

Burdisso, O OLucía ; Salvatierra, Lucas M. ; Giordano, Rodolfo M. ; Pérez, Leonardo M.

Obtención y caracterización de biomateriales de interés tecnológico formulados a base de polímeros naturales y subproductos industriales

Energeia, Año 14, N° 14, 2016

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Burdisso, L. M. et al. Obtención y caracterización de biomateriales de interés tecnológico formulados a base de polímeros naturales y subproductos industriales [en línea]. *Energeia*, 14(14), 2016.
Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/revistas/biomateriales-polimeros-naturales-subproductos.pdf> [Fecha de consulta:]

Obtención y caracterización de biomateriales de interés tecnológico formulados a base de polímeros naturales y subproductos industriales

M. Lucía Burdisso¹, Lucas M. Salvatierra^{2,4}, Rodolfo M. Giordano³, Leonardo M. Pérez^{1,2}

¹ Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR) & Instituto de Química Rosario (IQUIR, UNR-CONICET), Suipacha 570 (2000) Rosario, Argentina.

² Facultad de Química e Ingeniería del Rosario, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA-campus Rosario), Av. Pellegrini 3314 (2000) Rosario, Argentina.

³ Dirección General de Asistencia Técnica (DAT), Ministerio de la Producción, Santa Fe, Argentina.

⁴ Instituto de Físicoquímica Teórica y Aplicada (INIFTA, UNLP-CONICET), Dg. 113 y 64 (1900) La Plata, Argentina.

lucas_salvatierra@uca.edu.ar // leonardoperez@uca.edu.ar

Resumen. Los polímeros biodegradables derivados de fuentes naturales y renovables, han atraído la atención de los tecnólogos debido a su potencial para sustituir polímeros sintéticos derivados del petróleo en ciertas aplicaciones industriales. Especialmente en la industria plástica, el desarrollo de materiales utilizando polímeros biodegradables contribuiría a aliviar el problema de la contaminación ambiental con residuos sólidos y, en algunos casos, podría ser útil para encontrar nuevas aplicaciones a subproductos de la agroindustria. En particular, las proteínas aisladas o concentradas a partir del procesamiento del suero de quesería (lactosuero) han sido empleadas para la fabricación de films demostrando propiedades funcionales apropiadas para actuar como materiales para envoltura. Por lo tanto, su utilización en el desarrollo de envoltorios comestibles con potencial aplicación en la industria alimenticia sería una alternativa viable. En la literatura científica, se pueden encontrar numerosos estudios donde se utilizan proteínas del lactosuero para fabricar láminas o films con resultados promisorios mediante métodos que mayormente involucran el secado por evaporación, técnica conocida como «casting». Pero poco se conoce acerca del empleo de estas proteínas para el desarrollo de biomateriales sólidos, haciendo uso de tecnologías frecuentemente adoptadas por la industria plástica. En el presente estudio, se obtuvieron piezas plásticas por termocompresión empleando una prensa industrial calefaccionada a diferentes temperaturas combinando proteínas del lactosuero (WPC) y glicerol. Las propiedades mecánicas y físico-químicas del biomaterial desarrollado sufrieron modificaciones de acuerdo a la temperatura de procesamiento y obtención. Incluso, su capacidad de biodegradación se vio afectada debido al aumento en la generación de metabolitos tóxicos derivados de la reacción de Maillard.

Palabras clave: materiales sustentables, proteínas del lactosuero, bioplásticos, termocompresión, biodegradación.

Abstract. Biodegradable polymers derived from natural resources have attracted technologist attention since these materials are considered as a potential substitute for existing petroleum-based synthetic polymers. Especially at the plastic industry, materials development using biodegradable polymers could ease the solid waste contamination problem and, in some cases, also provide new applications for agro-industrial by-products. In particular, proteins isolated or concentrated from cheese whey (whey proteins) have been extensively employed for manufacturing films, and have demonstrated promising functional properties to act as wrapping materials. Therefore, the use of whey proteins for edible wrappings development with potential application at the food industry would be a suitable alternative. In the scientific literature, several studies can be found where whey proteins are used to make films mostly by methods that involved an evaporation drying step, usually known as «casting». But little is known about the use of these proteins for development of solid biomaterials making use of technologies frequently adopted by the plastic industry. In this work, plastic pieces were obtained by compression molding using an industrial press pre-heated at different temperatures, combining whey proteins (WPC) and glycerol. The mechanical and physic-chemical properties of the obtained bio-materials experienced modifications according to the processing temperature. Moreover, material biodegradability was also affected by the increase in the generation of toxic metabolites derived from the Maillard reaction.

Keywords: sustainable materials, whey proteins, bioplastics, compression molding, biodegradation.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos que se emplean en la actualidad se constituyen básicamente de polímeros de origen no-renovable y, en general, representan una fuente importante de generación de residuos y contaminación (Arrieta y col., 2011). Su uso se ha extendido universalmente debido a las múltiples ventajas que ofrecen estos materiales, entre las que podemos mencionar su disponibilidad a gran escala, el relativo bajo costo de su producción, la ligereza del material, su gran versatilidad para adaptarse a diferentes aplicaciones y sus eficientes propiedades de barrera (Tharanathan, 2003). Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que presentan estos materiales para la fabricación de envases y el moldeo de piezas plásticas, su empleo masivo trae consigo serios inconvenientes ambientales ya que no son biodegradables, ocasionando una gran acumulación de residuos sólidos al final de su ciclo de vida (Bucci y col., 2005).

