor (Lavelli y col., 1996).

3.1.3.2. Solubilidad de mezclas Gluten/Glicerol/agua

La etapa de mezclado produce escaso efecto sobre la solubilidad de la proteína en agua, pero contrariamente conduce a una reducción notable de la misma en las soluciones tampón de SDS y de mezcla de SDS/DTT (alcanzando porcentajes de reducción del 64 y 70%, respectivamente). Por lo tanto, el proceso de mezclado parece inducir la formación de puentes disulfuro, tanto a partir de grupos sulfidrilo libres (grupos tiol, -SH) como del intercambio tiol-disulfuro, con una pequeña contribución de la fracción de proteína soluble. Por otro lado, la combinación de cizalla y zonas de sobrecalentamiento inducidas por la disipación de energía mecánica, podría generar otras reacciones de entrecruzamiento. Así, como sugieren Micard y col. (2001), la baja solubilidad mostrada por las proteínas después del mezclado de los sistemas WG/GL podría atribuirse a la formación de enlaces isopeptídicos. Además, de acuerdo con Pommet y col. (2003) la energía mecánica suministrada durante el amasado juega un papel importante en la pérdida de solubilidad, ya que produce una reducción significativa de la energía de activación para la formación de entrecruzamientos. Así, el descenso en el valor de dicha energía de activación estimado por estos autores, bajo la acción de la cizalla, es de una quinta parte con respecto al valor que se obtiene en condiciones de reposo.

3.1.3.3. Solubilidad de probetas Gluten/Glicerol/agua

Los bioplásticos termomoldeados presentan muy baja solubilidad en agua que, no obstante, mejora notablemente tras la adición de SDS. Sin embargo, al agregar DTT no se detecta ninguna mejora significativa de la capacidad de extracción proteica. En cualquier caso, la solubilidad es menor al 3%p/p. Estos resultados confirman la participación de reacciones de polimerización de las proteínas de gluten inducida durante el proceso de termomoldeo como consecuencia del efecto combinado de presión y temperatura.

El efecto de la temperatura sobre las proteínas del gluten ha sido recientemente revisado por Lagrain y col. (2010), quienes informaron de la existencia de reacciones de entrecruzamiento entre segmentos de proteína entre 50 y 130°C. De acuerdo con Schofield y col. (1983), a temperaturas superiores a 55°C, el tamaño molecular de la glutenina aumenta, lo que conduce a una pérdida de solubilidad de la proteína, que relacionan con el aumento en la densidad de entrecruzamientos. Además, a temperaturas inferiores a 100°C, la oxidación de los grupos tiol puede estar involucrada en la polimerización de las macromoléculas de glutenina, tal y como postulan Weegels y Hamer (1998). También existen evidencias de la incorporación de las gliadinas en la estructura de la glutenina a través de reacciones de intercambio -SH/S-S (Singh y MacRitchie, 2004; Lagrain y col., 2005), que han de tenerse en cuenta, ya que un pequeño incremento en los niveles de enlaces S-S puede producir un gran incremento en la formación de estructura (Domenek y col., 2002).

La combinación de temperatura y presión parece conducir a la formación de entrecruzamientos permanentes que no pueden revertirse mediante agentes disociantes como el DTT. Aunque la mayoría de estos entrecruzamientos ocurre a través de la formación de enlaces S-S, también pueden producirse entrecruzamientos entre otros aminoácidos (Gerrard, 2002).

3.1.4. Influencia de la Humedad Relativa sobre las probetas moldeadas

3.1.4.1. Ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La Figura 3.1.11 muestra el flujo total de calor obtenido a partir de las medidas de DSC realizadas sobre muestras del sistema WG/GL/agua que fueron sometidas a sendos procesos de mezclado termoplástico y de termomoldeo a 130°C y 9 MPa, tras llevar a cabo un equilibrado de las mismas a humedad relativa constante. Como se puede apreciar en la figura, la humedad relativa ejerce una influencia destacable sobre los perfiles de DSC. Así, a valores de HR inferiores al 23%, dentro del rango experimental de temperatura, no se observa la aparición de ningún pico endotérmico que, sin embargo, aparece claramente por encima de dicho valor. Al aumentar HR, el pico endotérmico,

que se asocia a la desnaturalización de la proteína, se vuelve más pronunciado, desplazándose hacia valores de temperatura menores. Este efecto puede también apreciarse en la Tabla 3.1.13 que presenta los valores de dicho mínimo endotérmico de temperatura en función de la humedad relativa.

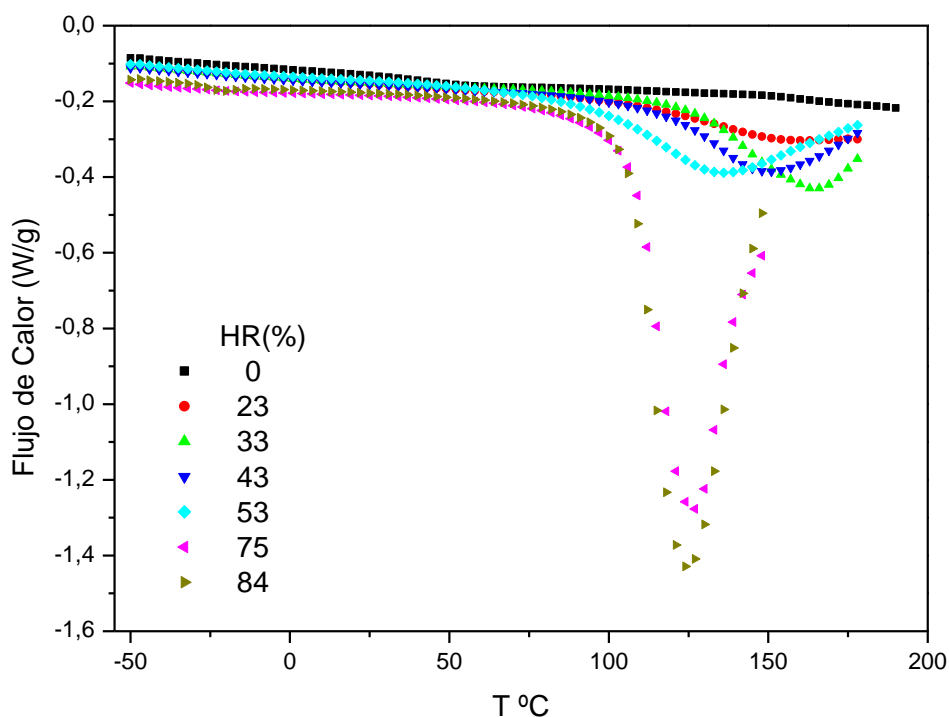


Figura 3.1.11. Pérfil de DSC para bioplásticos WG/GL/agua obtenidos mediante mezclado a 25°C y termomoldeo a 130°C y 9 MPa, en función del porcentaje de humedad relativa (%HR).

Conviene recordar que los especímenes WG/GL/Agua se prepararon a 130°C debido a que los resultados de los análisis de la temperatura de moldeo (Figura 3.1.6) no mostraron mayor evolución de los módulos viscoelásticos por encima de esta temperatura. Sin embargo, tras la exposición de las muestras termomoldeadas a niveles de HR que resultan relativamente bajos, el sistema recupera la capacidad de producir un evento endotérmico. Por consiguiente, el agua parece tener la habilidad de impartir cierto grado de movilidad a las cadenas de proteína, aún después del proceso de termomoldeo. Estos resultados sugieren que la estructura de la matriz de las probetas

termomoldeadas no es completamente irreversible. Por el contrario, el agua induciría alguna evolución de las interacciones no covalentes que participan en la estructura (por ejemplo puentes de hidrógeno intramoleculares en las cadenas de proteína).

Tabla 3.1.13. Temperatura de pico endotérmico de DSC para bioplásticos WG/GL/agua obtenidos mediante mezclado a 25°C y termomoleo a 130°C y 9 MPa, en función del porcentaje de humedad relativa (%HR)

HR	T _{pico}
0	ND ^a
23	ND ^a
33	165
43	151
53	136
75	130

^a No detectable

3.1.4.2. Ensayos de DMA en probetas con diferentes valores de humedad

La Figura 3.1.12 presenta los resultados de DMA para probetas rectangulares con una relación WG/GL de 3,8 preparadas mediante termomoldeo a 130°C y 9 MPa, tras el periodo de equilibrado a diferentes valores de HR: 8,2; 53 y 75%.

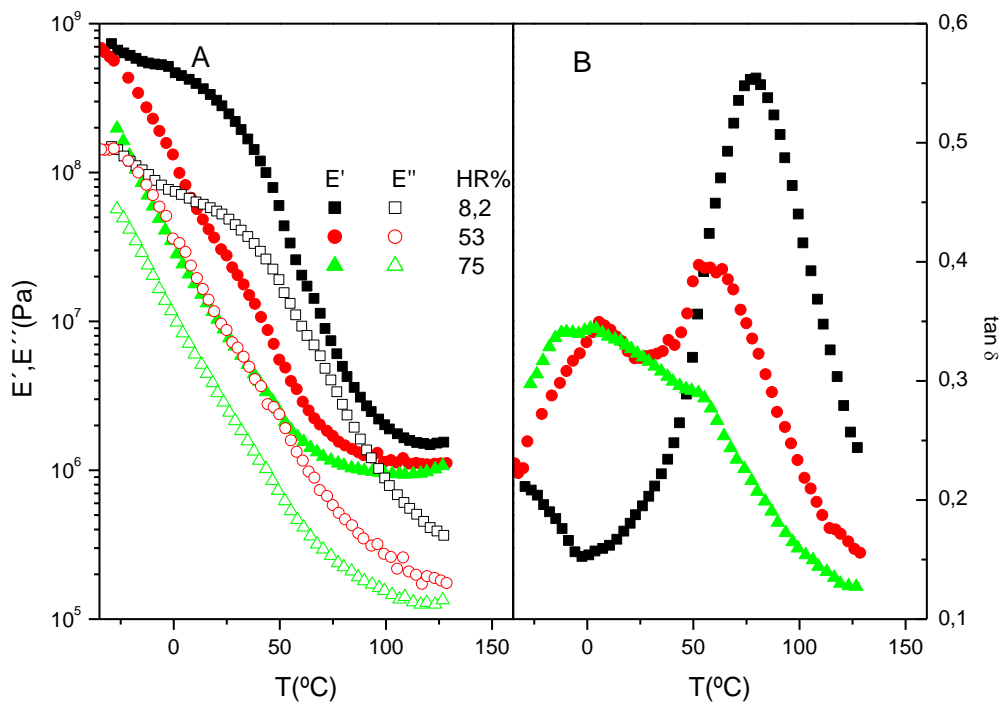


Figura 3.1.12. Dependencia de los módulos E' y E'' (A) y de $\tan \delta$ (B) con la temperatura para bioplásticos WG/GL/agua obtenidos mediante mezclado a 25°C y termomoldeo a 130°C y 9 MPa, en función del porcentaje de humedad relativa (%HR).

Los bioplásticos de gluten y glicerol muestran un carácter higroscópico altamente dependiente del contenido de glicerol. De ahí que un incremento en HR vaya acompañado de una marcada disminución en ambos módulos, E' y E'' . Tal como se podría esperar, el aumento de la temperatura durante el ensayo reduce las diferencias entre los sistemas equilibrados a diferentes valores de HR. El segundo pico en la tangente de pérdida, correspondiente a $T_{\alpha 2}$, experimenta un desplazamiento hacia valores de temperatura inferiores al aumentar HR, como consecuencia del bien conocido papel plastificante del agua cuya contribución se añade a la del glicerol. Por otro lado, la evolución de $T_{\alpha 1}$ con la humedad no se encuentra muy bien definida dentro del rango experimental de temperaturas. Así, tan sólo en el valor intermedio de HR (53%) puede distinguirse claramente el pico que le corresponde. A valores bajos de HR, $T_{\alpha 1}$ tiende a aparecer a temperaturas inferiores a -30°C. En cambio, en el

valor más alto de humedad puede apreciarse un solapamiento de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$ que sugiere la compatibilización de las mezclas gluten/plastificante, en la que deben participar tanto el agua como la glicerol.

3.1.4.3. Ensayos de tracción en probetas con diferentes valores de humedad:

En la Figura 3.1.13 se presentan los resultados de los ensayos de tracción llevados a cabo sobre probetas de bioplástico tras almacenamiento a diferentes valores de HR hasta alcanzar el equilibrio.

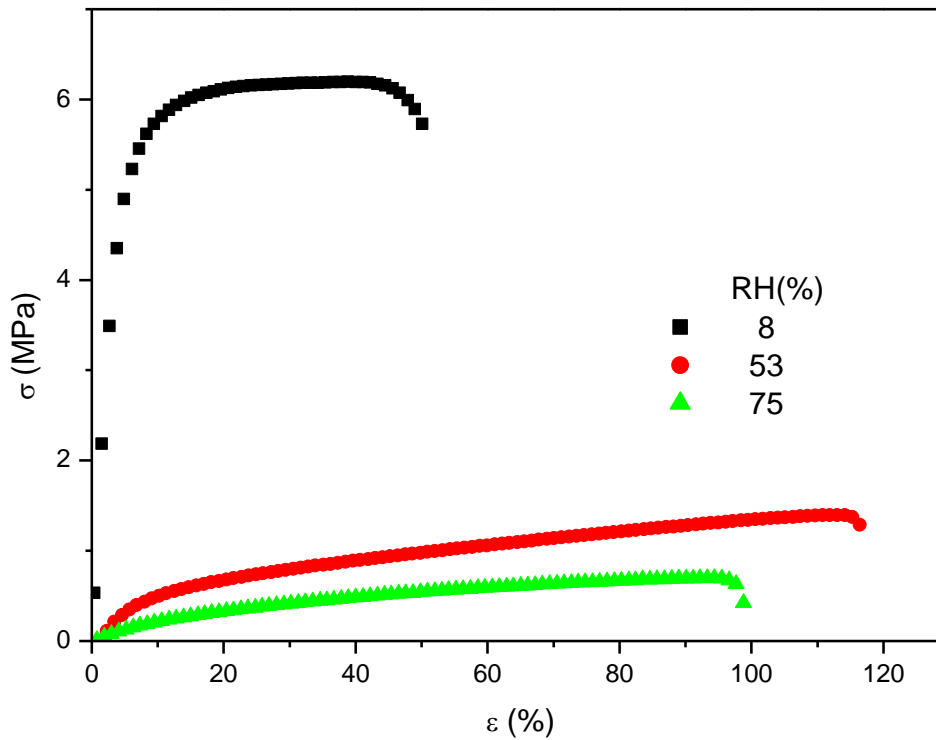


Figura 3.1.13. Curvas de esfuerzo – deformación obtenidas de los ensayos de tracción de bioplásticos WG/GL/agua obtenidos mediante mezclado a 25°C y termomoldeo a 130°C y 9 MPa, en función del porcentaje de humedad relativa (%HR).

La Tabla 3.1.14 contiene los parámetros σ_{\max} , ε_{\max} y módulo de Young, obtenidos a partir de las curvas de esfuerzo-deformación en los ensayos de tracción en función de la humedad relativa. También se presenta en dicha tabla

el contenido de agua final de las probetas después de alcanzar el equilibrio a la humedad relativa correspondiente.

Tabla 3.1.14. Parámetros de los ensayos de tracción de bioplásticos WG/GL/agua obtenidos mediante mezclado a 25°C y termomoldeo a 130°C y 9 MPa, en función del porcentaje de humedad relativa (%HR).

RH (%)	E^a (MPa)	σ_{max}^a (MPa)	ε_{max}^a (mm/mm)	Humedad^a absoluta (%)
8,23	158,46 ± 7,08	6,43 ± 0,21	0,48 ± 0,20	6,27 ± 0,09
53	5,85 ± 0,68	1,60 ± 0,32	1,54 ± 0,22	13,71 ± 0,25
75	2,60 ± 0,12	0,80 ± 0,10	0,89 ± 0,04	23,30 ± 0,17

^a Valor promedio ± intervalo de confianza de 95%

Como puede apreciarse, el módulo de Young y el esfuerzo máximo son altamente dependientes del valor de HR, experimentando un marcado descenso con la misma. Sin embargo, el valor máximo de elongación muestra un crecimiento notable hasta 53% de HR, seguido por un leve descenso a la mayor humedad relativa medida. En general, un incremento en HR favorece la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y los segmentos de proteína, confiriendo una mayor movilidad a la matriz del biopolímero y contribuyendo de este modo a una mayor elongación, aunque también a una menor resistencia (Matveev y col., 2000; Lagrain y col., 2010).

3.1.5. Estudio de la influencia del pH

3.1.5.1. Comportamiento viscoso de masas WG/GL/agua en función del pH

En la Figura 3.1.14 se presentan las curvas de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla a diferentes valores de pH, obtenidas tras la aplicación de las correcciones de Bagley (1957) y Weissenberg –Rabinowitsch (Ralston y

Osswald, 2008), tal y como se especifica en el apartado de metodología. Las condiciones de amasado para la obtención de las mezclas objeto de estudio han sido las correspondientes al sistema de referencia (50/18, 25°C, 50 rpm), siendo la temperatura del capilar (T_{cap}) de 90°C.

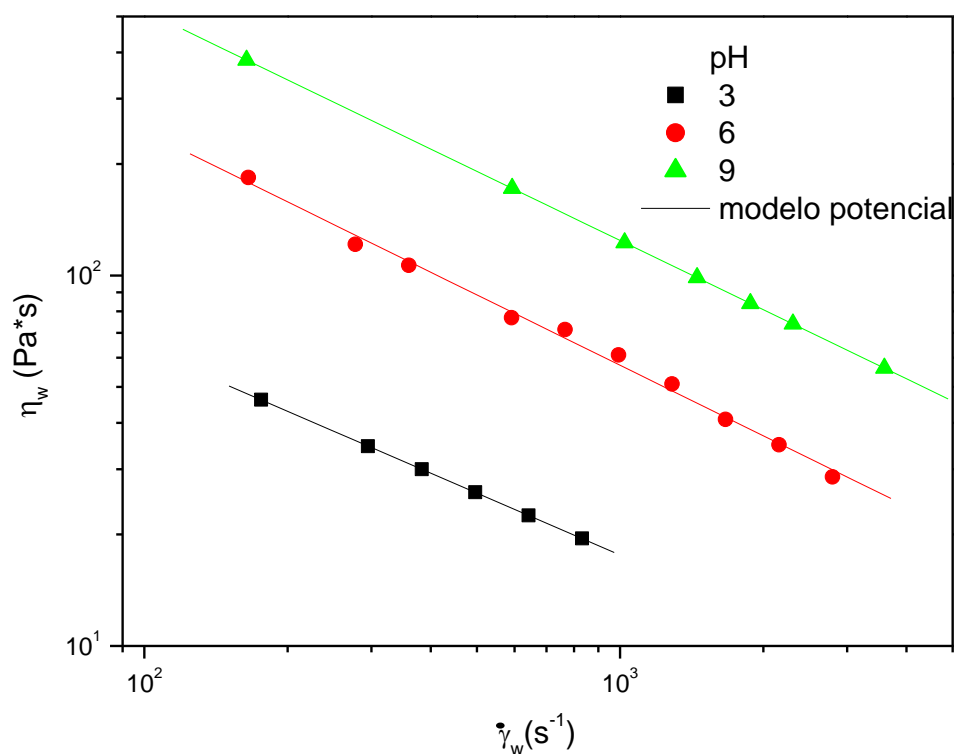


Figura 3.1.14. Valores de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para mezclas WG/GL/agua 50/18 con diferente pH (temperatura inicial de mezclado adiabático 25°C y T_{cap} 90°C).

Como se puede observar, las tres mezclas siguen un comportamiento pseudoplástico que se ajusta a una ecuación potencial (ecuación 3.1.2), cuyos parámetros se presentan en la Tabla 3.1.15. Se produce un ligero descenso del índice de flujo entre pH 3 y 6, no encontrándose diferencias significativas con el valor obtenido a pH 9. En cambio, puede apreciarse un incremento significativo de viscosidad capilar aparente al aumentar el valor de pH. Resulta especialmente pronunciado el descenso de viscosidad capilar a pH 3, que corresponde al sistema en el que las interacciones electrostáticas entre las

especies proteicas son mayores, debido a la mayor presencia de carga superficial positiva. Estos resultados parecen indicar que a este pH, el sistema presenta una menor tendencia a agregarse, lo que se traduce en una mayor facilidad para el flujo a través del capilar. Un mayor grado de agregación se encuentra a pH 6, en el que las proteínas presentes están más próximas al balance de cargas correspondiente al punto isoeléctrico, exhibiendo este sistema mayores valores de viscosidad con respecto al de pH ácido. La mezcla preparada a pH 9 presenta el mayor valor de viscosidad aparente. En dicho sistema, aunque las proteínas se encuentran menos agregadas que a pH 6, podría presentarse entrecruzamiento inducido por la cizalla y el calentamiento del capilar. El entrecruzamiento favorecido por el medio alcalino, conduciría a una mezcla con mayor reticulación y por tanto mayor resistencia al flujo por el capilar.

Tabla 3.1.15. Parámetros del modelo potencial para la viscosidad capilar de mezclas WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH.

Sistema	η_{1000} (Pa·s)	n (-)
WG/GL/agua pH3	17,60	0,445
WG/GL/agua pH6	57,03	0,333
WG/GL/agua pH9	124,27	0,380

3.1.5.2. Ensayos DMA para probetas de bioplástico en función del pH

En la Figura 3.1.15 se presentan los resultados de los módulos E' y E'' y de $\tan\delta$ para sistemas 50/18 procesados a partir de masas preparadas a distintos valores de pH. Las probetas de bioplásticos que muestran mayores valores de

E' y E'' corresponden a las masas preparadas a pH alcalino, en las que las proteínas de gluten presentan cargas negativas, ya que el pH es superior al punto isoeléctrico. Por el contrario, la presencia de cargas positivas del gluten en las masas preparadas a pH ácido (inferior al pI) conduce a materiales bioplásticos con valores inferiores de ambos módulos. También existe una diferencia evidente en los perfiles de $\tan \delta$ obtenidos a pH ácido, en los que se produce un solapamiento de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, similar a lo que sucedía al aumentar la humedad relativa. De hecho, al igual que con el efecto de la humedad, puede observarse cierta tendencia al aumento de $T_{\alpha 1}$ y al descenso de $T_{\alpha 2}$.

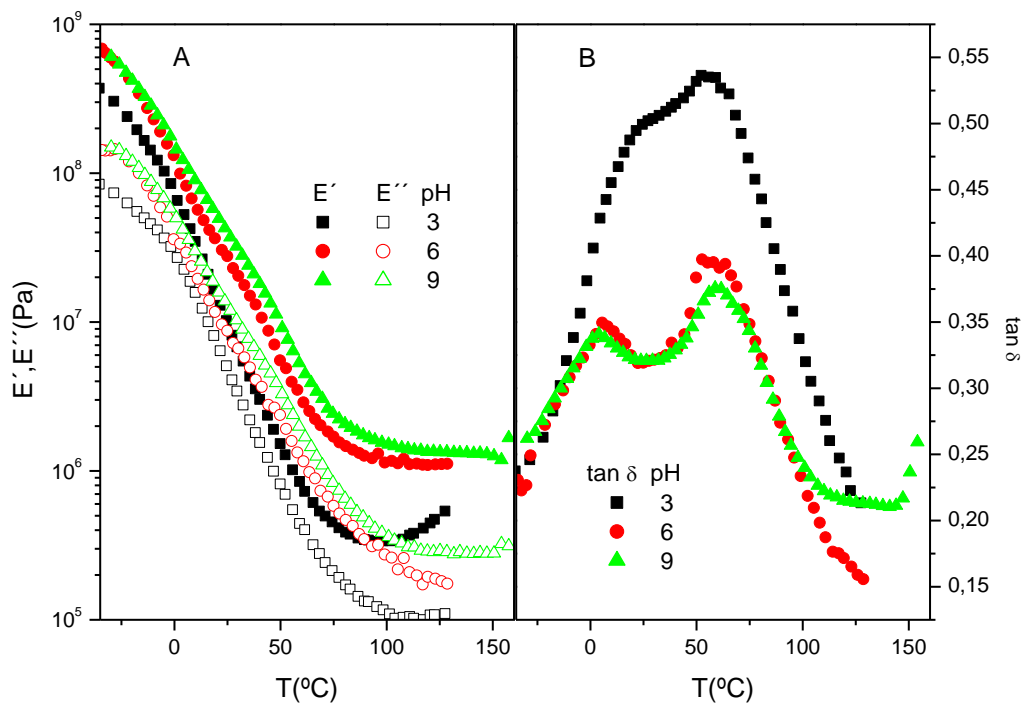


Figura 3.1.15. Ensayos de DMA en probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH (A) Módulos elástico E' y viscoso E'' ; (B) tangente de pérdidas ($\tan \delta$).

Estos resultados, unidos al aspecto visual de las probetas conducen a pensar que este sistema retiene una mayor cantidad de agua durante el procesado termomecánico. Para comprobar esta suposición se llevó a cabo la preparación de probetas a partir de masas en las mismas condiciones de pH pero con menor cantidad de agua añadida durante el mezclado (del orden del 10%).

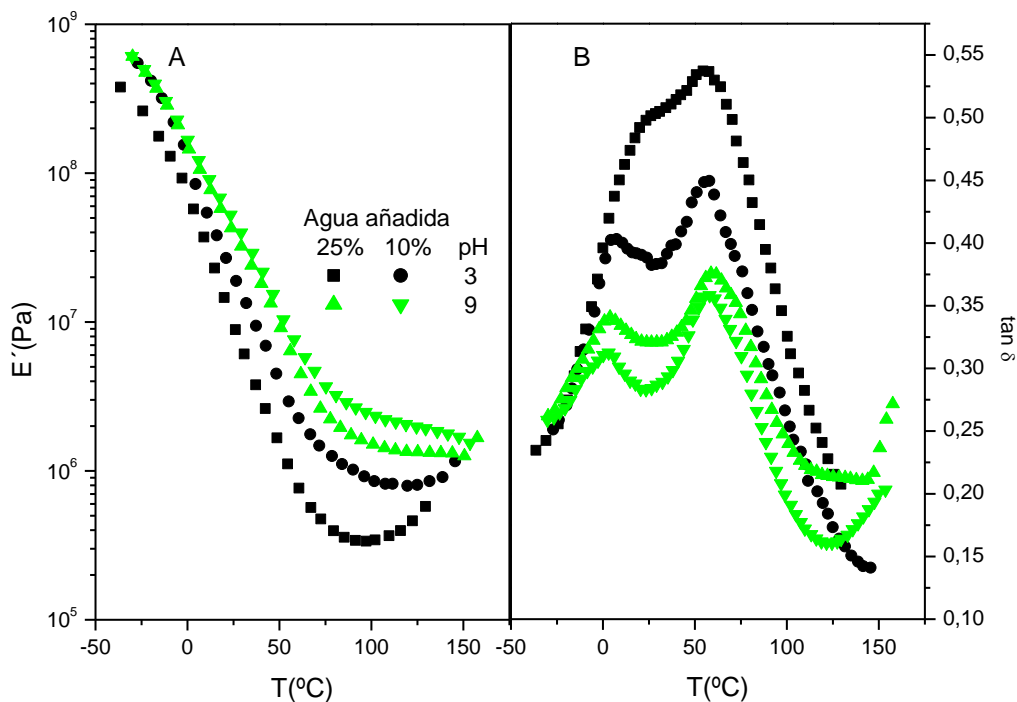


Figura 3.1.16. Ensayos de DMA en probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH y de la cantidad de agua añadida en el mezclado (A) Módulos E' y E'' ; (B) tangente de pérdidas ($\tan \delta$).

En la Figura 3.1.16.B, se comparan los resultados de $\tan \delta$ para estas probetas con los obtenidos anteriormente (correspondientes a un 25% de agua añadida durante el mezclado). Para mayor claridad, sólo se muestran resultados a pH 3 y 9, si bien los resultados a pH 6 son muy similares a los de pH alcalino. Como puede observarse, la diferencia es muy pequeña a pH 9 (al igual que a pH 6), sin embargo, a pH 3, se produce una clara separación de ambos picos, $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, cuando la cantidad de agua añadida durante la preparación de las masas es inferior. Este efecto, va además acompañado de una mejora notable del aspecto de las probetas que resultan visualmente mucho más homogéneas. Por consiguiente, podría concluirse que, si el proceso de termomoldeo se lleva a cabo en condiciones ácidas, resulta conveniente agregar una menor cantidad de agua durante la preparación de la mezcla.

3.1.5.3. Ensayos de tracción para probetas de bioplástico en función del pH

En la Figura 3.1.17 se presentan curvas de esfuerzo-deformación representativas, obtenidas de los ensayos de tracción de probetas de bioplástico del sistema de referencia 50/18 obtenidas mediante termomoldeo a partir de mezclas preparadas a distintos valores de pH. De nuevo, puede observarse que la probeta preparada a partir de la mezcla de menor pH (con mayor presencia de interacciones electrostáticas) es la que presenta los menores valores de tensión.

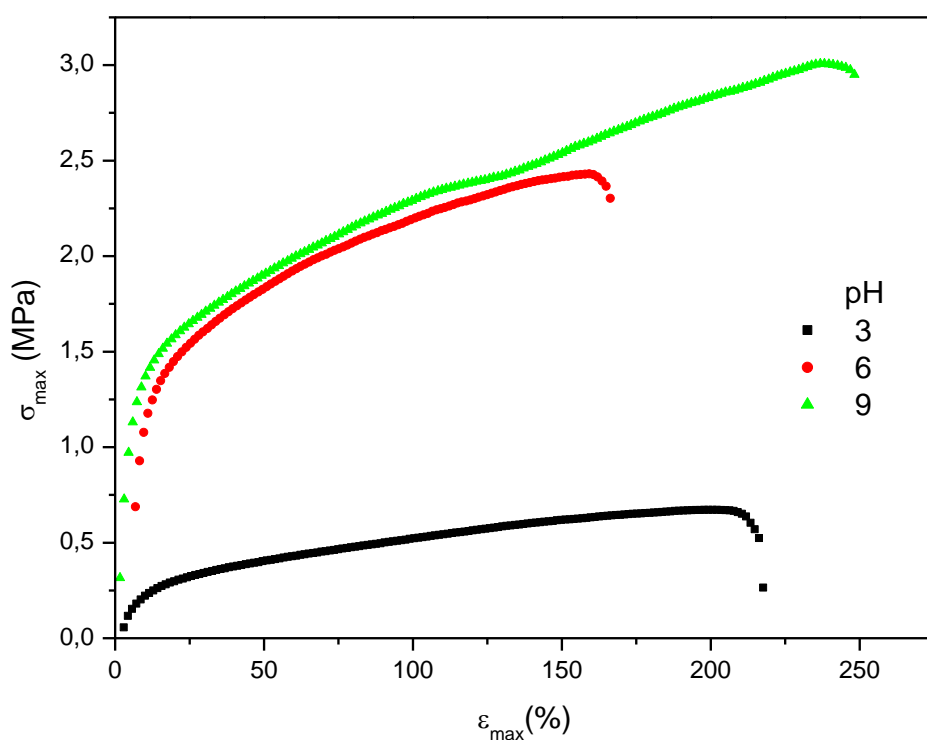


Figura 3.1.17. Curvas esfuerzo-deformación para los bioplásticos WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH obtenidas de los ensayos de tracción.

En la Figura 3.1.18 se representan los parámetros σ_{\max} , ϵ_{\max} , módulo de Young y humedad de las probetas sometidas a tales ensayos en función del pH. Como puede observarse, se produce un aumento en los valores de tensión máxima y módulo de Young con el pH, siendo este incremento más significativo al

aumentar el valor de pH de 3 a 6. En contraste, los valores de deformación de las probetas preparadas a distinto pH no presentan diferencias significativas. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por Gennadios y col.(1993b), quienes encontraron un aumento en la resistencia a la tracción en películas de gluten preparadas mediante un procedimiento fisicoquímico de “casting”, a pH alcalino (9-13), con respecto a las obtenidas a valores de pH ácido (2-4). Tales autores tampoco encontraron diferencias significativas en los valores del parámetro de deformación de las películas preparadas a distintos valores de pH.

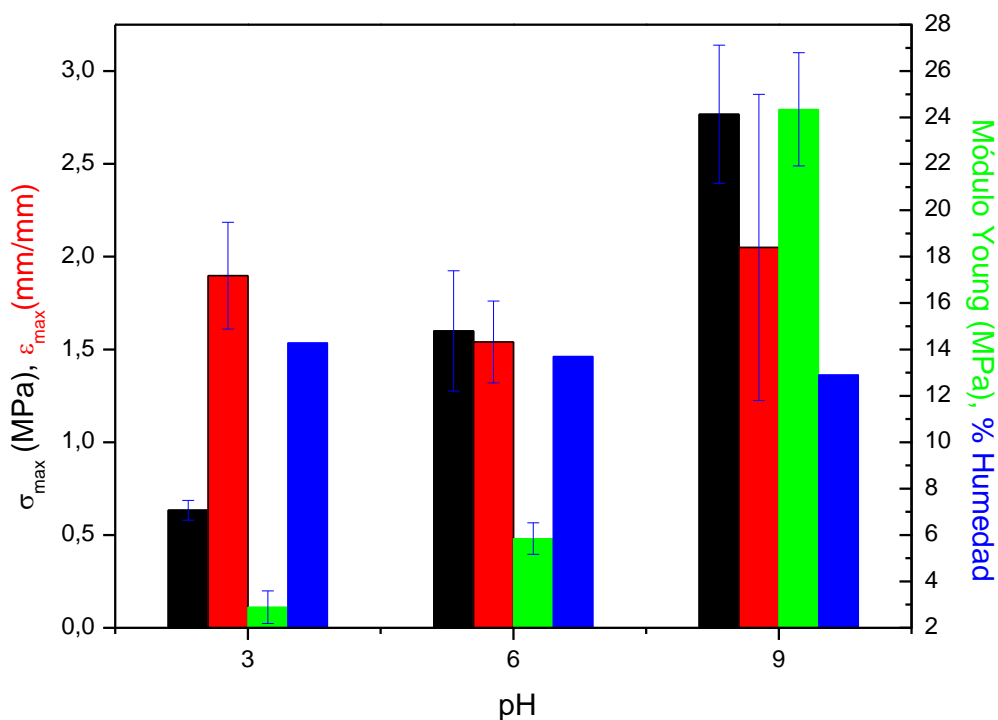


Figura 3.1.18. Resultados de los ensayos de tracción y humedad final en bioplásticos WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH.

Los bioplásticos obtenidos a pH alcalino en el presente estudio presentan una coloración pardusca, lo que coincide con los resultados de Cho y col.(2010) para películas de gluten y glicerol preparadas mediante casting a pH 11. Dichos investigadores atribuyen este fenómeno a una reacción de pardeamiento no enzimático (Maillard) entre azúcares reductores y

aminoácidos, inducida por tratamiento térmico y/o variaciones en el pH. Es bien sabido que varios aminoácidos presentes en el gluten causan pardeamiento. La prolina y glutamina, unos de los aminoácidos más abundantes en el gluten, pertenecen al grupo que tiene una capacidad de pardeamiento intermedia, mientras que el ácido glutámico y la cisteína corresponden al grupo con baja capacidad.

Por otro lado, la cantidad de agua podría también jugar un papel importante en la influencia del pH sobre el comportamiento de materiales con gluten. La deamidación bajo condiciones alcalinas convertiría los grupos amida de la glutamina (proteína-CONH₂) en grupos carboxilato del glutamato (proteína-COO⁻), con la consiguiente reducción de los enlaces de hidrogeno dentro de las estructuras de la proteína. De este modo, mejoraría la solubilidad y capacidad de dispersión del gluten. Así, varios autores han descrito como este efecto, que tiene lugar durante el proceso de casting, favorece la formación de películas más resistentes (Gennadios y col., 1993b; Herald y col., 1995; Zhang y col., 2006b).

Trabajos recientes presentan evidencias de entrecruzamiento por enlaces diferentes a S-S, bajo condiciones alcalinas. Rombouts y col. (2010) encontraron que, a pH alcalino y 130°C, la gliadina (que no posee grupos SH libres) forma puentes disulfuro y otros tipos de enlaces en presencia de agua. Estos autores plantean un mecanismo en el que la β-eliminación de la cistina produciría cisteína y dehidroalanina (DHA). Los grupos SH libres formados y los residuos de DHA causarían entrecruzamiento mediante tres vías posibles. En la primera los grupos SH libres conducirían a reacciones de intercambio SH-SS intermoleculares, permitiendo el entrecruzamiento de la gliadina. La segunda vía serían reacciones de oxidación dónde se consumirían grupos SH y, por último, la formación de lantionina (LAN) mediante enlaces entre los residuos de DHA y los grupos SH libres. Esta última reacción llevaría a un entrecruzamiento no reversible para el DTT.

Zhang y col.(2006b) investigaron la influencia del pH sobre materiales poliméricos de gluten y agua obtenidos por el método termomecánico a valores

de pH de 4 y 11. Tales estudios revelan que el entrecruzamiento térmico es predominante; sin embargo, con una cantidad de agua suficiente y bajo condiciones alcalinas, se puede producir cierto grado de deamidación del gluten que modificaría su estructura química y su grado de agregación, favoreciendo las interacciones intermoleculares entre el agua y los componentes del gluten. El resultado sería una matriz de gluten más estable, con fuertes interacciones intermoleculares entre diferentes componentes y fases. El tratamiento térmico fortalecería el entrecruzamiento de la matriz y probablemente favorecería la aparición de reacciones de Maillard. En cualquier caso, generaría mayor resistencia mecánica en dichos materiales. Según estos mismos autores, bajo condiciones alcalinas también se produciría saponificación de los lípidos presentes en el gluten, causando un incremento en su carácter hidrofílico y promoviendo interacciones entre moléculas de proteína del gluten y de plastificante (Zhang y col., 2006b).

Por tanto, en general, podría decirse que el comportamiento mecánico de los bioplásticos del sistema de referencia 50/18 se ve influido por el valor de pH, obteniéndose una mayor resistencia del material a pH alcalino, relacionado con cierto grado de deamidación del gluten que favorecería las interacciones intermoleculares entre el agua y los componentes del gluten y la formación de una matriz de gluten más estable. El tratamiento térmico fortalecería el entrecruzamiento de la matriz favorecido por reacciones de Maillard, intercambio SH-SS, oxidación de los grupos SH y/o de formación de LAN.

3.1.5.4. Ensayos de absorción de agua para bioplásticos en función del pH

En la Figura 3.1.19 se comparan los porcentajes de absorción de agua y pérdida de material soluble para probetas de bioplástico del sistema 50/18 para los tres valores de pH seleccionados. Se puede apreciar claramente que los bioplásticos absorben mayor cantidad de agua a pH ácido, tal fenómeno se ve acompañado por una mayor pérdida de material soluble e incluso de integridad en las probetas. Los menores valores en las variables examinadas se obtienen para el sistema a pH 6. En condiciones alcalinas se observa un aumento en los

porcentajes de absorción de agua con respecto al sistema a pH6, si bien este no llega a ser tan significativo como en el caso del pH ácido.

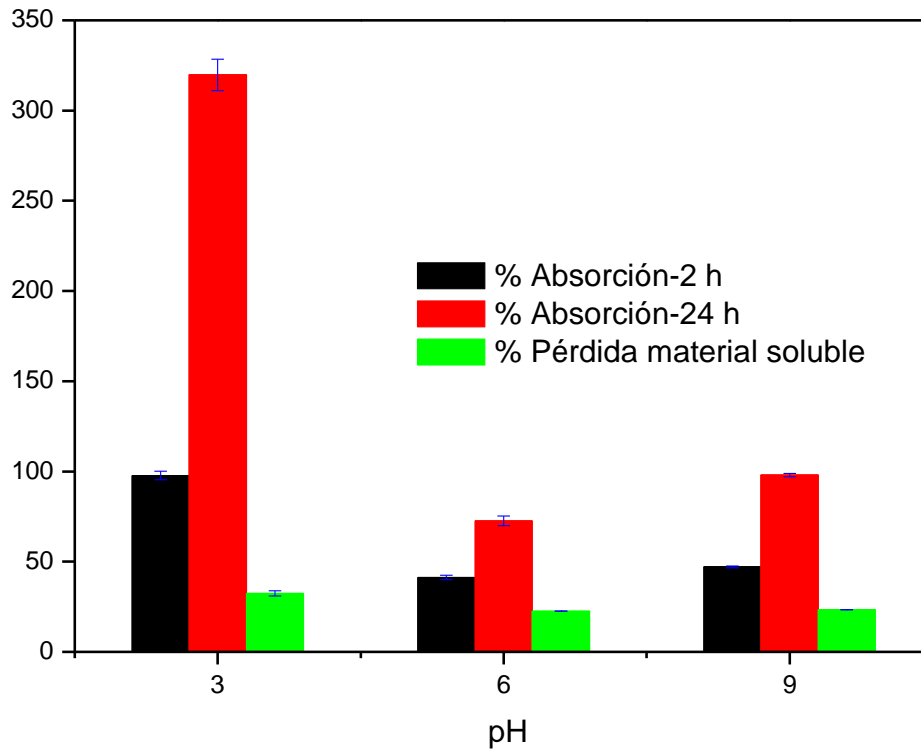


Figura 3.1.19. Resultados de los ensayos de absorción de agua en probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH.

Este comportamiento podría deberse a que los bioplásticos formados bajo condiciones ácidas presenten una matriz menos estructurada, donde los componentes y fases que la integran se encuentren menos asociados entre sí, pero con mayor número de puntos activos disponibles para la formación de puentes de hidrógeno. Así, existiría una mayor facilidad para atrapar moléculas de agua, lo cual coincidiría con las bajas propiedades mecánicas que presentan tales materiales. En condiciones de pH alcalino, a pesar de que el sistema parece estar más estructurado que a pH 6, las superficies de la proteína tendrían cierta carga residual que favorecería su interacción con el agua.

3.1.5.5. Estudio de la solubilidad en función del pH

En la Figura 3.1.20 se presentan los porcentajes de proteína soluble, con respecto a la cantidad total de proteína, correspondientes a muestras de gluten en polvo sometidas a extracción con diferentes disolventes (solución tampón acuosa, solución tampón con 1% de SDS o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%), preparados a diferentes valores de pH.

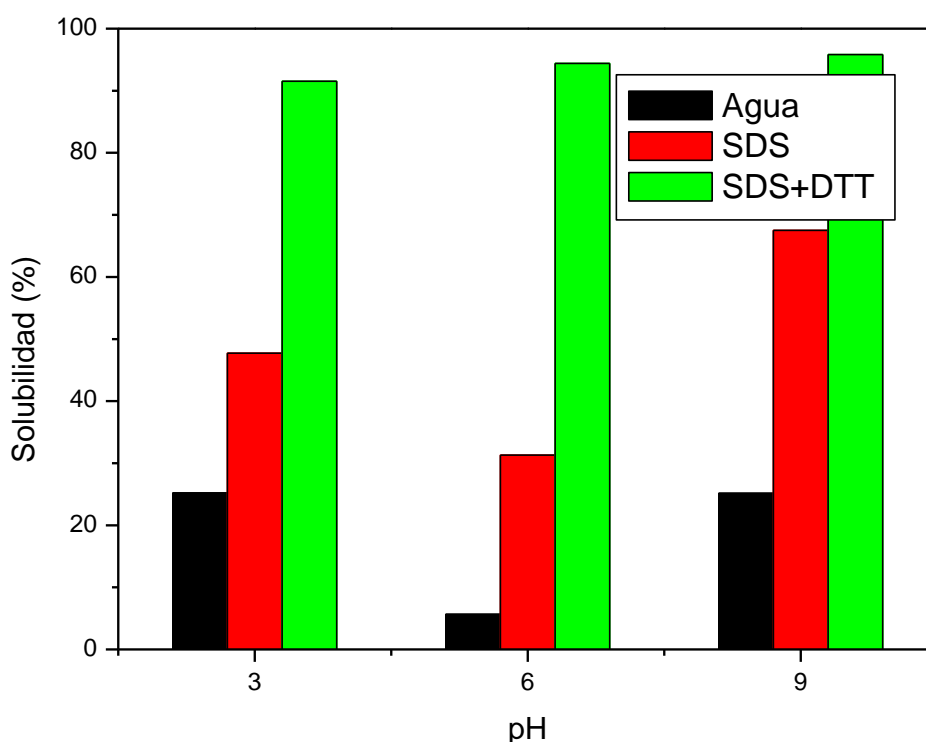


Figura 2.1.20. Solubilidad del gluten de trigo en función del valor de pH en diferentes medios: agua, disolución tampón de SDS al 1% y disolución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%.

Como cabría esperar, el valor más bajo de solubilidad de gluten en agua se obtiene a pH 6, que es el más próximo al punto isoeléctrico del gluten, en el que las cargas se encuentran compensadas y las proteínas tienden a agregarse. A valores de pH ácido y básico, el porcentaje de solubilidad en agua es superior al que corresponde a pH 6, debido a la mayor carga superficial de las moléculas de proteína que genera repulsiones electrostáticas.

Así, los valores de potencial Z para muestras de gluten a pH 3 y 9 son de $10,0\pm 0,3$ y $-33,1\pm 0,3$ mV, respectivamente.

La extracción con el medio que contiene el agente desnaturizante (SDS), que produce la rotura de enlaces no covalentes entre segmentos proteicos, tales como puentes de hidrógeno (Puppo y col., 1995), conduce a mejores resultados de solubilidad a pH 9 que a pH 3. De hecho, a pH 9, la carga neta superficial es mayor, en valor absoluto, que la que se obtiene a pH 3. Además, es bien sabido que las condiciones alcalinas favorecen la desnaturización de las proteínas (Roy y col., 2000), lo que debe conducir a una mayor densidad de puntos activos para la formación de puentes de hidrógeno. En cambio, la conformación de la molécula de proteína es más estable en condiciones ácidas (Wu y Dimler, 1964).

Cuando se emplean las disoluciones tampón de SDS+DTT como medio de extracción del concentrado de gluten, se obtienen elevados porcentajes de solubilidad para los tres valores de pH (91 a 96%), lo cual refleja la ruptura de interacciones tanto no covalentes como de enlaces S-S.

En la Figura 3.1.21 se muestran los porcentajes de proteína soluble obtenidos cuando se extraen muestras de masas de WG/GL/agua 50/18 preparadas a diferentes valores de pH, empleando como medio de extracción tres disoluciones tampón para cada valor de pH (solución tampón acuosa, solución tampón de SDS al 1% o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%). Estos resultados se comparan en dicha figura con los correspondientes porcentajes de solubilidad obtenidos empleando muestras de concentrado de gluten, presentados en la Figura 3.1.20.

