

Universidad de Huelva

Departamento de Ingeniería Química, Química Física y
Ciencias de los Materiales



**Bioplásticos a partir de proteína de guisante: procesado,
caracterización y ciclo de vida**

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Víctor Manuel Pérez Puyana

Fecha de lectura: 17 de marzo de 2023

Bajo la dirección de los doctores:

María Inmaculada Martínez García

Alberto Romero García

Huelva, 2023





Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Ciencia de
Materiales. Universidad de Huelva

Programa de Doctorado “Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental”
Línea de investigación “Ingeniería de Procesos y Productos Químicos”

BIOPLÁSTICOS A PARTIR DE PROTEÍNA DE GUISANTE:
PROCESADO, CARACTERIZACIÓN Y CICLO DE VIDA

Pea protein-based bioplastics: Processing, characterization and life
cycle

Víctor Manuel Pérez Puyana



BIOPLÁSTICOS A PARTIR DE PROTEÍNA DE GUIANTE:
PROCESADO, CARACTERIZACIÓN Y CICLO DE VIDA

Memoria presentada por:

Víctor Manuel Pérez Puyana

Directores:

Dr. Dña. Inmaculada Martínez García

Dr. D. Alberto Romero García

Huelva, 12 de Septiembre de 2022



Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Ciencia de
Materiales. Universidad de Huelva

La Tesis Doctoral titulada “Bioplásticos a partir de proteína de guisante: procesado, caracterización y ciclo de vida”, realizada por D. Víctor Manuel Pérez Puyana para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Huelva, se presenta con la aprobación de sus Directores.

Doctorando:

D. Víctor Manuel Pérez Puyana

Directores:

Dr. Dña. Inmaculada Martínez García

Dr. D. Alberto Romero García

Agradecimientos

En toda historia hay unos protagonistas sin los cuales la propia historia no tendría lugar. En mi caso, el desarrollo de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda, apoyo, consejo y trabajo de muchas personas, sin las cuales estoy seguro de que no se hubiera obtenido el mismo resultado. Es por ello que me gustaría dedicarles unas palabras de agradecimiento, aunque breves, me permiten devolver de alguna forma esa ayuda y apoyo con el que he contado.

Por supuesto, en primer lugar, quiero dedicar mi tesis doctoral a mi familia, la cual siempre me apoya y está ahí cuando se necesita, haciendo mención especial a dos personas para las cuales no hay palabras para expresar todo mi amor e inspiración. Por supuesto que estoy hablando de mis PADRES.

Además de a mi familia, no quiero dejar atrás a mi otra “familia”. Esos amigos que me han acompañado (y aguantado) durante este tiempo, con sus días de *chichas*, sus cafés y juegos virtuales y, como no, aquellas quedadas de cerveza.

Durante esta tesis doctoral he pasado muchísimo tiempo en el laboratorio. Esas horas han dado sus frutos gracias a la ayuda brindada por todos aquellos componentes de los Departamentos de Huelva y Sevilla. De aquí darles las gracias. Mención especial a Alberto, que me ha acompañado en esta nueva aventura y, por supuesto, a Inma, primero por aceptar embarcarse en este proyecto y, segundo, por toda la ayuda y consejo que me ha brindado. Por supuesto, no quiero dejar pasar la ocasión para agradecer la ayuda de Esperanza y Mercedes, siendo parte importante en el desarrollo de esta tesis doctoral. Además, agradezco poder haber contado con la ayuda de Johar, Dani y Pablo en esta aventura.

Víctor Manuel Pérez Puyana

Pero no solamente he trabajado en España, sino que también he pasado 3 meses en Estocolmo (Suecia) desarrollando mi tesis. Es por esto que quiero agradecerle también a Mikael y Antonio, que me aceptaron y ayudaron en todo lo posible allá en la “fría” Suecia. Espero que ahora pueda devolverle el favor a Antonio. No solo me puedo acordar de ellos, sino muchos otros como Hanno y Aseem que me han permitido disfrutar de la experiencia.