En los últimos años, se ha acrecentado el interés científico, político y social por la sostenibilidad de los materiales, tendientes no sólo a minimizar los riesgos medioambientales asociados al uso de materiales de origen no-renovable, sino a causa del elevado costo del petróleo y de las proyecciones acerca su agotamiento a futuro. En este sentido, se ha incrementado el interés por los biopolímeros como alternativa de reemplazo a los polímeros petroquímicos tradicionales en algunas aplicaciones industriales (Tharanathan, 2003; Tang y col., 2012). Estos materiales se obtienen a partir de fuentes naturales renovables y poseen la capacidad de ser biodegradables. En este contexto, en los últimos años se ha avanzado generosamente en el desarrollo de films a base de biopolímeros naturales biodegradables, siendo un campo de investigación y desarrollo tecnológico de amplio crecimiento (Javanmard, 2009; Janjarasskul y Krochta, 2010). En especial, las proteínas han demostrado ser excelentes materiales para la obtención de matrices plásticas debido a las características fisicoquímicas y estructurales de estas macromoléculas (Janjarasskul y Krochta, 2010). Estos biopolímeros se distinguen por la presencia de cargas electrostáticas y por la naturaleza anfifílica de sus cadenas polipeptídicas (Han y Gennadios, 2005). Las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas pueden verse afectadas por distintos tratamientos fisicoquímicos (calor, tratamiento mecánico, presión, irradiación, variaciones de pH, presencia de iones metálicos, etc.) y este hecho ha sido aprovechado frecuentemente para modificar la configuración espacial o las interacciones entre las cadenas proteicas, dando como resultado diferentes propiedades en los materiales obtenidos. Una característica negativa de los biomateriales obtenidos a base de proteínas es la susceptibilidad a presentar roturas, afectando seriamente sus propiedades mecánicas. Para disminuir esta fragilidad se requiere la inclusión en la formulación de compuestos plastificantes que reduzcan las interacciones entre las cadenas proteicas (Gounga y col., 2007; Sothornvit y col. 2007; Hernandez-izquierdo y col., 2008; Ramos y col., 2013). Entre ellos, el glicerol ha sido el plastificante más efectivo y ampliamente utilizado ya que permite obtener materiales estables, flexibles y menos quebradizos (Osés y col., 2009).

Otra desventaja suele ser la elevada solubilidad de estos biomateriales debido a la característica hidrofílica de las proteínas. Para sobrellevar este inconveniente suelen adicionarse a la formulación compuestos tales como fibras, resinas hidrofóbicas, pigmentos o sustancias de tipo oleoso (Shellhammer y Krochta, 1997; Pojanavaraphan y col., 2010; Soazo y col., 2013). Adicionalmente, los biomateriales que incluyen componentes de grado alimenticio (como las proteínas) en su estructura química pueden verse afectados por condiciones del proceso de obtención o a lo largo de un periodo almacenamiento, ocasionando alteraciones no sólo en la apariencia del biomaterial sino, además, en sus propiedades funcionales (Pérez y col., 2016).

Los biomateriales desarrollados a base de proteínas del lactosuero merecen una consideración especial. El lactosuero es el resultante líquido generado en el proceso de coagulación de las caseínas de la leche durante la fabricación de quesos (Tunick, 2008). Tradicionalmente, parte de este líquido conocido como “suero de quesería” se emplea como alimento de cerdos y ganado o como fertilizante, pero en su mayoría se desecha. En los últimos años, esta última práctica ha sido desestimada debido que al tratarse de una materia orgánica muy rica en nutrientes se convierte en un elemento contaminante de las aguas receptoras causando fenómenos de eutrofización (Carvalho y col., 2013). Por lo tanto, se ha promovido su procesamiento para obtener principalmente proteínas que se comercializan como aislados (WPI) o concentrados (WPC) (Balagtas y col., 2003). En la actualidad, existe un creciente interés por el uso de estas proteínas debido al impacto económico que se logra en las industrias lácteas al aumentar los ingresos derivados de la comercialización de un subproducto proveniente de la elaboración de quesos (Infotambo, 2013). Además de sus propiedades nutricionales (Bonnaillie y Tomasula, 2008; Tunick, 2008), las proteínas del lactosuero han demostrado ser excelentes materiales para la elaboración de bioplásticos (principalmente en forma de films) transparentes, flexibles y con propiedades de barrera adecuadas frente a vapores y gases (Javanmard, 2009; Jooyandeh, 2011). Además, algunos autores han demostrado la capacidad de estos biopolímeros para ser procesados por metodologías tradicionales de la industria plástica tales como termocompresión (Sothornvit y col. 2007) y extrusión (Hernandez-Izquierdo y col., 2008). Por lo tanto, su utilización para el desarrollo de envases o utensilios, tal como lo propone este proyecto, sería una alternativa viable para capitalizar las proteínas del lactosuero solventando los costos de su obtención en beneficio de su incorporación a la cadena productiva de la industria plástica.

METODOLOGÍA

Obtención de bioplásticos a base de concentrado de proteínas del lactosuero y glicerol

Los biomateriales se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito por Sothornvit y col. (2007) con algunas modificaciones. Brevemente, se preparó una mezcla anhidra de concentrado de proteínas del lactosuero (WPC 80, Arla Food Ingredients S.A.) y glicerol (99% p/p) empleando un plastógrafo Plasti-Corder PLE 331 (Brabender®, Alemania; 50 rpm, 7 min.). Luego, porciones de 35 g de esta mezcla (WPC-Glicerol 2:1) se colocaron en un molde de acero inoxidable precalentado a diferentes temperaturas (90, 110, 120, 130, 150, 170 y 190°C) ejerciéndose una presión de 10 toneladas con una prensa Carver Press Laboratory Modelo M (Carver Inc., EE.UU.) durante 2 min. (Fig. 1).