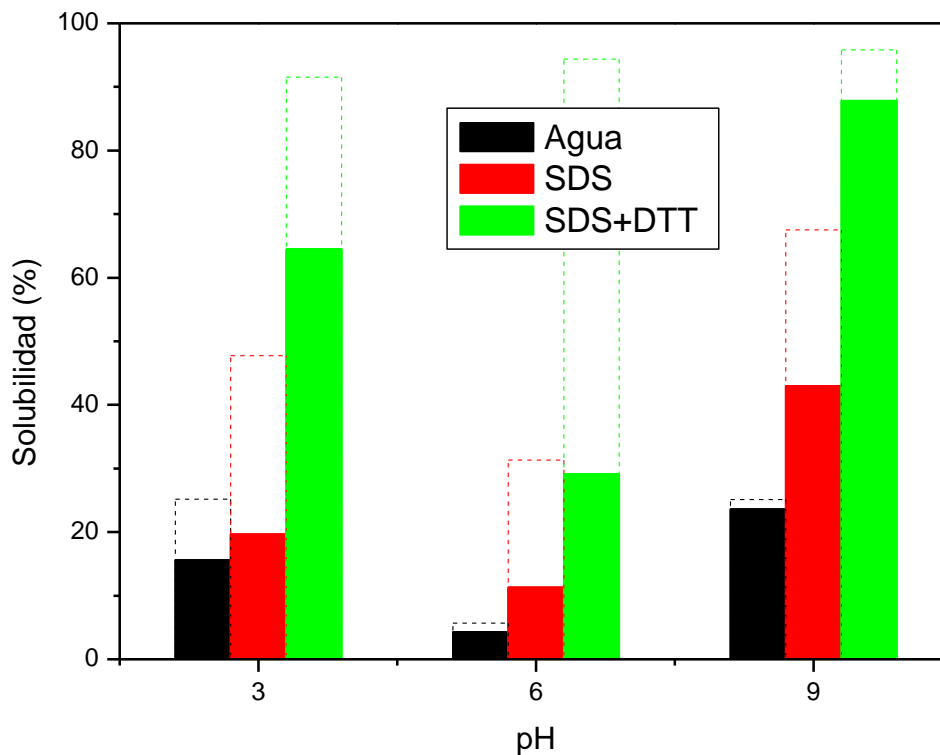


Figura 3.1.21. Solubilidad de masas WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH en diferentes medios: agua, disolución tampón de SDS al 1% y disolución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%. Las líneas discontinuas representan la solubilidad del concentrado de gluten.

El comportamiento de las masas en función del pH guarda cierta semejanza con el del gluten, siguiendo la misma secuencia que la carga superficial neta de las proteínas (marcada por el valor del potencial Z). Así, es la mezcla a pH 6 la que presenta los valores más bajos de solubilidad, seguida por la preparada a pH ácido. No obstante, en todas las masas se observa un descenso significativo en los porcentajes de solubilidad en los tres medios, con respecto a los del gluten al mismo valor de pH. La etapa de mezclado, gracias a la acción de la cizalla, parece favorecer la formación de cierto grado de estructura en las masas, que provoca una disminución en los porcentajes de solubilidad con respecto a los del gluten. Este efecto de reducción de solubilidad inducido por cizalla resulta especialmente importante para las masas procesadas a pH

6, lo que sugiere que la ausencia de repulsiones electrostáticas facilita la labor de la cizalla.

En la Figura 3.1.22 se muestran los porcentajes de proteína soluble obtenidos cuando se extraen muestras de probetas de bioplástico del sistema WG/GL/agua 50/18 preparadas mediante termomoldeo a 9MPa y 130°C a partir de mezclas de diferentes valores de pH. Como medio de extracción se emplean tres disoluciones tampón para cada valor de pH (solución tampón acuosa, solución tampón de SDS al 1% o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%). A efectos de comparación, se superponen en esta figura los correspondientes porcentajes de solubilidad obtenidos empleando muestras de concentrado de gluten y de masas, que han sido presentados previamente en las Figuras 3.1.20 y 3.1.21.

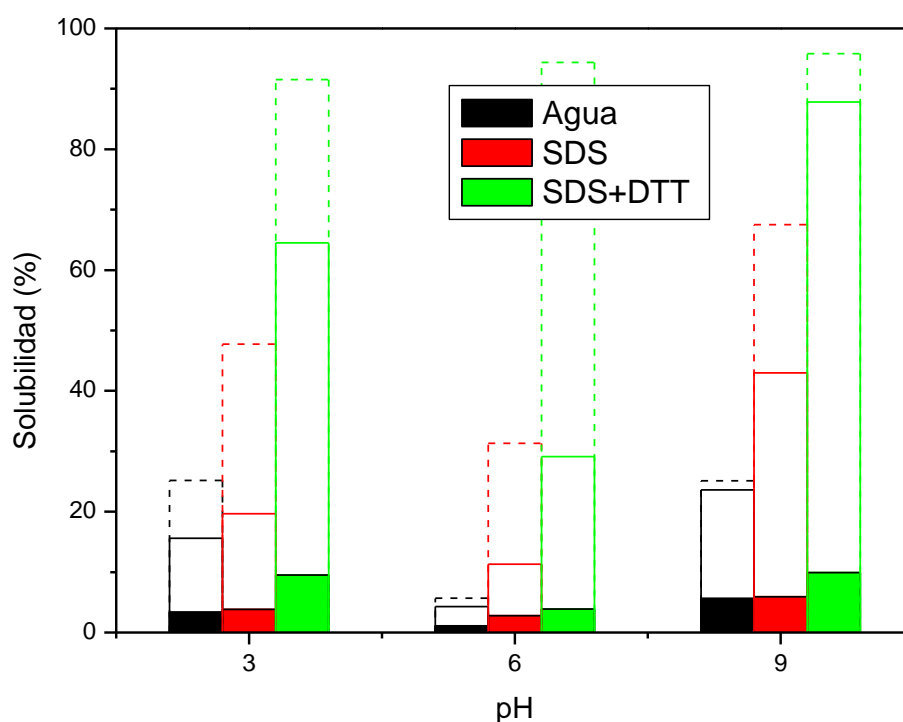


Figura 3.1.22. Solubilidad de probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función del valor de pH en diferentes medios: agua, disolución tampón de SDS al 1% y disolución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%. Las barras discontinuas corresponden al concentrado de gluten y las continuas (sin rellenar) a las masas usadas para preparar las probetas.

Independientemente del pH y del medio de extracción ensayado, las muestras de bioplástico sometidas a termomoldeo experimentan una extraordinaria reducción de solubilidad con respecto a las de concentrado de gluten y a las de las masas obtenidas tras el mezclado termoplástico. Los valores más altos de solubilidad se presentan a pH 9 y los más bajos a pH 6.

La proporción de reducción en la solubilidad con respecto a las masas es mayor en las probetas a pH 9 (76, 86 y 89% en los tres medios de extracción), a pesar de que en estas condiciones se alcanzan los valores más altos de solubilidad. Así, a pH alcalino se favorece la desnaturalización y deamidación de las proteínas, lo que favorece su solubilidad. Sin embargo las altas temperaturas favorecen ciertas reacciones de entrecruzamiento como las de Maillard o de formación de dehidroproteínas. Estos dos efectos harían que los bioplásticos a pH 9 exhibieran un mayor grado de agregación y polimerización que los obtenidos a los demás valores de pH (Olabarrietay col., 2006b).

El hecho de que las probetas preparadas a pH alcalino presenten una mayor solubilidad aparente en los tres medios, a pesar de demostrar claramente su mayor grado de entrecruzamiento, se puede deber a factores ajenos a la propia solubilidad del gluten. Ullsten y col.(2009) encontraron resultados similares para ensayos de solubilidad en extruidos de gluten en condiciones alcalinas. Dichos autores sugirieron que la saponificación de las grasas del gluten a pH básico podría ocasionar un aumento de la solubilidad en agua. No obstante, los mismos autores advierten de ciertas limitaciones del método de cuantificación del contenido proteico, que suele llevarse a cabo a través de la determinación de la absorbancia de las correspondientes soluciones, y que podrían conducir a sobreestimación de la solubilidad. Así, diferentes proteínas pueden tener coeficientes molares de absorbancia diferentes. Una posibilidad es que nuevos tipos de polímeros se formen en condiciones alcalinas, por ejemplo, las especies deamidadas comentadas anteriormente o nuevas especies formadas durante la reacción con la base. En ambos casos podría producirse una absorbancia mayor a la esperada y por tanto una mayor solubilidad aparente.

En cualquier caso, dado que en la presente investigación se emplea la medición de la absorbancia como técnica para la determinación del porcentaje de proteína soluble y que, por tanto, podría darse la hipótesis de Ullsten y col (2009), los resultados de solubilidad tras termomoldeo a pH alcalino deben ser analizados con precaución.

3.2. ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE ALDEHÍDOS AL SISTEMA WG/GL/AGUA

En el anterior apartado se caracterizó el sistema de referencia y se estudiaron las principales variables en el proceso de obtención de las probetas de bioplástico. En el presente apartado, se estudia la adición de aldehídos (formaldehído, glutaraldehído y glioxal) al sistema de referencia, aprovechando la bien conocida habilidad de estos para promover entrecruzamiento covalente tanto intra como intermolecular en las proteínas de gluten. A continuación se examinan las propiedades fisicoquímicas (reológicas, térmicas, mecánicas, solubilidad, etc.), tanto de masas como de probetas de bioplástico, de los sistemas WG/GL/Aldehído/agua en comparación con el sistema WG/GL/agua 50/18.

3.2.1. Comportamiento viscoso de masas WG/GL/aldehído/agua

En la Figura 3.2.1 se presentan las curvas de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para mezclas preparadas con diferentes aldehídos. Las condiciones de amasado para la obtención de estas mezclas han sido las correspondientes al sistema de referencia (50/18, 25°C, 50rpm), siendo la temperatura del capilar (T_{cap}) de 90°C.

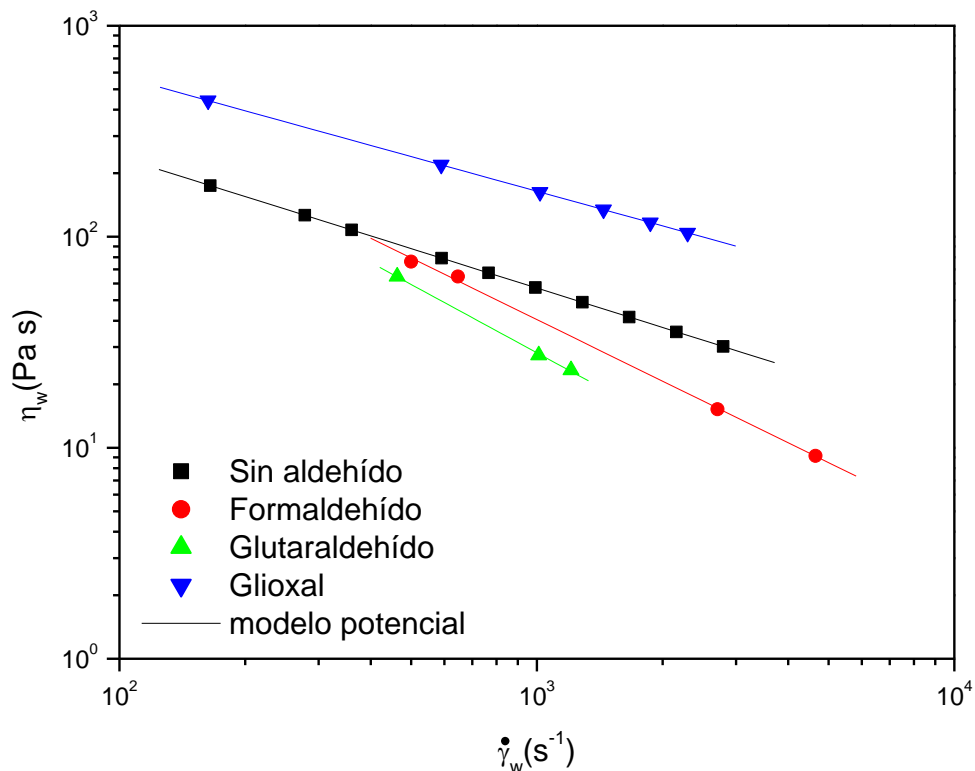


Figura 3.2.1. Valores de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para mezclas WG/GL/agua 50/18 con incorporación de aldehídos en una concentración de 3%.

Como se puede observar, las tres mezclas siguen un comportamiento pseudoplástico que se ajusta a una ecuación potencial (ecuación 3.1.2), cuyos parámetros se presentan en la Tabla 3.2.1. Cabría destacar que los valores del índice de flujo correspondientes a las masas con formaldehído y glutaraldehído no resultan significativamente distintos de cero, lo cual indica que se produce una especie de fractura durante el flujo de estas masas a través del capilar. De hecho, esta falta de cohesividad coincide con la apariencia visual de dichas mezclas que en ambos casos presenta un aspecto granulado. Además, estos sistemas presentan menores viscosidades capilares que la masa correspondiente al sistema de referencia, exento de aldehído. En cambio, con las mezclas que contienen glioxal se obtienen masas que, además de mostrar una apariencia más cohesiva, presentan valores de viscosidad capilar superiores a los del sistema de referencia. Este aumento de viscosidad debe

estar relacionado con el mayor grado de entrecruzamiento formado durante la etapa de mezclado que, sin embargo, no se manifiesta con los otros aldehídos.

Tabla 3.2.1. Parámetros del modelo potencial para las curvas de flujo capilar de la mezcla 50/18 en función del aldehído añadido.

	η_{1000} (Pa·s)	n (-)
Referencia	54,2	0,32
Formaldehído	40,4	0,03
Glutaraldehído	31,2	0,01
Glioxal	72,6	0,24

3.2.2. Ensayos de DSC en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/aldehído/agua

En la Figura 3.2.2 se muestra el flujo total de calor obtenido a partir de las medidas de DSC realizadas sobre muestras de bioplásticos del sistema WG/GL/aldehído/agua con distintos tipos de aldehído en una concentración del 3%, tras llevar a cabo un equilibrado de las mismas a humedad relativa constante de 53%. Las probetas fueron procesadas mediante mezclado termoplástico a 25°C y 50 rpm y termomoldeo a 130°C y 9 MPa. Conviene recordar que este tipo de probetas, a pesar de haber sido preparadas a 130°C, recupera la capacidad de producir un evento endotérmico tras ser equilibradas a una HR relativamente alta, como la del 53%, tal como se comentó en el apartado 3.1.2.2. Así, los perfiles obtenidos a partir de los ensayos de DSC para muestras de bioplásticos con los tres tipos de aldehídos son muy similares a los obtenidos para el sistema bioplástico de referencia. Todos ellos presentan un claro pico endotérmico a temperaturas muy similares, como se observa en la Tabla 3.2.2. Sin embargo, la adición de aldehído sí parece favorecer el evento

endotérmico que tiene lugar a alta temperatura, ya que conduce a un incremento de la entalpía de desnaturalización, sobre todo cuando se usa glioxal, al que le corresponde una mayor área del pico endotérmico. Por otra parte, la adición de glutaraldehído parece desplazar unos 6°C el pico del evento endotérmico (Tabla 3.2.2).

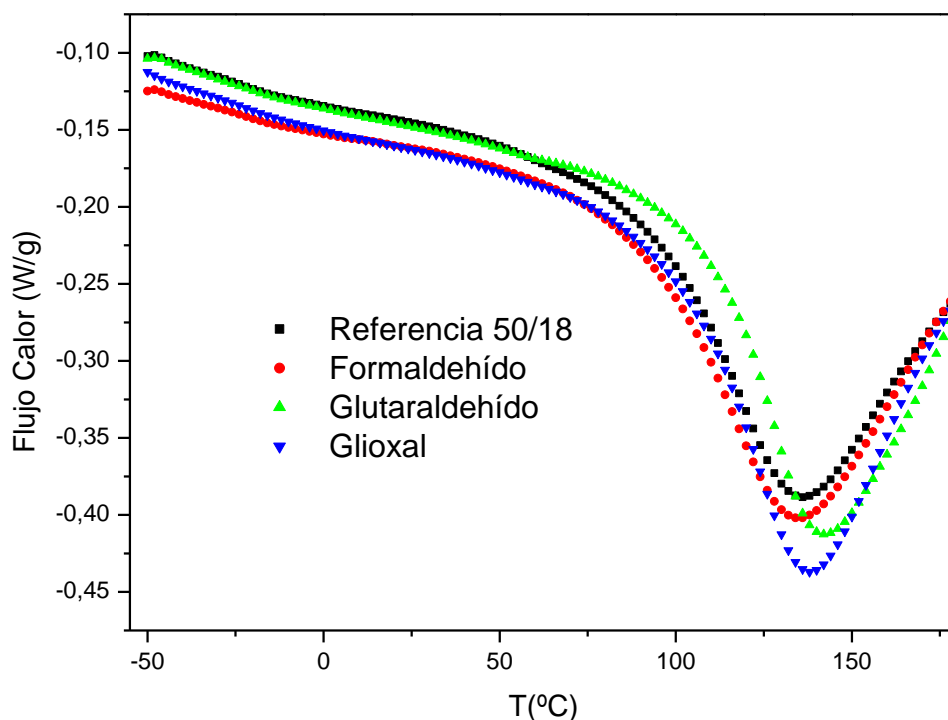


Figura 3.2.2. Perfil de DSC para probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/aldehído/agua: Flujo de calor total.

Tabla 3.2.2. Temperatura de pico endotérmico en DSC para probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/aldehído/agua.

Sistema	T _{pico}
Referencia 50/18	136
Formaldehído 3%	135
Glutaraldehído 3%	142
Glioxal 3%	138

3.2.3. Ensayos de DMA en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/aldehído/agua

3.2.3.1. Ensayos DMA en sistemas WG/GL/formaldehído/agua

La Figura 3.2.3 presenta los valores de E' , E'' y $\tan \delta$ obtenidos a partir de ensayos de DMA para bioplásticos del sistema WG/GL/Formaldehído /agua en función de la concentración de aldehído. Dicha concentración se expresa como porcentaje en peso de formaldehído con respecto a la cantidad de gluten en la masa de partida. Estas muestras se mezclaron a 25°C, se moldearon a 9 MPa y 130°C y se equilibraron a una humedad relativa de 53%. En la Figura 3.2.3 también se incluyen los resultados de DMA para probetas del sistema referencia 50/18.

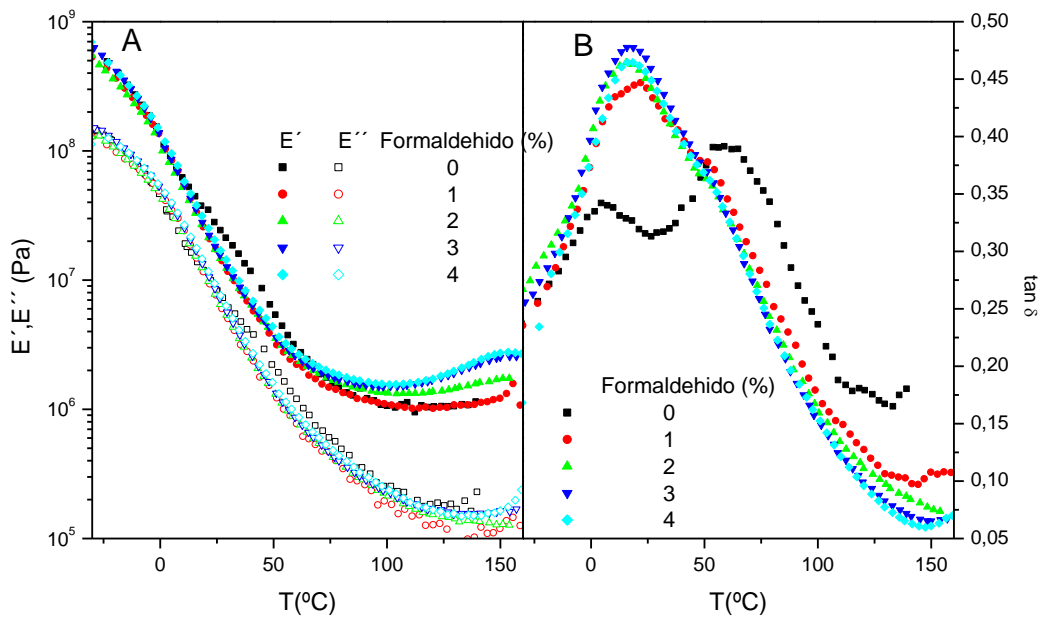


Figura 3.2.3. Ensayos de DMA en probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función de la concentración de formaldehído: (A) Módulos E' y E'' ; (B) tangente de pérdidas ($\tan \delta$).

Los perfiles de E' y E'' exhiben el mismo comportamiento para todas las muestras que contienen formaldehído. Los dos módulos disminuyen con la temperatura hasta alcanzar un valor mínimo, por encima de los 90°C, después del cual el módulo elástico E' experimenta un nuevo incremento con la

temperatura. En la Tabla 3.2.3 puede apreciarse que el valor mínimo de E' aumenta con el contenido de aldehído y tiende a desplazarse a temperaturas menores. Como puede observarse en la Figura 3.2.3.A, los bioplásticos con formaldehído presentan valores de E' y E'' muy similares a temperaturas por debajo de los 50°C, independientemente de la concentración de formaldehído. Por encima de este valor de temperatura, E' aumenta con la concentración de aldehído hasta aproximadamente 3%, a partir del cual no se aprecia una evolución significativa de dicho módulo.

En comparación con el sistema de referencia, las probetas con formaldehído muestran valores de E' menores en el intervalo de 0 a 50°C aproximadamente. Sin embargo, en la zona de altas temperaturas, no sólo presentan mayores valores del módulo elástico sino que también exhiben un mayor potencial de termoendurecimiento, tal como lo evidencia el aumento en E' en esta región. Estos resultados indican que el grado de entrecruzamiento inducido por la presencia de formaldehído aumenta con la temperatura, sobre todo por encima de la de procesamiento termomecánico (130°C).

Tabla 3.2.3. Parámetros de DMA para probetas de bioplástico en función de la concentración de formaldehído.

Concentración (%)	E'_{\min} (MPa)	T_{\min} (°C)	$T_{\alpha 1}$ (°C)	$T_{\alpha 2}$ (°C)
0	1,07	110,0	9,0	60,0
1	1,02	111,0	13,0	40,0
2	1,32	105,0	17,0	-
3	1,49	98,0	17,0	-
4	1,55	102,0	17,0	-

Como puede observarse en la Figura 3.2.3.B, las probetas del sistema de referencia y aquellas que contienen 1% de formaldehído presentan dos picos de $\tan \delta$, correspondientes a las temperaturas $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, cuyos valores se incluyen en la Tabla 3.2.3. Sin embargo, al aumentar la concentración del aldehído, tales picos se solapan en uno que se encuentra a una temperatura de aproximadamente 17°C.

Es bien sabido que el formaldehído promueve la formación de enlaces covalentes intramoleculares e intermoleculares debido a su capacidad de entrecruzar el grupo amino de la lisina así como las cadenas laterales de varios aminoácidos como la cisteína, tirosina, histidina, triptófano y arginina (Fraenkel-Conrat y Olcott, 1948). Por tanto, las reacciones de entrecruzamiento en presencia de formaldehído involucrarían todo tipo de proteínas, disminuyendo la separación de fases y aumentando la compatibilidad entre componentes, como puede observarse por el solapamiento de los picos de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$. Según Sun y col., (2007), durante el proceso de termomoldeo, además del entrecruzamiento por enlaces S-S, la presencia de aldehído introduce otro tipo de reacciones que implican el consumo de grupos amino (polares), conllevando un desequilibrio en los puentes de hidrógeno de las proteínas nativas.

3.2.3.2. Ensayos DMA en sistemas WG/GL/glutaraldehído/agua

La Figura 3.2.4 muestra la dependencia de E' , E'' y $\tan \delta$ con la temperatura en función de la concentración de aldehído, para probetas de bioplástico del sistema WG/GL/Glutaraldehído/agua, a partir de ensayos de DMA. El contenido de glutaraldehído corresponde al porcentaje en peso con respecto al gluten. Las probetas se obtienen a partir de mezclas procesadas en condiciones estándar (25°C y 50 rpm) sometidas a un proceso de termomoldeo a 9 MPa y 130°C. Las muestras se equilibran a una humedad relativa de 53% antes de realizar los ensayos.

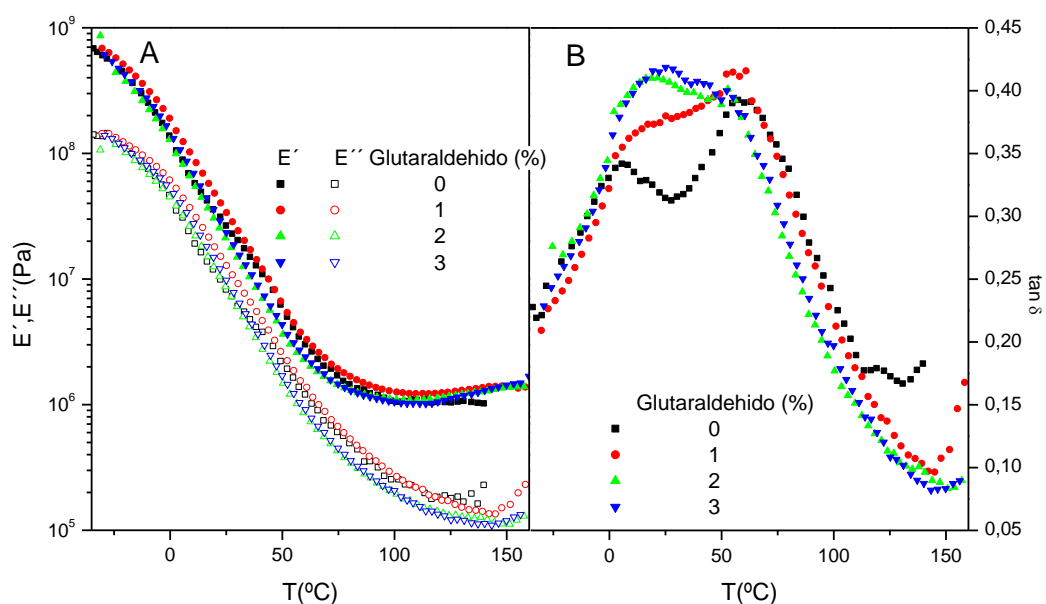


Figura 3.2.4. Ensayos de DMA en probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función de la concentración de glutaraldehído: (A) Módulos E' y E'' ; (B) tangente de pérdidas ($\tan \delta$).

De la evolución de los módulos E' y E'' para los bioplásticos que contienen glutaraldehído puede deducirse que el comportamiento de flexión de estas probetas no difiere mucho del correspondiente al sistema referencia 50/18, descrito anteriormente. Las únicas probetas que presentan valores de E' y E'' superiores al del sistema referencia, en todo el intervalo de temperaturas estudiado, son las que contienen un 1% de glutaraldehído, aunque sin diferencias significativas. Para las demás concentraciones de aldehído, se obtienen valores inferiores de E' y E'' en la región comprendida entre los 25 y 100°C aproximadamente, e iguales o ligeramente superiores en el resto del intervalo de medición. En la Figura 3.2.4.A puede detectarse cierto aumento en E' en la zona de altas temperaturas al aumentar la concentración de glutaraldehído, similar al obtenido con formaldehído, pero mucho más moderado. Como se evidencia en la Tabla 3.2.4, tanto el valor como la temperatura a la que se alcanza el mínimo en E' para los bioplásticos con glutaraldehído es muy próxima a la temperatura del plateau en el sistema sin aldehído.

Tabla 3.2.4. Parámetros de DMA para probetas de bioplástico en función de la concentración de glutaraldehído.

Concentración (%)	E'_{min} (MPa)	T_{min} (°C)	$T_{\alpha1}$ (°C)	$T_{\alpha2}$ (°C)
0	1,07	110,0	9,0	60,0
1	1,22	108,0	17,0	56,0
2	1,09	111,0	18,0	53,0
3	1,01	111,0	21,0	52,0

Esta similitud del comportamiento de las probetas con glutaraldehído y formaldehído puede apreciarse mejor en la Figura 3.2.4.B y la Tabla 3.2.4. Así, al igual que con las probetas que contenían formaldehído, se produce una tendencia al solapamiento de los picos correspondientes a $T_{\alpha1}$ y $T_{\alpha2}$ al aumentar el contenido de glutaraldehído, si bien en este caso resulta incompleto. En todo caso, la magnitud de los picos se invierte al subir la concentración por encima del 1%.

El glutaraldehído puede reaccionar específicamente con lisina, cisteína, histidina y tirosina (Tae, 1983), siendo el producto de reacción predominante la base conjugada Schiff con los grupos ϵ -amino de la lisina (Peter y Richard, 1977). La presencia de glutaraldehído aportaría nuevas reacciones de entrecruzamiento en los bioplásticos, además de las propias del proceso de termomoldeo, aumentando la compatibilidad entre las fases, como sugiere el desplazamiento en los picos de $T_{\alpha1}$ y $T_{\alpha2}$. El comportamiento de los bioplásticos con una concentración de aldehído del 1% parece ajustarse a este efecto de aumento del grado de entrecruzamiento y tendencia a la compatibilización de fases. Sin embargo, aunque el efecto de compatibilización sigue evolucionando, no parecen detectarse nuevos avances en el grado de

entrecruzamiento al aumentar la concentración de glutaraldehído, lo cual puede estar relacionado con un descenso de la probabilidad de formación de puentes de hidrógeno en las proteínas por consumo de grupos amino polares. Adicionalmente, las moléculas de glutaraldehído tenderían a polimerizarse en cadenas lineales de longitud variable, de tal modo que los enlaces entre cadenas de proteína por entrecruzamiento con el aldehído serían relativamente largos. Esto llevaría a un aumento en la distancia entre cadenas que perjudicaría a los demás tipos de enlaces (Orliac y col., 2002). Tales hechos podrían explicar la disminución de módulos y la evolución de los picos en $\tan \delta$, que se observan al incrementar el contenido de glutaraldehído por encima del 1%.

3.2.3.3. Ensayos de DMA en sistemas WG/GL/glioxal/agua

La Figura 3.2.5 representa los módulos E' y E'' , así como $\tan \delta$, en función de la temperatura para bioplásticos del sistema WG/GL/Glioxal/agua con distintos contenidos de glioxal. Tales perfiles se obtienen a partir de ensayos de DMA en probetas preparadas mediante mezclado (a 25°C y 50 rpm) y moldeo a 130°C y 9 MPa. Las muestras se mantienen a una HR de 53% hasta el equilibrio, antes de realizar los ensayos. Los valores del porcentaje de glioxal están referidos al peso de gluten en la masa de partida. También se incluyen en esta figura los resultados de DMA para probetas del sistema referencia 50/18, a modo de comparación.

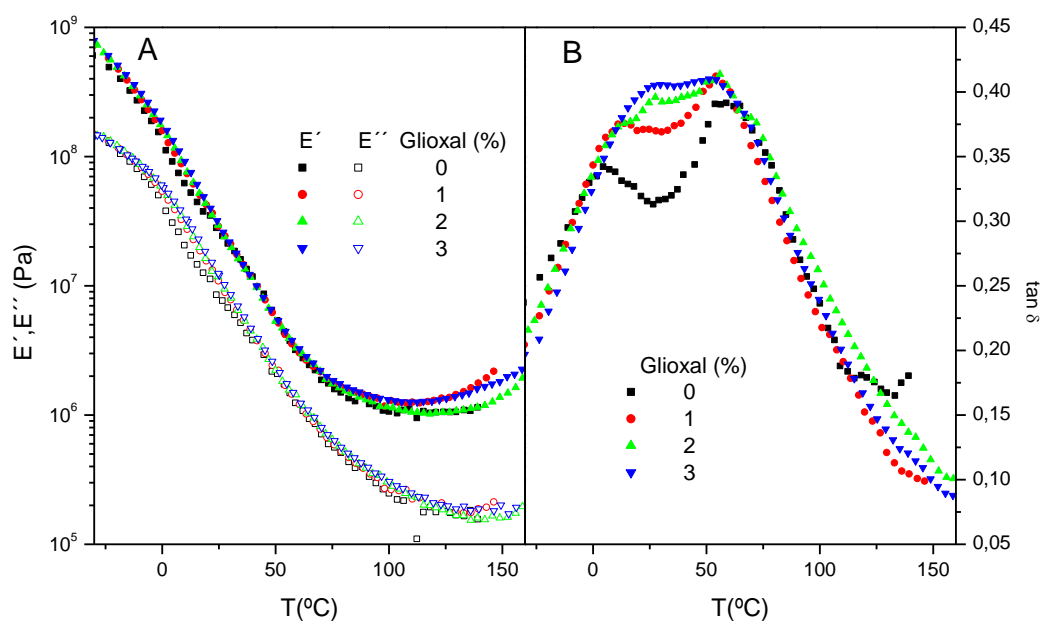


Figura 3.2.5. Ensayos de DMA en probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función de la concentración de glioxal: (A) Módulos E' y E'' ; (B) tangente de pérdidas ($\tan \delta$).

Los perfiles de E' y E'' de las muestras con glioxal son similares a los obtenidos para el sistema 50/18. En general, puede afirmarse que los valores de E' y E'' de los bioplásticos aumentan con la concentración de glioxal y son superiores a los de las probetas del sistema de referencia en la mayoría del intervalo de temperatura estudiado. Únicamente en la región correspondiente a temperaturas entre los 20 y 70°C aproximadamente, el sistema sin glioxal alcanza valores de módulos similares a los de las probetas con aldehído.

Como puede apreciarse en la Tabla 3.2.5, el valor del mínimo en E' se encuentra a temperaturas muy cercanas a los 110°C. A temperaturas por encima de este valor, el incremento en el contenido de glioxal en las probetas produce un aumento en E' , como puede observarse en la región de altas temperaturas de la Figura 3.2.5.A.

Parece existir un ligero desplazamiento en el valor de T_{\min} , así como una tendencia al aumento de los valores de los módulos con la concentración de Glioxal, sin embargo estas modificaciones no son tan claras como en el caso del formaldehído. Así, no se producen grandes diferencias entre los perfiles de

probetas con 1 y 3% de glicoxal. Este hecho parece indicar, que a una concentración del 3% de aldehído, las probetas se encuentran cerca al límite de mejora en la capacidad de termoendurecimiento al que se puede llegar mediante adición de glicoxal.

Tabla 3.2.5. Parámetros de DMA para probetas de bioplástico en función de la concentración de glicoxal.

Concentración (%)	E' min (MPa)	T _{min} (°C)	T _{α1} (°C)	T _{α2} (°C)
0	1,07	110,0	9,0	60,0
1	1,21	109,0	15,0	55,0
2	1,02	118,0	25,0	58,0
3	1,26	110,0	27,0	51,0

En la Figura 3.2.5.B y la Tabla 3.2.5 puede observarse que al incrementar el contenido de glicoxal se produce claramente una aproximación de ambos picos de tan δ, correspondientes a T_{α1} y T_{α2}, llegando casi a solaparse a la mayor concentración.

Los grupos de aldehído en el glicoxal pueden reaccionar con los grupos amino de la lisina o estructuras fenólicas de la tirosina para formar enlaces covalentes, resistentes a la hidrólisis ácida, en el entrecruzamiento de proteínas. Otras aminas primarias y grupos tiol también pueden reaccionar con glicoxal para formar enlaces químicos entre diferentes cadenas de proteína. Adicionalmente, los grupos hidroxilo del almidón (remanente en el gluten) y del glicerol, podrían tomar parte en reacciones con glicoxal para formar enlaces acetal. Bajo procesado termomecánico, estas reacciones y una condensación térmica adicional de los productos de tales reacciones, podrían formar enlaces

químicos estables y así construir una matriz de entrecruzamiento dentro de la fase de proteínas y almidón (Zhang y col., 2006a).

El aumento en los módulos E' y E'' de los bioplásticos que contienen glioxal, en comparación con el sistema de referencia, sugieren que la adición de glioxal produce un mayor grado de entrecruzamiento en las probetas de bioplástico ocasionado por algunas de las reacciones mencionadas anteriormente. La aproximación de los picos de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, sugiere una mayor interacción entre componentes y fases al incrementar la concentración de glioxal.

3.2.3.4. Influencia del tipo de aldehído sobre los resultados de DMA

A continuación se comparan los resultados correspondientes a las rampas de temperatura, en ensayos viscoelásticos lineales de flexión dinámica, de las probetas que contienen un 3% de cada uno de los tres aldehídos estudiados. En apartados anteriores, se ha considerado que para dos de ellos (formaldehído y glioxal) dicho contenido del 3% resulta adecuado para proporcionar una mejora significativa en las propiedades viscoelásticas, con respecto a las del sistema de referencia; mientras que para probetas de glutaraldehído no se ha observado una evolución clara en función de la concentración.

La Figura 3.2.6 presenta los valores de los módulos E' y E'' y $\tan \delta$ para probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/aldehído/Agua para los tres aldehídos estudiados en una concentración del 3% (con respecto a la cantidad gluten en el amasado). También se incluyen los perfiles del sistema de referencia 50/18.

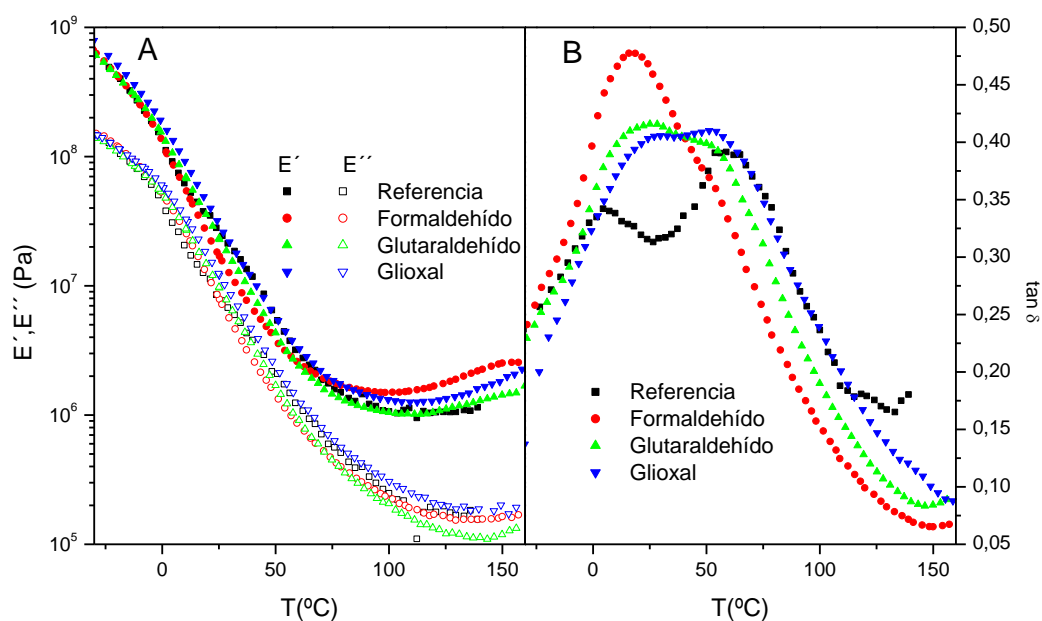


Figura 3.2.6. Ensayos de DMA en probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 en función del aldehído añadido (concentración 3%): (A) Módulos E' y E'' ; (B) tangente de pérdidas ($\tan \delta$).

Como puede verse en la Figura 3.2.6.A, a pesar de que los tres aldehídos seleccionados muestran evidencias de facilitar la formación de entrecruzamiento en las proteínas por reacciones similares (con los grupos amino de distintos aminoácidos), el sistema con glicoxal es el que parece dar origen a un sistema con una matriz que presenta un mejor comportamiento en todo el intervalo de temperaturas estudiado, con valores de E' y E'' mayores que el de referencia. Sin embargo, las probetas con formaldehído son las que presentan un mayor potencial de termoendurecimiento, seguidas de las formuladas con glicoxal, como se deduce de los valores más altos de módulos en la zona de altas temperaturas. En consecuencia, el empleo de una temperatura de procesado termomecánico (termomoldeo, extrusión, etc.) más elevada debería traducirse en una clara mejora de propiedades mecánicas en sistemas con formaldehído o glicoxal. Además, según se deduce de la Figura 3.2.6.B, el sistema con formaldehído es el que presenta el mejor solapamiento en los picos de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, y por tanto debe corresponderle el grado de compatibilidad proteína/plastificante mayor. En cualquier caso, las diferencias con el sistema sin aldehído son patentes para todos los aldehídos estudiados.

3.2.4. Ensayos de tracción en sistemas WG/GL/aldehído/agua

En la Figura 3.2.7 se muestran algunas curvas representativas de los ensayos de tracción realizados sobre probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/Aldehído/agua, para una concentración del 3% de aldehído. Las probetas con glutaraldehído y formaldehído alcanzan la ruptura a valores de σ y ε más bajos que para las muestras sin aldehído, o con glioxal. Los perfiles obtenidos con las probetas que contienen formaldehído y glioxal exhiben una discontinuidad en la región intermedia de la curva, indicando un fraccionamiento en la probeta, previo a su ruptura final.

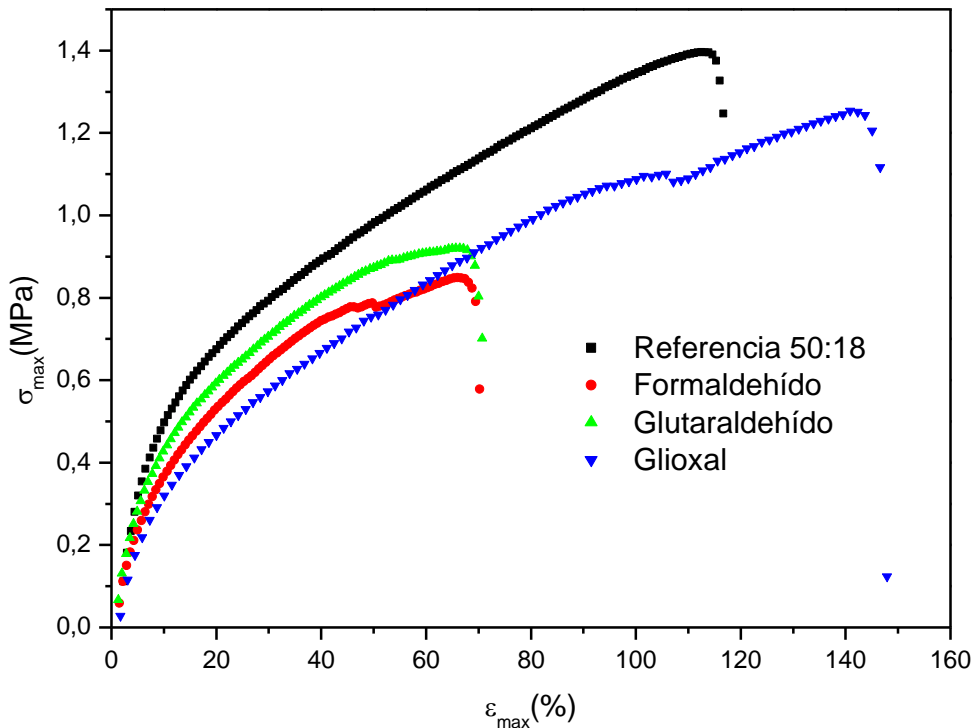


Figura 3.2.7. Curvas esfuerzo-deformación para los bioplásticos WG/GL/agua 50/18 en función del aldehído añadido (concentración 3%) obtenidas de los ensayos de tracción.

En la Figura 3.2.8 se representan los parámetros σ_{\max} , ε_{\max} , módulo de Young y humedad de las probetas de bioplástico en función del aldehído empleado. Tales valores se obtienen de los ensayos de resistencia a la tensión aplicados

a muestras con un contenido de aldehído del 3%, sometidas a las mismas condiciones de procesado y acondicionamiento (53% HR).

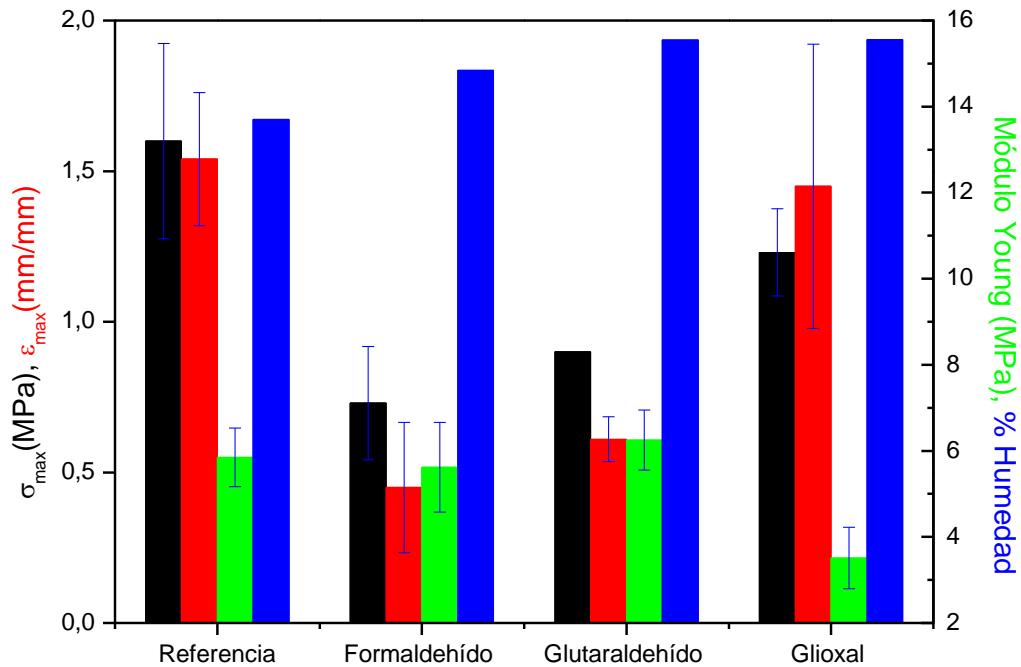


Figura 3.2.8. Comparación de resultados de ensayos de tracción y humedad final en probetas con distintos tipos de aldehídos (3%).

Entre los sistemas con aldehído incorporado, las muestras de bioplástico con glixal son las que exhiben los valores más altos de tensión máxima y deformación a la ruptura. Las probetas con formaldehído y glutaraldehído presentan valores más bajos en ambos parámetros sin que se hayan encontrado diferencias significativas entre sí. Del mismo modo, los valores del módulo de Young para estos últimos son bastante próximos y ligeramente mayores que para las muestras con glixal. Comparando con el sistema de referencia, puede decirse que las probetas sin aldehído no presentan diferencias significativas en σ_{\max} y ϵ_{\max} con respecto a las que contienen glixal. En cuanto al módulo de Young, las muestras del sistema de referencia presentan valores muy cercanos a las que incorporan formaldehído y glutaraldehído.

En este punto, cabe resaltar, que las probetas obtenidas por termomoldeo de masas con formaldehído y glutaraldehído presentan cierta heterogeneidad perceptible visualmente, lo que puede afectar negativamente a los resultados de los ensayos de resistencia a la tracción. Las probetas con glioxal presentan una mejor apariencia, es decir, menor heterogeneidad, y una coloración oscura, típica de sistemas con una participación importante de reacciones de Maillard, mientras que las del sistema de referencia 50/18 son más claras y con una apariencia visual más homogénea (Figura 3.2.9).



Figura 3.2.9. Probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 con adición de aldehídos (3%).

Algunos autores han encontrado evidencias de que el uso de formaldehído o glutaraldehído en películas de gluten favorece la formación de entrecruzamientos, mediante reacciones de grupos amino polares, dando como resultado un aumento en la resistencia a la tracción pero una disminución en la deformación a la ruptura (Herald y col, 1995; Micard y col., 2000). Los resultados del presente estudio parecen estar en desacuerdo con los observados para películas de gluten preparadas mediante casting. Sin embargo, Park y col. (2000) encontraron que la incorporación de grandes cantidades de glutaraldehído en películas de aislado de proteína de soja, obtenidas por termomoldeo, ocasionaba una disminución de tensión en la ruptura.

Durante el proceso de moldeo, al incrementar la temperatura, el sistema sería más susceptible de perder agua, dando lugar a un sistema menos uniforme y por tanto a probetas menos homogéneas y más frágiles. Esto explicaría los

bajos valores en módulos E' y E'' en DMA y de σ_{\max} y ε_{\max} en ensayos de tracción, con respecto al sistema 50/18. Por su parte, como se explicó en el apartado 3.2.3.2., el glutaraldehído podría polimerizarse provocando distanciamiento entre cadenas de proteína durante el entrecruzamiento, afectando a otras reacciones e interacciones que estabilizan la matriz.