Y ya para finalizar, me gustaría agradecerle a usted por dedicar parte de su tiempo en la lectura de este documento que he elaborado con tanto esfuerzo y cariño.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary.....	3
Capítulo 1: Antecedentes.....	5
1.1 Definición de bioplástico	7
1.2 Evolución histórica	9
1.3 Contexto actual	11
1.3.1 Bioplásticos y los Objetivos de Desarrollo Sostenible.....	11
1.3.2. Bioplásticos y la Economía Circular.....	13
1.4 Materia prima.....	18
1.4.1. Biopolímeros	18
1.4.2. Plastificante	24
1.5 Fabricación de bioplásticos.....	26
1.5.1 Moldeo por inyección.....	27
1.5.2 Métodos de entrecruzamiento	30
1.6 Justificación	38
1.6.1. Hipótesis y objetivos	38
1.6.2. Impacto de la investigación.....	39
Capítulo 2: Materiales y métodos.....	41
2.1 Materiales utilizados	43
2.2 Experimental	45
2.2.1 Fabricación de bioplásticos proteicos	45
2.2.2 Técnicas de caracterización.....	51
2.2.3. Análisis estadístico.....	67
Capítulo 3: Resultados y Discusión.....	69
3.1 Caracterización de la materia prima	71
3.1.1. Caracterización de la harina de guisante	71
3.2 Optimización de las condiciones de procesado	77

3.2.1. Evaluación de la etapa de mezclado.....	77
3.2.2. Evaluación de la etapa de inyección	83
3.3 Efecto del entrecruzamiento en bioplásticos.....	94
3.3.1. Efecto del entrecruzamiento físico	94
3.3.2. Efecto del entrecruzamiento químico.....	106
3.3.3. Efecto del entrecruzamiento enzimático	139
3.3.4. Comparativa de diferentes métodos de entrecruzamiento.	146
3.4 Ciclo de vida	149
Capítulo 4: Conclusiones.....	171
4.1 Conclusiones	173
4.2 Concluding remarks	178
Referencias	183
Índice de abreviaturas.....	199
Publicaciones	201

A mis padres, sin los cuales no sería la persona que soy ahora.

Víctor Manuel Pérez Puyana

Resumen

La Organización de las Naciones Unidas promulga los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), con el objetivo de acabar con la pobreza, proteger el planeta y garantizar que todas las personas disfruten de la paz y prosperidad para 2030. Entre ellos encontramos el objetivo 12 sobre una gestión eficiente de recursos naturales que reduce la cantidad de desechos. Para ello, en los últimos años se están utilizando residuos y subproductos de la industria para fabricar materiales sostenibles y que además sean *eco-friendly* (en un contexto de economía circular que haga uso de residuos o subproductos como materia prima). En esta línea de actuación propuesta se sitúan los materiales que buscan sustituir a los plásticos convencionales obtenidos a partir del petróleo. Dichos materiales reciben el nombre de bioplásticos porque son biodegradables, tienen un origen natural o porque cumplen ambas cualidades. En este sentido, el objetivo principal de esta tesis consiste en el desarrollo de bioplásticos a partir de un subproducto, procedente de la industria agroalimentaria, rico en proteína de guisante.

Para ello, la primera etapa de la tesis ha consistido en la **caracterización de la materia prima**, en base a su composición química y aminoacídica, y a sus propiedades fisicoquímicas y térmicas.

A continuación, se ha procedido a la fabricación de bioplásticos. Las técnicas clásicas de procesamiento de polímeros termoplásticos (extrusión, moldeo por compresión, etc.) han sido ampliamente utilizadas para obtener diferentes materiales bioplásticos basados en proteínas. En este estudio, se han fabricado bioplásticos por moldeo por inyección. Dicha técnica consiste en un mezclado previo de la proteína y un plastificante (glicerina), seguida de una etapa de inyección. Para ello, se han estudiado

la **influencia de los parámetros de procesado** involucrados, evaluando tanto la relación proteína/plastificante, el tiempo de mezclado o las condiciones de inyección como la presión de inyección, el tiempo o la temperatura del molde.