Figura 1. Piezas plásticas obtenidas empleando la técnica de moldeo por termocompresión a partir de una mezcla constituida por proteínas del lactosuero (WPC) y glicerol.

Evaluación del porcentaje de humedad y de la solubilidad en agua

Estos ensayos se realizaron sobre porciones de 0,1 g de muestra secadas en estufa a 105°C durante 24 h para obtener el peso seco inicial, a partir del cual se determinó el porcentaje de humedad por diferencia de pesada. Luego, las piezas del biomaterial seco se colocaron en tubos de ensayo conteniendo 10 mL de agua destilada y se incubaron durante 24 h en un baño termostatzado a 25°C bajo condiciones de agitación suave (150 rpm). Posteriormente se filtraron, y los sólidos remanentes se secaron nuevamente en estufa durante 24 h a 105°C para obtener el peso seco final. La cantidad de sólidos solubles se calculó a partir de la diferencia entre el peso seco final y el peso seco inicial de cada muestra, expresándose como porcentaje (%) respecto al peso seco inicial (Sothornvit y Krochta, 2000).

Variación del color de las piezas

El color de los materiales se evaluó mediante análisis digital de imágenes (Soazo y col., 2015). Se utilizó una tarjeta de color it8 para obtener el perfil ICC de la cámara digital que luego le fue asignado a todas las fotografías empleando el programa Photoshop®. A partir de los valores L^* (luminosidad), a^* y b^* (asociados con la tonalidad) se calculó el parámetro ΔE como se describe en Pérez y col. (2016).

Evaluación de las características estructurales de los biomateriales obtenidos a diferentes temperaturas de termocompresión

Se estudiaron por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier bajo condiciones de reflectancia total atenuada (FTIR/ATR) registrando los espectros de absorción para cada material entre 650 a 4000 cm^{-1} utilizando un espectrofotómetro Shimadzu Prestige-21 (Shimadzu Corp., Japón). Se realizó un total de 20 espectros por muestra con una resolución de 4 cm^{-1} . Los valores de absorbancia de la señal registrada a 1715 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), fue normalizada frente a la señal más estable registrada a 1034 cm^{-1} relacionada con las interacciones entre el plastificante (grupos OH- de glicerol) y la estructura proteica del biomaterial (Bergo y Sobral, 2007; Hoque y

col., 2010). Los resultados se informaron como el promedio de tres determinaciones (n=3).

Cuantificación de metabolitos generados por la reacción de Maillard

La cantidad de metabolitos generados por la reacción de Maillard se determinó mediante la medición fluorométrica de los productos finales de glicosilación avanzada siguiendo la metodología propuesta por Delgado-Andrade y col. (2008) y mediante la cuantificación colorimétrica de melanoidinas (Palombo y col. 1984). Brevemente, se llevó a cabo una digestión ácida partiendo de 0.1 g de muestra de cada biomaterial en 1 mL de HNO₃ c.c. (24 h, 55 °C). Posteriormente, se midió la intensidad de fluorescencia para el Triptófano (IFTrp; $\lambda_{ex} = 290$ nm, $\lambda_{em} = 340$ nm) y para los productos avanzados de la reacción de Maillard (IFAMP; $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 440$ nm) empleando un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301 PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). El valor de IFAMP se dividió por IFTrp para obtener el contenido relativo de productos avanzados de Maillard por unidad de proteína. Adicionalmente, las muestras fueron adecuadamente diluidas y se midió la capacidad de absorción de la solución a 420 nm empleando un espectrofotómetro Jasco V-530 (Jasco International, Tokyo, Japan), como método adicional para estimar la cantidad de melanoidinas.

Ensayos de biodegradación

La capacidad de biodegradación de los biomateriales obtenidos a diferentes temperaturas de termocompresión se valuó mediante un bioensayo colorimétrico indirecto desarrollado recientemente por el grupo de trabajo (Burdisso y col., 2015). Brevemente, la tasa de degradación microbiana de los diferentes bioplásticos se evaluó durante 5 días a 25 °C utilizando *Pseudomonas aeruginosa* como microorganismo modelo. Para ello, a tubos de ensayo de 20 mL de capacidad conteniendo 0,1 g de muestra de cada material como única fuente de carbono se adicionó una suspensión bacteriana (aprox. $2,5 \times 10^7$ UFC/mL) preparada en solución salina en presencia de 0.5 mg/mL de TTC (cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio), un indicador de tipo redox que al entrar en contacto con los microorganismos metabólicamente activos es reducido por las deshidrogenasas bacterianas a 1,3,5-trifenilformazán de color rojo cuya absorbancia máxima se encuentra a 476 nm (Berridge y col., 2005). De esta manera, la cuantificación colorimétrica del grado de acumulación intracelular del colorante es proporcional a la cantidad de crecimiento bacteriano, el cual depende de la capacidad de los microorganismos para metabolizar el bioplástico.