En el caso de la adición de glioxal, la pérdida de agua durante el termomoldeo sería compensada por el mismo aldehído. Una parte del glioxal participaría en las reacciones de entrecruzamiento y otra podría quedar atrapada dentro de la estructura de proteína actuando como plastificante tal y como sugirieron Orliac y col. (2002). De ahí que las probetas de glioxal sean más homogéneas y presenten propiedades similares a las del sistema de referencia en ensayos de tracción y mayores en DMA.

3.2.5. Ensayos de absorción de agua en sistemas WG/GL/aldehído/agua

En la Figura 3.2.10 se comparan los porcentajes de agua absorbida por las probetas de bioplástico del sistema WG/GL/aldehído/agua tras 2 y 24 horas de inmersión, así como la cantidad de material que se pierde por disolución de las mismas tras 24 horas de inmersión, en función del tipo de aldehído añadido. Todas las probetas tienen un contenido de 3% de aldehído (con respecto a la cantidad de gluten en la masa) y se obtuvieron mediante mezclado (a 25°C y 50 rpm) y moldeo a 9 MPa y 130°C.

Independientemente del tipo de aldehído utilizado en la preparación de las probetas, su incorporación siempre produce un descenso de la capacidad de absorción de agua con respecto a la de las probetas exentas de aldehído. El valor más bajo del porcentaje de absorción de agua tras 2 horas de inmersión corresponde a las muestras con formaldehído, en el que se obtiene una reducción de la capacidad de absorción de agua del orden del 15%. Después de 24 horas de inmersión, se observa siempre una reducción aun mayor de dicha capacidad, con respecto al sistema de referencia, alcanzando aproximadamente un 20% para las probetas con formaldehído y glioxal y un 40% para las que contienen glutaraldehído. Si bien no se aprecian grandes diferencias en los valores de los porcentajes de pérdida de material soluble

para las probetas en estudio, la incorporación de aldehído produce un aumento significativo de dicho porcentaje, siendo las que contienen glutaraldehído las que presentan una pérdida mayor.

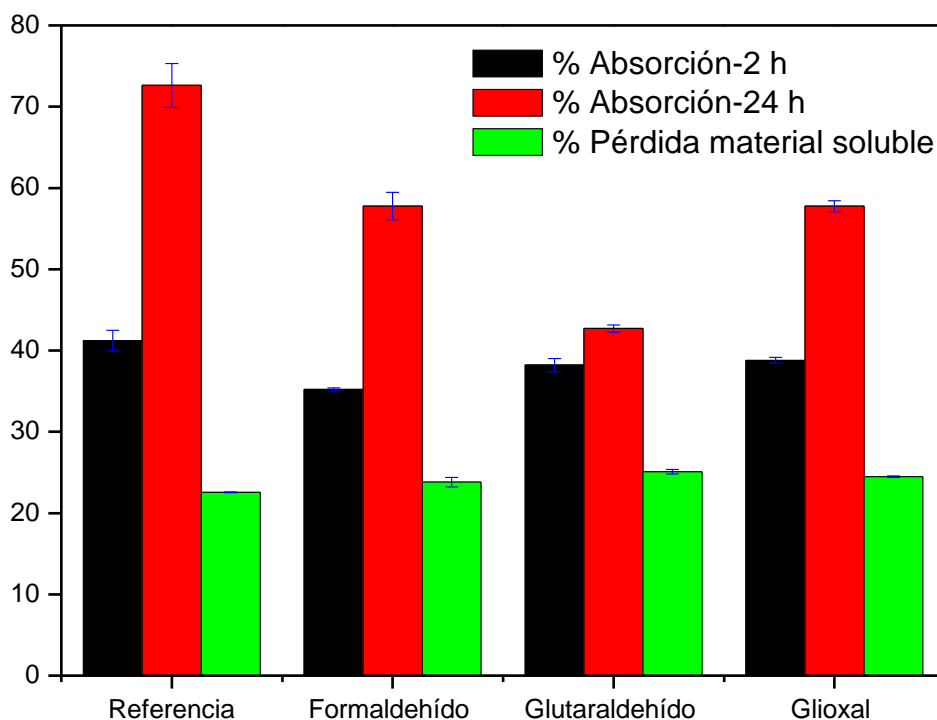


Figura 3.2.10. Comparación de resultados de ensayos de absorción de agua en probetas con distintos tipos de aldehídos (3%).

En definitiva, los resultados de los ensayos de absorción de agua en probetas de bioplástico indican un aumento en la hidrofobicidad de las muestras al adicionar aldehídos, que puede interpretarse como consecuencia de la aparición de nuevos enclaves de entrecruzamiento a lo largo de las cadenas proteicas, generados por la acción de los aldehídos durante el termomoldeo, que consumirían grupos amino reactivos (Sun y col., 2007). Tal fenómeno, unido al mayor grado de entrecruzamiento en el sistema, sería el responsable de la reducción en la absorción de agua de los bioplásticos.

3.2.6. Estudio de solubilidad de los sistemas WG/GL/aldehído/agua

En la Figura 3.2.11 se representan los valores de los porcentajes de proteína soluble sobre la cantidad total de proteína obtenidos cuando se extraen muestras de masas de WG/GL/aldehído/agua preparadas con diferentes tipos de aldehído, empleando como medio de extracción tres disoluciones tampón para cada tipo de masa (solución tampón acuosa, solución tampón de SDS al 1% o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%). Todas las masas tienen un contenido de 3% del aldehído seleccionado con respecto a la cantidad de gluten y se prepararon mediante mezclado a 25°C y 50 rpm. En este caso, se han detectado importantes sobreestimaciones de la cantidad de proteína soluble debido a interferencias del color de los sistemas con glutaraldehído y glicoxal. Por ello, se ha preferido utilizar un método de análisis elemental, mediante un analizador LECO (Modelo CHNS 93), que aunque resulta algo menos preciso, evita las interferencias del método colorimétrico.

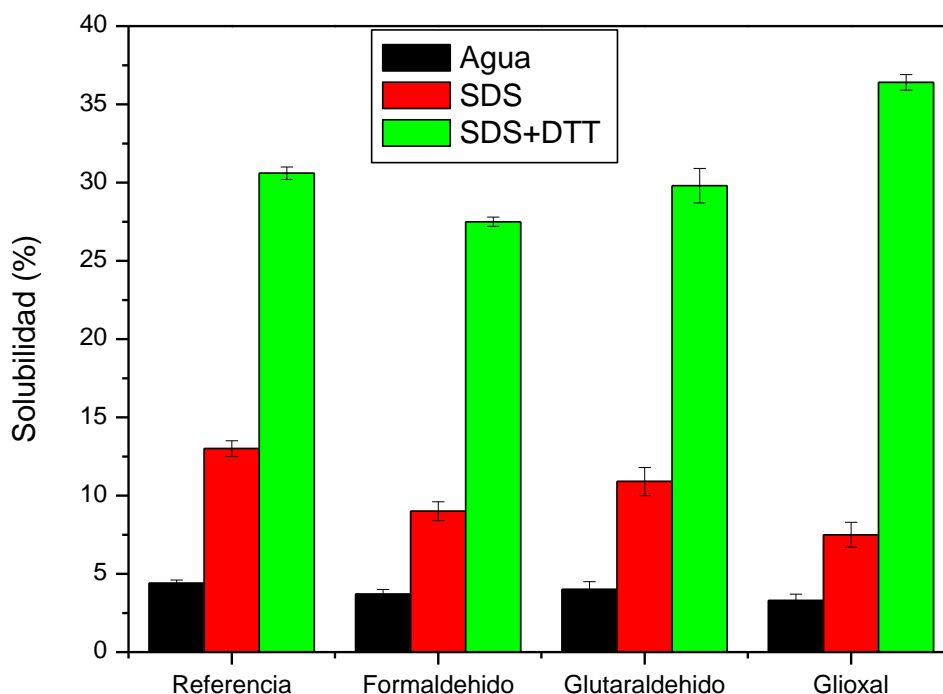


Figura 3.2.11. Comparación de resultados de solubilidad para masas con distintos tipos de aldehídos (3%) en diferentes medios: agua, disolución tampón de SDS al 1% y disolución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%.

Las masas con formaldehído y glutaraldehído presentan una solubilidad en los tres medios similar o ligeramente inferior a la masa del sistema de referencia 50/18. Sin embargo, las diferencias entre estas últimas y las masas con glioxal resultan más evidentes en los tres medios de extracción. Así, las masas con glioxal presentan una reducción de solubilidad tanto en agua como en la disolución de SDS. Sin embargo, cuando se emplea un agente reductor como el DTT, la solubilidad de las masas crece con respecto al sistema de referencia. Estos resultados indican un cierto grado de entrecruzamiento formado durante la etapa de mezclado, que concuerda con los mayores resultados obtenidos de viscosidad capilar (Figura 3.2.1.) y que no se da con los otros aldehídos. Además, dicho entrecruzamiento parece producirse a través de la formación de puentes disulfuros que al disgregarse en presencia del agente reductor darían una mayor solubilidad.

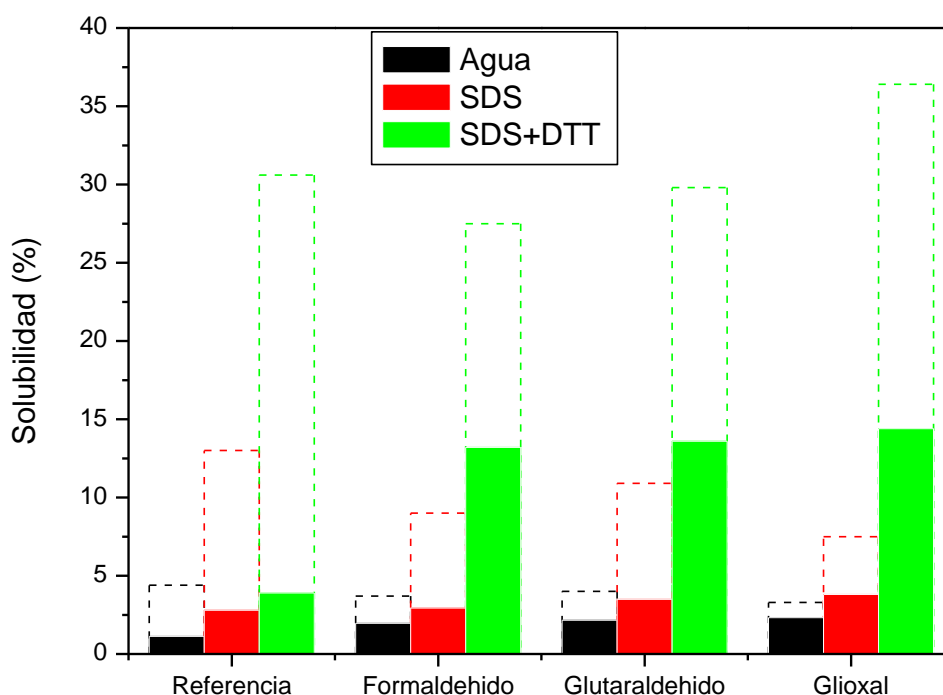


Figura 3.2.12. Comparación de resultados de solubilidad para probetas de bioplástico con distintos tipos de aldehídos (3%). Las líneas discontinuas representan la solubilidad de las masas correspondientes a cada probeta y medio.

La Figura 3.2.12 muestra los porcentajes de proteína soluble obtenidos cuando se extraen muestras de probetas de bioplástico de sistemas WG/GL/aldehído/agua preparadas con diferentes tipos de aldehído, con una concentración del 3%. Como medio de extracción se emplean tres disoluciones tampón para cada tipo de probeta (solución tampón acuosa, solución tampón de SDS al 1% o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%). Todas las probetas se han preparado mediante mezclado a 25°C y 50 rpm y termomoldeo a 9 MPa y 130°C. La determinación de solubilidad de las probetas se ha llevado a cabo mediante el método de Lowry modificado (Peterson, 1979).

De nuevo puede observarse que las muestras con glioxal son las que presentan los valores más altos de solubilidad en los tres medios, seguidas por las de glutaraldehído y en último lugar aparece el sistema de referencia con valores de solubilidad, en agua y en el tampón con SDS, muy cercanos a los de las probetas con formaldehído. No obstante, debe tenerse en cuenta que al utilizar un método colorimétrico, los valores de solubilidad pueden estar afectados de errores por exceso, sobre todo en aquellas que contienen glutaraldehído y glioxal. En cualquier caso, cabe resaltar la gran diferencia en los valores de solubilidad en el medio con SDS+DTT de las probetas con aldehído, en comparación con aquellas del sistema 50/18.

La similitud en los valores de solubilidad de las probetas en el medio con SDS, indicarían que las muestras de bioplástico estudiadas presentan interacciones hidrofóbicas y electrostáticas del mismo orden de magnitud. Sin embargo, la gran diferencia en los valores de solubilidad en el medio con SDS+DTT, de las probetas sin aldehídos con respecto a aquellas que los contienen, sugieren que la adición de aldehídos promueve la estabilización de la estructura por enlaces covalentes. Este tipo de enlaces correspondería a reacciones con grupos amino reactivos de los aminoácidos y puentes de azufre. De este modo se restringirían otro tipo de enlaces, como los isopeptídicos, que estarían presentes en mayor proporción en el sistema de referencia, cuya solubilidad en presencia de agentes reductores (como el DTT) es bastante inferior.

3.3. ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE GOMAS AL SISTEMA WG/GL/AGUA

Hasta este punto del estudio, se ha caracterizado el sistema de referencia WG/GL/agua y se ha examinado la influencia de la adición de aldehydos en las probetas resultantes. A continuación, se analizará el efecto que produce la incorporación de un polisacárido sobre las probetas de bioplásticos obtenidas mediante termomoldeo, empleando las mismas condiciones que para el sistema de referencia 50/18 y diferentes tipos de polisacáridos (gomas). El objetivo de la incorporación de este tipo de aditivos es el aprovechamiento de las posibles interacciones entre proteína y polisacárido para mejorar las propiedades de los bioplásticos finales. Para cada sistema WG/GL/goma/agua se analiza el efecto de la concentración de goma, así como de las condiciones de pH, con respecto a las del sistema de referencia preparadas de modo similar.

3.3.1. Efecto del tipo y concentración de goma en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/Goma/agua

A continuación se presentan y discuten los resultados de ensayos sobre probetas de bioplástico del sistema WG/GL/agua a las que se ha incorporado en el proceso de mezclado una de las cuatro gomias seleccionadas, sin modificar el valor de pH del medio (aproximadamente 6). Las gomias elegidas han sido dos aniónicas, goma xantana (XG), y carboximetilcelulosa (CMC); y dos no iónicas, metil-celulosa (MC) y goma de garrofín (LBG). En primer lugar se evalúa por separado el comportamiento termomecánico en ensayos de flexión (DMA) de probetas formuladas con cada goma en función de su contenido en la masa de partida. A continuación se comparan los resultados obtenidos, tanto en los ensayos de DMA, como en los de tracción y capacidad de absorción de agua, utilizando probetas con una concentración constante de cada tipo de goma y probetas exentas de polisacárido, correspondientes al sistema de referencia.

3.3.1.1. Ensayos de DMA en probetas de los sistemas WG/GL/Goma/agua

a) Ensayos de DMA en probetas con goma de garrofín (LBG)

La Figura 3.3.1 muestra la dependencia con la temperatura de E' , E'' y $\tan \delta$ en función de la concentración de LBG, para probetas de bioplástico del sistema WG/GL/LBG/agua, a partir de ensayos de flexión, DMA. El contenido del hidrocoloide se expresa como porcentaje en peso de LBG con respecto a la cantidad de gluten en la masa de partida. Las probetas se obtienen mezclando la proteína, plastificantes y goma bajo las condiciones estándar (25°C y 50 rpm) y realizando la etapa de termomoldeo a 9 MPa y 130°C. Las muestras se equilibran a una humedad relativa de 53% antes de realizar los ensayos.

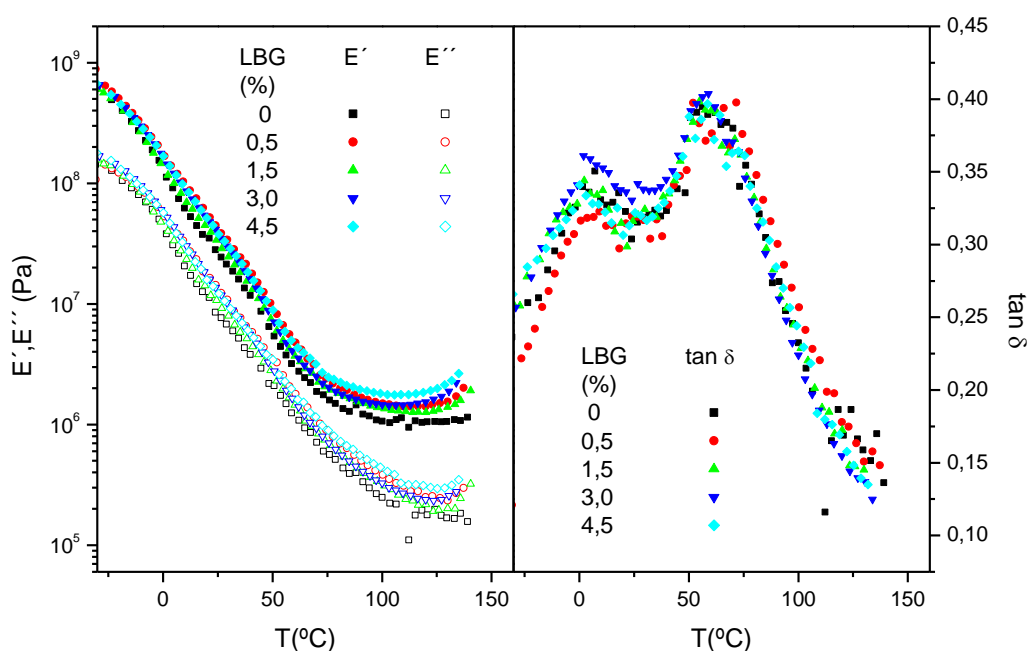


Figura 3.3.1. Ensayos de DMA en probetas con Goma de Garrofín en función de la concentración de LBG.

Como puede observarse en la Figura 3.3.1.A, los perfiles de E' y E'' de las muestras de bioplástico que contienen LBG exhiben un comportamiento similar a los del sistema de referencia 50/18, descrito anteriormente. No obstante, la incorporación de la goma confiere cierto potencial de termoendurecimiento a

las probetas, que se evidencia por el aumento de módulos en el límite superior del intervalo de temperatura del ensayo.

Los bioplásticos con LBG experimentan una tendencia al aumento en los valores de ambos módulos con la concentración, en todo el intervalo de temperaturas estudiado, siendo este más notorio a temperaturas superiores a 50°C, aproximadamente. Las probetas con un 0,5% de goma se desvían del comportamiento general, obteniéndose para éstas valores de módulos circunstancialmente mayores que para sus similares con contenidos más altos de LBG. No se detecta ninguna relación clara entre la concentración de goma y la temperatura a la que se alcanza el mínimo en el valor de E' , como puede deducirse de los valores presentados en la Tabla 3.3.1.

Tabla 3.3.1. Parámetros de DMA para probetas de bioplástico en función de la concentración de LBG.

Concentración (%)	E'_{\min} (MPa)	T_{\min} (°C)	$T_{\alpha 1}$ (°C)	$T_{\alpha 2}$ (°C)
0	1,067	110	6	60
0,5	1,409	109	8	63
1,5	1,255	113	4	61
3,0	1,440	103	3	59
4,5	1,749	106	3	61

Como puede verse en la Figura 3.3.1.B y en la Tabla 3.3.1 la incorporación de goma no ejerce un efecto demasiado importante sobre los perfiles de $\tan \delta$. De ahí que los picos, correspondientes a $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, se encuentren en valores de temperatura muy similares para las probetas con LBG y aquellas que no contienen goma.

Dada la diferencia en composición elemental de proteínas (unión covalente de cientos de aminoácidos) y polisacáridos (ensamblaje covalente de azúcares

con posibles ramificaciones), puede presentarse una gran variedad de estructuras bidimensionales y tridimensionales con diferentes propiedades fisicoquímicas y reológicas (Schmitt, 2009). En el sistema en estudio, es importante considerar las posibles interacciones entre los dos tipos de moléculas que pueden dar lugar a diferentes tipos de empaquetamiento en las cadenas, modificando la disponibilidad de volumen vacío en la matriz de biopolímero. Adicionalmente, Norton y Frith (2001) postulan que una mezcla de dos polímeros diferentes suele dar como resultado una separación de fases para formar dominios ricos en cada uno de ellos. Dichos autores atribuyen este fenómeno a la tendencia de las moléculas a asociarse con otras de estructura similar.

Teniendo en cuenta el comportamiento de las curvas de $\tan \delta$ para las probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/LBG/agua, la adición de LBG no parece provocar ni una separación de fases (mayor a la ya evidente en el sistema de referencia), ni un efecto de compatibilización de componentes o fases, por lo menos bajo las condiciones y concentraciones estudiadas aquí.

En vista de la ausencia efectos de compatibilización y de acuerdo con los ensayos de DMA, se podría considerar que la microestructura de estos bioplásticos se encuentra dominada por la matriz de proteína, cuyos espacios libres serían ocupados con partículas dispersas de LBG (Matveev y col., 2000). De este modo, la goma actuaría como relleno, contribuyendo al aumento de módulos E' y E'' observado, pero sin modificar los perfiles de los mismos.

b) Ensayos de DMA en probetas con goma xantana (XG)

La Figura 3.3.2 presenta los valores de E' , E'' y $\tan \delta$ obtenidos a partir de ensayos de DMA para probetas de bioplástico del sistema WG/GL/XG/agua, en función de la concentración de goma. El contenido de XG corresponde al porcentaje en peso con respecto al gluten. Estas muestras se mezclan a 25°C, se moldean a 9 MPa y 130°C y se equilibran a una humedad relativa de 53%. También se incluyen los resultados de DMA para probetas exentas de goma.

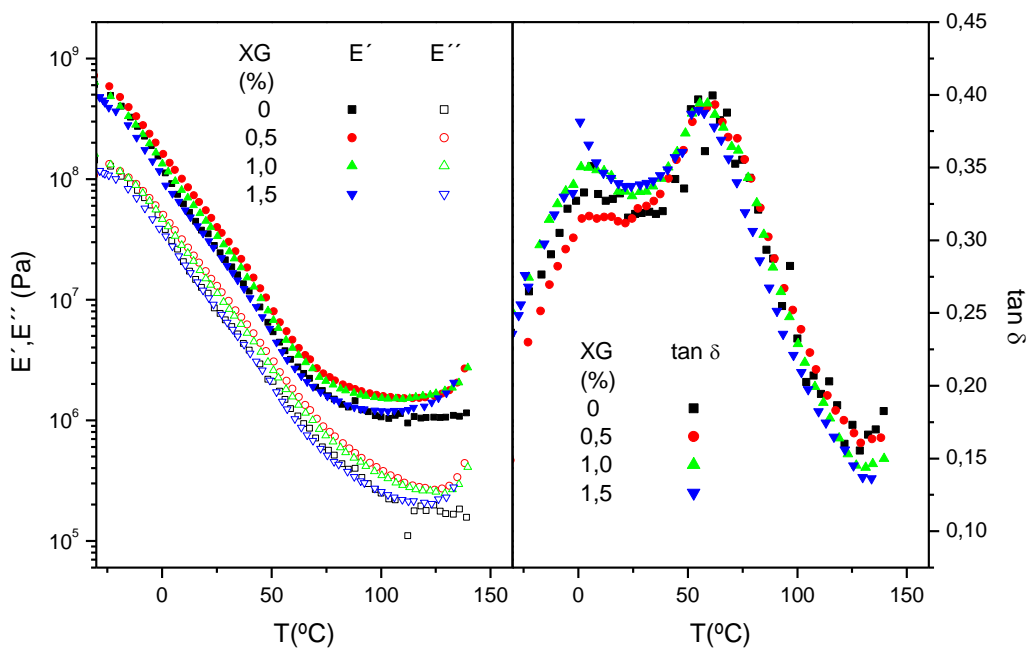


Figura 3.3.2. Ensayos de DMA en probetas con Goma Xantana en función de la concentración de XG.

Según se observa en la Figura 3.3.2.A, las curvas de E' y E'' exhiben el mismo comportamiento para todas las muestras que contienen XG. Ambos módulos viscoelásticos disminuyen con la temperatura hasta alcanzar un valor mínimo, por encima de los 100°C , después del cual experimentan un aumento, que en el caso del bioplástico de mayor contenido de XG resulta bastante pronunciado, indicando un marcado potencial de termoendurecimiento.

La incorporación de un 0,5% de XG produce un notable aumento de E' y E'' en todo el intervalo de temperaturas estudiados, especialmente a partir del valor de T_{min} . Por el contrario, el aumento de concentración de XG a partir de ese valor conduce a una reducción en los valores de ambos módulos. Como se aprecia en la Tabla 3.3.2, el valor mínimo de E' disminuye al aumentar el contenido de XG y se localiza en temperaturas menores.

De hecho, dicha reducción llega a ser tan importante que las probetas con un alto contenido de XG llegan a valores de E' y E'' similares e incluso inferiores a los del sistema de referencia, dependiendo de la región de temperaturas. Así,

en comparación con el sistema de referencia, se obtienen valores de E' y E'' menores (para temperaturas por debajo de 10°C), aproximadamente iguales (de 10 a 90°C) y mayores (por encima de 90°C) para las muestras con 1,5% de XG. En la zona de altas temperaturas, los bioplásticos con XG no sólo presentan mayores valores del módulo elástico que el sistema exento de goma, sino que además conducen a valores similares de E' y E'' independientemente del contenido de XG.

Como consecuencia, puede afirmarse que el reforzamiento de la matriz producido al incorporar XG alcanza un máximo para luego disminuir con el contenido de XG, en tanto que el potencial de termoendurecimiento crece continuamente con el mismo.

Tabla 3.3.2. Parametros de DMA para probetas de bioplástico en función de la concentración de XG.

Concentración (%)	E'_{\min} (MPa)	T_{\min} (°C)	$T_{\alpha 1}$ (°C)	$T_{\alpha 2}$ (°C)
0	1,067	110	6	60
0,5	1,505	114	9	60
1,0	1,495	110	6	58
1,5	1,177	103	4	56

En la Figura 3.3.2.B y la Tabla 3.3.2 puede observarse que los picos en $\tan \delta$, correspondientes a $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, se ubican en valores de temperatura muy similares para las probetas del sistema de referencia y aquellas que contienen goma. También puede apreciarse en los perfiles de $\tan \delta$ que cuando se añade XG en la menor proporción, se produce una ligera tendencia hacia el solapamiento de ambos picos, alcanzándose un valor máximo para $T_{\alpha 1}$, lo cual indica cierta tendencia a una compatibilización entre la proteína y la goma. Sin embargo, al aumentar la concentración de XG, $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$ tienden a desplazarse ligeramente a valores de temperatura menores, produciéndose una diferenciación más clara de ambos picos.

Considerando que los sistemas en estudio se encuentran en un valor de pH cercano al punto isoeléctrico del gluten (dónde la proteína tiene una carga aproximadamente nula) y que la goma xantana es un polímero aniónico, puede esperarse que dichos sistemas experimenten separación segregativa. La separación segregativa es un tipo de separación de fases dónde hay una repulsión relativamente fuerte entre dos biopolímeros. Este efecto ocurre mediante una exclusión estérica cuando al menos uno de los biopolímeros no posee carga o los dos tienen cargas eléctricas similares. A bajas concentraciones de biopolímero, los dos pueden mezclarse y formar una fase, pero por encima de cierto nivel de concentración se presenta la separación de fases (McClements, 2006).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que las moléculas de polisacárido en la solución que se añade a la mezcla de proteína y plastificante pueden formar agregados intermoleculares a través de puentes de hidrógeno y entrelazamiento de cadenas de polímero y que la XG puede sufrir un cambio conformacional durante el calentamiento, de un estado rígido ordenado a uno más flexible y desordenado a altas temperaturas.

El aumento en los módulos viscoelásticos al añadir pequeñas cantidades de goma podría tener su origen en un efecto de relleno (similar al observado para LBG) y en la formación de agregados intermoleculares de XG dentro de la matriz de proteína. Dado el ligero efecto de compatibilización detectado en la Figura 3.3.2.B, también debe tenerse en cuenta la contribución de interacciones entre moléculas de XG y algunos residuos proteicos con carga positiva, que no llegan a ser demasiado importantes debido a la proximidad al punto isoeléctrico. Sin embargo, al aumentar el contenido XG predominaría el efecto de separación segregativa, lo que conllevaría la disminución de los valores de E' y E'' .

También habría que considerar que el incremento en la movilidad de las cadenas de XG al aumentar la temperatura puede contribuir al cambio de tendencia del efecto de la concentración de XG que se produce en la región de temperatura elevada.

c) Ensayos de DMA en probetas con metil-celulosa (MC)

La Figura 3.3.3 representa los módulos E' y E'' , así como $\tan \delta$, en función de la temperatura para probetas rectangulares de bioplástico del sistema WG/GL/MC/agua con distintos contenidos de MC. También se incluye el sistema exento de goma. Tales perfiles provienen de ensayos de DMA de muestras preparadas mediante mezclado (a 25°C y 50 rpm) y moldeo a 130°C y 9 MPa. Previamente a la realización de las mediciones, las probetas se mantuvieron a una HR de 53% hasta el equilibrio. Los valores del porcentaje de MC están referidos al peso de gluten en la mezcla de partida.

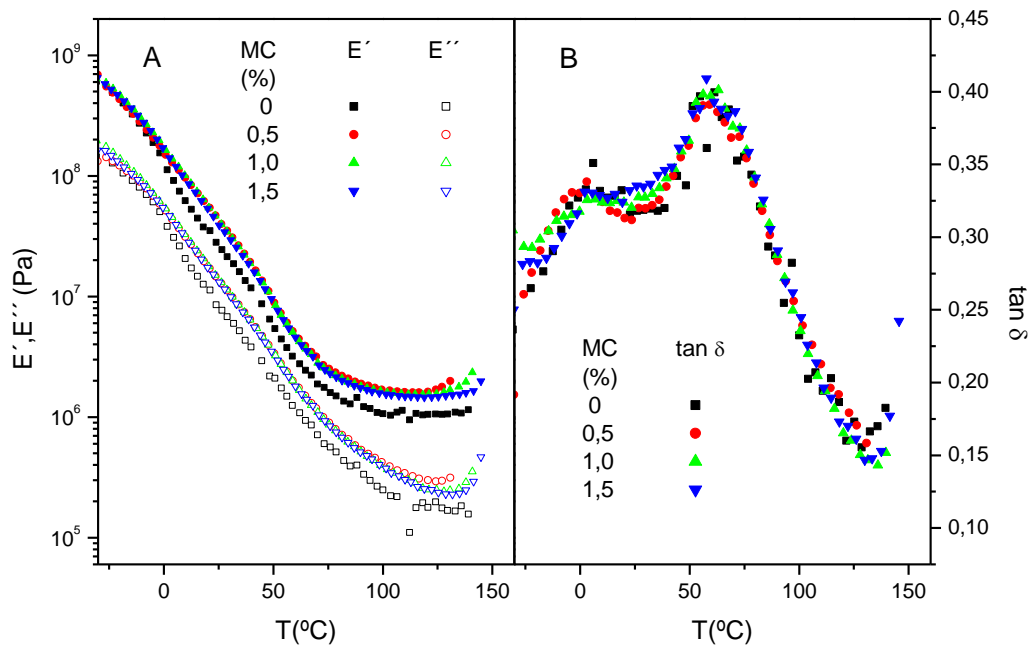


Figura 3.3.3. Ensayos de DMA en probetas con metil-celulosa en función de la concentración de MC.

Como se puede ver en la Figura 3.3.3.A, la evolución de los módulos E' y E'' para los bioplásticos que contienen goma son similares a los del sistema referencia 50/18. Sin embargo, las probetas con presencia de MC muestran una leve tendencia al aumento de E' en la zona de altas temperaturas, aunque en menor medida que en el caso de probetas con LBG o XG. Los valores de

los módulos viscoelásticos para distintas concentraciones de MC no presentan diferencias significativas entre sí. Sin embargo, son claramente superiores al sistema carente de goma en todo el intervalo de temperaturas estudiado.

En la Tabla 3.3.3 se presentan los valores de los parámetros seleccionados a partir de los ensayos de flexión DMA para probetas con MC, comparándolos con los del sistema exento de goma.

Tabla 3.3.3. Parámetros de DMA para probetas de bioplástico en función de la concentración de MC.

Concentración (%)	E'_{min} (MPa)	T_{min} (°C)	$T_{\alpha1}$ (°C)	$T_{\alpha2}$ (°C)
0	1,067	110	6	60
0,5	1,597	114	-1	62
1,0	1,523	117	2	61
1,5	1,458	119	5	60

Además del claro aumento del módulo E' , comentado anteriormente, en la Tabla 3.3.3 puede apreciarse que la adición de MC produce un ligero aumento de la temperatura a la que se alcanza el mínimo. En cualquier caso, lo que resulta más destacable de la incorporación de MC es que tiende a producir una separación de ambos picos de $\tan \delta$, $T_{\alpha1}$ y $T_{\alpha2}$, si se compara con el sistema de referencia, de forma que el primero se desplaza hacia una temperatura inferior a la del sistema de referencia y el segundo hacia una temperatura ligeramente superior. Este efecto indicaría una tendencia a la segregación. Sin embargo, al incrementar el contenido de MC en las muestras, vuelve a producirse el acercamiento de ambos picos, más patente en el caso de $T_{\alpha1}$, llegando a producirse cierto solapamiento, como puede apreciarse en la Figura 3.3.3.B. Estos resultados sugieren una inversión en el efecto producido por la MC, que en pequeñas cantidades tiende a inducir segregación, mientras que al aumentar su contenido tiende a favorecer la compatibilidad en el sistema.

La MC es un éter de celulosa no iónico, soluble en agua fría, con un carácter ligeramente hidrofóbico y cuya principal característica es la gelificación térmica y posible floculación de sus polímeros a altas temperaturas (Murray, 2009). La propiedad de termogelificación de MC se ha usado para unir y retener la forma en productos cuyos componentes no tienen buena cohesividad. Esta misma capacidad de adhesión se ha empleado en la formación de películas (Murray, 2009). El calentamiento de soluciones con MC por encima de determinada temperatura (50°C aproximadamente) produce la formación de un gel. La presencia de otras sustancias disueltas en soluciones con MC puede llegar a ocasionar un descenso en las temperaturas de gelificación. Así, Cash y Caputo (2010) encontraron que en presencia de un 40% de sacarosa se podía alcanzar una reducción de dicha temperatura hasta unos 30°C.

La gelificación es causada por la deshidratación del polímero producida durante el calentamiento. Este fenómeno puede ser explicado por debilitamiento de las interacciones agua-polímero y el fortalecimiento de las interacciones polímero-polímero (Cash y Caputo, 2010). Hague y Morris (1993) describieron el proceso de gelificación de MC en dos etapas. En la primera se produce una fusión de las estructuras presentes en la solución y en la segunda un reordenamiento para formar una nueva estructura. Así, la gelificación térmica de la MC resulta reversible; de forma que al disminuir la temperatura se retorna a la solución con la viscosidad original (Cash y Caputo, 2010).

La propiedad de termogelificación de la MC, explicada anteriormente, podría tener un efecto en el comportamiento de las probetas observado mediante DMA. La presencia de MC contribuiría a una mayor unión en los componentes y fases de los bioplásticos, lo que se reflejaría en el aumento de E' y E'' con respecto al sistema sin goma y a la compatibilización perceptible en las curvas de $\tan \delta$ al incrementar la cantidad de MC.

La presencia de otros componentes como el glicerol podría anticipar la temperatura de gelificación de la goma. La MC podría formar un gel con el agua dentro de la matriz de la proteína, incluso desde bajas concentraciones de goma, lo que provocaría un aumento en los módulos viscoelásticos e

indirectamente podría ser responsable del descenso en $T_{\alpha 1}$. Al aumentar el contenido de goma, más que producirse un reforzamiento del gel parece que se favorecerían las interacciones con la proteína lo que llevaría a obtener módulos similares pero una mayor compatibilización.

d) Ensayos de DMA en probetas con carboximetilcelulosa (CMC)

La Figura 3.3.4 muestra la dependencia con la temperatura de E' , E'' y $\tan \delta$ en función del contenido de goma, para bioplásticos del sistema WG/GL/CMC/agua, a partir de ensayos de DMA. La concentración de CMC corresponde al porcentaje en peso con respecto al gluten. Las probetas se prepararon mezclando los distintos componentes bajo las condiciones estándar (25°C y 50 rpm) y realizando moldeo a 9 MPa y 130°C. Las muestras se equilibraron a una humedad relativa de 53%.

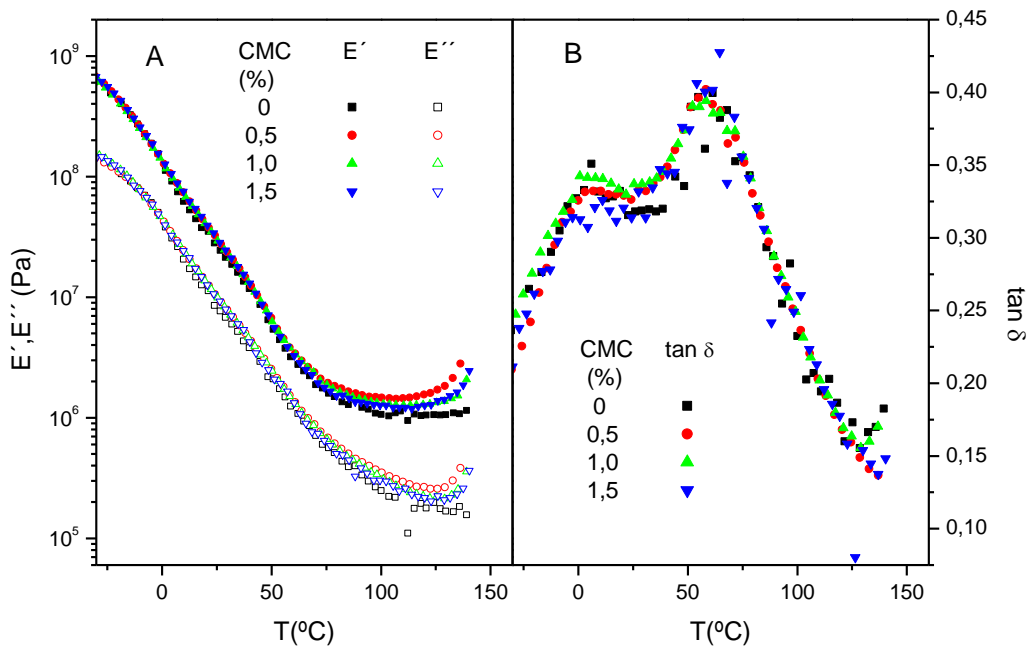


Figura 3.3.4. Ensayos de DMA en probetas con Carboximetilcelulosa en función de la concentración de CMC.

En la Figura 3.3.4.A se evidencia una clara similitud en comportamiento y en valores de módulos viscoelásticos entre las probetas con CMC y aquellas sin

goma. La única diferencia perceptible es el incremento de E' para los bioplásticos con CMC a temperaturas superiores a los 105°C aproximadamente. La Figura 3.3.4.B muestra un comportamiento muy similar de $\tan \delta$ en todos los sistemas. De acuerdo con los resultados de DMA presentados en la Figura 3.3.4, el contenido de CMC no tiene una influencia significativa sobre el comportamiento viscoelástico de los bioplásticos del sistema WG/GL/CMC/agua en el intervalo de concentraciones estudiado, por debajo de unos 110°C . Sin embargo, la presencia de CMC le confiere a los bioplásticos un claro potencial de termoendurecimiento. Así, según estos resultados, sería posible conseguir un aumento de módulos viscoelásticos si el proceso de termomoldeo se llevase a cabo a mayor temperatura.

En la Tabla 3.3.4 se presentan los valores de los parámetros seleccionados a partir de los ensayos de flexión DMA para probetas con CMC, comparándolos con los del sistema exento de goma.

Tabla 3.3.4. Parámetros de DMA para probetas de bioplástico en función de la concentración de CMC.

Concentración (%)	E'_{\min} (MPa)	T_{\min} ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{\alpha 1}$ ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{\alpha 2}$ ($^{\circ}\text{C}$)
0	1,067	110	6	60
0,5	1,433	106	4	58
1,0	1,256	109	3	57
1,5	1,185	113	2	60

Salvo las diferencias encontradas a temperatura elevada, relacionadas con el potencial de termoendurecimiento, que conducen a mayores valores de E'_{\min} , no se aprecian diferencias destacables entre las probetas sin goma y con CMC. De hecho, la CMC, produce un efecto ligeramente contrario al provocado por la MC, pudiendo apreciarse una reducción moderada de los valores de $T_{\alpha 1}$ que conduce a una leve separación de los picos al aumentar el contenido de CMC.

La CMC es un hidrocoloide de la misma familia que la MC pero con propiedades bastante diferentes, ya que en este caso se trata de un derivado aniónico de la celulosa con un carácter mucho más hidrofílico. Así, la CMC es soluble en agua caliente y fría y presenta la habilidad de formar complejos solubles con proteínas en las cercanías del punto isoeléctrico (Murray, 2009).

En este caso, es importante tener en cuenta que el comportamiento de dos biopolímeros en una fase acuosa no sólo viene marcado por las interacciones entre los mismos, sino también por la afinidad entre estos y el medio (Tolstoguzov, 1991; Schmitt, 2009). A bajas concentraciones de CMC, dada su gran afinidad por el agua, la goma podría distribuirse en la fase rica en solvente actuando más como plastificante que como competidor de la proteína. Esto explicaría el hecho de que los valores de los módulos de E' y E'' no presenten cambios al añadir CMC. Sin embargo, al ir incrementando el contenido de CMC, podría empezar a presentarse cierta competencia entre los dos biopolímeros por el agua, lo que favorecería la separación de fases. De ahí que se observe una ligera separación en los picos de $\tan \delta$ al aumentar el contenido de CMC.

e) Comparación de resultados de DMA en función del tipo de goma añadida

En este apartado se llevará a cabo una comparación de los resultados de DMA obtenidos para las distintas gomas utilizadas, así como para el sistema de referencia, exento de goma, manteniendo un valor constante de concentración del 1,5%, que es el contenido más alto evaluado en todos los sistemas con hidrocoloide.

La Figura 3.3.5 presenta los valores de los módulos E' y E'' y $\tan \delta$ para probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/goma/Agua para las gomas seleccionadas en una concentración del 1,5%, con respecto a la cantidad de gluten en la mezcla inicial. También se incluyen los perfiles del sistema exento de gomas.

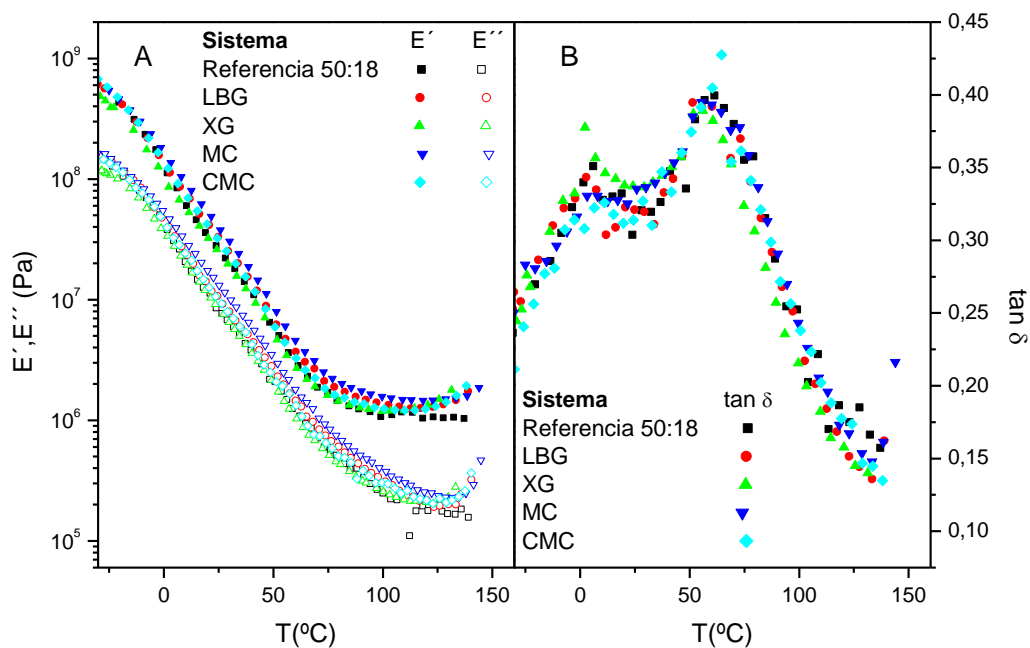


Figura 3.3.5. Ensayos de DMA en probetas con distintos tipos de gomas (1,5%).

Como puede observarse en la Figura 3.3.5.A, la mayoría de los sistemas con goma presentan valores de E' y E'' superiores o aproximadamente iguales a los del sistema sin goma. La única excepción se refleja en los bioplásticos con XG, para temperaturas inferiores a 10°C . A diferencia del sistema de referencia, todas las muestras con hidrocoloide revelan la existencia de un potencial de termoendurecimiento remanente. El sistema con MC es el que presenta los valores de E' y E'' más altos, en la mayor parte del intervalo de temperaturas estudiado. Le siguen en orden las probetas con LBG, CMC y por último XG. Sin embargo, los bioplásticos con MC son también los que presentan un menor potencial de termoendurecimiento, como se puede deducir de las diferencias entre los valores de la zona plateau de los módulos E' y E'' y los obtenidos a alta temperatura.

En la Figura 3.3.5.B se pueden apreciar claramente los dos picos correspondientes a $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$ para todos los sistemas, que se mantienen siempre en el intervalo entre -1 y 9°C y entre 56 y 63°C , respectivamente. Para la mayoría de probetas con gomas, la temperatura a la que se encuentra $T_{\alpha 1}$ se

desplaza ligeramente a temperaturas menores a las de las probetas sin hidrocoloide. Mientras que la temperatura a la que aparece el pico de $T_{\alpha 2}$ sólo varía para las muestras con XG, en cuyo caso se traslada también a temperaturas un poco más bajas. En cualquier caso, lo más destacable que puede apreciarse en dicha figura es que las probetas que presentan una tendencia más clara al solapamiento entre ambos picos, y por tanto un mayor grado de compatibilización entre las fases que intervienen en la microestructura de las probetas, son las que contienen MC.

Ello se suma al hecho de que, de acuerdo con los resultados de los ensayos de DMA, el sistema que presenta una mejora más notable en propiedades viscoelásticas con respecto al de referencia es el que contiene MC. Este hecho podría derivarse de la habilidad de MC para unir componentes y fases mediante su capacidad de termogelificación. LBG y CMC, en cambio, parecen desempeñar un papel típico de un material de relleno, muy moderado en este último, indicando un muy bajo grado de interacción con las proteínas del gluten. XG presenta un comportamiento altamente dependiente de la concentración. Dicha goma puede producir tanto mejora como descenso en las propiedades de las probetas, según se comporte como agente de relleno o interactúe con la proteína produciendo separación de fases.

El desplazamiento en el pico de $T_{\alpha 1}$ manifiesta la afinidad de las gomas por la fase rica en solvente y su competición por el agua con los demás componentes del sistema, principalmente con la proteína. Mientras que la escasa variación en $T_{\alpha 2}$ indica que la fase de proteína plastificada sufre pocos cambios.