Siguiendo las condiciones de procesado seleccionadas anteriormente se ha elaborado el sistema de referencia. De esta forma, se ha evaluado la influencia de diferentes **métodos de entrecruzamiento** sobre las propiedades de los bioplásticos obtenidos. Se han estudiado 3 métodos de entrecruzamiento. En concreto, se ha utilizado un tratamiento térmico y radiación ultravioleta (UV) como métodos físicos, genipina y aldehídos como métodos químicos y transglutaminasa como método enzimático. Respecto a los distintos métodos de entrecruzamiento, el entrecruzamiento físico genera nuevos enlaces por fenómenos físicos adicionales, mientras que los entrecruzamientos químico y enzimático generan nuevos enlaces mediante reacciones químicas provocadas por compuestos químicos o el uso de enzimas.

Finalmente, se incluye una evaluación medioambiental de un proceso que utiliza residuos/subproductos para comprender el proceso en el contexto de la economía circular. Por ello, se ha llevado a cabo un análisis preliminar de los bioplásticos obtenidos, con las diferentes modificaciones realizadas, a través de un **estudio preliminar del ciclo de vida de su proceso de fabricación**.

Summary

The United Nations enacts the 17 Sustainable Development Goals (SDG) with the aim of ending poverty, protecting the planet and ensuring that all people enjoy peace and prosperity by 2030. Among them, we find Goal 12 on efficient management of natural resources, which reduces the amount of waste. To this end, in recent years, waste and by-products from the industry are being used to produce sustainable materials that are also *eco-friendly* (in a circular economy context that makes use of wastes or by-products as raw material). Materials that seek to replace conventional petroleum-based plastics are located in this research line. These materials are called bioplastics because they are biodegradable, have a natural origin or because they meet both qualities. In this sense, the main objective of this project was the development of bioplastics from a by-product, from the agri-food industry, rich in pea protein.

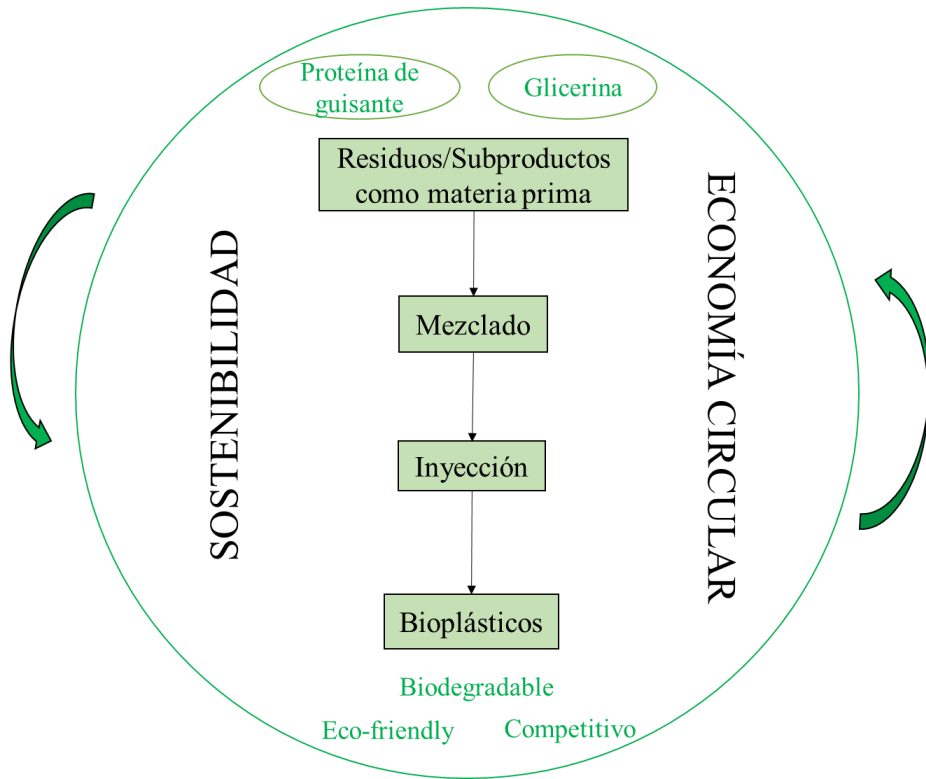
Thus, the first stage of the thesis consisted of the **characterization of the raw material**, based on its chemical and amino acid composition, its solubility and even its thermal properties.