Análisis estadísticos

Los datos experimentales fueron analizados aplicando el test de ANOVA (análisis de la variancia). Cuando el efecto de los factores estudiados fue significativo ($p < 0,05$) se procedió a realizar la prueba Honestly Significant Difference (HSD) de Tukey para efectuar comparaciones múltiples con un nivel de confianza del 95 %. El análisis estadístico fue realizado empleando el programa estadístico SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Humedad, solubilidad y color de los biomateriales a base de proteínas y glicerol

Como se observa en los resultados de la Tabla 1, los biomateriales obtenidos por termocompresión no presentaron diferencias considerables en el porcentaje de humedad ni en el valor calculado para su solubilidad en agua. Si bien, la composición del material y la elección del agente plastificante pueden afectar considerablemente el porcentaje de humedad (Pérez y col., 2016), en este caso, la relación WPC-Glicerol se mantuvo constante (2:1) sugiriendo entonces que el contenido de humedad de cada bioplástico puede atribuirse mayormente a la cantidad de glicerol en la formulación, capaz de unir moléculas de agua debido a su elevada capacidad higroscópica (Galus y col., 2010).

El pequeño aumento en el porcentaje de humedad que se observa en las piezas obtenidas a partir de los 150°C podría estar asociado a un incremento en las reacciones de condensación entre aminoácidos cercanos con el consiguiente desprendimiento de agua, la cual quedaría retenida mediante enlaces de hidrógeno con el esqueleto proteico del biomaterial (Huggins y Tidor, 2011).

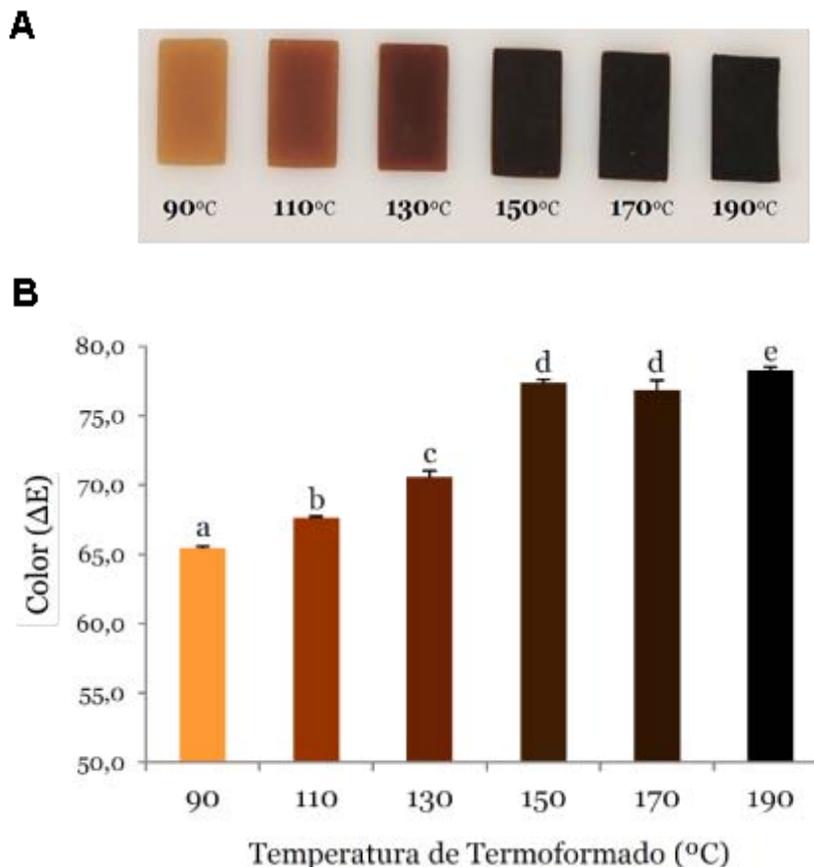
En especial, la solubilidad de un biomaterial es un parámetro importante a considerar, ya que aquellos con alta solubilidad tienen un uso muy limitado. En nuestro estudio, las piezas obtenidas mostraron ser parcialmente insolubles en agua, y esta propiedad no se vio afectada frente al incremento en la temperatura de obtención. Este atributo puede deberse a la formación de uniones intermoleculares fuertes (por ej., enlaces disulfuro) entre las proteínas que constituyen la matriz polimérica durante el proceso de termoformado (Ramos y col., 2013).

Tabla 1. Porcentaje de humedad y solubilidad en agua de biomateriales formulados a base de WPC-Glicerol, obtenidos a diferentes temperaturas de termocompresión.

Temperatura de Termofomado (°C)	Humedad (%)	Solubilidad (%)
90	11,5 ± 0,4 ^a	34,6 ± 0,9 ^a
110	11,6 ± 0,3 ^a	35,4 ± 0,5 ^a
120	11,5 ± 0,2 ^a	35,0 ± 0,9 ^a
130	11,0 ± 0,3 ^a	34,9 ± 0,9 ^a
150	13,4 ± 0,1 ^{bc}	34,8 ± 0,4 ^a
170	14,0 ± 0,1 ^c	34,4 ± 0,2 ^a
190	13,3 ± 0,1 ^b	36,0 ± 0,4 ^a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Sin embargo, la temperatura de termocompresión afectó significativamente el color de las piezas (Fig. 2), fundamentalmente debido al pardeamiento no enzimático característico de la reacción de Maillard (reacción amino-carbonilo entre amino ácidos o proteínas y azúcares reductores) que tiene lugar durante el calentamiento de sustancias alimenticias y que conlleva a la formación de polímeros oscuros a causa de la generación de compuestos coloreados denominados melanoidinas (Markowicz Bastos y col., 2012). Estas sustancias son polímeros nitrogenados heterogéneos, de elevado peso molecular y de coloración pardo oscuro-marrón que se forman en las etapas finales de la reacción de Maillard (Delgado-Andrade y col., 2009). Además, las melanoidinas presentan diversas propiedades que inciden en las características organolépticas, nutricionales, funcionales y tecnológicas y de los productos que las contienen (Rufián-Henares y Morales, 2007).