Considerando dichos resultados, para las condiciones y concentraciones estudiadas, se puede concluir que las gomas tendrían una leve interacción con el gluten y por tanto poca participación en la matriz del bioplástico. Su mayor impacto estaría en la fase rica en plastificantes, dispersa dentro de dicha matriz de proteína.

3.3.1.2. Ensayos de tracción en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/goma/agua

En la Figura 3.3.6 se presentan las curvas correspondientes a los ensayos de tracción para una probeta de referencia y otra representativa de cada bioplástico WG/GL/Goma/agua, con una concentración de 1,5% de hidrocoloide. Puede observarse, que las curvas correspondientes a los bioplásticos con goma incorporada presentan un comportamiento termoplástico con valores de resistencia a la tensión aplicada, así como de σ_{\max} y ε_{\max} , superiores a la muestra exenta de goma.

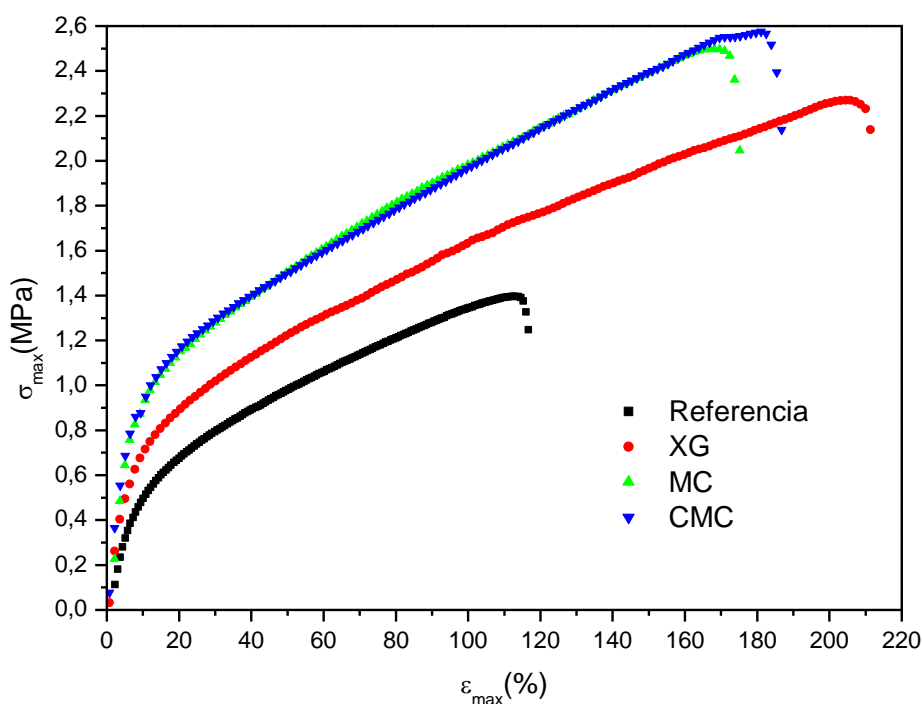


Figura 3.3.6. Curvas esfuerzo-deformación para los bioplásticos WG/GL/agua 50/18 en función de la goma añadida (concentración 1,5%) obtenidas de los ensayos de tracción.

La Figura 3.3.7 muestra los parámetros σ_{\max} , ε_{\max} , módulo de Young y humedad de las probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/Goma/agua y los de referencia (sin goma), obtenidos a partir de ensayos de tracción. Las muestras tienen un contenido de 1,5% de goma y fueron sometidas a las

mismas condiciones de procesado (9 MPa y 130°C) y acondicionamiento (53% HR).

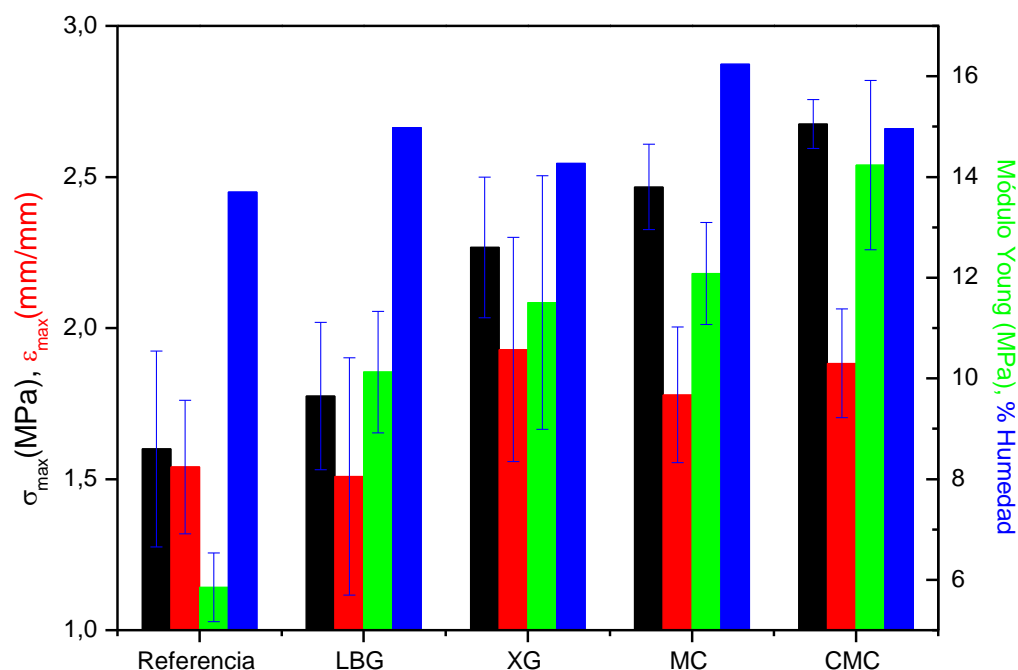


Figura 3.3.7. Comparación de resultados de ensayos de tracción en probetas con distintos tipos de gomas (1,5%).

Los valores medios más altos de tensión máxima corresponden a los bioplásticos con CMC, seguidos por MC y XG, aunque sin diferencias significativas entre sí. No obstante, las probetas con CMC y MC presentan valores de σ_{max} significativamente mayores que los de LBG y el sistema sin goma, que es el que presenta el valor más bajo. El valor máximo de la media de ϵ_{max} se alcanza en las muestras con XG. Le siguen en orden decreciente las probetas con CMC y MC. Sin embargo, estos resultados se refieren sólo a tendencias ya que, según el grado de dispersión de los datos, no puede decirse que existan diferencias significativas entre ellas ni con los bioplásticos exentos de goma o los que tienen LBG (que corresponden al valor medio de ϵ_{max} más bajo). En todos los casos se produce un aumento significativo del módulo de

Young al agregar goma en comparación con el sistema exento de hidrocoloides.

Zhou y col.(2008) encontraron una mejora simultánea en σ_{max} y ϵ_{max} al incorporar MC en bioplásticos de aislado de proteína de soja procesados por el método termomecánico, para una concentración de MC del 5%. Este hecho se atribuyó a la miscibilidad entre goma y proteína. Sin embargo, con un aumento inicial en el contenido de MC (por encima del 5%) se produjo un descenso en ϵ_{max} y al continuar aumentando la concentración de la misma también acababa produciéndose un descenso en σ_{max} . Estos autores pudieron explicar el comportamiento inicial por la fuerte agregación de MC en dominios cristalinos dentro de la matriz de proteína y la posterior formación de agregados cristalinos de goma fuera de ésta.

Los sistemas estudiados aquí, aunque corresponden a concentraciones más bajas de goma, coinciden con los resultados de Zhou y col.(2008). La formación de estructura en los dominios de goma dentro de la matriz de gluten llevaría al aumento en σ_{max} , de modo que tanto hidrocoloide como proteína aportan su contribución a la resistencia mecánica del material compuesto. Por otro lado, las gomas podrían interactuar en algún grado con las cadenas de proteína, debilitando la estructura rígida de gluten en el bioplástico, penetrando en esta y causando una reducción de puentes de hidrógeno. En tal caso, las gomas actuarían como plastificante, lo que explicaría el incremento aparente en ϵ_{max} , que se hace más evidente en las gomas aniónicas (XG y CMC). Además, la perturbación en la estructura de los bioplásticos al incorporar goma queda en evidencia por el cambio en el módulo de Young de las muestras con hidrocoloides.

3.3.1.3. Ensayos de absorción de agua en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/goma/agua

La Figura 3.3.8 muestra los porcentajes de absorción de agua (tras 2 y 24 horas de inmersión), así como la pérdida de material soluble para probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/goma/agua. Las muestras contienen 1,5%

de la goma seleccionada (con respecto a la cantidad de gluten en la mezcla) y se obtuvieron mediante mezclado (a 25°C y 50rpm) y moldeo a 9MPa y 130°C. También se incluyen los parámetros de las muestras sin goma.

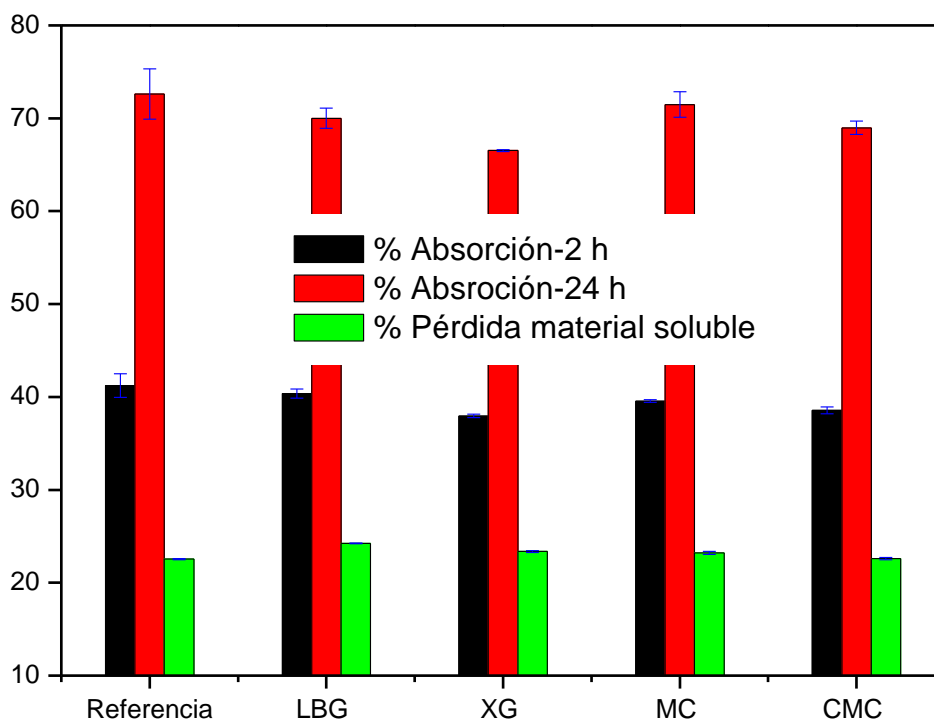


Figura 3.3.8. Comparación de resultados de ensayos de absorción de agua en probetas con distintos tipos de gomas (1,5%).

En la Figura 3.3.8 puede apreciarse que los porcentajes de absorción de agua más altos obtenidos tras 2 horas de inmersión corresponden a las muestras sin goma y a las que contienen LBG, entre las cuales no se han encontrado diferencias significativas. En orden decreciente les siguen las probetas que contienen MC y CMC y por último las procesadas con XG, con valores ligeramente inferiores a los del sistema de referencia. Después de 24 horas de inmersión, no se observan diferencias significativas en la capacidad de absorción de agua para las probetas sin goma y aquellas que contienen MC y LBG. Los bioplásticos con CMC y XG presentan una reducción significativa en la cantidad de agua retenida con respecto a las probetas que carecen de goma.

Por tanto, las secuencias correspondientes a la capacidad de absorción de las probetas serían las siguientes:

Tras 2 h de inmersión: Referencia \approx LBG > MC > CMC > XG

Tras 24 h de inmersión: Referencia \approx MC \approx LBG > CMC > XG

En cuanto a la pérdida de material soluble obtenida tras un periodo de inmersión de 24 h resulta mayor para las probetas con LBG que para el resto, siguiendo la siguiente secuencia:

Pérdida de material soluble: LBG > XG \approx MC > CMC \approx Referencia

En cualquier caso, los resultados de los ensayos de absorción de agua no revelan un efecto demasiado marcado de la adición de gomas en la capacidad de retención de agua de las probetas. La reducción moderada en los porcentajes de absorción de agua al incorporar hidrocoloides puede estar asociada a una disminución del volumen disponible por el agua dentro de la matriz de bioplástico. Parece que la incorporación de goma conlleva cierta disminución del carácter hidrófilo del sistema que resulta más importante con las gomas aniónicas XG y CMC. Asimismo, el hecho de que se produzca cierta pérdida de cohesividad en la estructura de la matriz formada tras la incorporación de la goma, que conduce a mayores pérdidas de material soluble, confirma la escasa compatibilidad entre la proteína y los polisacáridos estudiados.

3.3.2. Efecto del pH en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/Goma/agua

Como se demostró en el apartado 3.1.5, el pH juega un papel importante en los bioplásticos del sistema de referencia ya que modifica la carga superficial de las proteínas de gluten. Por tanto, conviene en este punto evaluar cómo afecta dicha modificación a las interacciones entre proteína y polisacárido y que influencia tienen dichas interacciones en las propiedades de las probetas resultantes. Para poder establecer el efecto del pH en sistemas WG/GL/goma/agua, se escogieron dos de las gomas estudiadas anteriormente,

una no iónica, como la LBG y otra aniónica como la XG. En ambos casos se tuvo en cuenta la mayor facilidad de procesado con estas gomas y la amplia información que se tiene de ellas en la literatura. Se mantuvo el mismo valor de concentración de la goma (1,5%) utilizado anteriormente.

Para poder investigar como afecta la carga de la proteína, se prepararon probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/Goma/agua a valores de pH de 3 y 9, comparando dichos bioplásticos con los ya estudiados al pH nativo del sistema. Con ello se establecieron distintas situaciones en cuanto al tipo de cargas que pueden tomar las proteínas del gluten, es decir, carga positiva a pH 3, neutra en el punto isoeléctrico (aproximadamente 6) y negativa a pH 9.

Inicialmente se presentan los perfiles de DMA para los 3 valores de pH en las probetas con LBG y XG. Posteriormente, para cada valor de pH, se comparan los bioplásticos sin goma con aquellos que contienen LBG y XG en función de los resultados de los ensayos de DMA, resistencia a la tensión y absorción de agua. Por último, se aborda un estudio de la solubilidad de masas y probetas en el sistema con XG, por ser el que presenta una mayor desviación con respecto al de referencia.

3.3.2.1. Ensayos de DMA en probetas de los sistemas WG/GL/Goma/agua

a) Ensayos de DMA en probetas con goma de garrofín (LBG) en función del pH

La Figura 3.3.9 representa los módulos E' y E'' , así como $\tan \delta$, en función de la temperatura para bioplásticos del sistema WG/GL/LBG/agua con una concentración de 1,5% de LBG para distintos valores de pH. Tales perfiles se obtienen a partir de ensayos de DMA en probetas preparadas mediante mezclado (a 25°C y 50 rpm) y moldeo a 130°C y 9 MPa. Las muestras se mantienen a una HR de 53% hasta el equilibrio, antes de realizar los ensayos. Los valores del porcentaje de LBG están referidos al peso de gluten en la masa de partida.

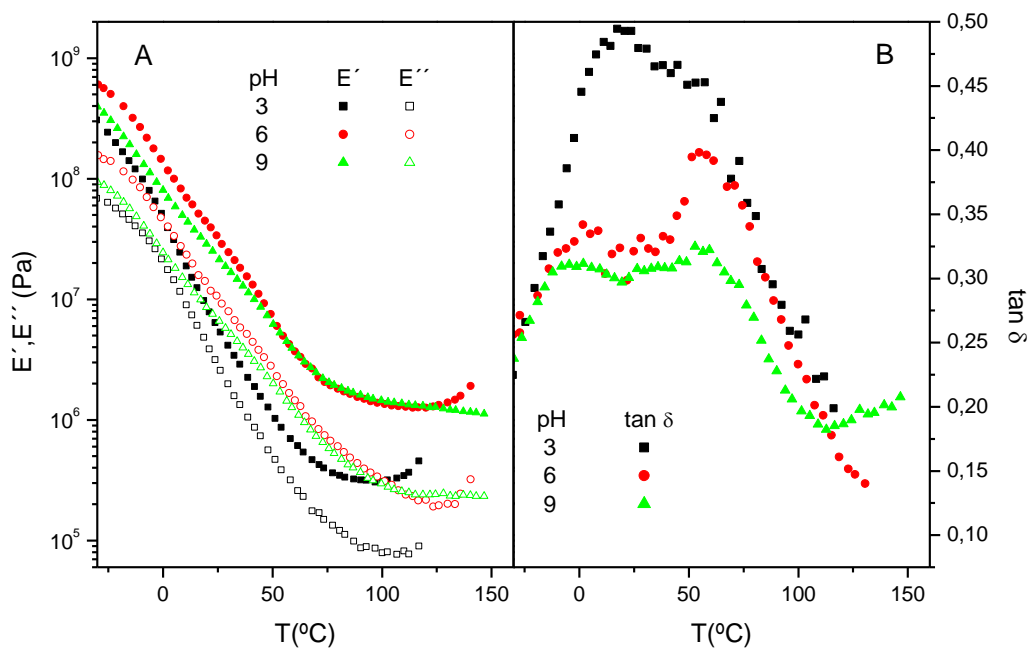


Figura 3.3.9. Ensayos de DMA en probetas con un contenido de LBG de 1,5% en función del valor de pH.

En la Figura 3.3.9.A puede observarse que las probetas preparadas a pH 3 presentan una reducción considerable de los valores de ambos módulos viscoelásticos con respecto a las probetas preparadas a pH nativo. Estas muestras preparadas a pH neutro presentan los valores más altos de ambos módulos a temperaturas inferiores a los 50°C. A temperaturas entre 50 y 125°C, los valores de E' y E'' de este sistema son igualados por los bioplásticos procesados a pH 9. Por encima de 125°C, las probetas con LBG a pH 6 presentan un aumento de valores de ambos módulos, mostrando un potencial de termoendurecimiento remanente similar al mostrado a pH 3, que sin embargo desaparece cuando son preparadas a pH alcalino.

En la Figura 3.3.9.B puede observarse que las muestras a pH 3 presentan un solapamiento en los picos correspondientes a $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$. Al aumentar el valor de pH el pico correspondiente a $T_{\alpha 1}$ se desplaza a temperaturas más bajas, mientras que el de $T_{\alpha 2}$ se mantiene aproximadamente en la misma temperatura. Los picos en $\tan \delta$ se distinguen más claramente a pH 6, cuando

la proteína presenta un balance de cargas prácticamente nulo. Al aumentar el valor de pH en los bioplásticos, la magnitud de dichos picos disminuye y pierden definición.

Según los resultados de DMA, podría decirse que la presencia de cargas en el gluten favorece la separación de fases entre LBG y la proteína, posiblemente mediante el efecto de separación segregativa (descrito en 3.3.1.1.a). De ahí que los valores de los módulos E' y E'' para los bioplásticos en los que las proteínas de gluten tienen mayor carga (pH 3 y 9) sean menores que para el sistema más próximo al punto isoeléctrico (pH 6). Sin embargo, el perfil de los picos en $\tan \delta$ sugiere una mayor compatibilidad en las muestras a pH ácido, probablemente asociado a una mayor retención de agua en el sistema.

b) Ensayos de DMA en probetas con goma xantana (XG) en función del pH

La Figura 3.3.10 muestra la dependencia con la temperatura de E' , E'' y $\tan \delta$ en función del valor de pH, para bioplásticos del sistema WG/GL/XG/agua, a partir de ensayos de DMA. Las probetas, que tienen un contenido de XG de 1,5%, se obtienen mezclando bajo las condiciones estándar (25°C y 50 rpm) y realizando moldeo a 9 MPa y 130°C. Las muestras se equilibran a una humedad relativa de 53% antes de realizar los ensayos.

En la Figura 3.3.10.A puede apreciarse que los valores más bajos en los módulos viscoelásticos se presentan en las muestras con XG a pH 3. Los valores de E' y E'' son mayores para los bioplásticos con goma a pH 6 hasta una temperatura de aproximadamente 40°C. De ahí en adelante, las probetas a pH básico presentan los valores más altos de módulos. Los bioplásticos con XG a pH 3 y 6 exhiben un incremento en E' en el límite superior de temperaturas, indicando un potencial de termoendurecimiento remanente. En la Figura 3.3.10.B se observa que, al disminuir el valor de pH de las probetas con XG, se produce un desplazamiento en los picos de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$ hacia valores de temperatura intermedios.

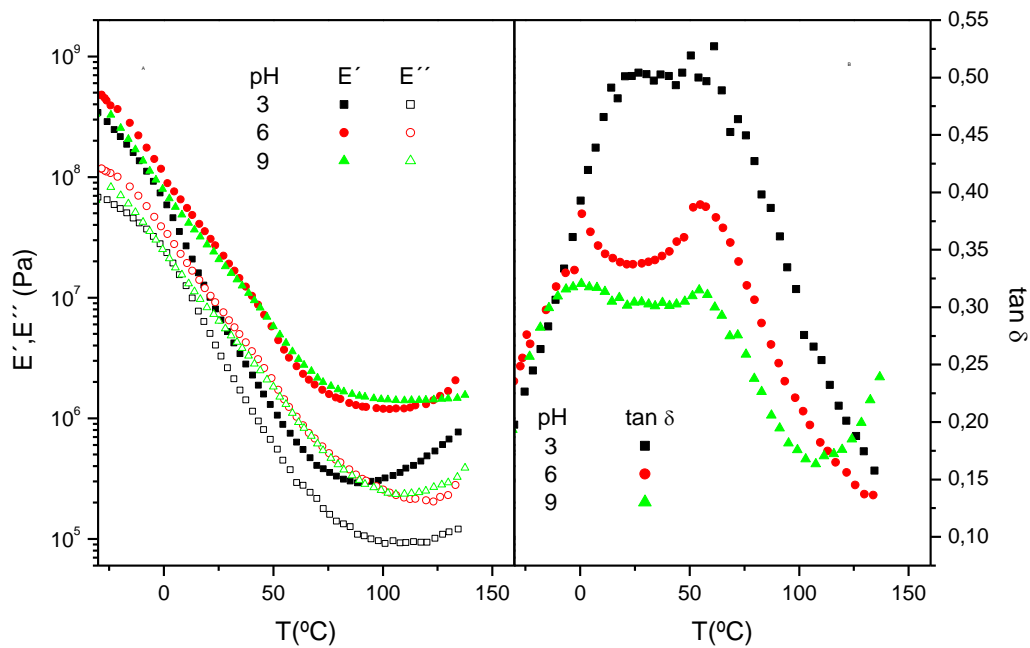


Figura 3.3.10. Ensayos de DMA en probetas con un contenido de XG de 1,5% en función del valor de pH.

La aparente mayor compatibilidad de los bioplásticos con goma a pH ácido, evidenciada por el acercamiento de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, sugiere un mayor grado de asociación entre XG y las proteínas del gluten, ocasionada por la atracción de moléculas con carga opuesta y por la mayor retención de agua en el sistema.

c) Comparación de resultados de DMA para probetas con goma en función del valor de pH

En la Figura 3.3.11 se comparan los valores de E' y $\tan \delta$ para probetas sin goma, con LBG o con XG (1,5%) para cada uno de los tres valores de pH ensayados.

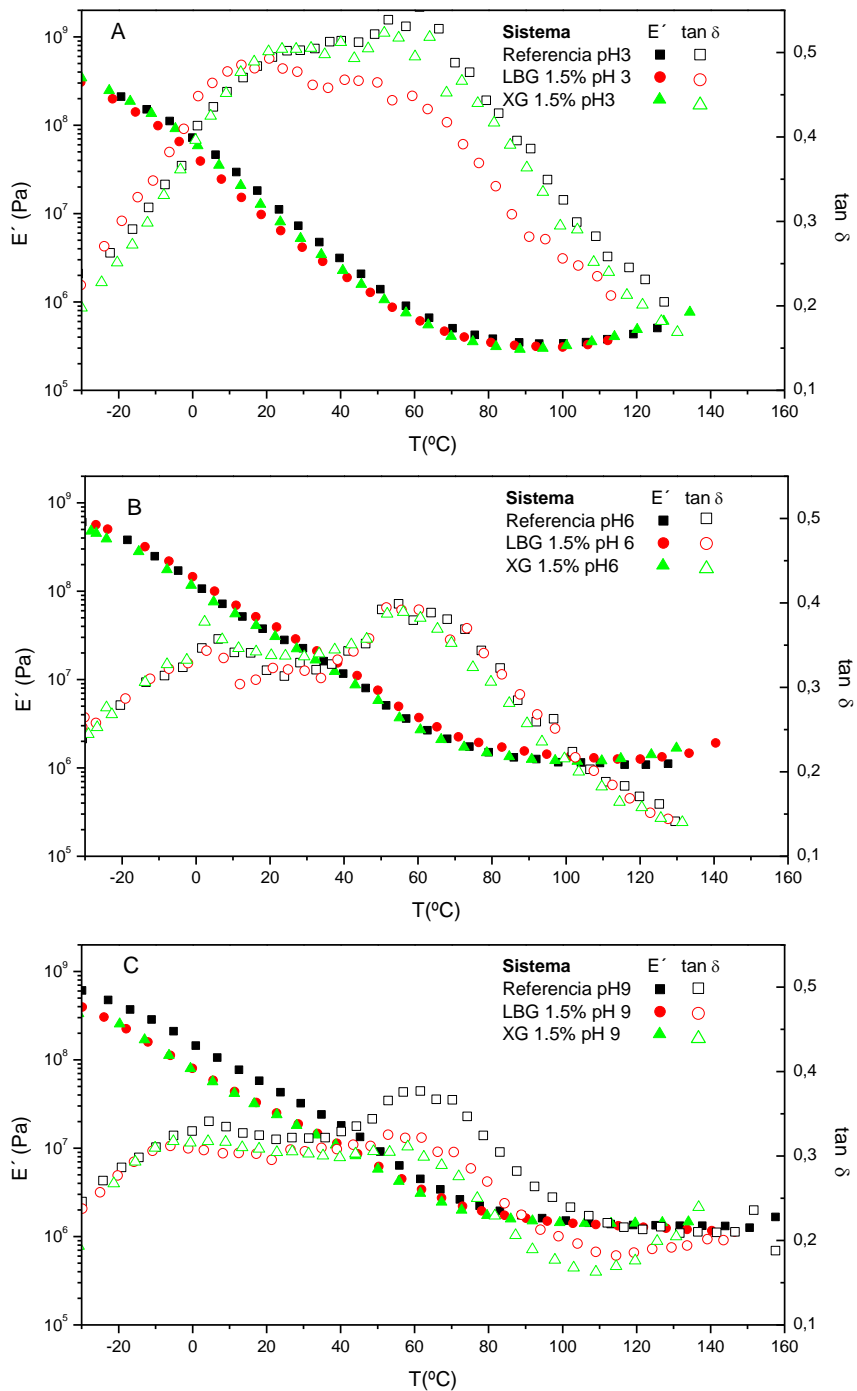


Figura 3.3.11. Ensayos de DMA en probetas con un contenido de Goma (LBG y XG) de 1,5% y exentas de gomas en función del valor de pH.

En la Figura 3.3.11.A puede observarse que las probetas sin goma presentan mayores valores de E' , en comparación con las que contienen gomas; sin

embargo, estas últimas revelan cierto potencial de termoendurecimiento en la zona de altas temperaturas. Entre los bioplásticos con goma, el que tiene carácter aniónico (XG) parece tener mayor interacción con el gluten, dando como resultado probetas con mayores valores de E' que las que contienen LBG. La presencia de gomas confiere cierto efecto plastificante, ya que desplaza las temperaturas $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$ hacia valores más bajos (principalmente $T_{\alpha 1}$) probablemente debido a la afinidad de los hidrocoloides por la fase acuosa. El comportamiento de los picos de $\tan \delta$ sugiere mayor compatibilidad en el sistema con XG, lo que se podría asociar a las interacciones de carácter atractivo entre la goma aniónica XG y las proteínas del gluten, cargadas positivamente a pH ácido.

La Figura 3.3.11.B hace una recopilación de los resultados presentados y discutidos en el apartado 3.3.1.1.4. Sólo cabe resaltar aquí, que las pequeñas diferencias en el módulo E' y en los perfiles de $\tan \delta$, sugieren un efecto de relleno por parte de LBG y una ligera separación de fases ocasionada por XG en las probetas de bioplástico del sistema original WG/GL/agua.

En la Figura 3.3.11.C puede apreciarse que los bioplásticos sin goma son los que exhiben los valores más altos de E' a temperaturas inferiores a unos 80°C aproximadamente. Superada esta temperatura, todas las probetas presentan valores similares de E' , sin que se aprecie posibilidad de termoendurecimiento a este pH. Los perfiles de E' de los bioplásticos con hidrocoloide son muy parecidos entre sí, indicando que para la concentración y pH estudiados, el efecto que producen XG y LBG en las probetas es muy similar. Dicho efecto podría ser el de separación segregativa que en el caso del LBG se produciría mediante impedimento estérico, y en el de la goma aniónica XG provendría de un efecto de repulsión de cargas. De nuevo, puede apreciarse un ligero efecto plastificante de la goma que causa un leve desplazamiento de $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$ hacia valores de temperaturas menores al agregar hidrocoloide.

3.3.2.2. Ensayos de tracción en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/goma/agua en función del valor de pH

La Figura 3.3.12 muestra los parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción para probetas a las que se incorporó LBG o XG en una concentración de 1,5%, que fueron preparadas partiendo de mezclas con distintos valores de pH. Para cada valor de pH, se comparan los bioplásticos con goma con los del sistema que carece de ellas. Todas las muestras se obtuvieron mediante mezclado (a 25°C y 50 rpm) y moldeo a 9 MPa y 130°C. Previamente a la realización de los ensayos, las probetas se mantuvieron en recipientes a una HR de 53% hasta el equilibrio.

En la Figura 3.3.12.A se comparan los parámetros de los ensayos de tracción en probetas de bioplástico preparadas a pH 3. No se aprecian diferencias significativas en los valores de σ_{\max} y ε_{\max} entre los bioplásticos con gomas y aquellos exentos de ellas. Sin embargo, la media de los valores de σ_{\max} es más alta para los bioplásticos con XG y el promedio de ε_{\max} es ligeramente mayor para las muestras que no contienen goma. Las probetas del sistema de referencia a pH 3 alcanzan módulos de Young significativamente mayores que los de los bioplásticos con hidrocoloide. Las muestras preparadas con LBG a dicho pH presentan los valores más bajos en todos los parámetros de los ensayos de tracción.

Tanto los hidrocoloides como las proteínas contribuyen a la resistencia mecánica del material compuesto, de ahí que los valores de tensión sean similares, e incluso algo mayores para las muestras con XG, cuyas moléculas podrían experimentar atracción por las cadenas de gluten cargadas positivamente. De otro lado, la distribución no uniforme de componentes en las fases podría incrementar la diferencia en fractura y comportamiento deformacional, lo que repercutiría en los valores de deformación máxima y módulo de Young (Matveev y col., 2000).

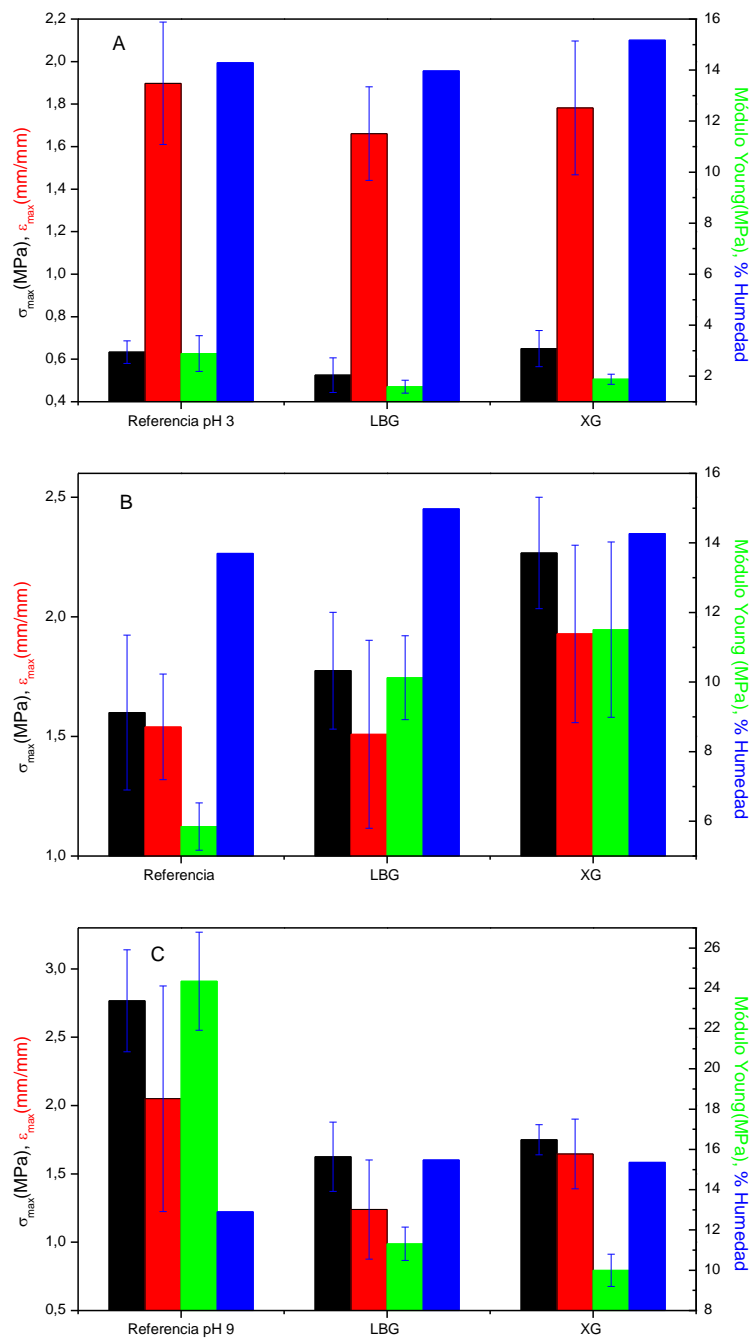


Figura 3.3.12. Comparación de resultados de ensayos de tracción en probetas con un contenido de Goma (LBG y XG) de 1,5% y exentas de gomas para distintos valores de pH A) pH 3; B) pH 6; C) pH 9.

En la Figura 3.3.12.B se muestran los resultados presentados y discutidos en el apartado 3.3.1.2 para probetas con LBG y XG a pH 6. Para esta condición de

pH se observa una aparente mejora en propiedades de los bioplásticos con XG, en comparación con los del sistema sin goma. Este comportamiento coincide parcialmente con estudios realizados por Oses y col.(2009). Dichos autores obtuvieron un descenso en σ_{\max} y un aumento en ϵ_{\max} al aumentar la concentración de Goma mesquita (una goma aniónica) en películas de aislado de proteína de suero de leche preparadas por el método de casting a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico de la proteína. Estos autores atribuyen dicho comportamiento a que la proteína forma una matriz rígida (mediante entrecruzamiento por enlaces S-S y puentes de hidrógeno) que presenta una baja elongación. La goma debilitaría esta estructura debido a la reducción de puentes de hidrógeno, actuando como plastificante, de tal modo que aumentaría la flexibilidad pero disminuiría la resistencia de las películas. En la presente investigación se alcanzan valores de tensión más altos adicionando XG a los sistemas con gluten y un incremento menos marcado en la deformación. Las diferencias con los resultados de Oses y col.(2009) serían atribuibles tanto a diferencias en la naturaleza de las materias primas, como en el proceso de preparación de los bioplásticos. En el proceso de casting hay mayor probabilidad de interacción entre los biopolímeros al encontrarse en un medio acuoso en exceso, mientras que en el proceso termomecánico se limita la cantidad de disolvente y se favorece la formación de sistemas más rígidos.

Zuo y col.(2009) también encontraron una reducción en los parámetros de los ensayos de tracción de probetas de WG/GL/MC obtenidas por termomoldeo, en comparación con las de los bioplásticos sin goma y con las películas del mismo sistema obtenidas por casting. Estos autores atribuyen estos resultados a la dispersión de MC y al grado de mezclado entre la goma y el gluten resultante de los diferentes medios de preparación.

En la Figura 3.3.12.C se pueden observar las propiedades extensionales, exhibidas por las probetas a pH 9. Los bioplásticos que no contienen gomas presentan valores de σ_{\max} y módulo de Young significativamente mayores que las muestras con XG y LBG. La media de ϵ_{\max} del sistema de referencia también es superior a la de los bioplásticos con goma, pero debido a la dispersión de los datos no se puede confirmar la existencia de diferencias

significativas. Las probetas con gomas tampoco presentan diferencias significativas entre sí.

En concordancia con los ensayos de DMA, la incompatibilidad termodinámica de los hidrocoloides con las proteínas del gluten, por repulsión electrostática en el caso de XG y por separación segregativa, relacionada con fenómenos de exclusión estérica para LBG, causaría una disminución en las propiedades de los bioplásticos en los ensayos de tracción a valores de pH básico.

3.3.2.3. Ensayos de absorción de agua en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/goma/agua en función del valor de pH

En la Figura 3.3.13 se comparan los resultados de los ensayos de absorción de agua (después de 2 y 24 horas de inmersión), así como la pérdida de material soluble para bioplásticos de los sistemas WG/GL/agua y WG/GL/Goma/agua, para diferentes valores de pH. Como gomas se emplearon LBG y XG con un contenido de 1,5% con respecto al gluten utilizado en la mezcla inicial. Todas las probetas se prepararon bajo las condiciones estándar de mezclado (25°C y 50rpm) y termomoldeo (130°C y 9MPa).

En la Figura 3.3.13.A pueden verse los resultados de los ensayos de absorción de agua en probetas a pH 3. La única diferencia apreciable se produce en la retención de agua después de 24 horas de inmersión, cuyo porcentaje se reduce casi en un 10% al añadir goma.

La Figura 3.3.13.B compara los porcentajes de absorción de agua y pérdida de solubles para bioplásticos sin goma y con las gomas de interés a pH 6. La capacidad de absorción de agua es similar entre las probetas del sistema exento de goma y aquellas que contienen LBG. Las muestras con XG presentan valores de absorción de agua ligeramente menores a las anteriores.

En la Figura 3.3.13.C se observan los parámetros en estudio para los bioplásticos preparados a pH 9. Las muestras con XG y LBG exhiben porcentajes menores de retención de agua con respecto a las probetas

carentes de hidrocoloide. Esta reducción se hace más evidente después de 24 horas de inmersión y cuando se emplea LBG (aproximadamente 10%).

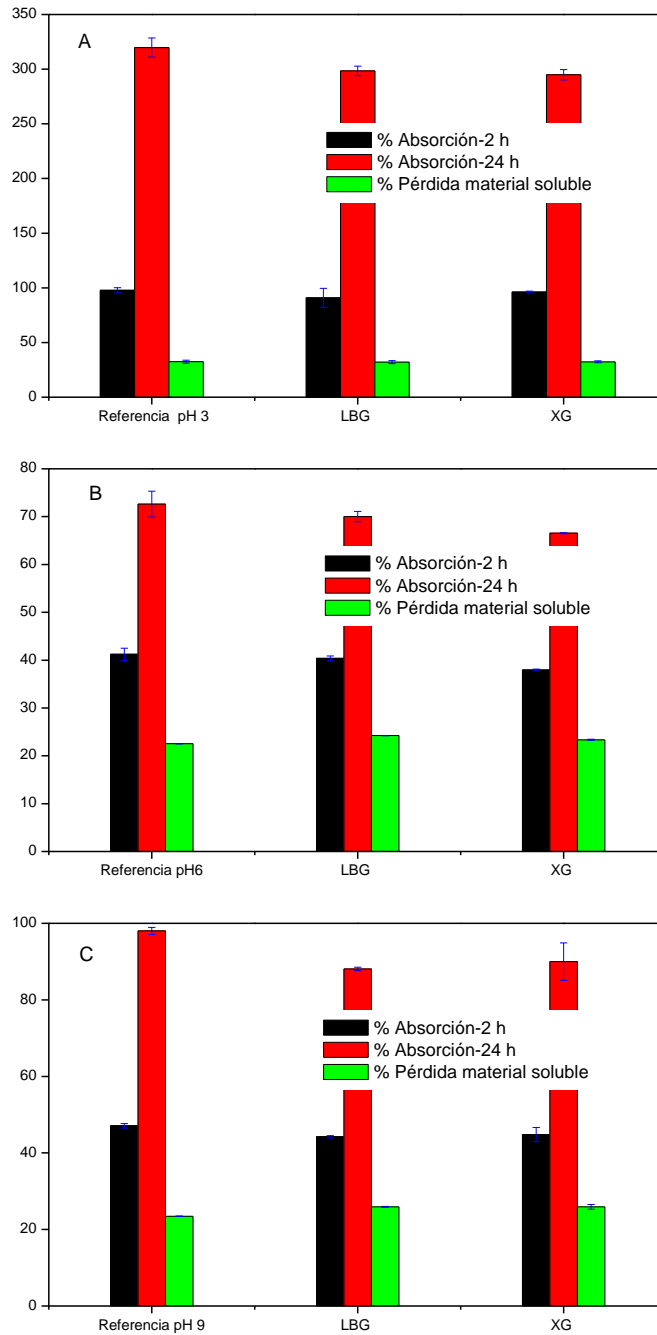


Figura 3.3.13. Comparación de resultados de ensayos de absorción de agua en probetas con un contenido de Goma (LBG y XG) de 1,5% y exentas de gomas para distintos valores de pH A) pH 3; B) pH 6; C) pH 9.

Considerando los anteriores resultados, podría decirse que en general la adición de gomas provoca una leve disminución en la capacidad de absorción de agua de los bioplásticos. Esta reducción se acentúa después de 24 horas de inmersión y para valores de pH diferentes al nativo, siendo en todo caso aproximadamente proporcional a la capacidad de retención propia del sistema sin goma. La incorporación de LBG tiene un efecto menos apreciable para valores de pH ácido y neutro que para sistemas alcalinos. Sin embargo, los sistemas con XG presentan una tendencia similar para todos los valores de pH.

Independientemente del pH, el comportamiento de los bioplásticos en los ensayos de absorción de agua, al añadir polisacárido, sugiere una menor habilidad de las proteínas para retener agua, debida probablemente a una disminución de las interacciones por puentes de hidrógeno y del volumen disponible para la entrada de moléculas de agua, ocasionadas por la presencia de las gomas en la matriz de la probeta. Por otro lado, las gomas también ven reducida su capacidad de ligar agua al estar atrapadas en la estructura del bioplástico y debido a su baja solubilidad a bajas temperaturas.

3.3.3. Solubilidad de sistemas WG/GL/XG/agua

Para obtener mayor información sobre el grado de entrecruzamiento de los sistemas con gluten en presencia de gomas y de las interacciones entre proteína e hidocoloide, se considera de interés hacer el estudio de solubilidad en función del pH para una goma aniónica. Para este estudio se ha seleccionado la goma XG, ya que se han caracterizado anteriormente sus probetas de bioplástico a distintos valores de pH. Así, en este apartado se hace un estudio de los perfiles de solubilidad para distintos medios y valores de pH de las masas y bioplásticos preparados con XG y se comparan con el sistema sin goma.

3.3.3.1. Solubilidad de masas del sistema WG/GL/XG/agua

En la Figura 3.3.14 se presentan los valores del porcentaje de proteína soluble con respecto al total de proteína en diferentes medios (agua, solución tampón de SDS al 1% o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%) para mezclas de

los sistemas WG/GL/agua y WG/GL/XG/agua en función del valor del pH. Las masas con goma tienen un contenido de 1,5% de XG con respecto a la cantidad de gluten. Todas las mezclas se prepararon bajo las mismas condiciones, velocidad de agitación de 50 rpm durante 20 min a 25°C.

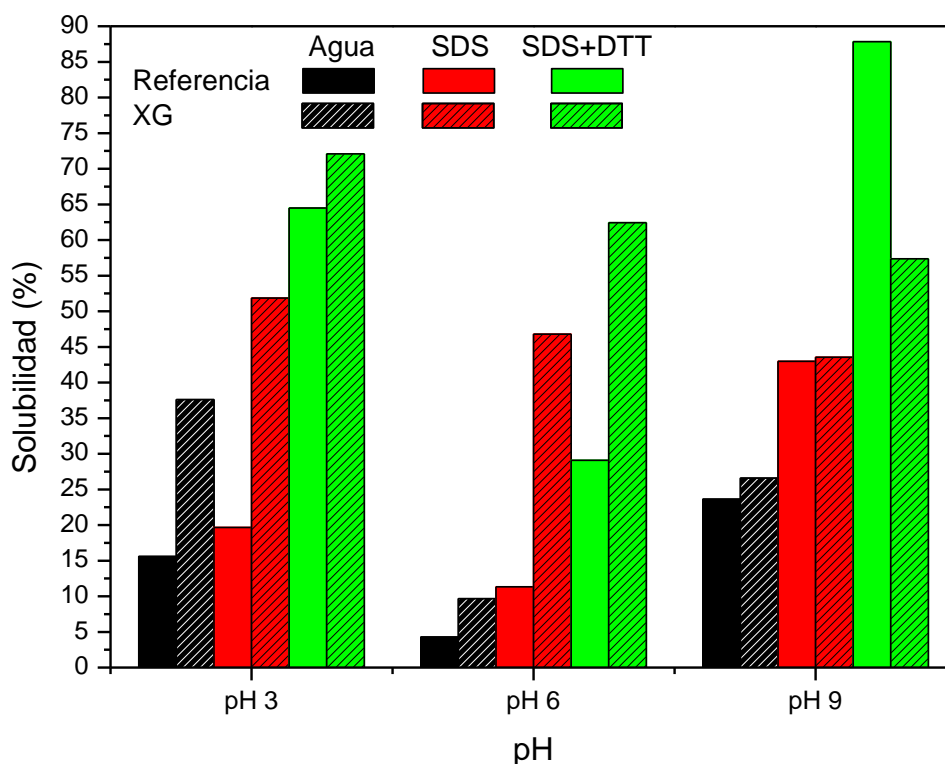


Figura 3.3.14. Comparación de perfiles de solubilidad de mezclas WG/GL/agua y WG/GL/XG/agua (1,5% de XG), en función del pH.

Como puede verse en la Figura 3.3.14, la presencia de XG en las masas produce un efecto de solubilización de la proteína en agua que es más evidente a pH 3. Este hecho debe estar relacionado con la formación de complejos solubles derivados de la interacción entre un hidrocólide aniónico y el gluten, descrita por otros autores (Bárcenas y col, 2009; Ribotta y col., 2005), que se encuentra favorecido a valores de pH inferiores al punto isoeléctrico, donde goma y proteína presentan cargas opuestas y experimentan interacciones de tipo atractivo. Sin embargo, en la Figura 3.3.14 también puede detectarse este

efecto solubilizante a pH 6, lo cual indica que la formación de complejos solubles se produce incluso en las proximidades del punto isoeléctrico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ribotta y col. (2005), que encontraron un aumento de solubilidad no selectivo de proteínas de gluten producido por interacciones con XG a pH 6,5. En cambio, a pH alcalino, dicho efecto de solubilización desaparece prácticamente debido a que la similitud en cargas produce repulsión y por tanto limita en gran medida la formación de dichos complejos solubles. Estas diferencias de solubilidad con el pH son aún más claras para las masas extraídas con SDS, que produce disgregación de uniones de tipo físico, como puentes de hidrógeno, que pueden también jugar un papel importante en las interacciones proteína-polisacárido, tal y como indicaron Ribotta y col. (2005). Así, el efecto solubilizante de la goma para las proteínas disgregadas sigue siendo evidente a pH 3 y 6, resultando incluso más patente en este último caso, a pesar de la escasa carga neta de las superficies proteicas. Por el contrario, a pH 9, este efecto resulta claramente impedido por las repulsiones electrostáticas. Como resultado, no hay diferencias significativas en solubilidad para las masas con y sin XG y se produce un desplazamiento del mínimo de solubilidad proteica de pH 6 a 9 de las masas con XG, cuando son extraídas con el agente disgregante.