Next, the fabrication of bioplastics was carried out. Classical thermoplastic polymer processing techniques (extrusion, compression moulding, etc.) have been widely used to obtain different protein-based bioplastic materials. In this study, bioplastics have been obtained by injection moulding. This technique consists of a previous mixing of the protein and a plasticizer (glycerol) followed by an injection stage. Therefore, the **influence of the processing parameters** involved has been studied, evaluating both the protein/plasticizer ratio, the mixing time or the injection conditions such as the injection pressure, the moulding time or the temperature of the mould.

The reference bioplastic has been fabricated with the processing conditions selected above. In this way, the influence of different **crosslinking methods** on the properties of the bioplastics obtained has been analyzed. Three methods of crosslinking have been studied. Specifically, a thermal treatment and UV radiation have been used as physical methods, genipin and aldehydes as chemical methods and transglutaminase as an enzymatic method. Regarding the different methods of crosslinking, physical crosslinking generates new bonds by additional physical phenomena, while chemical and enzymatic crosslinking generate new bonds through chemical reactions caused by chemical compounds or the use of enzymes.

To conclude the project, an environmental assessment of a process using waste/by-products is included to understand the process in the context of the circular economy. For this reason, a preliminary analysis of the bioplastics obtained has been carried out, with the different modifications carried out, through a **preliminary study of the life cycle of its fabrication process**.

Capítulo 1: Antecedentes



Víctor Manuel Pérez Puyana

1.1 Definición de bioplástico

Esta tesis se basa en el desarrollo y caracterización de bioplásticos proteicos obtenidos mediante moldeo por inyección.

Debido a la controversia existente en la definición de bioplástico entre las asociaciones industriales de plásticos y las organizaciones medioambientales, es necesario, en primer lugar, dejar claro los diferentes conceptos que van a aparecer en los diferentes capítulos (Tabla 1.1):

Tabla 1.1. Términos y definiciones. Tabla adaptada de Atiweh et al. (2021).

Término	Definición
Plástico	Materiales poliméricos principalmente de origen sintético o semisintético; más comúnmente derivados de los combustibles fósiles.
Bioplástico	Plástico de base biológica o biodegradable o que presenta ambas propiedades.
Material biodegradable	Un material biodegradable es aquel que se puede dividir en monómeros o componentes poliméricos a través de la acción de microorganismos.
Plásticos biológicos (<i>bio-based plastics</i>)	Plásticos derivados al menos en parte de fuentes renovables de carbono (como p.e. materia vegetal). Plásticos parcialmente de base biológica (o híbridos) que contienen carbono basado en combustibles fósiles renovables y convencionales.
Biopolímero	Molécula natural de gran tamaño formadas por unidades de repetición llamados “monómeros”.

De esta forma, los bioplásticos se clasifican en base a sus dos propiedades básicas: biodegradabilidad y origen biológico; diferenciando 4 grupos según las propiedades anteriormente mencionadas:

- Biodegradables y de origen biológico
- Biodegradables y procedentes de recursos fósiles
- No biodegradables y de origen biológico
- No biodegradables y procedentes de recursos fósiles

En este sentido, los objetivos planteados por la Unión Europea abogan por abandonar la dependencia de los recursos fósiles mediante la investigación y desarrollo de materiales sostenibles (Nanda et al., 2022). En concreto, y en relación con la temática de la tesis, con el desarrollo de bioplásticos. Por tanto, en mi opinión, no solo basta con elaborar bioplásticos que cumplan con uno de los requisitos anteriormente mencionados, pues, si de verdad se persigue abandonar dicha dependencia sin perjudicar al medio ambiente, se han de considerar como bioplásticos aquellos materiales que tienen un origen biológico y que, además, son biodegradables. De esta forma, se parte de la naturaleza para obtener un material que tras su aplicación se pueda descomponer en productos no tóxicos y cuyos componentes puedan “volver” a la naturaleza.