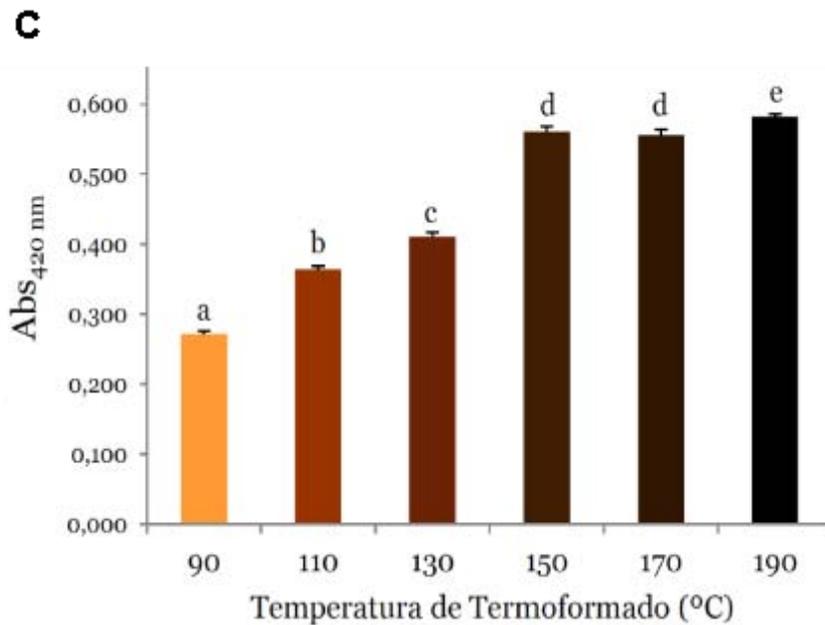


Figura 2. A) Variación del color de los bioplásticos formulados a base de WPC-Glicerol obtenidos a diferentes temperaturas de termocompresión. Se aprecia el oscurecimiento de las piezas conforme aumenta la temperatura del proceso de obtención. B) Cuantificación del color (ΔE) mediante análisis digital de imágenes. Nótese cómo el aumento en la coloración del biomaterial se correlaciona con el incremento en la formación de melanoidinas (C) asociadas a la reacción de Maillard. Estas sustancias, de color marrón, presentan un máximo de absorción a 420 nm. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La extensión de la reacción de Maillard es proporcional a la severidad del tratamiento térmico y, por lo general, ocurre a temperaturas que oscilan entre los 100-250°C. Además, esta reacción implica la presencia de carbohidratos en la matriz polimérica, tales como sacarosa, glucosa u otros polisacáridos (Markowicz Bastos y col., 2012). En este sentido, es interesante notar que el concentrado de proteínas de lactosuero (WPC) utilizado en el presente trabajo contiene aproximadamente entre un 7-10% de lactosa, además de otros residuos como grasas, fosfolípidos, y cenizas (WPC 80, Arla Food Ingredients S.A.).

En efecto, estudios previos han reportado que es posible que la reacción de Maillard involucre a la lactosa residual del WPC y a los grupos tiol (-SH) y ϵ -amino (-NH₂) de los residuos de cisteína y lisina, respectivamente, que forman parte de la estructura primaria de las proteínas del lactosuero (Loveday y col., 2010). Además, se han observado reacciones de pardeamiento no enzimático entre el glicerol y aminoácidos a temperaturas iguales o superiores a 65 °C (Smarrito-Menozzi y col., 2013).

Por otro lado, el oscurecimiento del material que ocurre como consecuencia de las reacciones de Maillard implica la degradación de compuestos con enlaces dobles conjugados a grupos carbonilo. El incremento en la banda de absorción correspondiente al carbonilo (C=O) ubicada a 1715 cm⁻¹ en los espectros infrarrojos (FTIR-ATR) de las piezas termoformadas a temperatura creciente avalan esta hipótesis, indicando la existencia de un proceso oxidativo que se hace más significativo a partir de los 150°C (Fig. 3). Esta observación, también podría explicar en parte el aumento en el porcentaje de humedad informado para las piezas obtenidas a temperaturas a partir de los 150°C (Tabla 1), ya que los grupos carbonilos son capaces de interactuar y retener moléculas de agua con gran afinidad (Thijs y col., 2007).