El efecto del pH para las masas extraídas con ambos agentes SDS (disgregante) y DTT (disociante) es similar pero conlleva un cambio más radical a pH 9. Así, mientras la adición de XG a pH 3 y 6 conduce a una mayor solubilidad, a pH 9 se produce el efecto contrario, siendo la solubilidad de la masa sin XG, extraída con SDS y DTT, mucho mayor que la que contiene XG. Como se mencionó anteriormente, durante el mezclado se produce cierto grado de entrecruzamiento inducido por la cizalla. El incremento en la solubilidad de las proteínas en el medio con SDS+DTT al incorporar goma a pH 3 y 6, sugiere una restricción en dicho entrecruzamiento por la presencia de XG. Sin embargo, a pH 9, lejos de observarse inhibición, parece que el XG presentaría cierta sinergia para la formación de entrecruzamientos inducida por la cizalla y las condiciones alcalinas. Como se discutió en el apartado de solubilidad para el sistema de referencia en función del pH, el aumento aparente de solubilidad

del sistema a pH alcalino puede deberse a la formación de especies con mayores tamaños pero más solubles o que salen del rango de determinación por absorbancia. Considerando lo anterior, no puede afirmarse con certeza que la reducción de la solubilidad en el medio con SDS+DTT de las mezclas con XG se deba a un mayor grado de entrecruzamiento en el sistema o, que por el contrario, la incorporación de XG produzca una disminución de las especies que estabilizan la estructura pero presentan una mayor solubilidad aparente.

3.3.3.2. Solubilidad de probetas de bioplástico del sistema WG/GL/XG/agua

La Figura 3.3.15 compara los valores del porcentaje de proteína soluble sobre la cantidad total de proteína en los diferentes medios de extracción mencionados anteriormente (agua, solución tampón de SDS al 1% o solución tampón de SDS al 1% y DTT al 1%) para muestras de bioplástico a las que se ha incorporado XG (1,5%), en función del pH, manteniendo como referencia los sistemas exentos de XG. Todos los bioplásticos se han preparado mediante mezclado a 25°C y 50 rpm y termomoldeo a 9 MPa y 130°C.

En la Figura 3.3.15 puede apreciarse, para todos los valores de pH ensayados, que de forma similar a lo que sucedía con las masas, al adicionar XG se produce un aumento en la solubilidad de las probetas tanto en agua como en la solución tampón que contiene SDS. La única excepción en este caso corresponde a la solubilidad en agua de las probetas preparadas a pH 3 en las que no se han encontrado diferencias significativas al añadir XG. El hecho anterior indica que las interacciones de tipo físico (no covalentes) revisten mayor importancia en la estructura de los bioplásticos con goma en comparación con los bioplásticos exentos de ella.

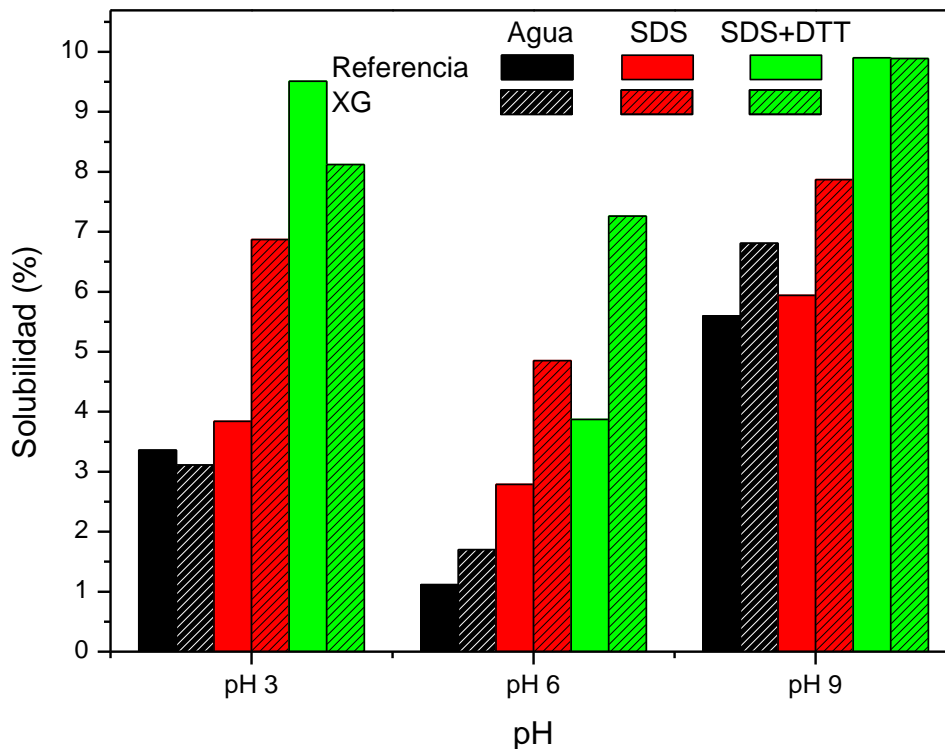


Figura 3.3.15. Comparación de perfiles de solubilidad de probetas de bioplástico WG/GL/agua y WG/GL/XG/agua (1,5% de XG), en función del pH.

En cuanto a la solubilidad en el medio con SDS+DTT, puede observarse una reducción de la misma en las probetas al incorporar XG a pH 3. Este resultado está de acuerdo con los ensayos de DMA y tracción, según los cuales la goma favorecería, aunque en baja proporción, el entrecruzamiento en la matriz de proteína por interacciones con el gluten positivamente cargado. Por otro lado, puede destacarse el hecho de que este efecto es contrario al que aparece para la solubilidad de las masas en las mismas condiciones, lo cual sugiere que la presencia de goma favorece la formación de entrecruzamientos durante el proceso de termomoldeo, que no pueden ser disociados por un agente reductor como el DTT. Tal vez debido a que la compensación de cargas parece facilitar la formación de enlaces isopeptídicos.

En cambio, las probetas a pH 6, presentan mayor solubilidad en el medio más agresivo cuando existe presencia de goma. Esto podría estar asociado a un menor grado de entrecruzamiento provocado por cierto papel plastificante que asume la XG en tales sistemas, lo cual se corrobora con los resultados de los perfiles de DMA y tracción.

La solubilidad en el medio con SDS+DTT de las probetas a pH 9 resulta independiente de la adición de XG. Esto implicaría que las reacciones de entrecruzamiento que dan origen a la estructura de la matriz de gluten no se ven afectadas por la presencia de goma, sin embargo habría una separación de fases en la matriz formada (debida probablemente a la similitud de cargas entre gluten y XG), lo que explicaría la disminución de módulos en DMA y de parámetros en los ensayos de tracción.

3.3.4. Incorporación simultánea de Aldehído y Gomas en bioplásticos WG/GL/agua

En los apartados anteriores se han estudiado las incorporaciones individuales de aldehídos o gomas en los bioplásticos formulados a partir del sistema WG/GL/agua, procesado mediante termomoldeo. En el presente apartado se busca una mejora en las propiedades mecánicas y de absorción de agua de las probetas de bioplástico obtenidas mediante el método termomecánico, adicionando de manera conjunta aldehído y goma al sistema base WG/GL/agua a pH 9, siendo hasta el momento esta condición de pH la óptima para la formación de los bioplásticos. Para tal fin se ha escogido el glioxal que, entre los aldehídos evaluados en el apartado 3.2, es el que da lugar a bioplásticos con mejores propiedades. En el caso de las gomas, se ha considerado la adición de XG y LBG en una proporción bastante mayor a las ya estudiadas (apartado 3.3.1). En este sentido, se pretende hacer uso del bien conocido efecto de sinergismo entre XG y LBG en disolución, para potenciar la interacción entre las gomas y la proteína de gluten.

A continuación se llevará a cabo un análisis individual de las probetas de bioplástico obtenidas mediante termomoldeo en condiciones alcalinas de las mezclas con adición de glioxal (al 3%) y por otro lado con adición de gomas,

XG o combinación de éstas XG/LBG (en una proporción total de 1/4 con respecto al gluten). Los resultados obtenidos se compararán con los correspondientes a los bioplásticos del sistema WG/GL/agua que incorpora de manera conjunta glioxal e hidrocoloides (combinación XG/LBG) a pH9.

3.3.4.1. Adición de Glioxal al sistema WG/GL/agua a pH 9:

Como se pudo observar en el apartado 3.2, el glioxal promueve el entrecruzamiento en la matriz de los bioplásticos de gluten obtenidos por termomoldeo a valores de pH cercanos al punto isoelectrico de la proteína. De otro lado, como establecen algunos autores (Gennadios y col., 1993; Zhang y col., 2006), y se evidenció en el apartado 3.1.5, las condiciones alcalinas favorecen la formación de bioplásticos de gluten.

A continuación, considerando la información anterior, se comparan los resultados de los ensayos de DMA, tracción y absorción de agua para probetas de bioplástico del sistema WG/GL/Glioxal/ agua a pH 9, con los obtenidos para el mismo sistema a pH 6 y con el sistema exento de aldehído a pH 9.

En la Figura 3.3.16 se presentan los valores de los módulos E' y E'' y $\tan \delta$ para probetas de bioplástico WG/GL/Glioxal/agua con una concentración de Glioxal de 3% (con respecto a la cantidad de gluten en el amasado), obtenidas a pH 6 y 9. También se incluyen los perfiles del sistema de referencia 50/18 a pH 9. Todas las muestras se prepararon mediante mezclado a 25°C y 50 rpm y termomoldeo a 9 MPa y 130°C.

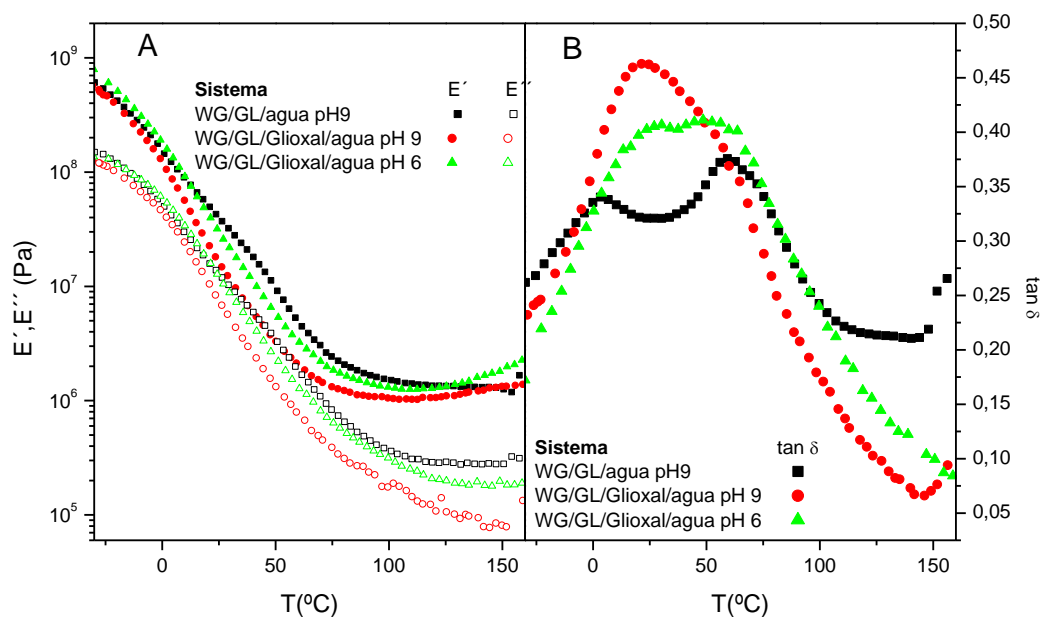


Figura 3.3.16. Ensayos de DMA en probetas WG/GL/Glioxal/agua (Glioxal 3%) a distintos valores de pH

En la Figura 3.3.16.A se puede observar una disminución significativa de los módulos E' y E'' para el sistema con Glioxal a pH 9, con respecto al mismo sistema a pH 6 y a las probetas exentas de aldehído a pH 9. Sin embargo, como lo evidencia el claro solapamiento de picos en $\tan \delta$, representado en la Figura 3.3.16.B, esta reducción va acompañada de un mayor grado de compatibilidad entre fases en las muestras WG/GL/Glioxal/agua a pH 9.

En la Figura 3.3.17 se representan los parámetros σ_{\max} , ε_{\max} , módulo de Young y humedad de las probetas de bioplástico WG/GL/Glioxal/agua con un contenido de Glioxal de 3% a pH 6 y 9. También se incluyen los resultados para los bioplásticos de referencia WG/GL/agua a pH 9. Dichos valores se obtienen de los ensayos de tracción aplicados a muestras sometidas a las mismas condiciones de procesamiento y acondicionamiento (53%HR).

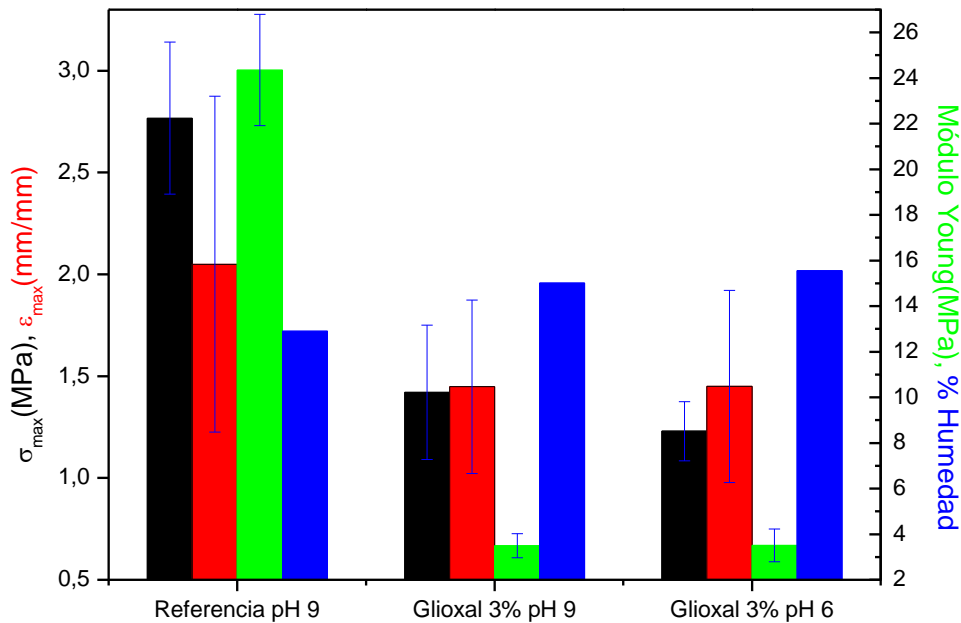


Figura 3.3.17. Ensayos de tracción en probetas WG/GL/Glioxal/agua (Glioxal 3%) a distintos valores de pH

Como se aprecia en la Figura 3.3.17, los valores de los parámetros de los ensayos de tracción para los especímenes con un contenido de Glioxal de 3% son muy similares para los dos valores de pH en estudio, no existiendo diferencias significativas entre ellos para ninguno de los parámetros. En comparación con las probetas de bioplástico exentas de aldehído, se evidencia un descenso significativo de σ_{max} y del módulo de Young al agregar Glioxal cuando los sistemas WG/GL/agua son preparados bajo condiciones alcalinas. Este mismo efecto del glioxal a pH 9 ya se apreciaba a pH 6 (apartado 3.3.3) y, como en aquel caso, puede estar relacionado con la mayor humedad que mantienen las probetas con glioxal.

La Figura 3.3.18 contiene los porcentajes de absorción de agua (después de 2 y 24 horas de inmersión) y pérdida de material soluble para muestras de bioplástico del sistema WG/GL/Glioxal/agua, preparadas a pH 6 y 9. Las probetas tienen un contenido de 3% del aldehído y se comparan con las de

referencia a pH 9 obtenidas por el mismo método de procesado: mezclado (a 25°C y 50rpm) y moldeo a 9MPa y 130°C.

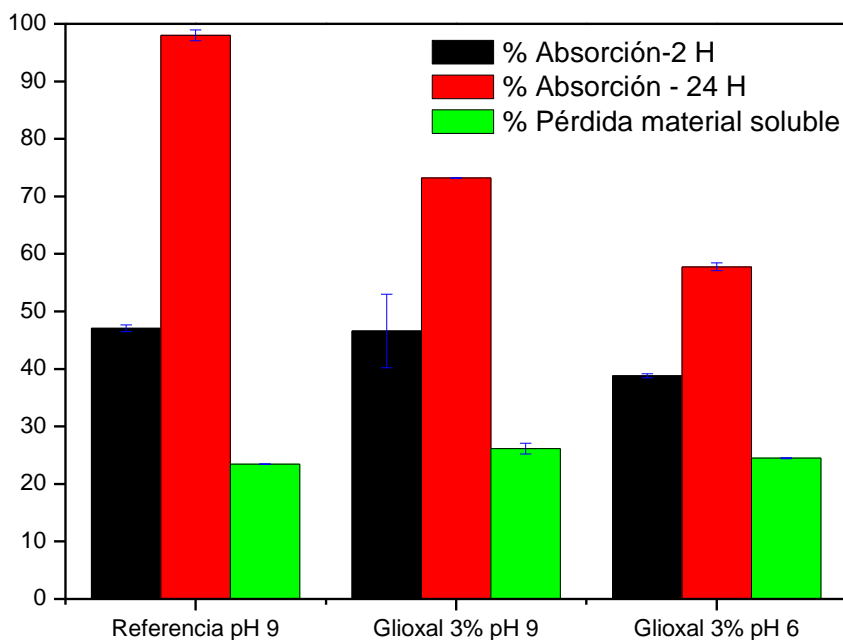


Figura 3.3.18. Ensayos de absorción de agua en probetas WG/GL/Glioxal/agua (Glioxal 3%) a distintos valores de pH.

Como se puede ver en la Figura 3.3.18, los bioplásticos con Glioxal a pH 9 presentan valores de absorción de agua (tras 2 y 24 horas de inmersión) intermedios entre los correspondientes al mismo sistema preparado a pH 6 y los del sistema exento de aldehído a pH 9. De ahí que se evidencie una mejora en la capacidad de absorción de agua en los sistemas con glioxal al aumentar el valor de pH, pero un detrimento en los valores de esta propiedad en bioplásticos WG/GL/agua a pH 9 cuando se agrega el aldehído. Este mismo efecto también ocurría al añadir Glioxal a pH 6.

En resumen, las condiciones de pH alcalino para los sistemas que incorporan Glioxal en una concentración del 3%, supone una disminución de los valores de los módulos de DMA aunque con una mayor compatibilización de fases en el

sistema y una mayor capacidad de absorción de agua, sin variación significativa de los parámetros de tracción.

3.3.4.2. Bioplásticos híbridos XG/LBG/WG

Anteriormente, en este mismo apartado, se estudio la adición de gomas en porcentajes relativamente bajos (1,5% con respecto a la proteína) para la obtención de bioplásticos de gluten procesados mediante termomoldeo a pH 9. Algunos autores han realizado experiencias con mezclas de gomas y proteínas en proporciones mucho mayores que las estudiadas hasta ahora. Se trata pues de sistemas híbridos goma/proteína en los que la primera deja de ser un aditivo. Así, existen estudios de sistemas híbridos en los que se han empleado relaciones de hasta 0,9 (goma con respecto al total de goma y proteína) en la preparación de películas por el método de casting y hasta 0,5 en procesado mediante termomoldeo, habiéndose encontrado mejoras de propiedades en ensayos de tracción (Osés y col., 2009; Zhou y col., 2007; Zuo y col., 2009). De otro lado, es bien conocida la capacidad de interacción entre XG y LBG como agentes espesantes en agua y su efecto de sinergismo en la formación de geles y de fortalecimiento mediante el establecimiento de estructuras tridimensionales (Wielinga, 2010).

A continuación, teniendo en cuenta lo anterior, a continuación se realiza un estudio de la adición de goma Xantana en una relación XG/WG de 1/4 en la formulación de bioplásticos obtenidos por termomoldeo a pH 9, manteniendo la misma cantidad de plastificante empleada en el sistema de referencia. Asimismo, en condiciones similares, se llevara a cabo un remplazo parcial de XG por LBG en dichas probetas conduciendo a sistemas XG/LBG/WG (0,5/0,5/4). Los resultados de los ensayos de DMA, tracción y absorción de agua de las probetas de bioplástico así preparadas, se compararán con los presentados previamente para las muestras del sistema de referencia WG/GL/agua a pH 9 y para las que incorporan 1,5% de XG al mismo valor de pH.

La Figura 3.3.19 presenta los valores de los módulos E' , E'' y $\tan \delta$, obtenidos a partir de ensayos de DMA en rampas de temperatura, para muestras de

bioplásticos de los sistemas WG/GL/agua, WG/GL/XG/agua con una concentración de XG de 1,5% y de sistemas híbridos WG/Gomas/GL/agua con una relación XG/WG 1/4 y XG/LBG/WG 0,5/0,5/4. En todos los casos a pH 9. El contenido de XG o XG/LBG con respecto al gluten en estos últimos sistemas es del 25%. Estas muestras fueron mezcladas previamente (a 25°C y 50 rpm), termomoldeadas (a 9 MPa y 130°C) y sometidas a equilibrio a una humedad relativa de 53 %.

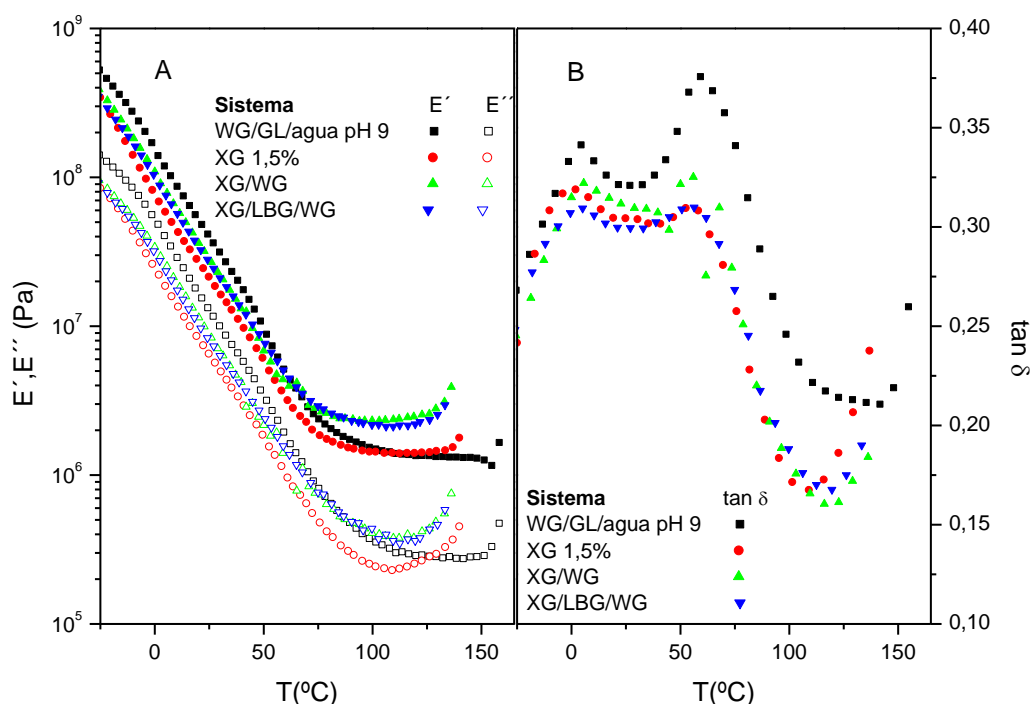


Figura 3.3.19. Ensayos de DMA en probetas de los sistemas: referencia (WG/GL/agua a pH9), con adición de 1,5% de XG (XG 1,5%) e híbridos XG/WG con relación 1/4 (XG/WG) y XG/LBG/WG con relación 0,5/0,5/4 (XG/LBG/WG), todos a pH9.

En la Figura 3.3.19.A puede observarse que los ensayos DMA muestran una gran similitud en comportamiento entre los bioplásticos formados a partir de sistemas que incorporan XG y los que contienen la combinación XG/LBG. Dichos materiales presentan valores de módulos de E' y E'' mayores a las probetas con 1,5% XG en todo el intervalo de temperaturas estudiado. Con respecto a las muestras del sistema sin goma al mismo valor de pH, los

sistemas denominados híbridos presentan menores valores de E' y E'' hasta una temperatura aproximada de 50°C , por encima de la cual ambos módulos viscoelásticos igualan e incluso superan los valores correspondientes al sistema de referencia. Asimismo, puede destacarse el potencial de termoendurecimiento mostrado por estos materiales híbridos que permitiría inducir mejoras de sus propiedades viscoelásticas mediante modificación de las condiciones de procesamiento termomecánico.

En la Figura 3.3.19.B puede apreciarse la presencia de los picos de $\tan \delta$, correspondientes $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, que se encuentran en valores de temperatura aproximadamente iguales para los dos materiales híbridos. Puede apreciarse un ligero acercamiento entre picos, en comparación con los demás sistemas representados.

En la Figura 3.3.20 se presentan los resultados de los ensayos de tracción en probetas de bioplástico de los sistemas WG/GL/agua, WG/GL/XG/agua con una concentración de XG de 1,5% y probetas de los sistemas híbridos WG/Gomas/GL/agua, con una relación XG/WG 1/4 y XG/LBG/WG 0,5/0,5/4. Todas las muestras fueron preparadas en condiciones alcalinas mediante el procesamiento estándar de mezclado y termomoldeo y equilibradas a 53%HR.

Como se observa en la Figura 3.3.20, las probetas que contienen XG, comparadas con el sistema sin goma, presentan una disminución de propiedades en tracción que se hace mayor al aumentar el contenido de goma, de tal modo que las muestras con una relación XG/WG 1/4 exhiben los valores más bajos de σ_{\max} y ϵ_{\max} . Sin embargo, al reemplazar parte de XG por LBG se logra amortiguar la reducción de dichos parámetros, ya sea por disminución de la cantidad de XG o por efecto de sinergia entre gomas. Cabe resaltar que, si bien los valores de los módulos de Young de los materiales híbridos no superan a los del sistema de referencia, si son significativamente mayores que los de las probetas con 1,5% de XG.

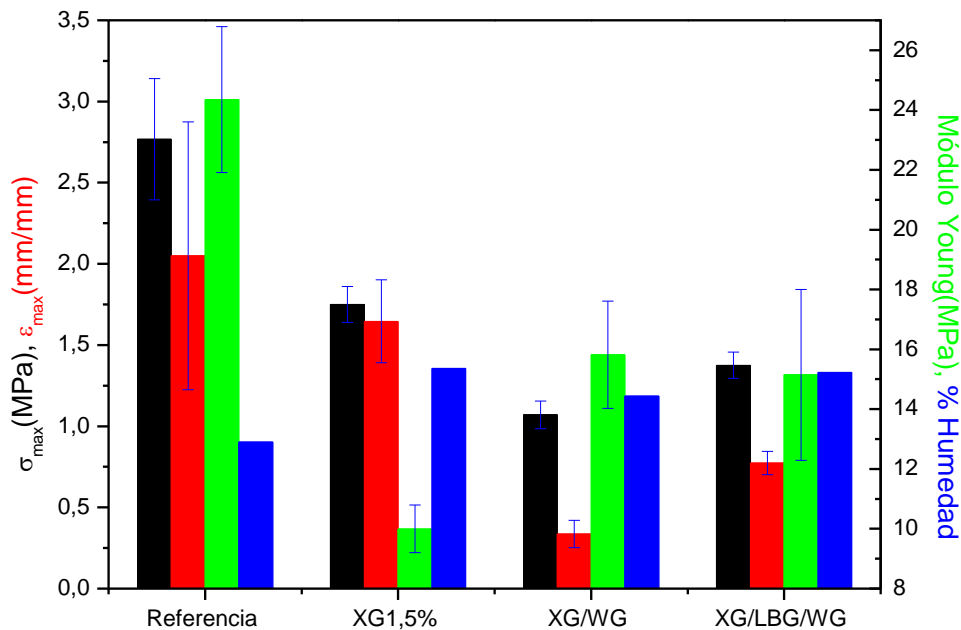


Figura 3.3.20. Ensayos de tracción en probetas de los sistemas: referencia, con adición de 1,5% de XG (XG 1,5%) y mezclas XG/WG con relación 1/4 (XG/WG) y XG/LBG/WG con relación 0,5/0,5/4 (XG/LBG/WG), todos a pH9.

En la Figura 3.3.21 se representan los resultados de los ensayos de absorción de agua obtenidos tras 2 y 24 horas de inmersión y de la pérdida de material soluble para los bioplásticos en estudio. En dicha figura puede observarse una evidente mejora de la capacidad de absorción de agua de los bioplásticos en las formulaciones híbridas XG/WG y XG/LBG/WG. Los especímenes del sistema XG/LBG/WG exhiben la mayor capacidad de absorción tras 2 horas de inmersión, superando a las probetas con XG/WG en un 10% y a los demás sistemas en casi un 20%. Sin embargo, las probetas del sistema XG/WG 1/4 son las que conducen a los mayores porcentajes de absorción después de 24 horas de inmersión, sobrepasando casi en un 50% la absorción alcanzada por el sistema sin gomas. Todo ello a pesar de que en estas condiciones de pH alcalino la adición de un 1,5% de XG reduce ligeramente la capacidad de absorción del material termomoldeado.

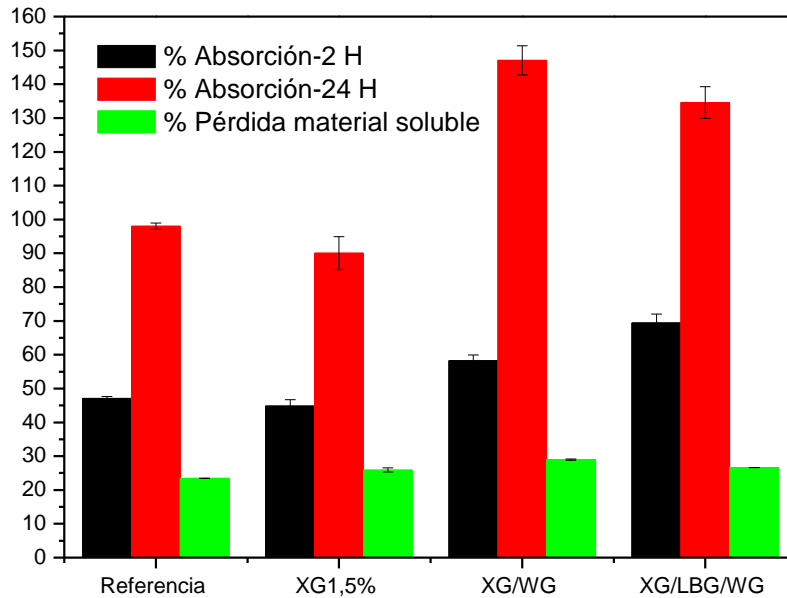


Figura 3.3.21. Ensayos de absorción de agua en probetas de los sistemas: referencia, con adición de 1,5% de XG (XG 1,5%) y mezclas XG/WG con relación 1/4 (XG/WG) y XG/LBG/WG con relación 0,5/0,5/4 (XG/LBG/WG), todos a pH9.

En resumen, los bioplásticos de los sistemas híbridos XG/WG 1/4 y XG/LBG/WG 0,5/0,5/4 presentan un interesante potencial para su aplicación como materiales absorbentes, ya que además de presentar una notable capacidad de absorción de agua, presentan valores de E' y E'' aceptables en comparación con las probetas sin goma y superiores al sistema con 1,5% de XG. Por el contrario, dichos sistemas híbridos presentan peores resultados de los ensayos de tracción (σ_{max} y ϵ_{max}). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en materiales preparados mediante termomoldeo de mezclas de gluten o soja con gomas derivadas de celulosa, en los que se obtiene una disminución de los parámetros de los ensayos de tracción para porcentajes de goma mayores a 5% con respecto a la proteína (Zhou y col., 2007; Zuo y col., 2009).

Zhou y col. (2007) indicaron que para relaciones goma/proteína altas puede tener lugar la agregación del hidrocólide en dominios cristalinos dentro de la matriz de proteína, en cuyo caso, el aumento de la cantidad de goma produciría

un incremento de la escala y densidad de la estructura cristalina con el correspondiente descenso de σ_{\max} y ε_{\max} . Estos mismos autores encontraron un descenso en la T_g de los bioplásticos al aumentar la concentración de goma, que asociaron con las estructuras formadas y con el incremento en la relación GL/WG, ocasionado por la inmiscibilidad entre el glicerol y los hidrocoloides.

Por otro lado, Zuo y col (2009) atribuyeron la disminución de los valores de los parámetros de tracción en bioplásticos procesados mediante termomoldeo de mezclas MC/WG a una escasa interacción interfacial entre las fibras de la goma y la matriz de gluten plastificado, que condujo a una fractura rápida del material en dicha interface. Estos autores también hallaron una diferencia en las T_g de los componentes al variar la relación goma/proteína, relacionada con la baja capacidad de plastificación del glicerol con la goma y con un cambio de la morfología del material.

En el presente estudio, para las condiciones de procesado utilizadas, no habría suficiente grado de mezclado entre gomas y proteína, lo que conduciría a la aparición de una estructura con separación de fases, pero con interacciones físicas entre componentes, efecto que sería responsable de los resultados de DMA y de la reducción σ_{\max} y ε_{\max} . La fase formada primordialmente por goma sería la causante del marcado aumento en la capacidad de retención de agua, siendo mayor para el sistema que sólo contiene XG, cuya habilidad para ligar agua es mayor que la de LBG. Teniendo en cuenta que las probetas del híbrido XG/LBG/WG exhiben una menor reducción en los parámetros de tracción que las del sistema XG/WG, sin comprometer de manera significativa la capacidad de absorción de agua y los módulos de DMA, se elige el primero como sistema de partida para la incorporación de glioxal en la siguiente etapa del estudio.

3.3.4.3. Bioplásticos del sistema XG/LBG/WG/Glioxal/GL/agua a pH 9

Hasta este punto se han caracterizado individualmente el sistema que contiene aldehído y el sistema XG/LBG/WG, los dos preparados a pH alcalino, mediante ensayos de DMA, tracción y absorción de agua. A continuación se incorporarán de manera simultánea gomas y aldehído al sistema WG/GL/agua a pH 9. Las

propiedades de las probetas resultantes se evaluarán en relación con los especímenes de los sistemas originarios, descritos anteriormente.

Las masas WG/GL/agua con incorporación de Glioxal y XG/LBG/WG/GL/agua con o sin adición de Glioxal preparadas mediante mezclado a 25°C y 50 rpm a pH9, fueron sometidas a moldeo a 130°C y 9 MPa para obtener las correspondientes probetas. Los ensayos de DMA realizados sobre las probetas obtenidas bajo dichas condiciones se presentan en la Figura 3.3.22. Como se puede observar en la figura en mención, las probetas de bioplástico del sistema que involucra la presencia de gomas y aldehído exhiben un comportamiento intermedio al de los sistemas de partida, con un leve aumento de módulos E' y E'' en la región de bajas temperaturas y valores similares al del sistema con gomas para el resto del intervalo de temperaturas estudiado. Por otro lado, se puede observar como el aldehído también produce un claro efecto de compatibilización de fases, con el correspondiente solapamiento de picos de $\tan \delta$, para el material híbrido.

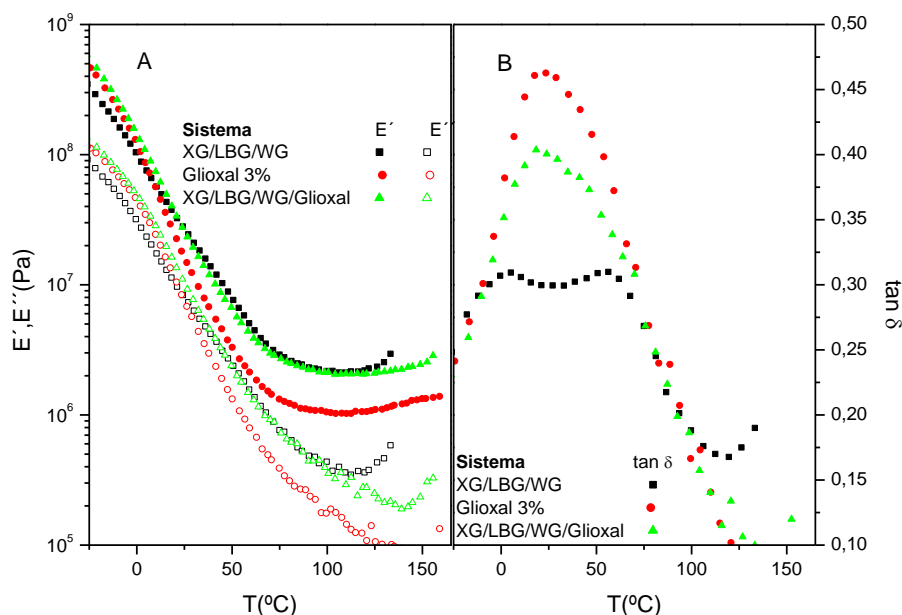


Figura 3.3.22. Ensayos de DMA en probetas de los sistemas WG/GL/Glioxal/agua con una concentración de aldehído de 3% (Glioxal 3%) y mezclas XG/LBG/WG 0,5/0,5/4 con adición (XG/LBG/WG/Glioxal) y sin adición (XG/LBG/WG) de Glioxal, todos a pH9.

La Figura 3.3.23 muestra los resultados de los ensayos de tracción realizados en probetas de bioplástico de los sistemas W/GL/Glioxal/agua con una concentración de aldehído de 3% e híbridos XG/LBG/WG 0,5/0,5/4 con y sin adición de Glioxal, preparadas a pH 9 mediante termomoldeo y sometidas a acondicionamiento a 53%HR. Se observa un leve aumento de σ_{\max} en los especímenes que incorporan de manera simultánea goma y aldehído con respecto a los demás bioplásticos. Para el resto de parámetros de tracción se evidencia un comportamiento intermedio del sistema mixto, con lo que se obtienen mayores valores de ϵ_{\max} , al añadir aldehído al sistema XG/LBG/WG, pero menores valores de módulo de Young.

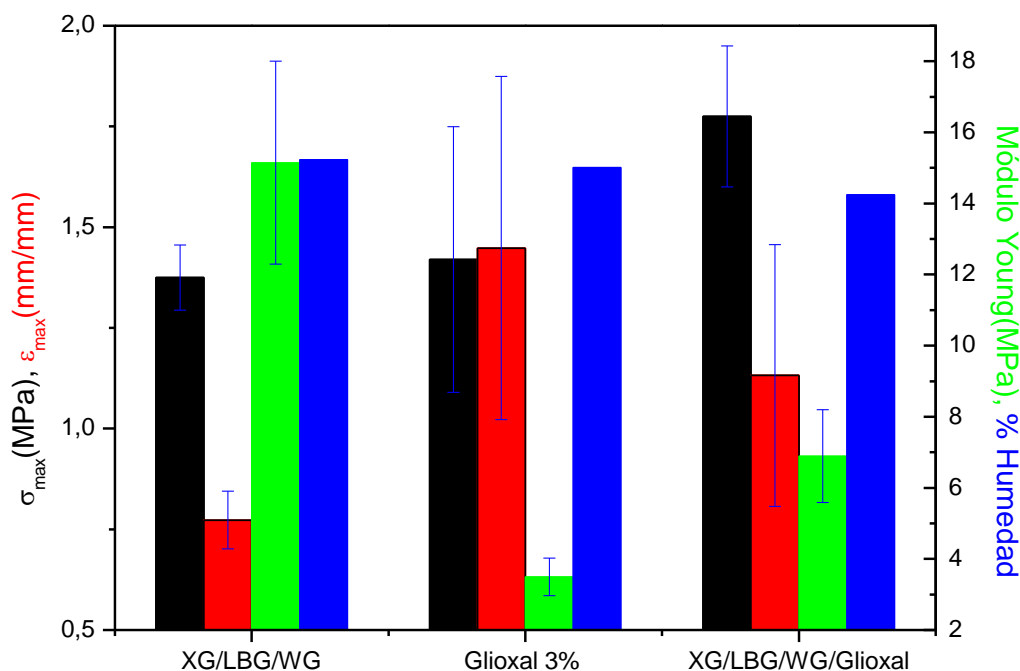


Figura 3.3.23. Ensayos de tracción en probetas de los sistemas W/GL/Glioxal/agua con una concentración de aldehído de 3% (Glioxal 3%) y mezclas XG/LBG/WG 0,5/0,5/4 con adición (XG/LBG/WG/Glioxal) y sin adición (XG/LBG/WG) de Glioxal, todos a pH9.

Como puede apreciarse en la Figura 3.3.24, que representa los resultados de absorción de agua y pérdida de material soluble de los bioplásticos en estudio, se produce una reducción en la capacidad de absorción de agua de los bioplásticos que contienen goma al incorporar glioxal a la formulación. En

concreto el sistema XG/LBG/WG experimenta, al adicionar glioxal, una reducción del 11 y 27% en los porcentajes de absorción de agua tras 2 y 24 horas de inmersión, respectivamente, al adicionar glioxal. No obstante, estos especímenes del sistema WG/GL/Glioxal/agua exhiben una capacidad de absorción de agua superior a la del sistema con glioxal, pero exento de goma.

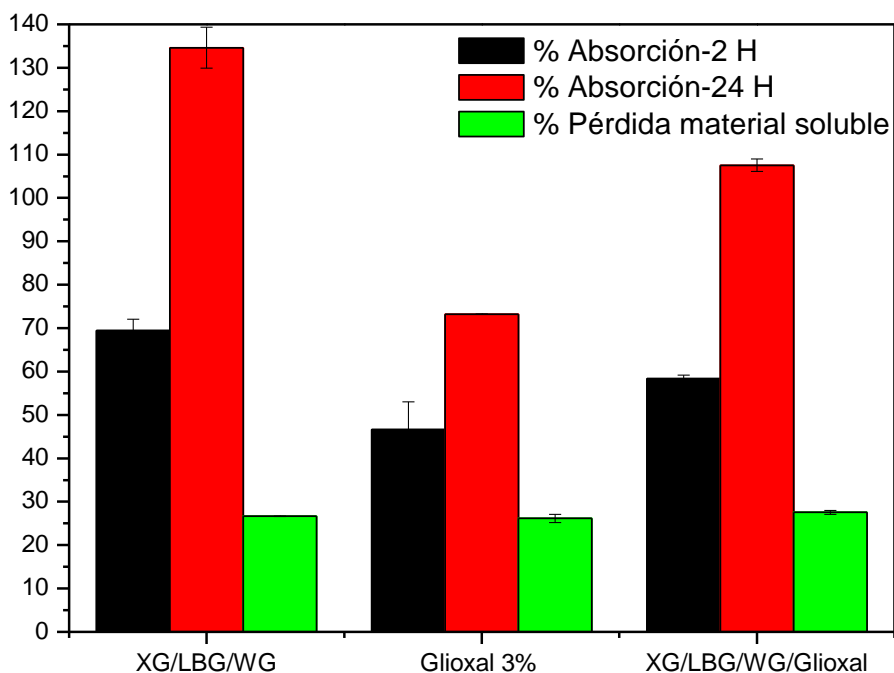


Figura 3.3.24. Ensayos de absorción de agua en probetas de los sistemas W/GL/Glioxal/agua con una concentración de aldehído de 3% (Glioxal 3%) y mezclas XG/LBG/WG 0,5/0,5/4 con adición (XG/LBG/WG/Glioxal) y sin adición (XG/LBG/WG) de Glioxal, todos a pH9.

De los anteriores resultados puede concluirse que la incorporación de Glioxal a los materiales híbridos XG/LBG/WG produce un mayor grado de compatibilidad entre fases, como puede verse por el perfil de $\tan \delta$, y una mejora en σ_{\max} y ϵ_{\max} . Sin embargo, se reduce de manera notoria la capacidad de absorción de agua en dichos bioplásticos, que en todo caso sigue siendo mayor a la del sistema de referencia WG/GL/agua a pH 9.

Dicho comportamiento podría deberse a un mayor grado de entrecruzamiento en los sistemas híbridos XG/LBG/WG promovido por el aldehído, que conduciría a una matriz más estructurada, lo cual explicaría el aumento de módulos en DMA y de σ_{\max} en tracción, así como la reducción de la capacidad de absorción de agua; pero a su vez con mayor compatibilidad entre componentes como lo indica el solapamiento del pico de $\tan \delta$ en DMA y la leve mejora de ϵ_{\max} en los ensayos de tracción.

3.4. EXTRUSIÓN

La extrusión es una de las técnicas más importantes de procesamiento de polímeros en la actualidad, debido a su alta eficiencia para mezclado y moldeo de materiales termoplásticos (Pommet y col, 2003). La mayoría de las películas de plásticos sintéticos, como el polietileno de baja densidad, se fabrican en extrusoras (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008). El uso de esta bien conocida tecnología con una materia prima renovable de origen agrícola, como lo es el gluten de trigo, representa un desafío y una oportunidad para la producción industrial de bioplásticos (Pommet y col, 2003).

A diferencia de los materiales termoplásticos, la viscosidad del gluten puede no disminuir con el calentamiento, llegando incluso a aumentar debido a posibles reacciones de entrecruzamiento. Por tanto, la extrusión de las proteínas del gluten es sólo posible en un limitado intervalo de condiciones de operación, que va desde el punto en que las proteínas fluyen (debido a la movilidad de las cadenas favorecidas por la agitación y el calentamiento) hasta la agregación (formación de entramado y gelificación), antes de una eventual degradación térmica, lo cual ocurre a temperaturas inferiores a las encontradas para polímeros sintéticos (Lagrain y col., 2010).

Por tanto, los cambios estructurales y reológicos del gluten durante la extrusión van a determinar la ventana de operación. Algunos parámetros importantes que afectan a su extrusionabilidad son la energía mecánica, la cizalla impartida, la presión, el contenido de plastificante, el tiempo de operación y la

temperatura. Estos parámetros determinan la extensión de los cambios conformacionales moleculares, la agregación y el entrecruzamiento químico ocurrido durante el procesado. En este sentido, es importante tener una temperatura de extrusión suficientemente amplia para obtener tanto una relación de la viscosidad, a la vez que una adecuada agregación de las proteínas que permitan formar películas homogéneas de material. Sin embargo, a temperaturas muy altas se puede presentar la degradación térmica del material que junto con una agregación extensiva, determina el límite superior de la temperatura de procesado. Así, el límite inferior de temperatura estará determinado por el inicio de la desnaturalización (Ullsten y col., 2009), requerida para que el material adopte la forma final. De ahí que los materiales con gluten sean normalmente procesados en seco entre 80 y 130°C y las propiedades de los extruídos dependan de las condiciones de operación de forma compleja (Redl y col., 1999).

Hasta este punto de la presente memoria se ha estudiado el termomoldeo por presión y temperatura del sistema WG/GL/agua y la influencia de la adición de aldehídos y gomas en dicho sistema. En este apartado, se pretende evaluar las propiedades reológicas y físico-químicas de bioplásticos WG/GL/agua obtenidos mediante procesado por extrusión y compararlos con aquellos preparados por termomoldeo. Para tal comparación, se ha seleccionado el sistema tomado como referencia (50/18), a dos valores de pH (6 y 9); un sistema con adición de aldehído (glioxal) y otro con incorporación de goma (xantana).