1.2 Evolución histórica

Antiguamente muchos objetos cotidianos se elaboraban a partir de caucho natural, celulosa o incluso celofán. Sin embargo, a partir de la década de los 30, los monómeros obtenidos por el refinado del petróleo empezaron a dominar el mercado. Años más tarde (sobre 1947) surgió la Poliamida 11 (Rilsan) (o Poliamida 11) como el primer bioplástico técnico que se introdujo en el mercado gracias a sus excelentes propiedades mecánicas químicas. A partir de los años 90, le siguieron los bioplásticos más conocidos en la actualidad como son el PLA (ácido poliláctico), los PHAs (Polihidroxicanoatos) y los almidones plastificados, que se beneficiaron de los rápidos avances de la química verde para la utilización de biomasa. Actualmente, además de los nuevos polímeros de origen biológico y/o biodegradables que emergen regularmente como el PEF (polietilen-furanoato), los principales cambios se basan en la diversificación de los recursos utilizados para producir estos materiales, con la mayor parte de los esfuerzos volcados en el aprovechamiento de coproductos o residuos de diferentes biomásas. Este aprovechamiento de los residuos se está fomentando ya que el consumo mundial de biomasa, combustibles fósiles, metales y minerales es extremadamente alto y se espera que se duplique en los próximos cuarenta años, lo que resultará en un aumento anual proyectado en la generación de desechos del 70 % para 2050 (OECD, 2019).

Como posible uso de los residuos de la biomasa encontramos la fabricación de bioplásticos. De hecho, la producción de bioplásticos se ha incrementado con el paso de los años y hoy en día, se produce más bioplástico biodegradable que no biodegradable (1,5 millones de toneladas frente al millón de toneladas de bioplástico no biodegradable) (European Bioplastics, 2020). Además, viendo la tendencia creciente,

existe la esperanza de que con el paso del tiempo esta diferencia vaya aumentando hasta producir la mínima cantidad necesaria de bioplásticos no biodegradables y que la cifra total de bioplásticos se aproxime a la cantidad de plásticos existentes en el mercado. De hecho, se prevé que la capacidad mundial de producción de bioplásticos aumente de alrededor de 2,11 millones de toneladas en 2020 a aproximadamente 2,87 millones de toneladas en 2025 según los últimos datos de mercado obtenido por European Bioplastics en colaboración con Nova-Institute (European Bioplastics, 2020).

La producción de bioplásticos surge como alternativa en un intento por reducir los impactos negativos de los plásticos a base de petróleo. Entre las aplicaciones de bioplásticos, el envasado de alimentos sigue siendo el segmento más amplio de toda la familia de bioplásticos, con una producción de casi 1 millón de toneladas en 2020 (Shlush & Davidovich-Pinhas, 2022), lo que representa casi la mitad del mercado total de bioplásticos. Sin embargo, a pesar de la incuestionable importancia de los bioplásticos para permitir una economía circular más sostenible (Barbi et al., 2021), solo cubren aproximadamente el 1 % del mercado mundial de plásticos. Estos procesos, incluyendo la fermentación o la funcionalización, suelen incrementar sus costes y, en consecuencia, reducen su eficiencia en la sustitución de los plásticos convencionales. Por tanto, aún es necesario seguir investigando y desarrollando nuevos bioplásticos que sean biodegradables y competitivos frente a los plásticos comunes. En este contexto, los polímeros derivados de biomasa, basados en polisacáridos y proteínas son buenos candidatos para desempeñar un papel clave en la producción sostenible de estos materiales.