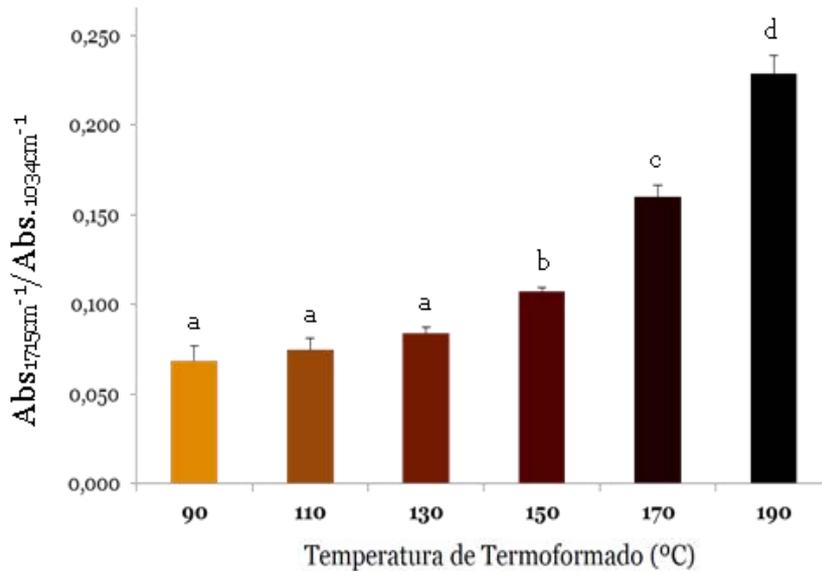


Figura 3. Intensidad normalizada de la señal relativa al grupo C=O en biomateriales formulados a base de WPC-Glicerol obtenidos a diferentes temperaturas de termocompresión. Se realizó el cociente entre la señal registrada a 1715 cm⁻¹ (C=O) en los espectros FTIR/ATR frente a la señal que se mantuvo más estable (1034 cm⁻¹), correspondiente a la presencia de glicerol. Se aprecia un incremento significativo a partir de los 150°C, indicativo de un proceso oxidativo. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

Cuantificación de metabolitos generados por la reacción de Maillard

La reacción de Maillard se describe a menudo para sistemas alimenticios, pero también ocurre en los organismos vivos. En los sistemas biológicos, los productos finales de esta reacción se denominan AGE por sus siglas en inglés (Advanced Glycation End products). Los AGE son un grupo heterogéneo de compuestos que surgen no-enzimáticamente por la reacción entre un azúcar reductor y compuestos α -carbonílicos con grupos amino libres que componen estructuralmente a diferentes macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos). Existen evidencias de que estas sustancias pueden participar en varios procesos patológicos, por lo que la reacción de Maillard tiene implicancias no sólo en la industria alimenticia sino también en medicina (Markowicz Bastos y col., 2012).

La formación de productos finales de glicación avanzada (AGE) ocurre naturalmente en las personas a lo largo de su vida aunque de una manera muy lenta. Sin embargo, este proceso puede acelerarse bajo ciertas condiciones fisiológicas, tales como hiperglicemia o estrés oxidativo, contribuyendo a la acumulación de metabolitos secundarios de Maillard en los tejidos, favoreciendo el inicio y/o progresión de diferentes complicaciones metabólicas (Barbosa y col., 2008; Yamagishi, 2011).

Tradicionalmente, el monitoreo de la extensión de la reacción de Maillard se realiza mediante la evaluación espectrofotométrica del color de una muestra a 420 nm. Como se mencionó anteriormente, a esta longitud de onda absorben un grupo heterogéneo de compuestos denominados melanoidinas (ver Fig. 2 C). Sin embargo, más recientemente, se ha hecho habitual la evaluación de compuestos fluorescentes que son precursores de los pigmentos marrones formados en la reacción de Maillard (Delgado-Andrade y col., 2009). Además de su uso tradicional en sistemas alimenticios, la medición por espectroscopia de fluorescencia también ha sido útil para evaluar la generación de AGE en sistemas biológicos (Markowicz Bastos y col., 2012), ya que los métodos fluorométricos en general poseen mayor sensibilidad que las técnicas colorimétricas.

La cuantificación de la fluorescencia de los productos avanzados de Maillard y del triptófano soluble (ó FAST, por sus siglas en inglés, Fluorescence of Advanced Maillard products and Soluble Tryptophan) es un método bien establecido que se ha utilizado para medir la extensión de esta reacción. Esta técnica se basa en la cuantificación fluorescente de los productos de Maillard (IFAMP), tales como pirrol y derivados de imidazol, a longitudes de onda (λ) de excitación/emisión de 350/440 nm, y del aminoácido triptófano (IFTrp) a λ de excitación/emisión de 290/340 nm. Luego, el índice FAST se calcula según la siguiente expresión: IFAMP/IFTrp*100 (Delgado-Andrade y col., 2008).

En la Fig. 4, se muestra la cuantificación de AGE empleando la técnica FAST. Como puede observarse, la generación de estos metabolitos en los bioplásticos termoformados aumenta en función de la temperatura de obtención conforme a una mayor extensión de la reacción de Maillard. Estos resultados son compatibles con los mostrados previamente en la Fig. 2. Además, Liggins y Furth (1997) reportaron que a través de las reacciones oxidativas de Maillard se generan

compuestos carbonílicos en paralelo a los AGE. Estos resultados y los de la Fig. 3 sustentan estas afirmaciones.

Biodegradabilidad de biomateriales a base de proteínas del lactosuero y glicerol

Todos los bioplásticos obtenidos a las diferentes temperaturas de termocompresión mostraron ser biodegradables; sin embargo, se observó una tendencia negativa en la tasa de biodegradación a los 5 días (TD5) conforme el aumento en la temperatura de obtención. Las piezas producidas a 90°C mostraron una TD5 cuatro veces superior a aquellas obtenidas a 190°C, demostrando que la temperatura de procesamiento afecta directamente a la biodegradabilidad del material (Fig. 5).