Su procesado consistió, primero, en el mezclado bajo condiciones adiabáticas (25°C y 50 rpm) hasta obtener una masa que, después de someterse a un proceso de reducción de tamaño, se alimentó a la extrusora. Se ensayaron varios perfiles de temperatura en la misma, a fin de obtener láminas continuas, con apariencia y propiedades adecuadas para la formación de probetas (por troquelado). Los materiales así obtenidos, tanto tras la premezcla como tras la extrusión, han sido posteriormente caracterizados mediante ensayos de DMA, tracción y absorción de agua. Finalmente, se realiza una comparación de los

resultados obtenidos para estos materiales con los correspondientes al proceso termomecánico (mezclado y termomoldeo).

3.4.1. Etapa de mezclado previo

Como paso previo a la extrusión, se prepararon masas del sistema WG/GL/agua 50/18 a dos valores de pH (6 y 9) y de los sistemas WG/GL/Glioxal/agua y WG/GL/XG/agua con contenidos de aldehído de 3% y de goma del 1,5% respectivamente, calculadas con respecto a la cantidad de gluten en la mezcla de partida. Como se observó en el apartado 3.1.1., los procesos de mezclado a temperaturas bajas dan lugar, por su menor viscosidad, a masas con propiedades adecuadas para su uso en extrusión. Por tanto se seleccionó como condición térmica de mezclado la adiabática con temperatura inicial de 25°C. Otros investigadores también emplearon el mezclado previo entre gluten y glicerol (Ullsten y col., 2009) y la adición de agua (Hochstetter y col., 2006) para facilitar el proceso de extrusión en la obtención de bioplásticos de gluten y glicerol.

Teniendo en cuenta que las propiedades del material resultante de la premezcla pueden afectar a la operación de extrusión, resulta conveniente estudiar el proceso de mezclado y realizar una caracterización viscosa de las masas resultantes para así poder establecer de qué modo influirán las propiedades reológicas de las masas resultantes en el comportamiento de los sistemas durante la extrusión. A continuación se presenta el análisis de los perfiles de par de torsión y temperatura y el comportamiento viscoso de las masas que serán posteriormente extrusionadas.

3.4.1.1. Perfiles par de torsión y temperatura

La Figura 3.4.1 muestra perfiles del par de torsión y de la temperatura, durante el mezclado de los sistemas que posteriormente serán sometidos a extrusión. Al igual que en capítulos anteriores el mezclado se realizó a una velocidad de agitación de 50 rpm y temperatura inicial de 25°C.

Como puede apreciarse en la Figura 3.4.1, todos los sistemas presentan una evolución de los perfiles de par de torsión y temperatura similar a la descrita anteriormente para el sistema WG/GL/Agua 50/18 a pH6 (apartado 3.1.1). La única desviación se observa para la mezcla con goma xantana, XG, en cuyo caso los perfiles presentan, comparados con los otros sistemas, un desplazamiento (de aproximadamente 2 min) en el aumento de los valores de par de torsión y temperatura. Este retraso se debe al modo de preparación de las masas con XG. Para lograr una adecuada incorporación de los componentes de la mezcla, se requiere agregar gradualmente la disolución de goma mientras se continúa con el proceso de amasado. Este paso requiere unos pocos minutos, que corresponde con el traslado de los perfiles a tiempos mayores.

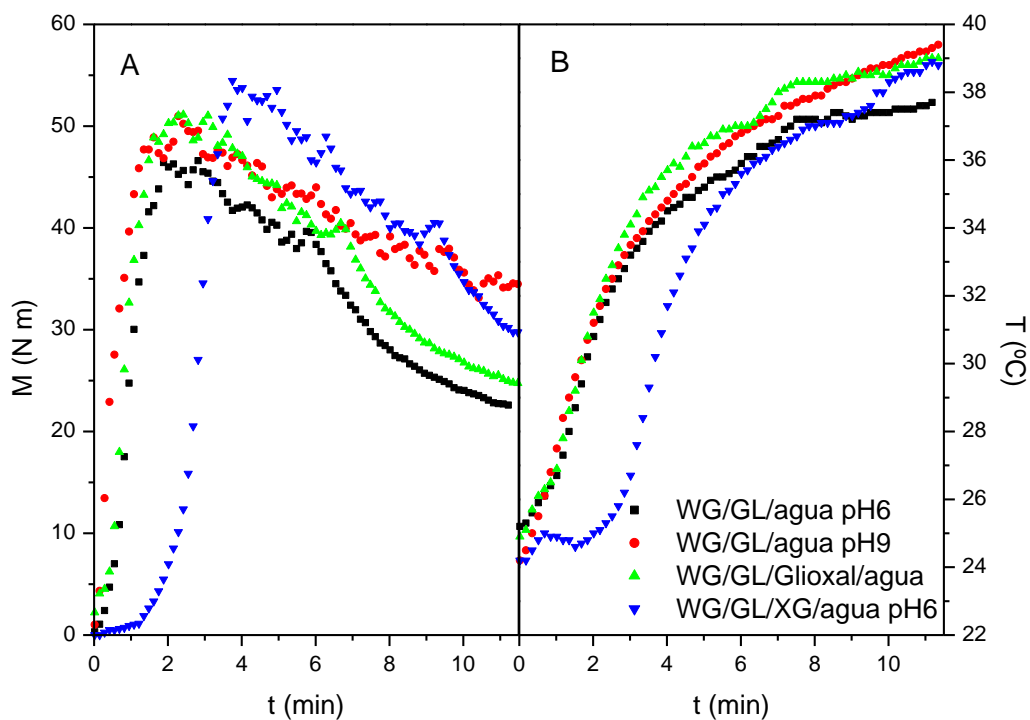


Figura 3.4.1. Evolución del par de torsión (A) y la temperatura (B) durante el mezclado previo a la extrusión de diferentes bioplásticos (50 rpm, temperatura inicial 25°C).

La Tabla 3.4.1 recoge algunos parámetros de interés relacionados con el proceso de mezclado de las masas en estudio, dónde los valores máximos

corresponden al tiempo en el que se alcanza el pico del par de torsión y los finales al tiempo final de mezclado, tal como se definió en el apartado 3.1.1.

Tabla 3.4.1. Parámetros obtenidos del mezclado de diferentes sistemas procesados bajo las mismas condiciones (velocidad de mezclado 50 rpm, condiciones adiabáticas y tiempo de mezclado de 11 min).

	WG/GL/agua pH6	WG/GL/agua pH9	WG/GL/Glioxal/agua	WG/GL/XG/agua pH6
M_{Final}^a (Nm)	22,50±0,50	32,67±2,94	23,57±4,86	29,20±0,51
T_{Final} (°C)	37,60±0,91	40,30±0,88	39,97±1,72	39,20±0,45
SME_{Final} (kJ/kg)	470,58±10,35	544,93±35,55	544,71±34,65	448,33±29,92
t_{Max}^b (min)	2,26±0,30	2,15±0,46	2,56±0,26	4,53±0,59
M_{Max} (Nm)	48,60±1,23	46,83±2,17	45,57±4,44	52,17±1,44
T_{Max} (°C)	31,30±1,00	32,73±0,37	34,13±2,18	32,43±1,74
SME_{Max} (kJ/kg)	75,62±12,08	90,76±23,63	97,00±21,19	86,26±21,87

^a subíndice “Final” indica el valor del parámetro tras 11 minutos de mezclado

^b subíndice “Max” indica el valor del parámetro cuando se alcanza el máximo del par de torsión

Como puede observarse en la Figura 3.4.1 y en la Tabla 3.4.1 no se presentan diferencias significativas en los valores de los parámetros para el pico correspondiente al máximo de par de torsión, salvo para el sistema con XG, para el que la mayor viscosidad de la disolución XG/agua alimentada parece incrementar el valor de par de torsión durante el mezclado.

El sistema WG/GL/agua pH9 presenta los mayores valores de energía consumida y par de torsión al final del mezclado, seguido por la mezcla que contiene glioxal. Según afirman Redl y col. (1999) tanto la estructura como las propiedades viscoelásticas de las mezclas WG/GL están directamente controladas por la SME transferida al producto y por la temperatura alcanzada durante el proceso de mezclado. Adicionalmente, la energía de activación para el entrecruzamiento se reduce por la energía mecánica impartida durante el mezclado. De ahí que pueda esperarse un mayor grado de entrecruzamiento en las masas obtenidas a partir de los sistemas WG/GL/agua a pH9 y WG/GL/Glioxal/agua. Sin embargo, se debe considerar que el sistema con XG presenta un desplazamiento en la cinética de mezclado. Posiblemente un

mayor tiempo de mezclado compensaría este retraso y llevaría a valores similares a los obtenidos para las mezclas mencionadas anteriormente. Además, la adición de XG, altamente hidrofílica, a la mezcla glicerol/agua puede traducirse en una menor cantidad de agua libre disponible para plastificar la proteína. Este hecho provocaría que la mezcla proteína/plastificante tenga una mayor concentración efectiva.

3.4.1.2. Comportamiento viscoso de mezclas

En la Figura 3.4.2 se presentan las curvas de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla para las masas obtenidas tras mezclado adiabático con temperatura inicial de 25°C y agitación a 50 rpm. Resulta de gran interés conocer el comportamiento viscoso de estos sistemas en condiciones similares a las que se usan posteriormente en la etapa de extrusión, con temperaturas en torno a los 90°C.

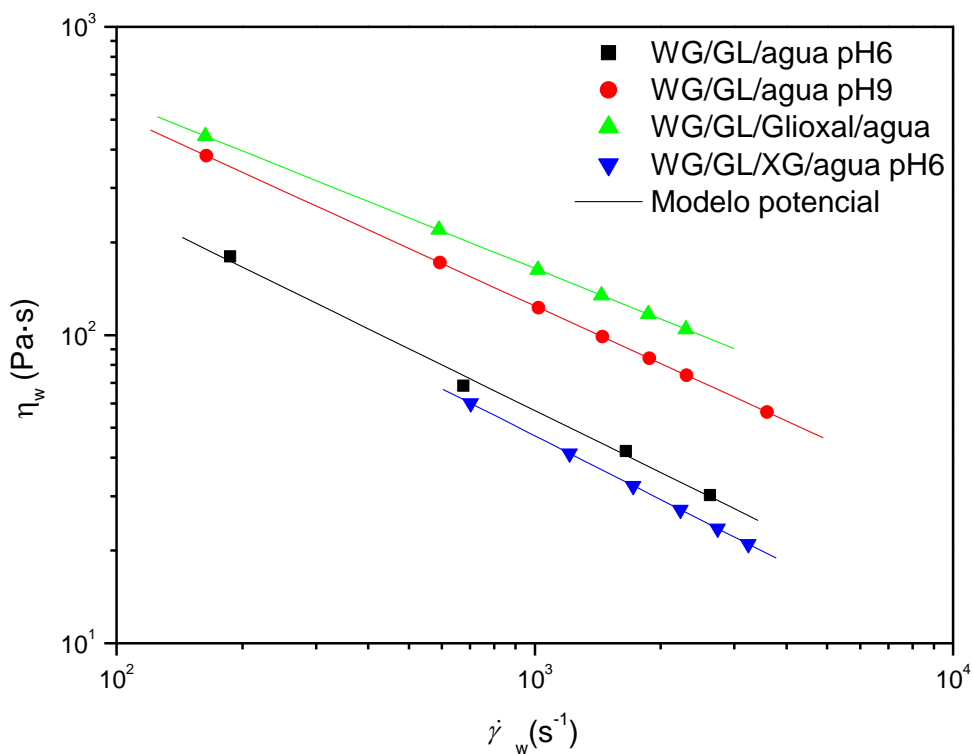


Figura 3.4.2. Valores de viscosidad capilar en función de la velocidad de cizalla de las masas proteicas obtenidas tras el mezclado adiabático (temperatura de capilar 90°C).

Todas las mezclas exhiben un comportamiento pseudoplástico, que puede ajustarse al modelo potencial, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 3.4.2. En la Figura 3.4.2 y Tabla 3.4.2 puede observarse que la mezcla con glioxal presenta los mayores valores de viscosidad e índice de flujo, seguida por la masa de referencia 50/18 a pH 9. Como ya se ha comentado, una mayor reticulación en dichos sistemas, provocada, probablemente, por los mayores valores de SME_{Final} , conduciría a sistemas con un alto grado de entrecruzamiento, lo que parece traducirse en una mayor resistencia al flujo a través del capilar. Estos resultados, por tanto, son congruentes con los perfiles de par de torsión y temperaturas discutidos anteriormente.

Tabla 3.4.2. Parámetros del modelo potencial de masas proteicas sometidas a mezclado adiabático durante 11 min a 50 rpm.

Sistema	η_{1000} (Pa·s)	n (-)
WG/GL/agua pH6	57,03	0,333
WG/GL/agua pH9	124,27	0,380
WG/GL/Glioxal/agua	164,37	0,454
WG/GL/XG/agua pH 6	47,08	0,312

Las masas con XG presentan los valores más bajos de los parámetros en viscosidad capilar. Cabe recordar que dichas masas experimentaban un retraso en la cinética de mezclado como consecuencia del método de preparación (discutido anteriormente). Además, se debe considerar el carácter altamente pseudoplástico de las disoluciones de XG, cuya viscosidad se reduce al aumentar la cizalla, lo que podría afectar al comportamiento reológico global de las mezclas con gluten.

3.4.2. Extrusión de las masas proteicas

Las mezclas anteriormente obtenidas fueron sometidas a un proceso de reducción de tamaño y se alimentaron a la extrusora. Para cada sistema se ensayaron al menos cuatro perfiles de temperatura en la extrusora, hasta alcanzar láminas adecuadas para la elaboración de probetas por troquelado. A

continuación se presentan los resultados de los ensayos de DMA, tracción y absorción de agua y se comparan con los obtenidos para probetas preparadas a partir de las mismas masas pero por el método de termomoldeo a 9 MPa y 130°C.

3.4.2.1. Extrusión sistema WG/GL/agua pH6

La Figura 3.4.3 muestra las láminas de bioplástico obtenidas del procesado por extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 6 para distintos perfiles de temperatura, descritos en la Tabla 3.4.3. A la vista de los resultados, la extrusión 2 es la que presenta una mejor apariencia visual, siendo la lámina más compacta y lisa de las tres obtenidas (Figura 3.4.3).



Figura 3.4.3. Láminas de bioplástico obtenidas por extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 6 bajo diferentes perfiles de temperatura.

Tabla 3.4.3. Perfiles de temperaturas correspondientes a las extrusiones del sistema WG/GL/agua a pH6.

Perfil de temperaturas en la extrusora ^a	Zona1	Zona2	Zona3	Boquilla
	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)
Extr1	55	65	80	100
Extr2	80	120	110	100
Extr3	80	110	120	100

^a Correspondiente a cuatro zonas de calentamiento desde la alimentación hasta la salida en la boquilla

La Figura 3.4.4 presenta los valores del módulo elástico (E') y la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) obtenidos a partir de ensayos de DMA en rampas de temperatura para muestras extruidas de bioplásticos del sistema WG/GL/agua 50/18 a pH 6, equilibradas a una humedad relativa de 53 % RH. Estos sistemas se comparan con muestras que fueron mezcladas previamente a 25°C y sometidas a termomoldeo (9 MPa y 130°C). En la Tabla 3.4.4, se incluyen algunos parámetros de interés extraídos de los ensayos de DMA.

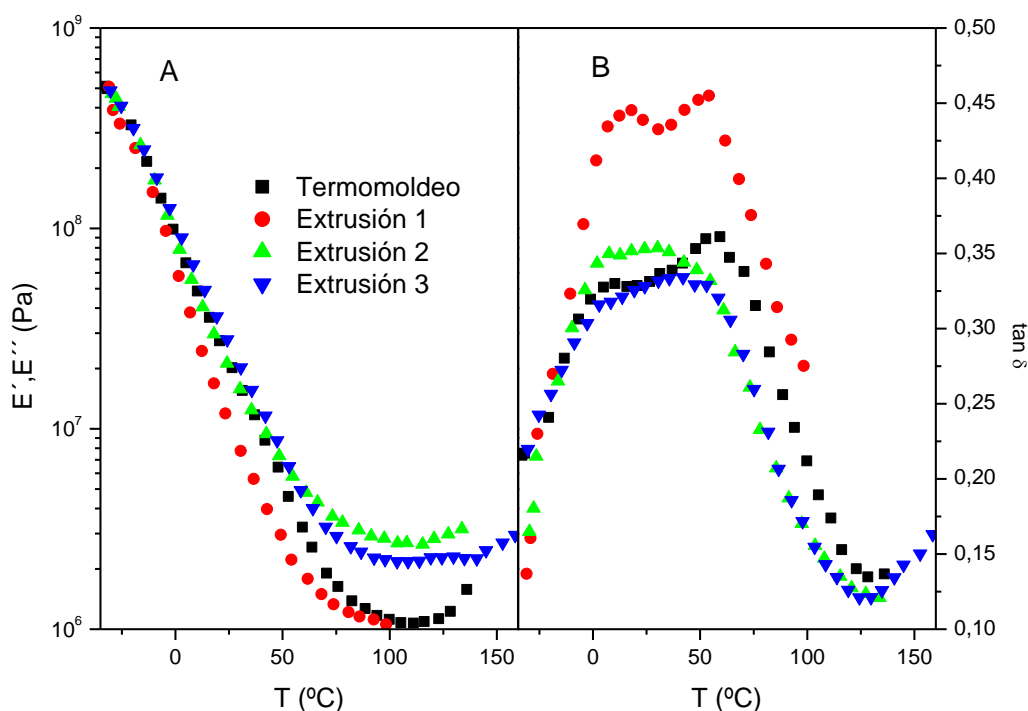


Figura 3.4.4. Dependencia del módulo E' (A) y de la tangente de pérdidas $\tan \delta$ (B) con la temperatura para bioplásticos WG/GL/agua a pH6, obtenidos mediante termomoldeo (a 130°C y 9 MPa) y por extrusión (a diferentes perfiles de temperatura).

En la Figura 3.4.4.A puede observarse que el perfil de E' es similar para todos los sistemas, obteniéndose los mayores valores de E' para las probetas de bioplástico resultantes de la extrusión 2 (especialmente a partir de unos 70°C) y los más bajos para la extrusión 1. Se debe considerar que el perfil de temperaturas de la extrusión 1 es relativamente bajo con respecto a las demás extrusiones y a la temperatura de termomoldeo seleccionada (130°C). Así, el perfil de temperatura de la extrusión 1 no superó en ningún caso los 100°C,

entre 20 y 30 °C menos que en los otros tratamientos térmicos. En este sentido, el sistema extrusionado según el perfil 1 es el que presenta los valores de $\tan \delta$ mayores, sugiriendo una menor elasticidad y por tanto, un menor grado de entrecruzamiento (Figura 3.4.4.B).

Varios autores describen un cambio conformacional en las proteínas de gluten a temperaturas cercanas a los 55°C que facilitan el intercambio SH/SS entre grupos expuestos (Schofield y col., 1983; Lefebvre y col., 2000; Redl y col., 2003). Los diferentes grados de entrecruzamiento alcanzado en las láminas de bioplástico, como consecuencia de las distintas condiciones de calentamiento, conducirían a la formación de estructuras cuyas diferencias se ven representadas en el módulo E' .

Tabla 3.4.4. Parámetros de DMA para probetas de bioplásticos del sistema WG/GL/agua a pH6 en función del método de preparación.

Método de preparación	E'_{\min} (MPa)	T_{\min} (°C)	$T_{\alpha 1}$ (°C)	$T_{\alpha 2}$ (°C)
Termomoldeo: 130°C y 9 MPa	1,067	110,4	7,7	56,5
Extr1: 55, 65, 80 y 100 °C	1,050	102,2	17,4	54,1
Extr2: 80, 120, 110 y 100 °C	2,680	107,6	9,7	31,3
Extr3: 80, 110, 120 y 100 °C	2,160	104,4	-	39,8

También, en la Figura 3.4.4.B, se aprecia una separación bastante clara de los picos de $\tan \delta$ para los bioplásticos termomoldeados y extrusionados siguiendo el perfil 1. Sin embargo, en las muestras preparadas por las extrusiones 2 y 3 estos picos se aproximan y tienden a superponerse, indicando una mayor compatibilidad entre los componentes en el proceso de extrusión. Sin embargo, los valores de E' más altos, tras alcanzar el mínimo, y sobre todo, la aparición del plateau en E' a temperaturas más bajas que en el sistema moldeado, lo que sugiere que las cadenas poliméricas de los materiales obtenidos tras las extrusiones 2 y 3 presentan una menor movilidad térmica.

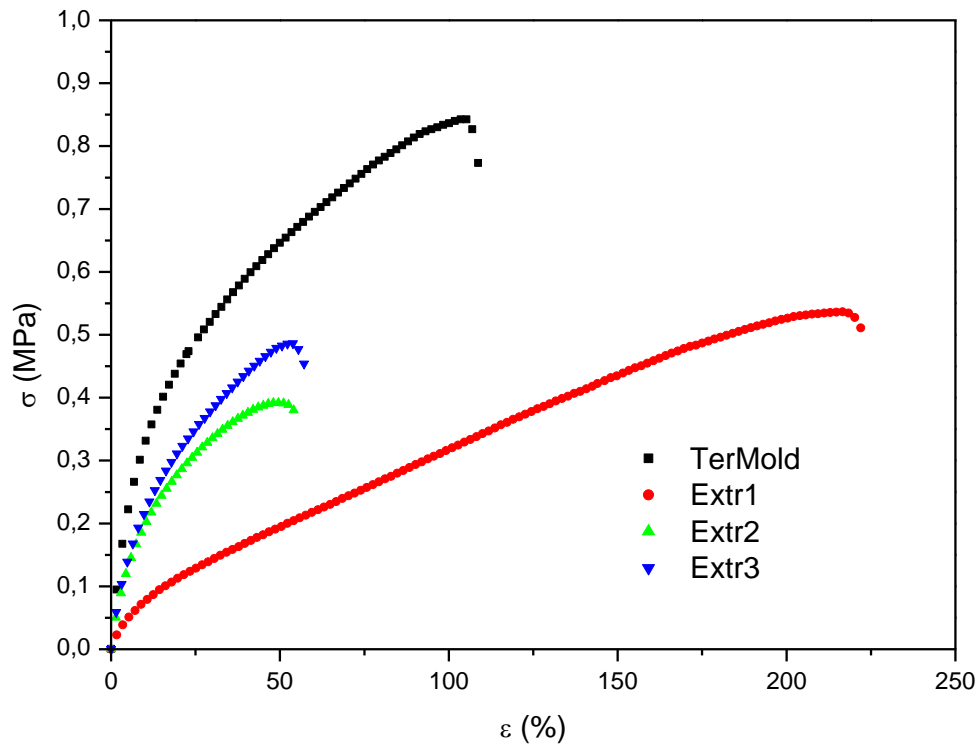


Figura 3.4.5. Curvas de esfuerzo – deformación obtenidas de los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/agua 50/18 a pH 6 en función del método de procesado.

La Figura 3.4.5 muestra algunas curvas representativas de los ensayos de tracción realizados sobre probetas preparadas mediante un proceso de mezclado adiabático seguido de una etapa de termomoldeo (9 MPa y 130°C), o de extrusión con los distintos perfiles descritos en la Tabla 2.3.2. Las probetas corresponden a mezclas WG/GL/agua 50/18 a pH 6 y fueron sometidas en todos los casos a un período de equilibrado a humedad relativa constante de 53%. Como se puede observar el sistema extrusionado Ext1 presenta los valores de elongación más altos. Por su parte el esfuerzo de fractura es más alto en el sistema termomoldeado.

En la Figura 3.4.6 se presentan los parámetros σ_{max} , ϵ_{max} y humedad de las probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 a pH 6 en función del método de procesado. Tales valores se obtienen de los ensayos de tracción aplicados a todas las muestras de los lotes representados en la Figura 3.4.5.

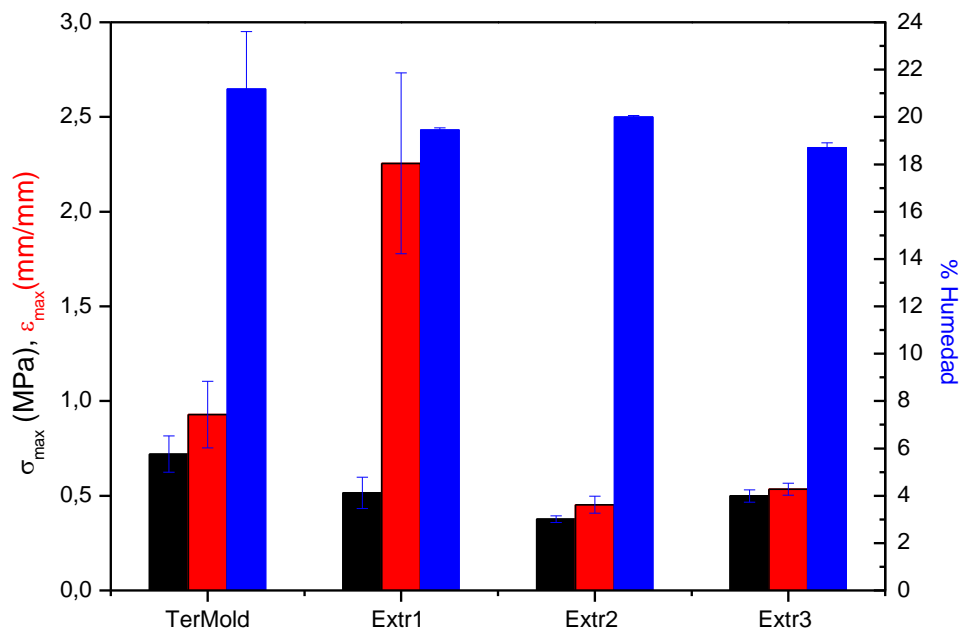


Figura 3.4.6. Parámetros de los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/agua 50/18 a pH 6 en función del método de procesado.

En las Figuras 3.4.5 y 3.4.6 se observa que el mayor valor de σ_{\max} corresponde a las probetas obtenidas por termomoldeo, seguidas por aquellas preparadas en la extrusión 1. Sin embargo, esta última presenta los mayores valores de ϵ_{\max} , que indica que el material puede experimentar fácilmente una extensión, oponiendo escasa resistencia a la medida. Por su parte, los sistemas obtenidos tras las extrusiones 2 y 3 muestran mayor resistencia a la tracción pero una reducida capacidad de elongación, en torno al 50%. Este hecho puede reflejar una menor cohesión en el bioplástico o una movilidad reducida de las cadenas poliméricas.

Como ya se ha comentado, la extrusión 1 presenta un perfil de temperaturas dentro de la extrusora inferiores a los de las demás extrusiones, con temperaturas que no superan los 100°C. Como afirman Redl y col.(1999), en dichas condiciones de temperatura y bajo la acción de la cizalla, las cadenas de proteína empezarían a desplegarse produciendo una exposición de grupos hidrofóbicos, que les permitiría formar estructuras con relativa movilidad. Sin

embargo, las estructuras deben ser estabilizadas mediante entrecruzamiento covalente inducido por la temperatura. Al no alcanzar temperaturas suficientemente altas, los bioplásticos obtenidos de la extrusión 1 presentarían una matriz con bastante movilidad y cierto potencial de entrecruzamiento, lo que explicaría los resultados obtenidos en los ensayos de tracción. De otro lado, según los autores anteriormente citados, la formación prematura de estructuras con alto grado de entrecruzamiento reduce la movilidad de las cadenas poliméricas e inhibe la recuperación elástica sin ruptura después del procesado. De ahí que las extrusiones con perfiles de temperatura mayores den lugar a muestras con valores bajos de σ_{\max} y ϵ_{\max} .

Los anteriores hallazgos parecen indicar que un calentamiento progresivo y no demasiado severo dentro de la extrusora (temperaturas menores a los 100°C), conduce a láminas con valores de deformación altos, aunque exhibiendo menor resistencia a la tracción. Adicionalmente, como sugieren los altos valores de σ_{\max} de los bioplásticos termomoldeados, el proceso de termomoldeo parece dar origen a probetas con estructuras significativamente diferentes y con mayor entrecruzamiento en comparación con las muestras obtenidas por extrusión, a la vez que presentan una mayor cohesividad, lo cual debe estar relacionado con las elevadas presiones utilizadas durante el moldeo del material.

En la Figura 3.4.7 se comparan los porcentajes de absorción de agua (después de 2 y 24 horas de inmersión) y pérdida de material soluble para muestras de bioplástico del sistema WG/GL/agua a pH 6 en función de las condiciones de procesado (termomoldeo o extrusión).

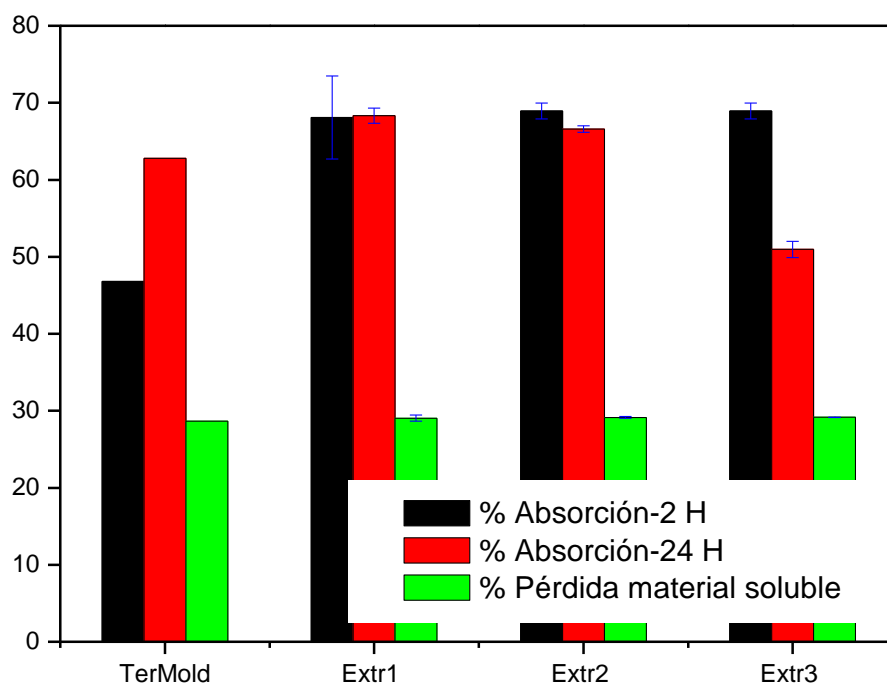


Figura 3.4.7. Parámetros de los ensayos de absorción de agua de bioplásticos WG/GL/agua 50/18 a pH 6 en función del método de procesado.

Como puede verse en la Figura 3.4.7, después de 2 horas de inmersión en agua, las probetas obtenidas por extrusión alcanzan altos porcentajes de absorción, cuyos valores superan aproximadamente un 20% los obtenidos para las muestras preparadas por termomoldeo. Después de 24 horas de inmersión, los bioplásticos termomoldeados alcanzan porcentajes de absorción similares a los de las muestras de extrusión.

Los bioplásticos obtenidos por extrusión mantienen, y en algún caso, reducen sus porcentajes de absorción de agua después de 24 horas con respecto a los obtenidos a las 2 horas de inmersión, probablemente como consecuencia de una pérdida de glicerol en las probetas. Estos resultados parecen indicar que las probetas preparadas mediante extrusión tienen una cinética de absorción de agua más rápida.

3.4.2.2. Extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 9

En la Figura 3.4.8 se pueden observar las láminas de bioplástico resultantes del procesado por extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 9, para las condiciones descritas en la Tabla 3.4.5. Las láminas presentan una superficie más o menos lisa, de coloración café, brillante y translúcida.

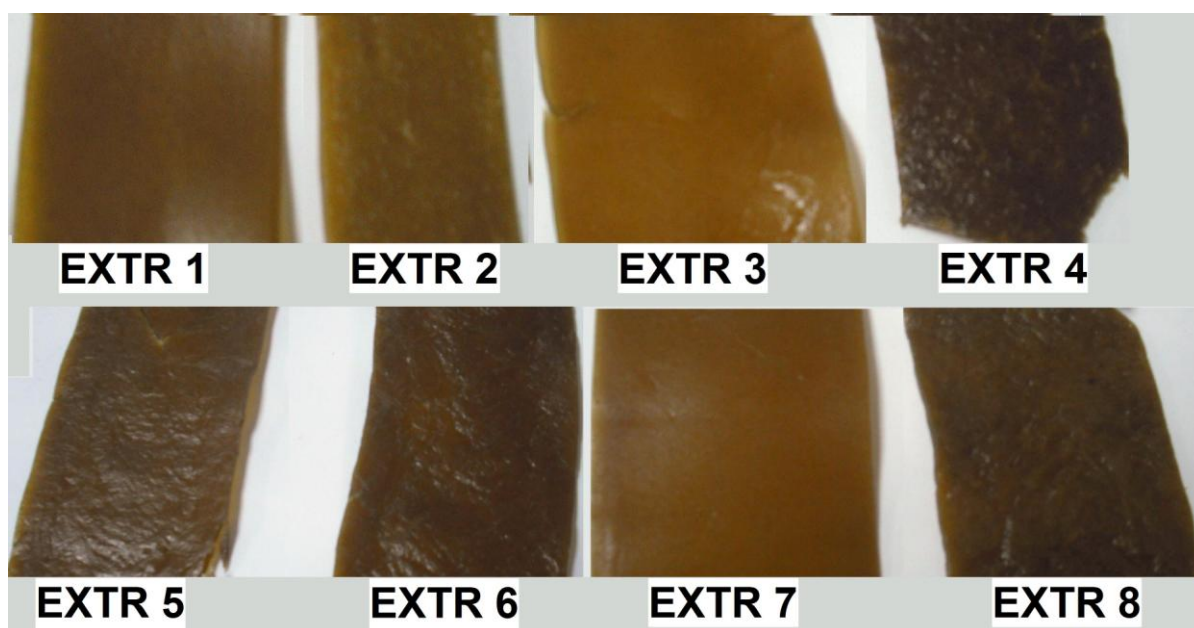


Figura 3.4.8. Láminas de bioplástico obtenidas por extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 9 para diferentes perfiles de temperatura.

Como se puede observar en la Tabla 3.4.5., se han propuesto dos tipos de perfiles en la extrusora:

- Perfil ascendente: dónde la temperatura máxima se alcanza en la boquilla (Extr. 1, 2, 3 y 7), con valores en este punto que oscilan entre los 100 y 120°C.
- Perfil con un máximo de temperatura: el cual se encuentra en diferentes zonas de calentamiento antes de la boquilla (Extr. 4, 5, 6 y 8). Lo que permite reducir la temperatura del material desde la zona de máxima temperatura hasta la salida. La extrusión 5 presenta un perfil intermedio entre los dos mencionados, sin embargo se incluye en este último.

Tabla 3.4.5. Perfiles de temperaturas correspondientes a las extrusiones del sistema WG/GL/agua a pH 9.

Perfil de temperaturas en la extrusora ^a	Zona1	Zona2	Zona3	Boquilla
Extr1	55	65	80	100
Extr2	55	65	80	120
Extr3	60	70	90	100
Extr4	80	90	120	100
Extr5	70	80	100	100
Extr6	60	70	110	100
Extr7	60	70	90	110
Extr8	80	120	110	100

^a Correspondiente a cuatro zonas de calentamiento desde la alimentación hasta la salida en la boquilla

La Figura 3.4.9 muestra la dependencia con la temperatura de E' y $\tan \delta$, obtenidos a partir de ensayos de DMA para muestras extruidas de bioplásticos del sistema WG/GL/agua 50/18 a pH 9. Además, se presentan a modo de comparación probetas elaboradas mediante mezclado a 25°C y 50 rpm, seguido de una etapa de moldeo por compresión a 130°C. Todas las probetas se almacenan hasta alcanzar el equilibrio a un valor de HR de 53%, antes de realizar los ensayos. La Tabla 3.4.6 incluye los valores de los parámetros de DMA para las muestras ensayadas.

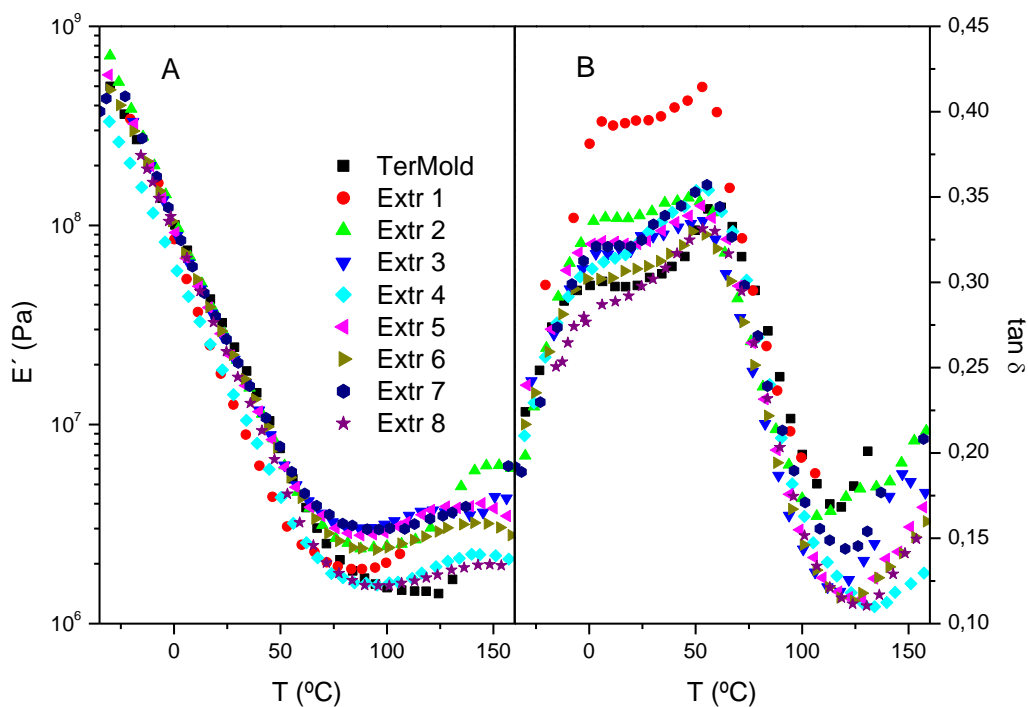


Figura 3.4.9. Dependencia del módulo E' (A) y de la tangente de pérdidas $\tan \delta$ (B) con la temperatura para bioplásticos WG/GL/agua a pH9, obtenidos mediante termomoldeo (a 130°C y 9 MPa) y extrusión utilizando diferentes perfiles de temperatura.

Tabla 3.4.6. Parámetros de DMA para probetas de bioplásticos del sistema WG/GL/agua a pH9 en función del método de preparación.

Método de preparación	E'_{\min}	T_{\min}	$T_{\alpha 1}$	$T_{\alpha 2}$
Termomoldeo: 130°C y 9 MPa	1,470	106,4	1,8	59,0
Extr1: 55, 65, 80 y 100 °C	1,840	85,3	6,0	53,1
Extr2: 55, 65, 80 y 120 °C	2,410	91,1	5,7	48,9
Extr3: 60, 70,90 y 100 °C	3,010	81,0	5,6	53
Extr4: 80, 90,120 y 100 °C	1,551	94,9	2,4	54,9
Extr5: 70, 80, 100 y 100 °C	2,770	92,1	1,8	54,1
Extr6: 60, 70,110 y 100 °C	2,330	93,2	-1,0	51,3
Extr7: 60, 70, 90 y 110 °C	2,920	99,4	3,9	55,4
Extr8: 80, 120, 110 y 100 °C	1,540	92,0	0,7	56,1

Como se observa en la Figura 3.4.9.A, los valores de E' hasta los 60°C son similares en todos los casos, excepto para el sistema con perfil más bajo de temperatura (Extrusión 1) y los perfiles de temperatura más altos (aquellos que comienzan a 80°C, Extrusiones 4 y 8). Estos tres sistemas se caracterizan, además, por presentar los valores más bajos de E'_{min} , similares a los encontrados para el sistema termomoldeado. El comportamiento ascendente de las curvas de E' en la región final de los ensayos de DMA para las muestras de extrusión, sugiere que estos bioplásticos poseen un mayor potencial de termoendurecimiento remanente que aquellos procesados por termomoldeo.

En la Figura 3.4.9.B y la Tabla 3.4.6 puede apreciarse la presencia de dos picos más o menos diferenciados en torno a los 4 y 55°C, cuya mayor separación se percibe para los bioplásticos preparados por termomoldeo. Al disminuir las temperaturas del perfil de extrusión se produce un acercamiento de los picos de $\tan \delta$, correspondientes a $T_{\alpha1}$ y $T_{\alpha2}$, lo que podría asociarse con una mayor compatibilidad entre los componentes del material procesado mediante extrusión.

La Figura 3.4.10 muestra algunas curvas representativas de los ensayos de tracción realizados sobre probetas de bioplásticos del sistema WG/GL/agua 50/18 a pH 9, equilibradas a 53 % HR. Estas muestras se obtuvieron a partir de las mezclas preparadas, mediante dos tipos de procesado: termomoldeo (9 MPa y 130°C) y extrusión (con diferentes perfiles de temperatura). En general, los materiales extruidos siguiendo un perfil ascendente de temperatura, se caracterizan por requerir mayores esfuerzos de tracción para alcanzar la ruptura y en el caso de las extrusiones 1 y 2, también una mayor elongación. Por el contrario, los perfiles que presentan un máximo de temperatura, seguido por un descenso de estas dentro de la extrusora muestran escasa capacidad de elongación.

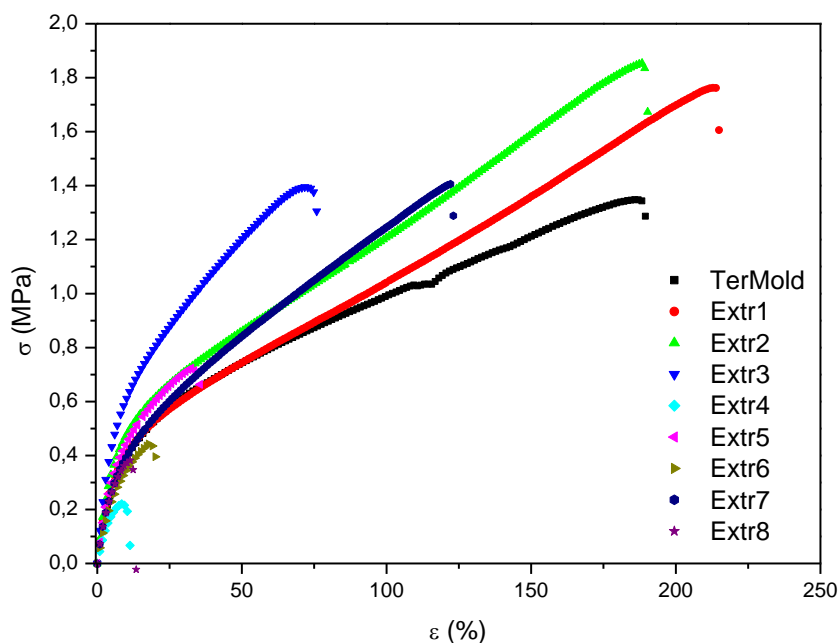


Figura 3.4.10. Curvas de esfuerzo – deformación obtenidas de los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/agua 50/18 a pH 9 en función del método de procesado.

En la Figura 3.4.11 se presentan los parámetros σ_{\max} , ϵ_{\max} y humedad de las probetas de bioplástico WG/GL/agua 50/18 a pH 9, correspondientes a los ensayos de tracción representados en la Figura 3.4.10.

En las Figuras 3.4.10 y 3.4.11 se observa que los mayores valores de σ_{\max} y ϵ_{\max} se obtienen para la extrusión 1, llegando incluso a estar por encima de los correspondientes a las probetas procesadas mediante termomoldeo. Estos resultados coinciden con una buena apariencia de las láminas obtenidas de la extrusión 1, que a simple vista parecen ser las mejores dentro de las procesadas por extrusión para el sistema WG/GL/agua 50/18 a pH 9. Tal como establecieron Ullsten y col.(2009), en comparación con las muestras moldeadas por compresión, los sistemas extruídos experimentan una mayor cizalla y, probablemente, sus proteínas se encuentran más agregadas y/o entrecruzadas. Además, Hochstetter y col.(2006) indicaron un posible alineamiento estructural dentro de las láminas en la dirección de flujo de la

extrusión. Todo ello podría explicar los mayores valores de σ_{\max} y ϵ_{\max} en la extrusión 1 con respecto a las muestras preparadas por termomoldeo.

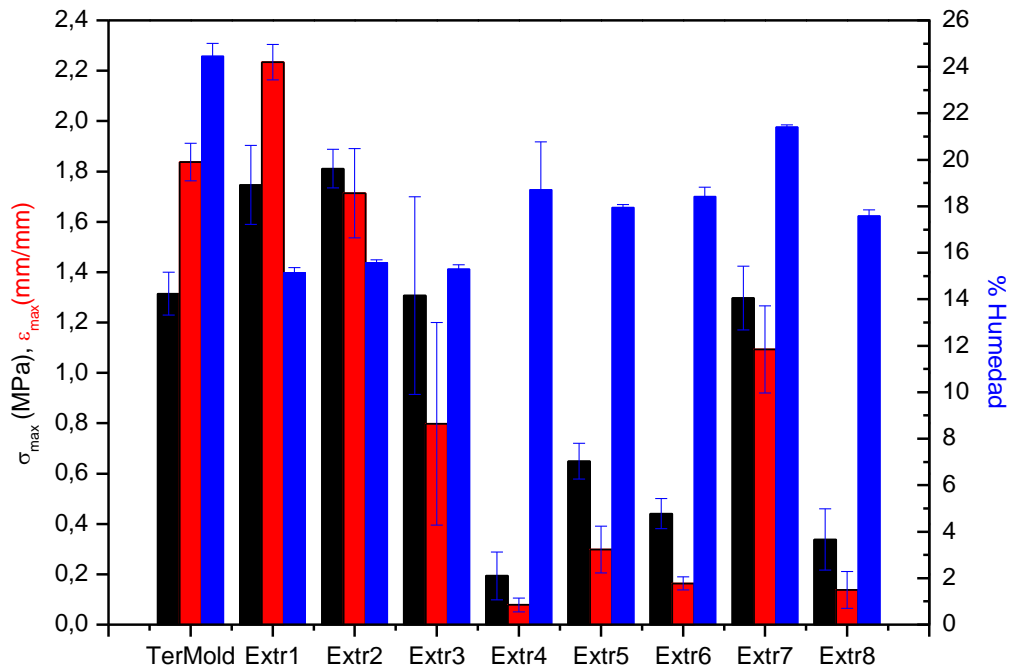


Figura 3.4.11. Parámetros de los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/agua 50/18 a pH 9 en función del método de procesado.

Como se puede ver a partir de los resultados de la extrusión 2, al aumentar el último valor de temperatura del perfil de extrusión (con respecto a la extrusión 1), que corresponde a la temperatura de la boquilla, se reduce ϵ_{\max} mientras que σ_{\max} no experimenta una variación significativa.