1.3 Contexto actual: Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) y Economía circular

1.3.1 Bioplásticos y los Objetivos de Desarrollo Sostenible

El desarrollo de bioplásticos colabora de forma directa con algunos de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), que se adoptaron en 2015 por todos los Estados Miembros de las Naciones Unidas con el objetivo de acabar con la pobreza, proteger el planeta y garantizar que todas las personas disfruten de la paz y prosperidad para 2030 (Karan et al., 2019). Siguiendo el principio de “no dejar nadie atrás”, los países más desarrollados se han comprometido en ayudar a aquellos subdesarrollados o en vías de desarrollos. De los 17 ODS adoptados (mostrados en la Figura 1.1), los bioplásticos colaboran de forma directa con cuatro de ellos:

- Objetivos 11 y 12 (Ciudades y comunidades sostenibles y Consumo responsable): Se consigue una gestión eficiente de recursos naturales que reduce la cantidad de desechos, de tal forma, que cumple con algunas de las metas de dichos ODS. De esta forma, el uso de agro-residuos y subproductos como materia prima para la producción de bioplásticos, combate de forma directa con estos objetivos. Hoy en día, este aspecto es de vital importancia ya que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura estima que un tercio de los alimentos producidos en el mundo se eliminan y no son aprovechados, todo esto supone una cantidad aproximada de 1,3 billones de toneladas al año (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020).
- Objetivo 13 (Lucha contra el cambio climático): Al no provenir de combustibles fósiles, reducimos emisiones de gases de efectos

invernadero y, por ende, evitamos el calentamiento global. Por esta razón, los bioplásticos son una medida idónea para cumplir las metas de dicho objetivo.

- Objetivo 14 (Flora y fauna acuáticas): La producción masiva de plásticos no biodegradables deja huella también en la vida submarina. Por cada kilómetro cuadrado de océano, se estima que hay 13.000 trozos de desechos de plásticos. Además, los océanos también absorben alrededor del 30% del dióxido de carbono y se ha registrado un 26% de aumento en la acidificación de los gases. Por lo tanto, la producción de bioplásticos degradables pueden combatir directamente con estos problemas (Guo et al., 2022).



Figura 1.1. Objetivos de Desarrollo Sostenible. Imagen obtenida de la web de la UNESCO.

Para finalizar con los objetivos de desarrollo sostenible, es interesante comentar que, aunque los bioplásticos inciden de manera directa con estos cuatro ODS comentados, también lo hacen de manera indirecta con muchos otros, ya que todos los objetivos de desarrollo sostenible están conectados entre sí. Por ejemplo, si se cumple el ODS 14 significa que las fuentes hídricas disponibles para el ser humano estarán en mejor estado y el resultado de este ODS trae consigo la solución para otros

Antecedentes

ODS, como pueden ser el ODS 6, agua limpia y saneamiento, y el ODS 3, salud y bienestar. Por tanto, es necesario evaluar también la sinergia y posibles alianzas (ODS 17) formadas a raíz de los objetivos de desarrollo sostenible para evaluar de la mejor manera posible el impacto positivo que trae consigo la producción de bioplásticos degradables al mundo.

1.3.2. Bioplásticos y la Economía Circular

El incipiente interés en el desarrollo de bioplásticos se explica porque el uso extremo de los recursos no renovables está provocando la emisión de gases de efecto invernadero y la contaminación que contribuye a la degradación del medio ambiente y el clima de la Tierra. Esto está creando la necesidad de nuevas fuentes renovables de energía y productos químicos como alternativa. En concreto, otro problema que existe hoy en día es el uso de plásticos a base de petróleo es que no solo están disminuyendo las reservas mundiales de petróleo, sino que también conducen a la contaminación plástica debido a los problemas relacionados con la eliminación de desechos.

De hecho, el nuevo Pacto Verde de la Unión Europea (2019-2023) enfatiza la necesidad de una acción inmediata para hacer de Europa una región climáticamente neutra en 2050. En este sentido ha creado nuevas áreas de políticas a favor del consumo responsable. Conjuntamente, el nuevo Programa de Investigación e Innovación de la Unión Europea (UE): Horizonte Europa (2021-2027) aborda el cambio climático, ayuda a alcanzar los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU e impulsa la competitividad y el crecimiento de la UE. Dicho Programa también se centra en la unión entre la biodiversidad, el agua, los alimentos y la salud y su interrelación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible relacionados con la seguridad alimentaria, salud para todos, la protección de la biodiversidad y la lucha contra el cambio climático. En este

contexto, la Comisión Europea adoptó el nuevo Plan de Acción de Economía Circular (CEAP) como uno de los principales pilares del Pacto Verde Europeo, la nueva agenda de Europa para el crecimiento sostenible y el empleo. Una economía circular es una condición previa para lograr la neutralidad climática buscada y detener la pérdida de biodiversidad. En este sentido, la Comisión Europea tiene como objetivo la transición del modelo clásico de economía lineal a un modelo circular que garantice que los recursos utilizados se mantienen en la economía de la UE (European Commission, 2019).