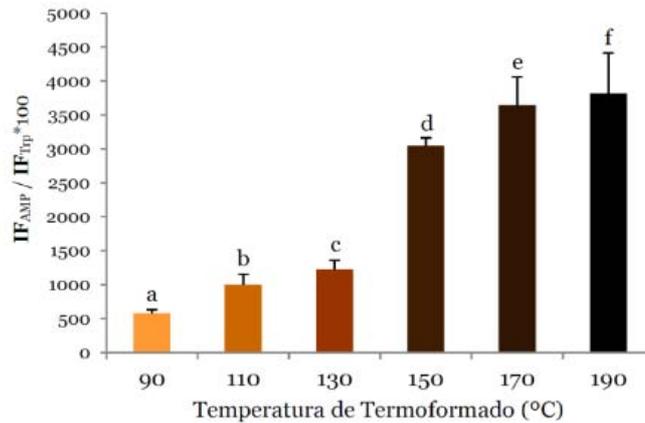


Figura 4. Cuantificación de productos finales de la reacción de Maillard (AGE) mediante el método FAST. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Claramente, esta disminución en la capacidad de las células bacterianas para metabolizar el biomaterial puede estar vinculada al significativo aumento en la cantidad de metabolitos secundarios, potencialmente tóxicos, generados por la reacción de Maillard (Figs. 2 C y 4). Si bien, los productos mayoritarios de estas reacciones son moléculas que aportan sabor y aroma a los alimentos, se ha descrito su citotoxicidad tanto en células eucariotas (Barbosa y col., 2008; Yamagishi, 2011; Markowicz Bastos y col., 2012) como procariotas (Kim y Lee, 2003). Por lo tanto, es dable especular que los productos de la reacción de Maillard afecten la viabilidad de los microorganismos provocando una disminución en la tasa de biodegradación de los bioplásticos formulados a base de WPC-Glicerol.

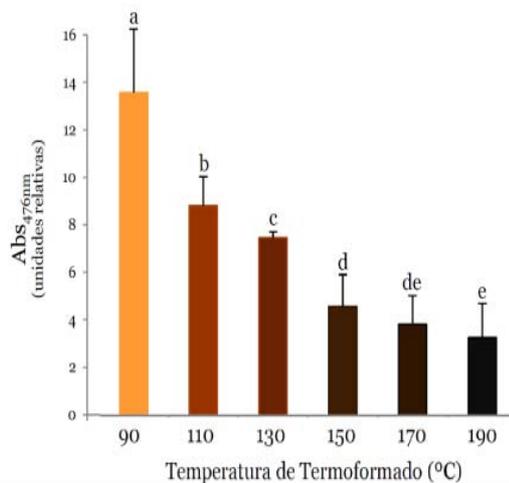


Figura 5. Estimación de la biodegradabilidad de los materiales formulados a base de WPC-Glicerol medida a 5 días (TD5). El valor de Abs.476 nm es indicativo del crecimiento bacteriano, el cual depende de la capacidad de los microorganismos para metabolizar el bioplástico utilizándolo como única fuente de nutrientes. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

Si bien existen numerosos estudios donde se han utilizado proteínas del lactosuero para fabricar films, poco se conoce acerca del empleo de estas proteínas para el desarrollo de biomateriales más sólidos haciendo uso de tecnologías comúnmente presentes en la industria plástica. En este trabajo, se obtuvieron piezas con atributos plásticos a partir de una mezcla anhidra de concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) y glicerol, termo-prensada a diferentes temperaturas (90, 110, 120, 130, 150, 170 y 190°C). Las piezas obtenidas no presentaron diferencias considerables en cuanto al porcentaje de humedad o a su solubilidad en agua. Sin embargo, la temperatura de termocompresión afectó significativamente el color de las mismas debido al pardeamiento no enzimático característico de la reacción de Maillard, que se relaciona con la existencia de un proceso oxidativo. Si bien, todos los biomateriales demostraron ser biodegradables, esta capacidad se mostró disminuida a causa del aumento significativo en la cantidad de metabolitos tóxicos generados por dicha reacción.

AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Provincia de Santa Fe y a la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario de la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA-campus Rosario) por los fondos suministrados para la ejecución de este proyecto. También agradecemos a la Dirección General de Asistencia Técnica (DAT) del Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe por el aporte técnico brindado durante la realización de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Arrieta, M.P.; Peltzer, M.A.; Garrigós Selva, M.C.; Jiménez Migallón, A. (2011). Envases alimentarios sostenibles. *Seguridad y Medio Ambiente*, 121: 46-56.
- Balagtas, J.V.; Hutchinson, F.M.; Krochta, J.M.; Sumner, D.A. (2003). Anticipating market effects of new uses for whey and evaluating returns to research and development. *Journal of Dairy Science*, 86: 1662-1672.
- Barbosa, J.H.P.; Oliveira, S.L.; Seara, L.T. (2008). The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications. *Brazilian Archives of Endocrinology and Metabolism*, 52(6): 940-950.
- Bergo, P.; Sobral, P. J. A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21: 1285-1289.
- Berridge, M.V.; Herst, P.M., Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127-152.
- Bonnaillie, L.M.; Tomasula, P.M. (2008). Whey protein fractionation. En: *Whey processing, functionality and health benefits*. (C.I. Onwulata y P. J. Huth. Eds.), pp. 15-38.
- Bucci, D.Z.; Tavares, L.B.B.; Sell, I. (2005). PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing*, 5: 564-571.
- Burdisso, M.L.; Salvatierra, L.M.; Pérez, L.M. (2015). Nueva metodología de screening para una rápida evaluación de la biodegradabilidad de materiales poliméricos. XI Simposio Argentino de Polímeros (SAP 2015), Santa Fe, Argentina.
- Carvalho, F.; Prazeres, A.R.; Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 445-446: 385-396.
- Delgado-Andrade C.; Rufián-Henares J. A.; Morales F. J. (2008): Optimised procedure to analyse Maillard reaction-associated fluorescence in cereal-based products. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(5): 339-346.
- Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J.; Morales, F. (2009). Colour and fluorescence measurement as unspecific markers for the Maillard reaction. En: *Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods*, Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J.. 1º ed., Granada: Atrios.
- Gounga, M.E.; Xu, S.; 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: 521-530.
- Han, J.H.; Gennadios, A. (2005). Edible films and coatings: a review. En: *Innovations in Food Packaging*. (J. Han, Ed.), pp. 3-11.
- Hernandez-Izquierdo, V.M.; Reid, D.S, McHugh, T.H.; Berrios, J. de J.; Krochta, J.M. (2008). Thermal transitions and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures. *Journal of Food Science*, 73(4): E169-E175.