Comparando los resultados de los parámetros de tracción de las extrusiones 1 y 2 con los de las extrusiones 3 y 7, puede verse que un aumento de alrededor de 5°C en las temperaturas de los perfiles de extrusión conlleva una reducción importante de ϵ_{\max} y σ_{\max} . Esta tendencia continúa si se comparan las dos últimas con las extrusiones 5 y 4. Como se explicó en la sección 3.4.2.1, las temperaturas relativamente bajas en los perfiles de extrusión evitan la formación prematura de estructuras rígidas que puedan presentar mayor

facilidad de ruptura después del procesado. En este sentido, alcanzar temperaturas altas (120 o 110 °C) en etapas tempranas de extrusión parece dar lugar a materiales con propiedades mecánicas más pobres y menor ductilidad.

En la Figura 3.4.11 también puede observarse que las probetas obtenidas por extrusión presentan menores porcentajes de humedad que las muestras termomoldeadas, indicando que el procesado por extrusión es más eficiente para la eliminación de agua. Este resultado sería de interés en sistemas que tienden a retener agua y formar burbujas durante el termomoldeo. Además, excepto en el sistema 7, los perfiles ascendentes conducen a una humedad final menor que los que alcanzan un máximo en un punto intermedio de la extrusora (incluido el 5).

En la Figura 3.4.12 se representan los porcentajes de absorción de agua y pérdida de material soluble para probetas de bioplástico del sistema WG/GL/agua a pH 9 en función del tipo y condiciones de procesado (termomoldeo o extrusión). Puede observarse que los bioplásticos obtenidos de la extrusión 2 presentan los valores más altos de absorción de agua, tanto a las 2 horas como a las 24 horas de inmersión, seguidos por las muestras de la extrusión 1. En la mayoría de casos, las probetas obtenidas mediante extrusión exhiben porcentajes de absorción de agua, tras 2 horas de inmersión, mayores que los obtenidos para las probetas sometidas a termomoldeo. Sin embargo, estas últimas alcanzan porcentajes similares (o mayores) de absorción después de 24 horas. El aumento en las temperaturas del perfil de extrusión conlleva una disminución en los porcentajes de absorción de agua, que no presentan mayores cambios entre las dos y las 24 horas de inmersión. No se aprecian diferencias significativas en los porcentajes de pérdida de materia soluble para las probetas en función del método y condiciones de procesado.

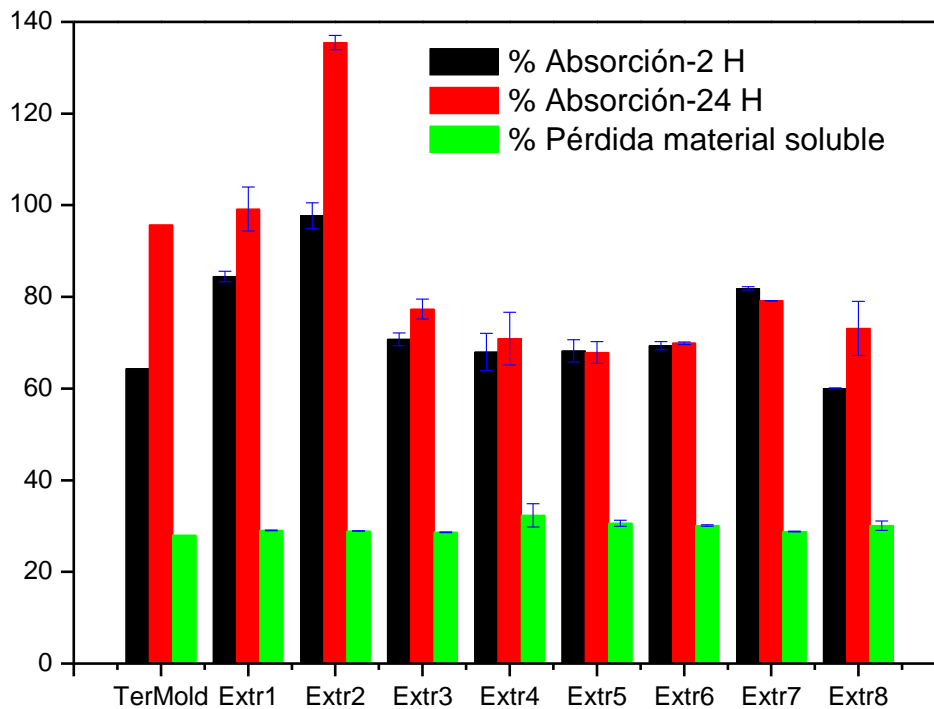


Figura 3.4.12. Parámetros de los ensayos de absorción de agua de bioplásticos WG/GL/agua 50/18 a pH 9 en función del método de procesado.

3.4.2.3. Extrusión del sistema WG/GL/Glioxal/agua a pH6

La Figura 3.4.13 muestra las láminas de bioplástico obtenidas del procesado por extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 6 para distintos perfiles de temperatura, descritos en la Tabla 3.4.7. Debido a las irregularidades y aspecto heterogéneo de las láminas obtenidas en la extrusión 5, no se consiguió formar probetas de bioplástico aptas para la realización de los ensayos, por tanto, dicha extrusión se descartó del análisis de propiedades en DMA, tracción y absorción de agua. Las demás láminas presentan continuidad, una superficie con menor grado de irregularidad y de color oscuro.

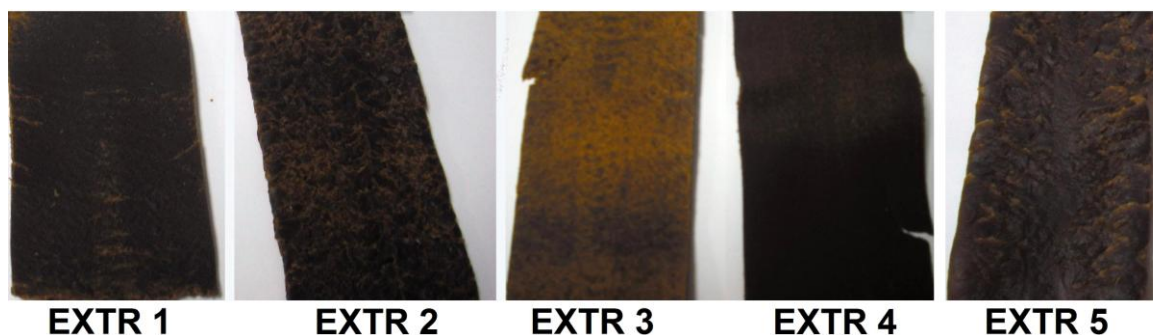


Figura 3.4.13. Láminas de bioplástico obtenidas por extrusión del sistema WG/GL/Glioxal/agua, con un contenido de aldehído del 3%, bajo diferentes perfiles de temperatura.

Tabla 3.4.7. Perfiles de temperaturas correspondientes a las extrusiones del sistema WG/GL/Glioxal/agua (Glioxal 3%).

Perfil de temperaturas en la extrusora ^a	Zona1	Zona2	Zona3	Boquilla
Extr1	80	120	110	100
Extr2	70	80	100	100
Extr3	70	110	100	90
Extr4	80	110	120	100
Extr5	55	65	80	100

^a Correspondiente a cuatro zonas de calentamiento desde la alimentación hasta la salida en la boquilla

La Figura 3.4.14 muestra la dependencia con la temperatura de E' y $\tan \delta$ en función del método y condiciones de procesado, para bioplásticos del sistema WG/GL/Glioxal/agua a pH 6. El contenido de glioxal en las probetas es de 3% y se expresa como porcentaje en peso de aldehído con respecto a la cantidad de gluten en la masa de partida. Las muestras se equilibraron a una humedad relativa de 53% antes de realizar los ensayos. El método, las condiciones de moldeo y los valores de los parámetros de los ensayos DMA para estas probetas se presentan en la Tabla 3.4.8.

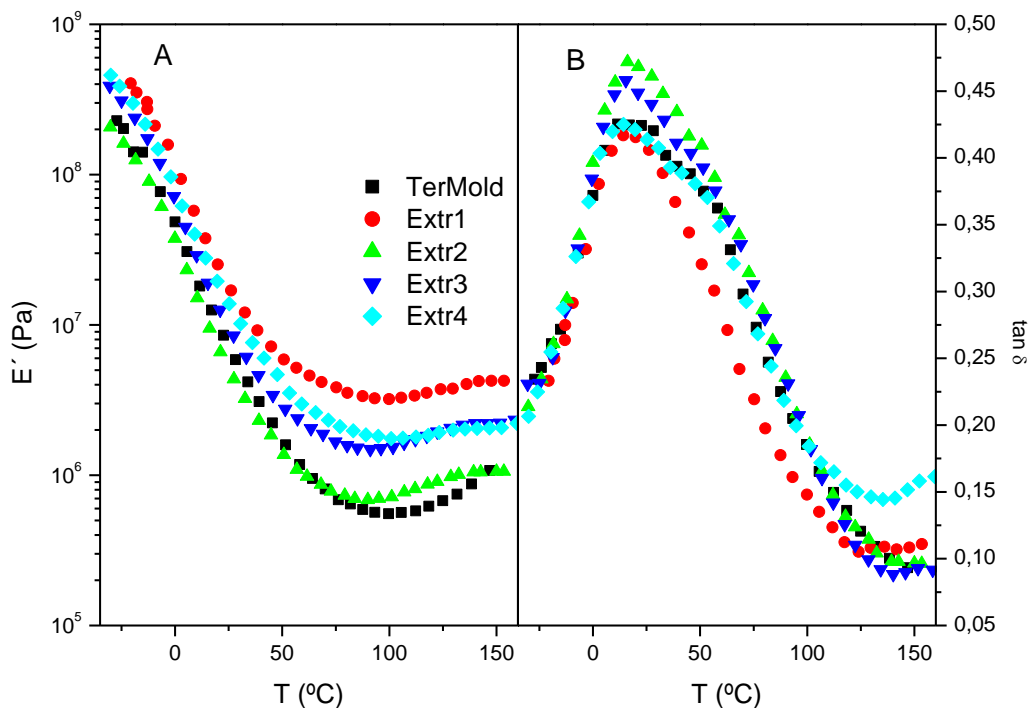


Figura 3.4.14. Dependencia del módulo E' (A) y de la tangente de pérdidas, $\tan \delta$ (B), con la temperatura para bioplásticos WG/GL/Glioxal/agua a pH6 con un contenido de 3% de Glioxal, obtenidos mediante termomoldeo (a 130°C y 9 MPa) y por extrusión (con diferentes perfiles de temperatura).

En la Figura 3.4.14.A puede verse que los bioplásticos obtenidos por extrusión presentan valores de E' mayores a los de las probetas procesadas mediante termomoldeo en todo el intervalo de temperatura estudiado, salvo para la extrusión 3. No obstante, el aumento de E' en la región de altas temperaturas es menos pronunciado en las muestras preparadas por extrusión, en comparación con las termomoldeadas, sugiriendo un mayor potencial de termoendurecimiento remanente en estas últimas. El sistema que presenta mayores valores de módulos en todo el intervalo de temperatura corresponde al extruido según el perfil de la extrusión 1.

Tabla 3.4.8. Parámetros de DMA para probetas de bioplásticos WG/GL/Glioxal/agua a pH6 con un contenido de 3% de Glioxal, en función del método de preparación.

Método de preparación	E'_{min}	T_{min}	$T_{\alpha1}$	$T_{\alpha2}$
Termomoldeo: 130°C y 9 MPa	0,560	101,6	14,2	45,5
Extr1: 80, 120, 110 y 100 °C	3,206	97,6	16,6	-
Extr2: 70, 80, 100 y 100 °C	0,684	90,4	16,9	-
Extr3: 70, 110, 100 y 90 °C	1,460	93,9	15,9	-
Extr4: 80, 110, 120 y 100 °C	1,743	101,4	14,2	44,1

Como puede observarse en la Figura 3.4.14.A y Tabla 3.4.8, se mantiene en todos los casos el solapamiento de los picos de $\tan \delta$, correspondientes a $T_{\alpha1}$ y $T_{\alpha2}$, ya encontrado para el sistema termomoldeado con glioxal. Dicho efecto, característico de una buena compatibilidad entre los componentes del bioplástico, se hace incluso más evidente en las probetas preparadas mediante extrusión, excepto para el perfil correspondiente a la extrusión 4, que muestra resultados de $\tan \delta$ similares a los obtenidos mediante termomoldeo.

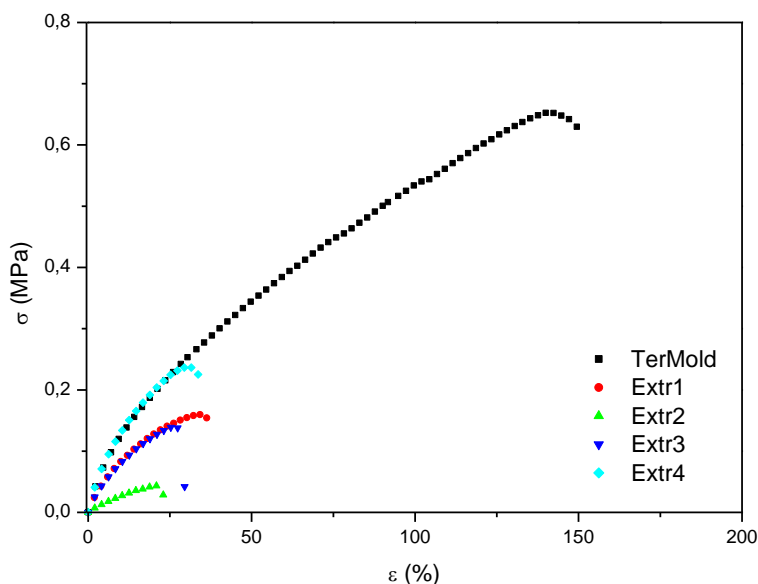


Figura 3.4.15. Curvas de esfuerzo – deformación obtenidas para los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/Glioxal/agua a pH6 con un contenido de 3% de Glioxal, en función del método de procesado.

La Figura 3.4.15 presenta curvas representativas de los ensayos de tracción llevados a cabo sobre bioplásticos del sistema WG/GL/Glioxal/agua a pH 6, equilibrados a 53 % HR. Estas probetas se prepararon a partir de las mezclas preparadas a 25°C y 50rpm, mediante procesado por termomoldeo (9 MPa y 130°C) o por extrusión (empleando diferentes perfiles de temperatura).

También en la Figura 3.4.16 se muestran los parámetros σ_{\max} , ε_{\max} y humedad de las probetas bioplástico de los sistemas WG/GL/Glioxal/agua a pH 6, obtenidos a partir de los ensayos de tracción representados en la Figura 3.4.15, para diferentes métodos y condiciones de procesado.

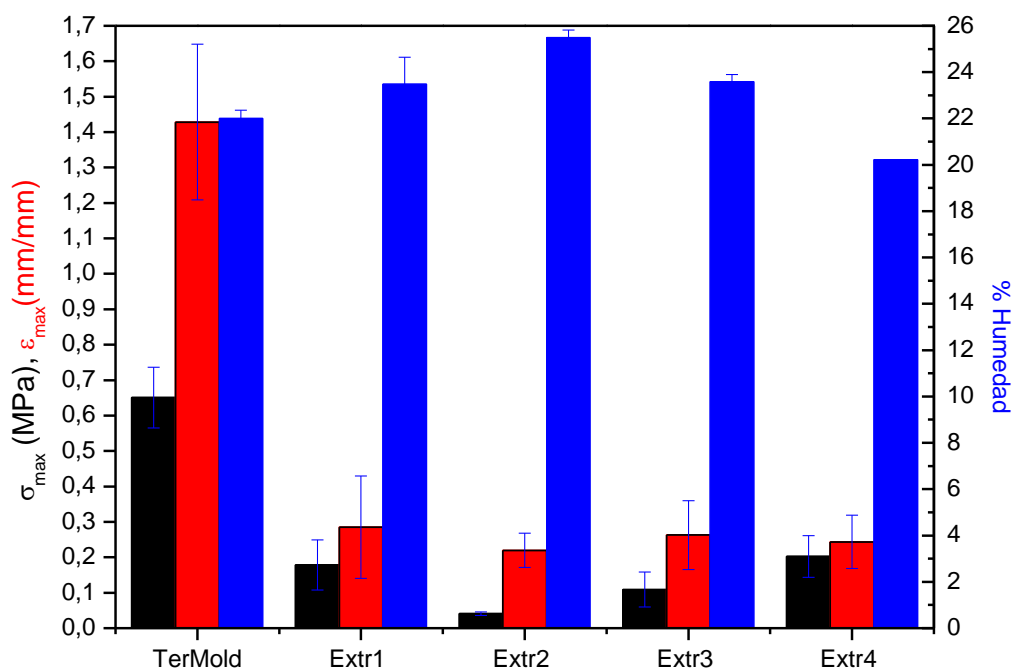


Figura 3.4.16. Parámetros de los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/Glioxal/agua a pH6 con un contenido de 3% de Glioxal, en función del método de procesado.

Según los resultados presentados en las Figuras 3.4.15 y 3.4.16, las probetas del sistema WG/GL/Glioxal/agua a pH 6 obtenidas por termomoldeo, exhiben valores de σ_{\max} y ε_{\max} muy superiores a los alcanzados en los bioplásticos preparados mediante extrusión. No se evidencian diferencias significativas en

los parámetros de los ensayos de tracción al variar el perfil de temperaturas en la extrusora. Aunque parece que los sistemas con perfiles de temperatura altos (extrusiones 1 y 4) presentan valores medios de σ_{\max} y ε_{\max} mayores en comparación con las extrusiones realizadas a menores valores de temperatura (extrusión 2). Los valores de los parámetros de tracción y la apariencia de las láminas, sugieren que dentro de las condiciones estudiadas, el proceso de extrusión sería adecuado para la obtención de bioplásticos del sistema WG/GL/Glioxal/agua a pH 6 si se utiliza un perfil de temperaturas como el de la extrusión 4.

De acuerdo con los resultados discutidos y con experiencias previas, en las que se probaron perfiles de temperatura menores dentro de la extrusora sin llegar a obtener láminas continuas, se puede decir que la incorporación de glioxal restringe aún más la ventana de extrusión de los sistemas WG/GL/agua, desplazandola hacia temperaturas de operación mayores. Según Pommet y col.(2003), altas temperaturas junto con la aplicación de energías mecánicas significativas, dan lugar a estructuras más entrecruzadas en las que el valor crítico de cizalla, a la que se produce la rotura del extruído, disminuye substancialmente. Este fenómeno sería más acusado en sistemas con aldehído y a la salida del material en la boquilla. De ahí que se requiera la llegada de un material más resistente al final de la extrusión, lo que implica un mayor entrecruzamiento a lo largo del proceso, favorecido por un aumento de perfiles de temperatura dentro de la extrusora. Esto también explicaría las bajas propiedades mecánicas de los bioplásticos que incorporan glioxal obtenidos por extrusión, en comparación con los sistemas termomoldeados.

La Figura 3.4.17 muestra los porcentajes de absorción de agua (después de 2 y 24 horas de inmersión) y pérdida de material soluble (tras 24 horas de inmersión) para probetas de bioplástico obtenidas a partir de mezclas del sistema WG/GL/Glioxal/agua a pH 6, en función del tipo y condiciones de procesado (termomoldeo o extrusión).

Como se observa en la Figura 3.4.17, los bioplásticos obtenidos por extrusión tienen una mayor capacidad de absorción de agua tras 2 horas de inmersión en

comparación con aquellos preparados por termomoldeo. Después de 24 horas de inmersión, las probetas resultantes de las extrusiones experimentan un descenso en los porcentajes de absorción de agua, cuyos valores son superados por las muestras termomoldeadas. Este comportamiento es similar al descrito para los sistemas WG/GL/agua a pH 6 (sección 3.4.2.1.). Este resultado podría estar relacionado con una lenta liberación del glicerol, que parece continuar después de 2 horas. Este hecho provocaría una reducción del carácter higroscópico del material.

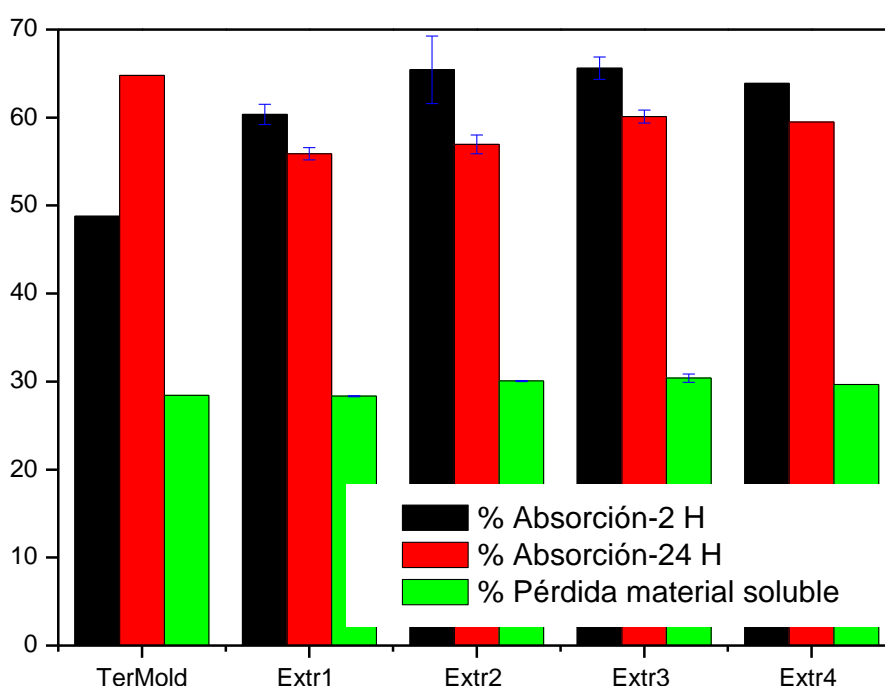


Figura 3.4.17. Parámetros de los ensayos de absorción de agua en probetas de bioplásticos WG/GL/Glioxal/agua a pH6 con un contenido de 3% de Glioxal, en función del método de procesado.

3.4.2.4. Extrusión del sistema WG/GL/XG/agua a pH6

En la Figura 3.4.18 se pueden observar las láminas de bioplástico resultantes del procesado por extrusión del sistema WG/GL/XG/agua, con un contenido de goma de 1,5%, bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.4.9. Cabría destacar el hecho de que aquellos perfiles ascendentes que alcanzan la

temperatura máxima en la boquilla conducen a probetas de apariencia más heterogénea. De hecho, en el posterior análisis de propiedades obtenidas mediante ensayos de DMA, tracción y absorción de agua, no se consideran las extrusiones 5 y 6 debido a la imposibilidad de obtención de probetas como consecuencia de la heterogeneidad en las láminas correspondientes a dichas extrusiones.

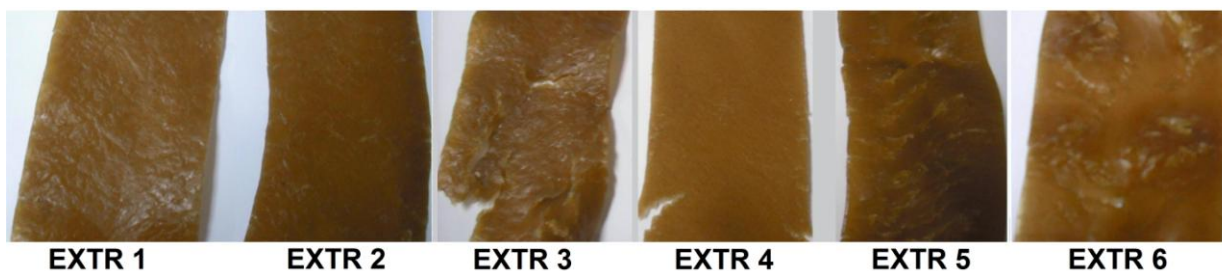


Figura 3.4.18. Láminas de bioplástico obtenidas por extrusión del sistema WG/GL/XG/agua, con un contenido de XG de 1,5%, bajo diferentes perfiles de temperatura.

Tabla 3.4.9. Perfiles de temperaturas correspondientes a las extrusiones del sistema WG/GL/XG/agua (XG 1,5%).

Perfil de temperaturas en la extrusora ^a	Zona1	Zona2	Zona3	Boquilla
Extr1	80	90	120	100
Extr2	70	80	100	100
Extr3	80	110	120	100
Extr4	80	120	110	100
Extr5	60	70	90	110
Extr6	55	65	80	100

^a Correspondiente a cuatro zonas de calentamiento desde la alimentación hasta la salida en la boquilla

La Figura 3.4.19 presenta los valores de E' y $\tan \delta$ obtenidos a partir de ensayos de DMA para bioplásticos del sistema WG/GL/XG/agua con una concentración de goma Xantana (XG) de 1,5%, en función del método de procesado. Las masas de partida se prepararon mediante mezclado adiabático (a 25°C y 50 rpm) y posteriormente se sometieron a termomoldeo o extrusión.

La Tabla 3.4.10 muestra los valores de los parámetros obtenidos en ensayos de DMA para cada sistema. Todos los especímenes se equilibraron a una humedad relativa de 53% antes de la realización de los ensayos.

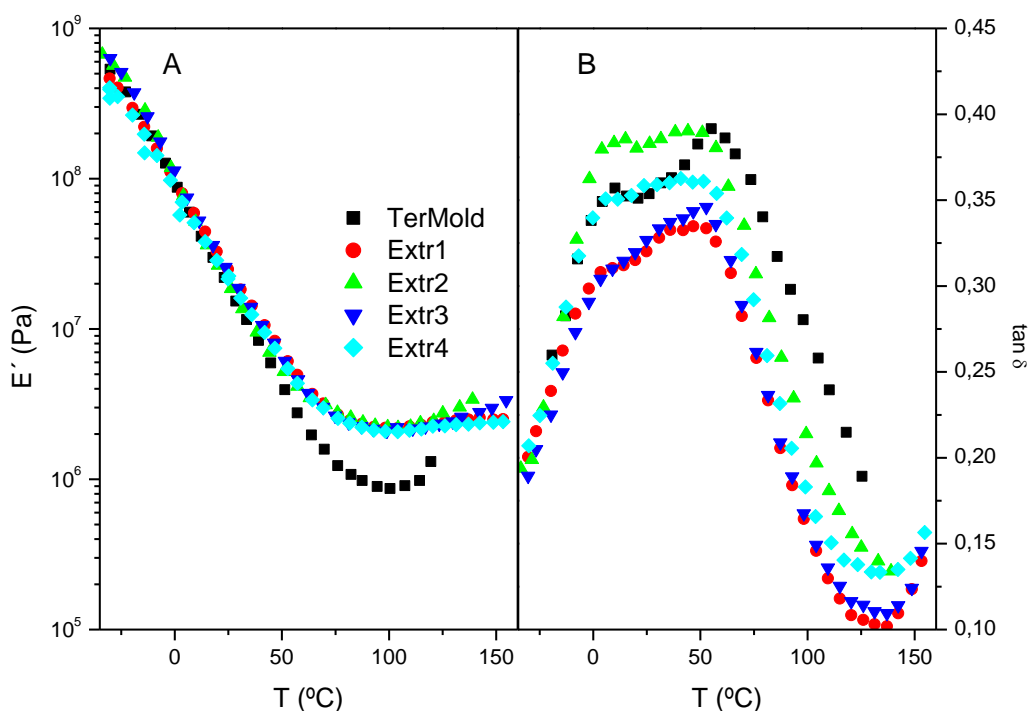


Figura 3.4.19. Dependencia del módulo E' (A) y de la tangente de pérdidas $\tan \delta$ (B) con la temperatura para bioplásticos WG/GL/XG/agua a pH6 con un contenido de 1,5% de XG, obtenidos mediante termomoldeo (a 130°C y 9 MPa) y por extrusión (con diferentes perfiles de temperatura).

Tabla 3.4.10. Parámetros de DMA para probetas de bioplásticos WG/GL/XG/agua a pH6 con un contenido de 1,5% de XG, en función del método de preparación.

Método de preparación	E'_{\min}	T_{\min}	$T_{\alpha 1}$	$T_{\alpha 2}$
Termomoldeo: 130°C y 9 MPa	0,856	101,6	10,1	55,1
Extr1: 80, 90,120 y 100 °C	2,180	95,2	5,8	47,8
Extr2: 70, 80, 100 y 100 °C	2,198	101,9	8,7	47,2
Extr3: 80, 110, 120 y 100 °C	2,100	99,0	7,8	50,6
Extr4: 80, 120, 110 y 100 °C	2,061	98,8	7,0	47,0

En la Figura 3.4.19.A se observa un comportamiento bastante similar de las muestras preparadas por extrusión, independientemente del perfil de temperaturas dentro de la extrusora. Por otro lado, para temperaturas de medida superiores a los 40°C aproximadamente, los bioplásticos obtenidos por extrusión exhiben valores de E' superiores a los correspondientes a especímenes sometidos a termomoldeo. Sin embargo, estos últimos presentan un perfil de E' con tendencia creciente en la zona de altas temperaturas.

En la Figura 3.4.19.B y la Tabla 3.4.10 se aprecia la aparición de dos picos de $\tan \delta$, correspondientes a $T_{\alpha 1}$ y $T_{\alpha 2}$, en torno a los 8 y 50°C. La mayor separación y nitidez en los picos se observa para los bioplásticos preparados por termomoldeo, mientras que el mayor acercamiento se presenta en los especímenes obtenidos tras las extrusiones 2 y 4, lo que sugiere una mayor compatibilidad entre las fases.

Los resultados descritos apuntan a que la combinación de perfiles de temperatura y de cizalla severos, durante la extrusión, hacen que estas muestras presenten un elevado grado de entrecruzamiento por inducción térmica, tal como lo indica el plateau de E' en la zona de altas temperaturas. Por el contrario, los especímenes obtenidos por termomoldeo, conservan un cierto potencial de termoendurecimiento, pudiendo inferirse que una mayor temperatura de procesamiento conduciría a estructuras más entrecruzadas.

La Figura 3.4.20 muestra las curvas obtenidas en los ensayos de tracción realizados sobre probetas de éste bioplástico. Todas las probetas se almacenaron hasta el equilibrio en desecadores a 53%HR.

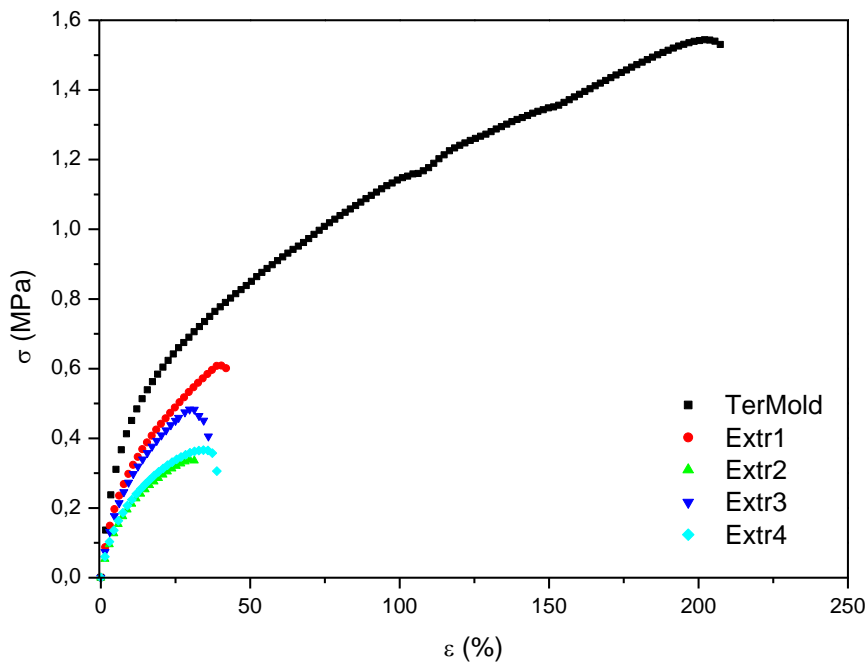


Figura 3.4.20. Curvas de esfuerzo – deformación obtenidas de los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/XG/agua-pH6 con un contenido de 1,5% de XG, en función del método de procesado.

Además, en la Figura 3.4.21 se comparan los valores de los parámetros σ_{\max} , ϵ_{\max} y humedad de las probetas de bioplástico WG/GL/XG/agua a pH6 (1,5% de XG) correspondientes a los ensayos de tracción representados en la Figura 3.4.20. En las dos Figuras puede observarse una diferencia bastante notoria entre los parámetros de tracción para las probetas obtenidas por termomoldeo en relación con aquellas provenientes de extrusión. Los valores de σ_{\max} y ϵ_{\max} para los especímenes termomoldeados superan a los alcanzados para los bioplásticos extruidos, al menos en un 150 y 400%, respectivamente.

Analizando entre sí los procesos de extrusión, las probetas obtenidas de la extrusión 1 presentan los mayores valores de σ_{\max} y de ϵ_{\max} .

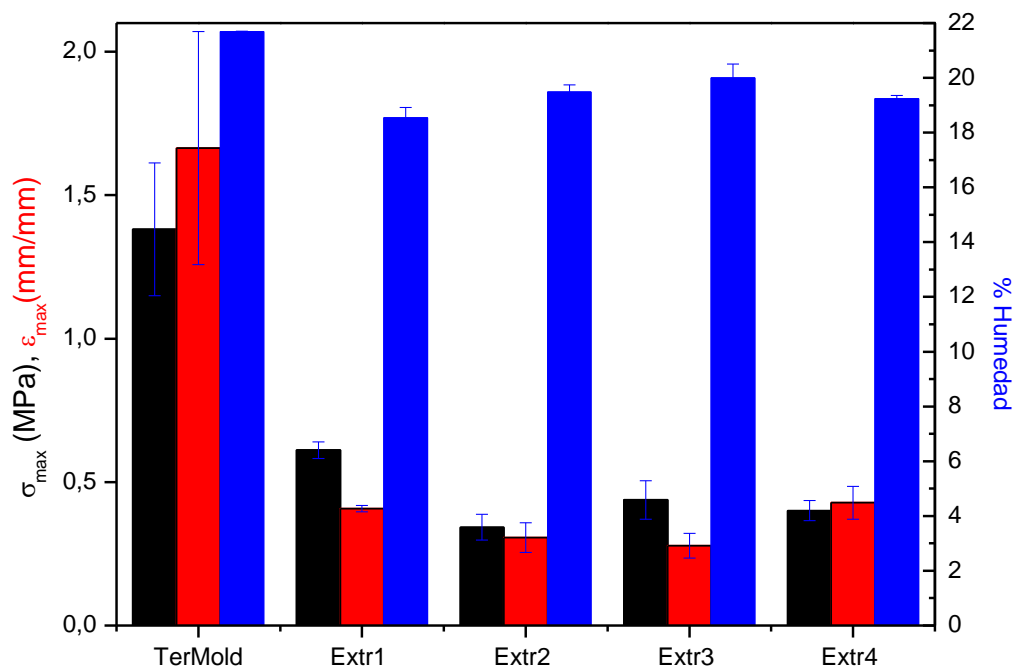


Figura 3.4.21. Parámetros de los ensayos de tracción en probetas de bioplásticos WG/GL/XG/agua a pH6 con un contenido de 1,5% de XG, en función del método de procesado.

Comparando los resultados de los ensayos de tracción con los de DMA y con los perfiles de temperatura de las extrusiones, es evidente que las altas temperaturas seleccionadas durante la extrusión del material conducen a una polimerización prematura de las proteínas, dando lugar a probetas con propiedades bajas en tracción. Sin embargo, los perfiles con temperaturas menores conducen a la ruptura del material a la salida de la boquilla sin que se lleguen a obtener láminas continuas. Este último hecho se constató en ensayos previos, de los cuales no se pudo obtener mayor información, debido a la imposibilidad de preparar probetas adecuadas para su estudio.

En la Figura 3.4.22 se comparan los porcentajes de absorción de agua (después de 2 y 24 horas de inmersión) y pérdida de material soluble para muestras de bioplástico del sistema WG/GL/XG/agua a pH6.

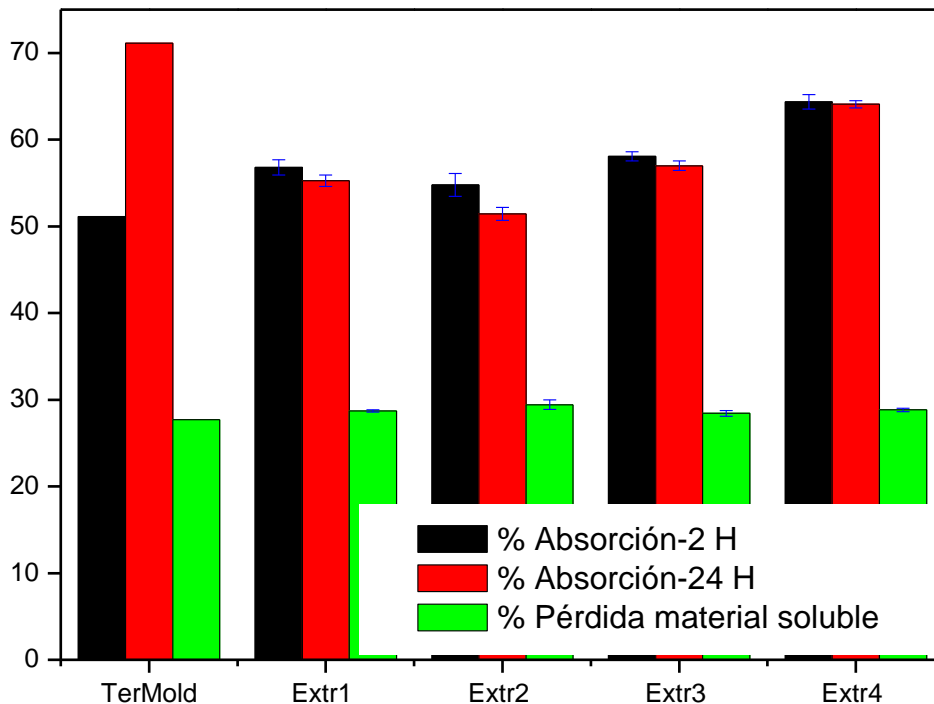


Figura 3.4.22. Parámetros de los ensayos absorción de agua en probetas de bioplásticos WG/GL/XG/agua a pH6 con un contenido de 1,5% de XG, en función del método de procesado.

Después de 2 horas de inmersión, las probetas procesadas mediante extrusión alcanzan mayores valores de absorción de agua que las muestras termomoldeadas. Tras 24 horas de inmersión, los bioplásticos provenientes del termomoldeo superan los porcentajes de absorción de los extraídos, probablemente debido a una cinética lenta de liberación de glicerina al medio acuoso, como se mencionó anteriormente.

3.4.2.5. Comparación entre formulaciones tras la extrusión

Hasta aquí se ha comparado el procesado por termomoldeo y el realizado por extrusión, para algunos sistemas seleccionados (WG/GL/agua a pH6, WG/GL/agua a pH9, WG/GL/Glioxal/agua a pH6 y WG/GL/XG/agua a pH6). En este apartado se pretende estudiar el efecto de la formulación sobre diferentes sistemas extruados. Para tal fin, se escogió el perfil de temperatura de extrusión que conducía, en cada caso, a los mejores resultados, de acuerdo

con la discusión realizada en apartados anteriores. Los perfiles de extrusión seleccionados se recogen en la Tabla 3.4.11. A continuación, se lleva a cabo una comparación de los resultados procedentes de los ensayos de DMA, tracción y absorción de agua, obtenidos para dichos perfiles.

La Figura 3.4.23 compara las curvas del módulo elástico (E') y la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) obtenidos a partir de ensayos de DMA en rampas de temperatura para los diferentes bioplásticos, todos ellos equilibrados a una humedad relativa de 53 % RH. Los valores de los parámetros de los ensayos de DMA para las probetas, se presentan en la Tabla 3.4.11.

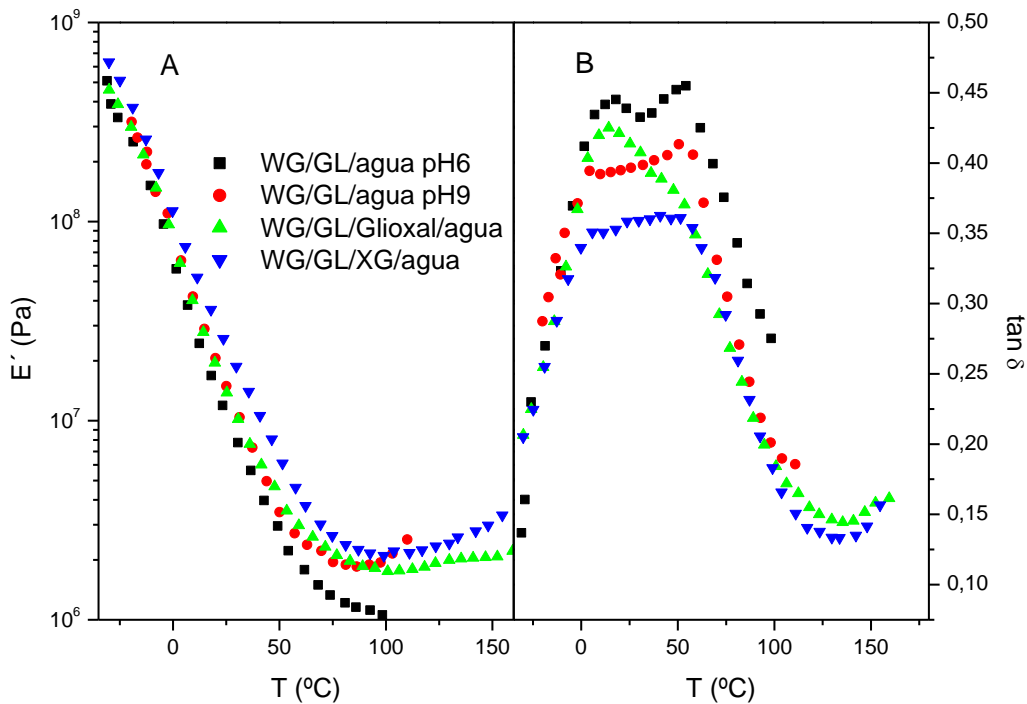


Figura 3.4.23. Dependencia del módulo E' (A) y de la tangente de pérdidas $\tan \delta$ (B) con la temperatura para probetas de bioplástico procesadas mediante extrusión a partir de distintos sistemas WG/GL/agua.

Como puede observarse en la Figura 3.4.23.A las curvas de E' presentan un comportamiento similar para todos los sistemas, siendo superiores los valores del módulo E' para las probetas con el sistema que incorpora XG. También

puede apreciarse un incremento en E' en la región de altas temperaturas, especialmente notorio para el sistema WG/GL/agua a pH9.

Tabla 3.4.11. Parámetros de DMA para probetas de bioplástico procesadas mediante extrusión a partir de distintos sistemas WG/GL/agua.

Sistema	Perfil de extrusión	E'_{min}	T_{min}	$T_{\alpha1}$	$T_{\alpha2}$
WG/GL/agua pH6	Extr1: 55, 65, 80 y 100	1,050	102,2	17,4	54,1
WG/GL/agua pH9	Extr1: 55, 65, 80 y 100	1,840	85,3	6,0	53,1
WG/GL/Glioxal/agua (3% Glioxal) pH6	Extr4: 80, 110, 120 y 100	1,743	101,4	14,2	44,1
WG/GL/XG/agua (1,5% XG) pH6	Extr4: 80, 120, 110 y 100	2,061	98,8	7,0	47,0

En la Figura 3.4.23.B se pone de manifiesto la presencia de dos picos en $\tan \delta$, en las cercanías de los 7 y 50°C, asociados a $T_{\alpha1}$ y $T_{\alpha2}$ (Tabla 3.4.11). Los sistemas que incorporan algún aditivo (goma o aldehído) evidencian un acercamiento entre $T_{\alpha1}$ y $T_{\alpha2}$, especialmente los que contienen glioxal, en cuyo caso los picos de $\tan \delta$ tienden a solaparse. Este hecho sugiere un mayor grado de compatibilidad entre fases en dichos sistemas, en comparación con los sistemas sin aditivos. La separación más notoria entre los picos de $\tan \delta$ se presenta para el sistema WG/GL/agua a pH 9.

Los altos valores de E' para bioplásticos con goma, que además son las que presentan características más elásticas (menores valores de $\tan \delta$), y el solapamiento de los picos de $\tan \delta$ para probetas con glioxal y XG, indican que la cizalla y las relativamente altas temperaturas dentro de la extrusora favorecen un mayor grado de entrecruzamiento y compatibilización de los sistemas que incorporan estos componentes en comparación con aquellos exentos de aditivos. De hecho, la cizalla puede disminuir la energía de activación de las reacciones de entrecruzamiento y facilitar la interacción entre los grupos reactivos de los aditivos y los de las cadenas de proteína (Pommet y col., 2003), mientras que los altos perfiles de temperatura ayudarían a fijar la estructura de la matriz de bioplástico (Lagrain y col., 2010).

La Figura 3.4.24 muestra los resultados de los ensayos de tracción a los que se ha sometido cada probeta. Como puede verse las probetas que presentan los mayores valores de σ_{\max} y ϵ_{\max} (mayor ductilidad) corresponden al sistema WG/GL/agua a pH9, mientras que los más bajos se encuentran para los bioplásticos con glioxal.

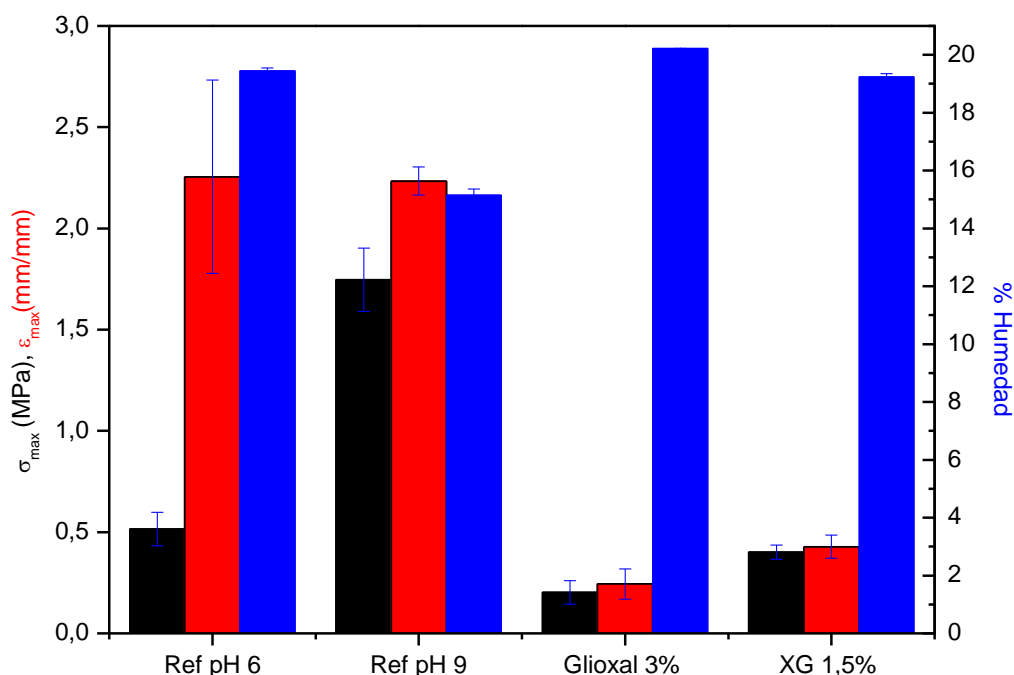


Figura 3.4.24. Parámetros de los ensayos de tracción en probetas de bioplástico procesadas mediante extrusión a partir de diferentes sistemas WG/GL/agua.

Como se analizó en el apartado 3.1.5., a pH alcalino se favorece la agregación de las proteínas de gluten y la formación de enlaces por reacciones de Maillard, intercambio SH-SS, oxidación de los grupos SH y/o de formación de lantionina (LAN). El medio alcalino permitiría la formación de una matriz de gluten con un buen grado de entrecruzamiento, más estable y con fuertes interacciones intermoleculares entre componentes bajo condiciones moderadas de temperatura. De ahí las buenas propiedades mecánicas que dicho sistema exhibe bajo los ensayos de tracción. De otro lado, las altas temperaturas empleadas para la formación de láminas con glioxal y XG parecen conducir a

una alta polimerización, dando lugar a bioplásticos más frágiles, con valores bajos de σ_{\max} y ϵ_{\max} .

Ullsten y col.(2009) realizaron extrusiones en sistemas WG/GL con o sin adición de NaOH, con un perfil de temperaturas de 30, 55, 60 y 105°C. En el presente estudio se han alcanzado valores de ϵ_{\max} un 50% mayores que los obtenidos por estos autores. Sin embargo, los valores de σ_{\max} son aproximadamente un 35% más bajos que los obtenidos por dichos autores para bioplásticos almacenados con un 50%HR. Cabe resaltar que Ullsten y col. también obtuvieron una mejora de propiedades en el sistema que incorpora NaOH en comparación con el exento de base. Por otro lado, Hochstetter y col.(2006) llevaron a cabo extrusiones de sistemas WG/GL/agua con seis tramos de control térmico en la extrusora y dos en la boquilla, a temperaturas de 80, 100, 130, 130, 130, 130, 130 y 130°C. Estos investigadores presentaron valores de σ_{\max} mayores a los de Ullsten y col. y a los obtenidos en el presente trabajo. Además, los valores que obtuvieron de ϵ_{\max} son iguales a los de Ullsten y col. pero menores que los de esta investigación, para probetas de bioplástico conservadas con un 54%HR.

En la Figura 3.4.25 se comparan los porcentajes de absorción de agua después de 2 y 24 horas de inmersión y pérdida de material soluble obtenidos para los diferentes bioplásticos estudiados (Tabla 3.4.11).

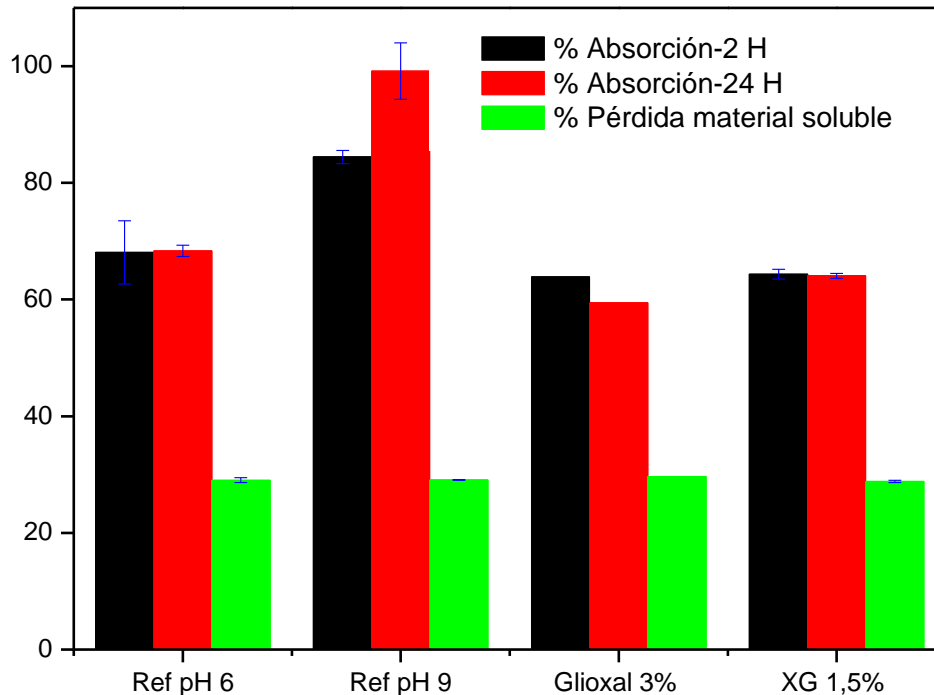


Figura 3.4.25. Parámetros de los ensayos de absorción de agua de probetas de bioplástico procesadas mediante extrusión a partir de diferentes sistemas WG/GL/agua.

El sistema WG/GL/agua a pH 9 presenta los valores más altos de absorción de agua mientras que el sistema con glioxal exhibe los más bajos, si bien a las dos horas muestran resultados similares a los sistemas preparados a pH6 o con adición de goma. Como se discutió anteriormente (apartado 3.1.5) para el sistema a pH alcalino las superficies de la proteína tendrían cierta carga residual que favorecería su interacción con el agua y por tanto la mayor absorción de esta. Aparentemente los bioplásticos con glioxal poseen una estructura más entrecruzada que daría menor espacio a la interacción con las moléculas de agua, reflejándose en menores porcentajes de absorción del líquido. Estos resultados sugieren la utilización de sistemas a pH alcalino para aplicaciones que impliquen una buena absorción de agua y de probetas con aldehído o goma xantana cuando se requiera limitar dicha propiedad. Además, la incorporación de aditivo (aldehído o polisacárido) al bioplástico parece favorecer la compatibilización de fases en el material.

4. CONCLUSIONES

4.1. SISTEMA GLUTEN/GLICEROL/AGUA

- a) El mezclado de los sistemas gluten/glicerol/agua conlleva una evolución apreciable de los perfiles de par de torsión y temperatura, en los que la presencia de agua parece evitar la aparición del periodo de inducción descrito por algunos autores para sistemas en los que se utiliza glicerol como único plastificante.
- b) El incremento en la temperatura de mezclado (hasta los 60°C) produce menores valores de SME y de propiedades de flujo capilar, lo cual constituye una ventaja en términos de procesamiento de las mezclas gluten/plastificante en procesos industriales como la extrusión y la inyección. Además, el empleo de temperaturas de mezclado moderadas resulta conveniente para aquellas aplicaciones que requieren materiales con una alta capacidad de absorción de agua (materiales absorbentes biodegradables para aplicaciones sanitarias, agrícolas y hortícolas) y que al mismo tiempo mantengan propiedades mecánicas adecuadas durante su uso final.
- c) Los resultados de solubilidad del sistema WG/GL/agua 50/18, reflejan los beneficios potenciales que se obtienen al combinar la cizalla y las altas temperaturas durante el procesamiento de las mezclas proteína/plastificante (como en el caso de la extrusión) para mejorar el entrecruzamiento entre cadenas proteicas.
- d) Un aumento en la temperatura de moldeo del sistema WG/GL/agua 50/18 produce una reducción en la compatibilidad de fases entre el gluten y los plastificantes. De acuerdo con los bajos potenciales de termoendurecimiento encontrados en los ensayos de DMA para bioplásticos moldeados a temperaturas iguales o superiores a los 130°C, temperaturas cercanas a dicho valor resultan adecuadas para el proceso de termomoldeo.

- e) Los bioplásticos de los sistemas WL/GL/agua presentan propiedades térmicas y mecánicas altamente dependientes del valor de humedad relativa, que favorece la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y los segmentos de proteína, confiriendo una mayor movilidad a la matriz del biopolímero y contribuyendo de este modo a una mayor elongación, aunque también a una menor resistencia en los ensayos de tracción. El efecto plastificante del agua queda reflejado por los desplazamientos de las temperaturas de transición vítrea y de desnaturalización en los ensayos de DMA y MDSC, respectivamente.
- f) Las condiciones de pH de las mezclas WL/GL/agua afectan al comportamiento térmico y mecánico de los bioplásticos formados mediante termomoldeo. A pH alcalino se obtienen las probetas con mayores propiedades de resistencia a la tracción y DMA, relacionadas con cierto grado de deamidación del gluten que favorecería las interacciones intermoleculares entre el agua y los componentes del gluten, inducidas por el tratamiento térmico, favoreciendo la formación de una matriz de gluten más estable. Por el contrario a pH ácido, los bioplásticos presentan una matriz menos estructurada, pero con mayor número de puntos activos disponibles para la formación de puentes de hidrógeno. Es así como estos sistemas presentan bajas propiedades mecánicas y térmicas pero una mayor capacidad de absorción de agua.

4.2. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE ALDEHÍDOS

- a) La incorporación de aldehídos modifica las propiedades de los bioplásticos WL/GL/agua, facilitando la formación de entrecruzamiento en las proteínas por reacciones con los grupos amino de distintos aminoácidos, siendo el sistema con glioxal el que parece dar origen a un sistema con una matriz con mejores propiedades térmicas y mecánicas.
- b) Los bioplásticos formulados con formaldehído o glutaraldehído presentan una reducción en propiedades térmicas y mecánicas, como consecuencia de las reacciones en las que participan perturbando el equilibrio en los puentes de hidrógeno de las proteínas, disminuyendo la

capacidad plastificante del agua durante el proceso de moldeo y conduciendo a probetas más frágiles.

- c) En el caso del glioxal, tal como describen otros autores, una parte del aldehído parece participar en las reacciones de entrecruzamiento y la otra actuaría como plastificante, lo que se refleja en mejores propiedades térmicas y mecánicas.
- d) La adición de aldehídos siempre produce un descenso de la capacidad de absorción de agua con respecto a la de las probetas exentas de aldehído, indicando un aumento en la hidrofobicidad de las muestras como consecuencia de la aparición de nuevos enclaves de entrecruzamiento que consumirían grupos amino reactivos.

4.3. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE POLISACÁRIDOS

- a) La incorporación de gomas en bajas concentraciones (1 a 5%) en las mezclas gluten/plastificante afecta a la fase rica en plastificantes, dispersa dentro de la matriz del bioplástico, como lo indican los ensayos de DMA, pero tienen una participación minoritaria en la matriz de los bioplásticos WG/GL/goma/agua.
- b) Entre las gomas estudiadas, la MC es la que presenta una mejora más notable en propiedades viscoelásticas, debido probablemente a su capacidad para unir componentes y fases, derivada de su capacidad de termogelificación. LBG y CMC, parecen actuar como materiales de relleno, mientras que XG tiene un comportamiento altamente dependiente de la concentración.
- c) Los ensayos de tracción para sistemas con hidrocoloides sugieren una moderada contribución a la formación de estructura en los dominios de goma dentro de la matriz de gluten, como lo indica la tendencia al aumento en σ_{\max} , así la posibilidad de que las gomas desempeñen un papel de plastificante, causando el incremento aparente observado en ϵ_{\max} .

- d) La adición de gomas en una concentración de 1,5% reduce moderadamente la capacidad de absorción de agua de las probetas, como consecuencia de una disminución del carácter hidrófilo del sistema y del volumen libre disponible por el agua dentro de la matriz de bioplástico.
- e) Los bioplásticos de los sistemas WG/GL/goma/agua presentan propiedades térmicas y mecánicas dependientes del valor de pH del medio de preparación y del carácter (aniónico o sin carga) de la goma incorporada. A pH ácido los bioplásticos con goma exhiben un mayor potencial de termoendurecimiento que las probetas exentas de hidrocoloide al mismo valor de pH. Para dicho valor de pH habría una mayor compatibilidad entre la goma aniónica (XG) y las proteínas del gluten (cargadas positivamente a pH ácido), asociada a interacciones de carácter atractivo. A pH alcalino, la incompatibilidad termodinámica de los hidrocoloides con las proteínas del gluten, por repulsión electrostática en el caso de XG y por separación segregativa relacionada con fenómenos de exclusión estérica para LBG, causaría una disminución en las propiedades de los bioplásticos en DMA y en los ensayos de tracción.
- f) Los bioplásticos de los sistemas híbridos XG/WG 1/4 y XG/LBG/WG 0,5/0,5/4 presentan una mejora en la capacidad de absorción de agua y en las propiedades viscoelásticas a elevada temperatura, pero presentan una reducción en los valores de σ_{\max} y ϵ_{\max} de los ensayos de tracción.
- g) La incorporación de Glioxal a los sistemas híbridos XG/LBG/WG produce un mayor grado de compatibilidad entre fases, como puede deducirse del perfil de $\tan \delta$, y una mejora de propiedades mecánicas (σ_{\max} y ϵ_{\max}). Sin embargo, reduce notablemente la capacidad de absorción de agua. Dicho comportamiento podría atribuirse a un mayor grado de entrecruzamiento en los materiales híbridos XG/LBG/WG, promovido por

el aldehído, que conduciría a una matriz más estructurada, con una mayor participación de los distintos biopolímeros.

4.4. PROCESO DE EXTRUSIÓN

- a) Se han obtenido diferentes grados de entrecruzamiento en las láminas de bioplástico del sistema WG/GL/agua 50/18 preparadas a pH 6, como consecuencia de las distintas condiciones de calentamiento a las que se someten durante el procesado por extrusión. Un calentamiento progresivo y no demasiado severo dentro de la extrusora (temperaturas menores a los 100°C), conduce a láminas con valores de deformación altos, sin comprometer de modo significativo los valores de tensión obtenidos en los ensayos de tracción.
- b) Los bioplásticos obtenidos mediante extrusión del sistema WG/GL/agua 50/18 a pH 9 poseen un mayor potencial de termoendurecimiento remanente que aquellos procesados por termomoldeo. El perfil de extrusión 1 (55, 65, 80 y 100 °C) conduce a las láminas de bioplástico del sistema WG/GL/agua 50/18 a pH 9 con mayores valores de parámetros de los ensayos de tracción, superando incluso a los correspondientes a las probetas procesadas mediante termomoldeo.
- c) La incorporación de glioxal restringe aún más la ventana de extrusión de los sistemas WG/GL/agua, aunque la desplaza a temperaturas de operación mayores. Perfiles con temperaturas más altas dentro de la extrusora favorecen un mayor entrecruzamiento y la formación de un material más resistente, que al llegar al final de la extrusión no se fractura por la cizalla. Los bioplásticos obtenidos por extrusión del sistema WG/GL/Glioxal/agua a pH 6 presentan valores de funciones viscoelásticas mayores a los de las probetas procesadas mediante termomoldeo. Sin embargo, presentan propiedades mecánicas, bajo tracción, inferiores a los sistemas termomoldeados que incorporan glioxal.

- d) Las altas temperaturas durante el procesado por extrusión de los bioplásticos WG/GL/XG/agua a pH6 conducen a una polimerización prematura de las proteínas, dando lugar a probetas con propiedades pobres en tracción. Sin embargo, perfiles con temperaturas menores conducen a la ruptura del material a la salida de la boquilla sin que se lleguen a obtener láminas continuas.
- e) Comparados los sistemas extruidos, las láminas procedentes de la extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 9 presentan el mejor comportamiento bajo tracción. Por el contrario, las altas temperaturas utilizadas para la formación de láminas con glioxal y XG producen una alta polimerización, dando lugar a bioplásticos con bajas propiedades mecánicas bajo tracción. Por tanto, los bioplásticos preparados mediante extrusión del sistema WG/GL/agua a pH 9 representan una buena opción como materiales absorbentes ya que reúnen una alta capacidad de absorción de agua y buenas propiedades mecánicas.

4. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Mendez, M.; Martin-Martinez, E.; Tomas, S.; Cruz-Orea, A. y Jaime-Fonseca, M. 2008 “Gelatin-starch films: physicochemical properties and their application in extending the post-harvest shelf life of avocado (*Persea americana*)”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (2): 185–193.

Arvanitoyannis, I.; Psomiadou, E.; Nakayama, A.; Aiba, S. y Yamamoto, N. 1997 “Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols 3” *Food Chemistry*, 60 (4): 593–604.

Arvanitoyannis, I. y Biliaderis, C. 1998 “Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends” *Food Chemistry*, 62 (3): 333–342.

ASTM, American Society for Testing Materials. 2000 “Standard test method for tensile properties of plastics, ASTM D638-99”.

ASTM, American Society for Testing Materials. 2005 “Standard test method for water absorption of plastics, ASTM D570-98”.

ASTM, American Society for Testing Materials. 1983 “Standard test methods for water vapour transmission of materials E96-80” en *Annual Book of American Standard Testing Methods*. ASTM, Philadelphia, PA

Baldwin, R. 1986 “Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 8069–8072.

Bagley, E.B. 1957 “End corrections in the capillary flow of polyethylene” *Journal of Applied Physics*, 28:624–657.

Bárceñas, M.E.; De la O-Keller, J. y Rosell, C.M. 2009 “Influence of different hydrocolloids on major wheat dough components (gluten and starch)” *Journal of Food Engineering*, 94: 241–247.

Belitz, H. D. y Grosch, W. 1999 “Amino acids, peptides, proteins” en *Food Chemistry*, 2nd ed., Belitz, H. D., Grosch, W.(Eds.), Springer-Verlag:Berlin, Heidelberg, New York. pp 8-97

Belton, P.S. 1999 “On the Elasticity of Wheat Gluten” *Journal of Cereal Science*, 29: 103–107.

Belton, P. S.; Colquhoun, I. J.; Field, J. M.; Grant, A.; Shewry, P. R.; Tatham, A. S. y Wellner, N. 1995 "FTIR and NMR studies on the hydration of a high *M_r* subunit of glutenin" *International Journal of Biological Macromolecules* 17: 74.

Bengochea, C.; Arrachid, A.; Guerrero, A.; Hill, S.E. y Mitchell, J.R. 2007 "Relationship between the glass transition temperature and the melt flow behavior for gluten, casein and soya" *Journal of Cereal Sciences*, 45:275-284.

Berg, J.; Stryer, L. y Tymoczko, J. 2006 "Protein structure and composition" en *Biochemistry*, Sixth Edition, Stanford (CA): Freeman, W.H. & Company. Cap 2.

Biesecker, G.; Harris, J.; Thierry, J.; Walker, J. y Wonacott, A. 1977 "Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*" *Nature*, 266: 328.

Booth, M. R.; Bottomley, R. C.; Ellis, J. R. S.; Malloch, G.; Schofield, J. D. y Timms, M. F. 1980 "The effect of heat on gluten-physico-chemical properties and baking quality" *Ann. Technol. Agric.*, 29: 399–408

Camire, M. 1991 "Protein functionality modification by extrusion cooking" *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68 (3): 200–205.

Cash, M.J. y Caputo, S.J. 2010 "Cellulose derivatives" en *Food Stabilisers, thickeners and gelling agents*, Imeson, A. (Ed), Oxford, UK, Wiley-Blackwell. Cap. 6.

Cho, S.-W.; Gällstedt, M. y Hedenqvist, M.S. 2010 "Effects of glycerol content and film thickness on the properties of vital wheat gluten films cast at pH 4 and 11" *Journal of Applied Polymer Science*, 117: 3506-3514.

Ciesla, K.; Salmieri, S. y Lacroix, M. 2006 "Modification of the properties of milk protein films by gamma radiation and polysaccharide addition" *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (6): 908–914.

Coughlan, K.; Shaw, N.; Kerry, J.P. y Kerry, J.F. 2004 "Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films" *Journal of Food Science*, 69 (6): E271–E275.

Cunningham, P.; Ogale, A.; Dawson, P. y Acton, J. 2000 "Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique" *Journal of Food Science*, 65(4):668–671.

- Cuq, B.; Boutrot, F.; Redl, A. y Lullien-Pellerin, V. 2000 "Study of the temperature effect on the formation of wheat gluten network: influence on mechanical properties and protein solubility" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2954–2959.
- Dakia, P.A.; Blecker, C.; Robert, C.; Wathelet, B. y Paquot, M. 2008 "Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment" *Food Hydrocolloids*, 22: 807-818.
- Damodaran, S. 1997 "Food proteins: an overview" en *Food proteins and their applications*, Damodaran, S., Paraf, A. (ed.), Nueva York, Marcel Dekker, Inc. Cap. 1, 1.
- De Graaf, L.A. 2000 "Denaturation of proteins from a non-food perspective" *Journal Biotechnology*, 79: 299-306.
- De Graaf, L.A. y Kolster, P. 1998 "Industrial proteins as a green alternative for 'petro' polymers: potentials and limitations" *Macromolecular Symposium*, 127:51–58.
- di Gioia, L. y Guilbert, S. 1999 "Corn protein-based thermoplastic resins: effect of some polar and amphiphilic plasticizers" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1254–1261.
- Domenek, S.; Morel, M. H.; Bonicel, J. y Guilbert, S. 2002 "Polymerization kinetics of wheat gluten upon thermosetting: A mechanistic model." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21): 5947–5954.
- Domenek, S.; Morel, M. H.; Redl, A. y Guilbert, S. 2003 "Rheological investigation of swollen gluten polymer networks: Effects of process parameters on cross-link density" *Macromolecular Symposium*, 200: 137– 145.
- Domenek, S.; Feuilloy, P; Grataud, J.; Morel, M.H. y Guilbert, S. 2004 "Biodegradability of wheat gluten bioplastics" *Chemosphere*, 54: 551-559.
- Erdohan, Z. y Turhan, K. 2005 "Barrier and mechanical properties of methycellulose-whey protein films" *Packaging Technology and Science*, 18 (6): 295–302.
- Fayle, S. E. y Gerrard, J. A. 2002 "What is the Maillard Reaction?" en *The Maillard reaction*, P. S. Belton (ed), Cambridge, Royal Society of Chemistry. Cap 1.
- Feeney, R.E.; Blankenhorn, G. y Dixon H.B.F. 1975 "Carbonyl-Amine Reactions in Protein Chemistry" *Advances in Protein Chemistry*, 29: 135-203.
- Feeney, R. E. y Whitaker, J. R. 1988 "Importance of cross-linking reactions in proteins" *Advances in Cereal Science and Technology*, IX: 21–43.

- Fraenkel-Conrat, H. y Olcott, H. S. 1948 "Reaction of formaldehyde with protein. VI. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups" *Journal of Biological Chemistry*, 174: 827–843.
- Friedman, M. 1999 "Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1295–1319.
- Fujimaki, M.; Haraguchi, T.; Abe, K.; Homma, S. y Arai, S. 1980 "Specific conditions that maximize formation of lysinoalanine in wheat gluten and fish-protein concentrate" *Agricultural and Biological Chemistry*, 44 (8): 1911–1916.
- García- Martínez, J.M.; Areso, S.; Taranco, J. y Collar, E.P. 2004 "Ensayos de termoplásticos y termoestables" en *Ciencia y tecnología de materiales poliméricos*, Volumen II, Garrido, L.; Ibarra, L y Marco, C. (Eds), Madrid, Instituto de la Ciencia y tecnología de los polímeros (CSIC). Cap. 21.
- Garnier, C.; Schorsch, C y Doublier, J.L. 1995 "Phase separation in dextran/locust bean gum mixtures" *Carbohydrate polymers*, 28: 313-317.
- Gennadios, A. 2002 "Protein based films and coatings" CRC, New York, pp 66-115.
- Gennadios, A.; Weller, C.L. y Testin, R.F. 1993a "Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films" *Cereal Chemistry*, 70: 426–429.
- Gennadios, A.; Brandenburg, A.H.; Weller, C.L. y Testin, R.F. 1993b "Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41: 1835-1839.
- Gerrard, J.A. 2002 "Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications" *Trends in Food Science & Technology*, 13: 391–399
- Gerrard, J.A.; Brown, P.K. y Fayle, S.E. 2003 "Maillard crosslinking of food proteins II: the reactions of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehydes with wheat proteins in vitro and in situ" *Food Chemistry*, 80: 35–43.
- Ghanbarzadeh, B. y Oromiehi, A.R. 2009 "Thermal and mechanical behaviour of laminated gluten films" *Journal of Food Engineering*, 90: 517-524.
- Gontard, N.; Guilbert, S. y Cuq, J. 1993 "Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology" *Journal of Food Science*, 57: 190-196.

- Gorstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Vasco-Méndez, N. y Paredes-López, O. 1996 "Denaturant-induced conformations of globulins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 93-96.
- Gounga, M.; Xu, S. y Wang, Z. 2007 "Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation" *Journal of Food Engineering*, 83 (4): 521–530.
- Guerrieri, N.; Alberti, E.; Lavelli, V. y Cerletti, P. 1996 "Use of spectroscopic and fluorescence techniques to assess heat-induced molecular modifications of gluten" *Cereal Chemistry*, 73 (3): 368–374.
- Guilbert, S.; Cuq, B. y Gontard, N. 1997 "Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials" *Food Add Contaminants*, 14: 741-751.
- Gilbert, S. M.; Wellner, N.; Belton, P. S.; Greenfield, J. A.; Siligardi, G.; Shewry, P. R. y Tatham, A. S. 2000 "Expression and characterisation of a highly repetitive peptide derived from a wheat seed storage protein" *Biochemistry Biophysics Acta* 1479: 135–146.
- Hague, A. y Morris, E.R. 1993 "Thermogelation of methylcellulose. Part 1: Molecular structures and processes" *Carbohydrate Polymers*, 22: 161-173.
- Haines, P.J. 2002 "*Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*" The Royal Society of chemistry, Cambridge.
- Hall, G. 1996 "Basic concepts" en *Methods of testing protein functionality*, Hall, G. (Ed), London, Blackie Academic & Professional. Cap 1.
- Hatakeyama, T. y Hatakeyama, H. 2004 "Thermal properties of green polymers and biocomposites. Hot topics in thermal analysis and calorimetry Vol. 4" Springer Verlag, Berlin ó Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Hayta, M. y Schofield, J. D. 2004 "Heat and additive induced biochemical transitions in gluten from good and poor breadmaking quality wheats" *Journal of Cereal Science*, 40 (3): 245–256.
- Herald, T.; Gnanasambandam, R.; Mcguire, B. y Hachmerster, K. 1995 "Degradable wheat gluten films: preparation, properties and applications" *Journal of Food Science*; 60: 1147–1150.
- Hernández-Muñoz, P.; Villalobos, R. y Chiralt, A. 2004 "Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films" *Food Hydrocolloids*, 18: 403-411.

- Hernandez-Izquierdo, V. 2007 "Thermal transitions, extrusion, and heat-sealing of whey protein edible films [dissertation]" Davis, Calif.: Univ. of California. 110p.
- Hernandez-Izquierdo, V. y Krochta, J. 2008 "Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation—A Review" *Journal of Food Science*, 73 (2): R30 - R39
- Hill, S. y Easa, A. M. 1998 "Linking proteins using the Maillard reaction and the implications for food processors" en *The Maillard reaction in foods and medicine*, J. O'Brien (Ed.), Cambridge, Royal Society of Chemistry, pp. 133–138.
- Hochstetter, A.; Taljaa, R.A.; Heléna, H.J.; Hyvönena, L. y Jouppila, K. 2006 "Properties of gluten-based sheet produced by twin-screw extruder" *LWT*, 39: 893–901.
- Irissin-Mangata, J.; Bauduin, G.; Boutevin, B. y Gontard, N. 2001 "New plasticizers for wheat gluten films" *European Polymer Journal*, 37: 1533-1541.
- Jagannath, J.; Nanjappa, C.; Das Gupta, D. y Bawa, A. 2003 "Mechanical and barrier properties of edible starch-protein-based films" *Journal of Applied Polymer Science*, 88 (1): 64–71.
- Jayakrishnan, A. y Jameela, S. R. 1996 "Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices" *Biomaterials*, 17: 471-484.
- Jerez, A. 2007 "Formulación y procesado de materiales poliméricos biodergradables", Tesis Doctoral, Universidad de Huelva.
- Jerez, A.; Partal, P.; Martínez, I.; Gallegos, C. y Guerrero, A. 2005 "Rheology and processing of gluten based bioplastics" *Biochemical Engineering Journal*, 26: 131-138
- Jerez, A.; Partal, P.; Martínez, I.; Gallegos, C. y Guerrero, A. 2007 "Protein-based bioplastics: effect of termo-mechanical processing" *Rheologica Acta*, 46: 711-720.
- Kampf, N. y Nussinovitch, A. 2000 "Hydrocolloid coatings of cheeses" *Food Hydrocolloids*, 14: 531-537
- Kieffer, R.; Schurer, F.; Koehler, P. y Wieser, H. 2007 "Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin" *Journal of Cereal Science*, 45 (3): 285–292.
- Kokini, J.L.; Cocero, A.M.; Madeka, H. y Degraaf, E. 1994 "The development of state diagrams for cereal proteins" *Trends in Food Science Technology*, 5(9): 281-288.

Krochta, J.M.; Baldwin, E.A. y Nisperos-Carriedo, M. 1994 Edible coating and films to improve food quality. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company. 379 pp.

Kunanopparat, T.; Menut, P.; Morel, M. H. y Guilbert, S. 2008 "Reinforcement of plasticized wheat gluten with natural fibers: From mechanical improvement to deplasticizing effect" *Composites, Part A*, 39 (5): 777–785.

Lagrain, B.; Brijs, K.; Veraverbeke, W. S. y Delcour, J. A. 2005 "The impact of heating and cooling on the physico-chemical properties of wheat gluten-water suspensions" *Journal of Cereal Science*, 42 (3): 327–333.

Lagrain, B.; Brijs, K. y Delcour, J. A. 2006 "Impact of redox agents on the physico-chemistry of wheat gluten proteins during hydrothermal treatment" *Journal of Cereal Science*, 44 (1): 49–53.

Lagrain, B.; Thewissen, B. G.; Brijs, K. y Delcour, J. A. 2008 "Mechanism of gliadin-glutenin crosslinking during hydrothermal treatment" *Food Chemistry*, 107 (2): 753–760.

Lagrain, B.; Goderis, B.; Brijs, K. y Delcour, J.A. 2010 "Molecular Basis of Processing Wheat Gluten toward Biobased Materials" *Biomacromolecules*, 11: 533–541.

Lai, H.M. y Chiang, I.C. 2006 "Properties of MTGase treated gluten film" *European Food Research and Technology*, 222: 291–297.

Larre', C.; Deshayes, G.; Lefebvre, J. y Popineau, Y. 1998 "Hydrated gluten modified by a transglutaminase" *Nahrung – Food*, 42:155-157.

Larré, C.; Desserre, C.; Barbot, J. y Gueguen, J. 2000 "Properties of Deamidated Gluten Films Enzymatically Cross-Linked" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:5444–5449

Lavelli, V.; Guerrieri, N. y Cerletti, P. 1996 "Controlled reduction study of modifications induced by gradual heating in gluten proteins" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2549-2555.

Lee, K.; Shim, J. y Lee, H. 2004 "Mechanical properties of gellan and gelatin composite films" *Carbohydrate Polymers*, 56 (2): 251–254.

Lee, S.L.; Lee, M.S. y Song K.B. 2005 "Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films" *Food Chemistry*, 92(4): 621-625.

Lefebvre, J.; Popineau, Y.; Deshayes, G. y Lavenant, L. 2000 "Temperature induced changes in the dynamic rheological behavior and size distribution of polymeric proteins for

glutens from wheat near-isogenic lines differing in HMW glutenin subunit composition” *Cereal Chemistry*, 77 (2): 193–201.

Lin, D. y Zhao, Y.Y. 2007 “Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6 (3): 60–75.

MacRitchie, F. y Singh, H. 2004 “Polymer concepts applied to gluten behaviour in dough” en *The gluten proteins*, Lafiandra, D.; Masci, S. y D’Ovidio, R. (Eds). Cambridge: The royal Society of Chemistry. pp: 227- 230.

Mangavel, C.; Rossignol, N.; Perronnet, A.; Barbot, J.; Popineau, Y. y Gueguen, J. 2004 “Properties and microstructure of thermo-pressed wheat gluten films: a comparison with cast films” *Biomacromolecules*, 5: 1596–1601.

Marcus, S. M. y Blaine, R. L. 1994 “Thermal Conductivity” en *Modulated Differential Scanning Calorimetry: A New Method for Thermal Conductivity of Polymers, Glasses, and Ceramics*, Tong, T. W. (ed.), Lancaster, PA, Technomic Publishing. Cap 22, pp. 826-833.

Marque, C. 2001 “Chemical reaction in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde and glioxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4676-4681.

Matveev, Y.; Grinberg, V. y Tolstoguzov, V. 2000 “The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, foods and seeds” *Food Hydrocolloids*, 14: 425-437.

McClements, D. 2006 “Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides” *Biotechnology Advances*, 24: 621–625

Micard, V.y Guilbert, S. 2000 “Thermal behaviour of native and hydrophobized wheat gluten, gliadin and glutenin-rich fractions by modulated DSC” *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(3): 229-236.

Micard, V.; Belamri, R; Morel, M.H. y Guilbert, S. 2000 “Properties of chemically and physically treated wheat gluten films” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2948-2953.

Micard, V.; Morel, M.; Bonicel, J. y Guilbert, S. 2001 “Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation” *Polymer*, 42: 477-485.

Michon, T.; Wang, W.; Ferrasson, E. y Gue´guen, J. 1999 “Wheat prolamine cross-linking through dityrosine formation catalyzed by peroxidases: improvement in the modification of a

poorly accessible substrate by “indirect” catalysis” *Biotechnology and Bioengineering*, 63 (4): 449-458.

Moser, A. 1996 “Ecotechnology in industrial practice: implementation using sustainability indices and case studies. *Ecological Engineering*, 7: 117-138.

Murray, J.F.C. 2009 “Cellulosics” en *Handbook of hydrocolloids, Second edition*, Phillips G.O. y Williams, P.A. (Eds), Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited. Cap. 25.

Norton, I.T. y Frith, W.J. 2001 “Microstructure design in mixed biopolymer composites” *Food Hydrocolloids*, 15: 543–553.

Nussinovitch, A. 2009 “Hydrocolloids for coatings and adhesives” en *Handbook of hydrocolloids, Second edition*, Phillips G.O. y Williams, P.A. (Eds), Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited. Cap. 28.

Olabarrieta, I.; Gällstedt, M.; Ispizua, I.; Sarasua, J.-R.; y Hedenqvist, M.S. 2006a “Properties of aged montmorillonite-wheat gluten composite films” *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 1283–1288.

Olabarrieta, I.; Cho, S.-W.; Gällstedt, M.; Sarasua, J.-R.; Johansson, E. y Hedenqvist, M.S. 2006b “Aging Properties of Films of Plasticized Vital Wheat Gluten Cast from Acidic and Basic Solutions” *Biomacromolecules*, 7: 1657-1664.

Orliac, O.; Rouilly, A.; Silvestre, F. y Rigal, L. 2002 “Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate” *Polymer*, 43: 5417-5425.

Osés, J.; Fabregat-Vázquez, M.; Pedroza-Islas, R.; Tomás, S.; Cruz-Orea, A. y Maté, J. 2009 “Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum” *Journal of Food Engineering*, 92: 56–62.

Osswald, T.A. y Menges, G. 2003 *Material Science of Polymers for Engineers*, 2nd Edition, Munich, Hanser Publishers. 622p.

Pallos, F.; Robertson, G.; Pavlath, A. y Orts, W. 2006 “Thermoformed Wheat Gluten Biopolymers” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 349-352.

Park, S.K.; Bae, D.H. y Rhee, K.C. 2000 “Soy protein biopolymers cross-linked with glutaraldehyde” *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77: 879-883.

- Parris, N. y Coffin, D. 1997 "Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic zein films" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (5): 596–1599.
- Payne, P. y Corfield, K. 1979 "Subunits composition of wheat glutenin proteins isolated by gel filtration in a dissociating medium" *Planta*, 14: 83-88.
- Pence, J. W.; Mohammad, A. y Mecham, D. K. 1953 "Heat denaturation of gluten" *Cereal Chemistry*, 30: 115–126.
- Pereda, M.; Aranguren, M.I. y Marcovich, N.E. 2010 "Effect of crosslinking on the properties of sodium caseinate films" *Journal of Applied Polymer Science*, 116: 18-26.
- Peter, K. y Richard, F. M. 1977 "Chemical cross-linking: reagents and problems in studies of membrane structure" *Annuals Reviews Biochemistry*, 46: 523-551.
- Peterson, G.L. 1979 "Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall" *Analytical Biochemistry*, 100:201-220.
- Pol, H.; Dawson, P.; Acton, J. y Ogale, A. 2002" Soy protein isolate/corn-zein laminated films: transport and mechanical properties" *Journal of Food Science*, 67(1):212–217.
- Pommet, M. ; Redl , A. ; Morel, M.H. ; Domenek, S. y Guilbert, S. 2003 "Thermoplastic processing of protein-based bioplastics: chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding" *Macromolecular Symposia*, 197: 207-217.
- Pommet, M.; Morel, M. H.; Redl, A. y Guilbert, S. 2004 "Aggregation and degradation of plasticized wheat gluten during thermo-mechanical treatments, as monitored by rheological and biochemical changes" *Polymer*, 45 (20): 6853–6860.
- Pommet, M. ; Redl , A. ; Guilbert, S. y Morel, M.H. 2005 " Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials" *Journal of Cereal Science*, 42: 81–91.
- Puppo, M.C.; Lupano, C.E. y Añón, M.C. 1995 "Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43: 2356-2361.
- Ralston, B.E. y Osswald, T.A. 2008 "Viscosity of Soy Protein Plastics Determined by Screw-Driven Capillary Rheometry" *Journal of Polymers and the Environment*,16:169–176.

- Redl, A.; Morel, M.H.; Bonicel, J.; Guilbert, S. y Vergnes, B. 1999 "Rheological properties of gluten plasticized with glycerol content and mixing conditions" *Rheologica Acta*, 38: 311-320.
- Redl, A.; Guilbert, S. y Morel, M. H. 2003 "Heat and shear mediated polymerisation of plasticized wheat gluten protein upon mixing" *Journal of Cereal Science*, 38 (1): 105–114.
- Rhim, J.W.; Gennadios, A.; Weller, C.L. y Hanna, M.A. 2002 "Sodium dodecyl sulfate treatment improves properties of cast films from soy protein isolate" *Industrial Crops and Products*, 15 (3): 199-205.
- Ribotta, P.D.; Ausar, S.F.; Beltramo, D.M. y León, A.E. 2005 "Interactions of hydrocolloids and sonicated-gluten proteins" *Food Hydrocolloids*, 19: 93–99.
- Rombouts, I.; Lagrain, B.; Brijs, K. y Delcour, J.A. 2010 " β -Elimination reactions and formation of covalent cross-links in gliadin during heating at alkaline pH" *Journal of Cereal Science*, doi:10.1016/j.jcs.2010.06.006.
- Romero-Bastida, C.; Flores-Huicochea, E.; Martin-Polo, M.; Velazquez, G. y Torres, J. 2004 "Compositional and moisture content effects on the biodegradability of zein/ethylcellulose films" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (8): 2230–2235.
- Roy, S.; Weller, C.; Gennadios, A.; Zeece, M. y Testin, R. 1999 "Physical and molecular properties of wheat gluten films cast from heated film-forming solutions" *Journal of Food Science*, 64: 57–60.
- Roy, S.; Gennadios, A.; Weller, C.L.; y Testin, R.F. 2000 "Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film" *Industrial Crops and Products*, 11(1): 43-50.
- Sarwin, R.; Laskawy; G. y Grosch, W. 1993 "Changes in the levels of glutathione and cysteine during the mixing of doughs with l-threo- and d-erythro-ascorbic acid" *Cereal Chemistry*, 70: 553–557.
- Scheraga, H.; Nemethy, G. y Steinberg, I. 1962 "The contribution of hydrophobic bonds to the thermal stability of protein conformations" *Journal of Biological Chemistry*, 237: 2506–2508.
- Schmitt, C. 2009 "Protein –polysaccharide complexes and coacervates" en *Handbook of hydrocolloids, Second edition*, Phillips G.O. y Williams, P.A. (Eds), Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited. Cap. 16.

Schofield, J.D.; Bottomley, R.C.; Timms, M. y Booth, M.R. 1983 "The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulfhydryldisulfide interchange reactions" *Journal of Cereal Sciences* 1:241–253.

Shen, L.; Haufe, J. and Patel, M. 2009 "Product overview and market projection of emerging bio-based plastics" PRO-BIP 2009 Final report. Utrecht University: Utrecht – The Netherlands. 227p.http://www.european-bioplastics.org/media/files/docs/en-pub/PROBIP2009_Final_June_2009.pdf

Shewry, P. R. y Tatham, A. S. 1997 "Disulphide bonds in wheat gluten proteins" *Journal of Cereal Science*, 25 (3): 207–227.

Shewry, P. R.; Tatham, A. S.; Forde, J.; Kreis, M. y Mifflin, B. J. 1986 "The classification and nomenclature of wheat gluten proteins -a reassessment" *Journal of Cereal Science*, 4 (2): 97–106.

Shewry, P.R.; Halford, N.G.; Belton, P.S. y Tatham, A.S. 2002 "The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain" *The Royal Society* 357, 133–142.

Singh, H. 1991 "Modification of food proteins by covalent crosslinking" *Trends in Food Science and Technology*, 2: 196–200.

Singh, H. y MacRitchie, F. 2004 "Changes in proteins induced by heating gluten dispersions at high temperature" *Journal of Cereal Sciences*, 39 (2):297–301.

Siracusa, V.; Rocculi, P.; Romani, S. y Dalla Rosa M. 2008 "Biodegradable polymers for food packaging: a review" *Trends in Food Science and Technology*, 19: 634-643.

Slade, L.; Levine, H. y Finley, J. W. 1989 "Protein-water interactions: Water as a plasticizer of gluten and other polymers" en *Protein Quality and the Effects of Processing*, Philips, R. D. y Finley, J. W. (Eds), Marcel Dekker, New York. pp 9-124.

Song, Y.; Zheng, Q. y Liu, C. 2008 "Green biocomposites from wheat gluten and hydroxyethyl cellulose: Processing and properties" *Industrial Crops and Products*, 28 (1): 56–62.

Sothornvit, R.; Olsen, C; McHugh, T. y Krochta, J. 2003 "Formation conditions, water-vapor permeability, and solubility of compression-molded whey protein films" *Journal of Food Science* 68(6):1985–1989.

Sothornvit, R. y Krochta, J. 2005 "Plasticizers in edible films and coatings" Han JH, editor. *Innovations in food packaging*. San Diego, Calif. : Elsevier Academic Press. pp 403–433.

- Sothornvit, R; Olsen, C; McHugh, T. y Krochta, J. 2007 “Tensile properties of compression-molded whey protein sheets: determination of molding condition and glycerol-content effects and comparison with solution-cast films” *Journal of Food Engineering* ,78(3):855–860.
- Stevens, E. 2002 “Green Plastics: An introduction to the new science of biodegradable plastics” Princeton, N.J: Princeton University Press.
- Strecker, T.; Cavaliere, R.; Zollars, R. y Pomeranz, Y. 1995 “Polymerization and mechanical degradation kinetics of gluten and glutenin at extruder melt-section temperatures and shear rates” *Journal of Food Science*, 60: 532–537.
- Stuchell, Y. M. y Krochta, J. M. 1994 “Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films” *Journal of Food Science*, 59: 1332-1337.
- Sun, S., Song, Y. y Zheng, Q. 2007 “Morphologies and properties of thermo-molded biodegradable plastics based on glycerol-plasticized wheat gluten” *Food Hydrocolloids*, 21: 1005–1013.
- Sun, S.; Song, Y. y Zheng, Q. 2008 “Termo-molded wheat gluten plastics plasticized with glycerol: Effect of molding temperature” *Food Hydrocolloids*, 22: 1006-1013.
- Sun, S.; Song, Y. y Zheng, Q. 2008 “Morphology and mechanical properties of thermo-molded bioplastics based on glycerol-plasticized wheat gliadins” *Journal of Cereal Science*, 48: 613–618
- Sworn, G. 2009 “Xanthan gum” en *Handbook of Hydrocolloids Second edition*, Phillips G.O. y Williams, P.A. (Eds), Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited. Cap. 8.
- Sworn, G. 2010 “Xanthan gum” en *Food Stabilisers, thickeners and gelling agents*, Imeson, A. (Ed), Oxford, UK, Wiley-Blackwell. Cap. 17.
- Tae, H. J. 1983 “Bifunctional reagents” *Methods in Enzymology*, 91: 580–609.
- Tilley, K.A.; Benjamin, R.E.; Bagorogoza, K.E.; Okot-Kotber, B.M.; Prakash, O. and Kwena, H. 2001 “Tyrosine cross-links: molecular basis of gluten structure and function” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2627–2632.
- Tolstoguzov, V. 1991 “Functional properties of food proteins and role of protein–polysaccharide interaction” *Food Hydrocolloids*, 4: 429–468.

Tolstoguzov, V. 1993 "Thermoplastic extrusion—the mechanism of the formation of extrudate structure and properties." *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 70(4):417–24.

Toufeili, I.; Lambert, I. A. y Kokini, J. L. 2002 "Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of gluten: Development of a preliminary state diagram" *Cereal Chemistry*, 79 (1): 138–142.

Turhan, K.; Sancak, Z.; Ayana, B. y Erdogdu, F. 2007. "Optimization of glycerol effect on the mechanical properties and water vapor permeability of whey protein-methylcellulose films" *Journal of Food Process Engineering*, 30 (4): 485–500.

Ullsten, N.H.; Cho, S.-W.; Spencer, G.; Gällstedt, M.; Johansson, E y Hedenqvist, M.S. 2009 "Properties of extruded vital wheat gluten sheets with sodium hydroxide and salicylic acid" *Biomacromolecules*, 10: 479–488.

Veraverbeke, W. S. y Delcour, J. A. 2002 "Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (3): 179–208.

Weegels, P. L. y Hamer, R. J. 1998 "Temperature-induced changes of wheat products" en *Interactions: The Keys to Cereal Quality*. Hamer, R. J., Hosenev, R. C. (Eds.), American Association of Cereal Chemists, Inc: St. Paul, MN. pp 95-130.

Wellner, N.; Belton, P. S. y Tatham, A. S. 1996 "Fourier transform IR spectroscopic study of hydration induced structure changes in the solid state of omega gliadins" *Biochemistry journal*, 319: 741–747.

Wielinga, W. 2010 "Seed Gums" en *Food Stabilisers, thickeners and gelling agents*, Imeson, A. (Ed), Oxford, UK, Wiley-Blackwell. Cap. 15.

Wrigley, C. W.; Be'ke's, F. y Bushuk, W. 2006 "Gluten: a balance of gliadin and glutenin" En *Gliadin and Glutenin: The Unique Balance of Wheat Quality*. Wrigley, C. W., Be'ke's, F., Bushuk, W. (Eds). AACC International: St. Paul, MN. pp 2-32.

Wu, Y. V. y Dimler, R. J. 1964 "Hydrogen-ion equilibria of wheat gluten in guanidine-hydrochloride solutions" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 108: 490-496.

Zayas, J. F. "1997" *Functionality of proteins in food*. Berlin: Springer-Verlag.

Zhang, J. ; Mungara, P. y Jane, J. 2001 "Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets" *Polymer*, 42: 2569–2578.

Zhang, H. y Mittal, G. 2010 "Biodegradable Protein-based films from plant resources: a review" *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 29(2):203-220.

Zhang, X; Hoobin, P.; Burgar, I. y Dieu Do, M. 2006a "Chemical Modification of Wheat Protein-Based Natural Polymers: Cross-Linking Effect on Mechanical Properties and Phase Structures" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54: 9858-9865

Zhang, X.; Hoobin, P.; Burgar, I. y Dieu Do, M. 2006b "pH effect on the mechanical performance and phase mobility of thermally processed wheat gluten-based natural polymer materials" *Biomacromolecules*, 7: 3466-3473.

Zhou, Z.; Zheng, H.; Wei, M.; Huang, J. y Chen Y. 2008 "Structure and mechanical properties of cellulose derivatives/soy protein isolate blends" *Journal of applied polymer science*, 107: 3267-3274.

Zuo, M.; Song, Y. y Zheng, Q. 2009 "Preparation and properties of wheat gluten/methylcellulose binary blend film casting from aqueous ammonia: A comparison with compression molded composites" *Journal of Food Engineering*, 91(3): 415-422.

www.european-bioplastics.org. 2008 "Bioplastics Frequently Asked Questions (FAQs)".
<http://elmhurst.edu/~chm/vchembook/564peptide.html>