- Hoque, M. S.; Benjakul, S.; Prodpran, T. (2010). Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering*, 96: 66-73.
- Huggins, D.J.; Tidor, B. (2011). Systematic placement of structural water molecules for improved scoring of protein–ligand interactions. *Protein Engineering Design & Selection*, 24(10): 777-789.
- Infotambo (2013). Disponible en: <http://www.infotambo.com.ar/web/detalle-base/Los-beneficios-y-usos-del-suero.cnt/17300042/> y <http://www.infotambo.com.ar/web/detalle-base/Las-exportaciones-de-derivados-del-lactosuero-crecieron-un-50.cnt/17300128/>
- Janjarasskul T.; Krochta, J.M. (2010). Edible packaging materials. *Annual Review in Food Science and Technology*, 1: 415-448.
- Javanmard, M. (2009). Biodegradable whey protein edible films as a new biomaterials for food and drug packaging. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 129-134.
- Jooyandeh, H. (2011). Whey protein films and coatings: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(3): 296-301.
- Kim, K.W.; Lee, S.B. (2003). Inhibitory effect of Maillard reaction products on growth of the aerobic marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7): 4325-4328.
- Liggins, J.; Furth, A.J. (1997). Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1361: 123–130
- Loveday, S. M., Hindmarsh, J. P., Creamer, L. K., Singh, H. (2010). Physicochemical changes in intermediate-moisture protein bars made with whey protein or calcium caseinate. *Food Research International*, 43: 1321-1328.
- Markowicz Bastos, D.; Monaro, E.; Siguemoto, E.; Séfora, M. (2012). Maillard reaction products in processed food: Pros and cons. In B. Valdez (Ed.), *Food industrial processes - Methods and equipment* (pp. 281-300). Rijeka: InTech-Open Acces.
- Palombo, R.; Gertler, A.; Saugy, I. (1984). A simplified method for determination of browning in dairy powders. *Journal of Food Science*, 49: 1609-1613.
- Pérez, L.M.; Piccirilli, G.N.; Delorenzi, N.; Verdini, R.A. (2016). Effect of different combinations of glycerol and/or trehalose on physical and structural properties of whey protein concentrate-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 56: 352-359.
- Pojanavaraphan, T.; Magaraphan, R.; Chiou, B-S.; Schiraldi, D.A. (2010). Development of biodegradable foam-like materials based on casein and sodium montmorillonite clay. *Biomacromolecules*, 11: 2640-2646.
- Ramos, O.L.; Reinas, I.; Silva, S.I.; Fernandes, J.C.; Cerqueira, M.A.; Pereira, R.N.; Vicente, A.A.; Poças, M.F.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30(1): 110-122.
- Rufián-Henares, J. A.; Morales, F.J. (2007) Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40: 995-1002.
- Shellhammer, T.H.; Krochta, J.M. (1997). Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science*, 62(2): 390-394.
- Smarrito-Menozi, C., Matthey-Doret, W., Devaud-Goumoens, S., & Viton, F. (2013). Glycerol, an underestimated flavor precursor in the maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10225-10230.
- Soazo, M.; Pérez, L.M.; Rubiolo, A.C.; Verdini, R.A. (2013). Effect of freezing on physical properties of whey protein emulsion films. *Food Hydrocolloids*. 31(2): 256-263.
- Soazo, M.; Pérez, L.M.; Rubiolo, A.C.; Verdini, R.A. (2015). Pre-freezing application of whey protein based edible coating to maintain quality attributes of strawberries. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(3): 605-611.
- Sothornvit, R.; Krochta, J.M. (2000). Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. *Journal of Food Science*, 65(4): 700-703.
- Sothornvit, R.; Olsen, C.W.; McHugh, T.H.; Krochta, J.M. (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: 855-860.
- Tang, X.; Kumar, P.; Alavi, S.; Sandeep, K. (2012). Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52: 426–442.

Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14: 71-78.

Thijs, H.M.L.; Becer, C.R.; Guerrero-Sanchez, C.; Fournier, D.; Hoogenboom, R.; Schubert, U.S. (2007). Water uptake of hydrophilic polymers determined by a thermal gravimetric analyzer with a controlled humidity chamber. *Journal of Materials Chemistry*, 17(46): 4864-4871.

Tunick, M.H. (2008). Whey protein production and utilization: a brief history. En: *Whey processing, functionality and health benefits*. (C.I. Onwulata; P.J. Huth, Eds.), pp. 1-13.

Yamagishi, S. (2011). Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Experimental Gerontology*, 46(4): 217-224.