La llamada “economía lineal” se basa en el supuesto de creer que los recursos están disponibles, son abundantes, fáciles de obtener y es fácil disponer de los residuos (Fernández-Dacosta et al., 2015; Fernández Dacosta, 2018). De hecho, alrededor de 6,2 millones de toneladas de macroplásticos (con un tamaño superior a 5 mm) y 3 millones de toneladas de microplásticos (con un tamaño inferior a 3 mm) se perdieron en el medio ambiente de los 322 millones de toneladas de plásticos producidos a nivel mundial en 2015 (Ryberg et al., 2019). Esto puede tener consecuencias desastrosas, por ejemplo, contaminación, desperdicio de energía, pérdida económica, peligro para la biodiversidad e incremento en la huella de carbono en el medio ambiente (Chow et al., 2017). Por lo tanto, se requiere un cambio significativo en las industrias para experimentar nuevos productos con propiedades mejoradas.

Para mejorar la eficiencia de los recursos y la gestión de residuos, es importante promover y obedecer un enfoque de economía circular en el proceso. Esta estrategia tiene como finalidad que el valor de los productos, materiales y recursos se mantengan en la economía durante el mayor tiempo posible, fomentando la eficiencia del sistema a través de la reducción al mínimo de los residuos generados (Camacho-Otero et al.,

Antecedentes

2018). Alternativas que van desde biomasa, flujos de residuos municipales o los flujos de desechos industriales pueden proporcionar una fuente sostenible de carbono en lugar de los combustibles fósiles. No solo ayudará a reducir los desechos y los costes de eliminación de desechos en el medio ambiente, sino que también reducirá el coste total de producción.

En este sentido, las insuficiencias de la gestión activa de residuos sólidos para determinar los desechos plásticos generan situaciones críticas en relación con el medio ambiente, la salud humana y animal. En consecuencia, existe una inquietud sustancial en la elaboración de potenciales alternativas como los bioplásticos, materiales biodegradables donde uno de los elementos principales es un derivado de origen vegetal, animal o microbiano (V. Kalia et al., 2000). Los bioplásticos se consideran muy importantes para aumentar la sostenibilidad, donde la sostenibilidad define un equilibrio entre los aspectos económicos, ambientales y sociales del negocio y se puede aplicar a diferentes sectores.

1.3.2.1 Herramientas para alcanzar la eco-sostenibilidad

Es importante incluir la evaluación tecno-económica de un proceso que utiliza residuos/subproductos para comprender el proceso en el contexto de la economía circular. Los estudios tecno-económicos revelarían la viabilidad industrial de cualquier proceso junto con los principales parámetros del proceso que afectan el coste de producción. Revela los cuellos de botella de un proceso y guía a los investigadores para desarrollar un proceso rentable desde el punto de vista de la industria.

Hay varias herramientas para la evaluación de la sostenibilidad y entre ellas el estudio del ciclo de vida es la herramienta más común. El ciclo de vida evalúa los impactos ambientales asociados con cualquier proceso

de fabricación, desde la adquisición de materias primas hasta la eliminación o el reciclaje. También se conoce como "análisis de la cuna a la tumba" y el concepto se utiliza para optimizar el diseño ecológico o el desempeño ambiental del producto o proceso. De hecho, en los últimos años se ha dado con un nuevo concepto denominado "de la cuna a la cuna" como una modificación del anterior, que establece que todos los productos han de ser fácilmente "desmontables" en sus diferentes componentes iniciales de forma que puedan volver a ser utilizados en la creación de nuevos productos o sistemas. Este principio es la principal perspectiva de la economía circular pues fomenta el desarrollo productivo sin la generación de residuos.

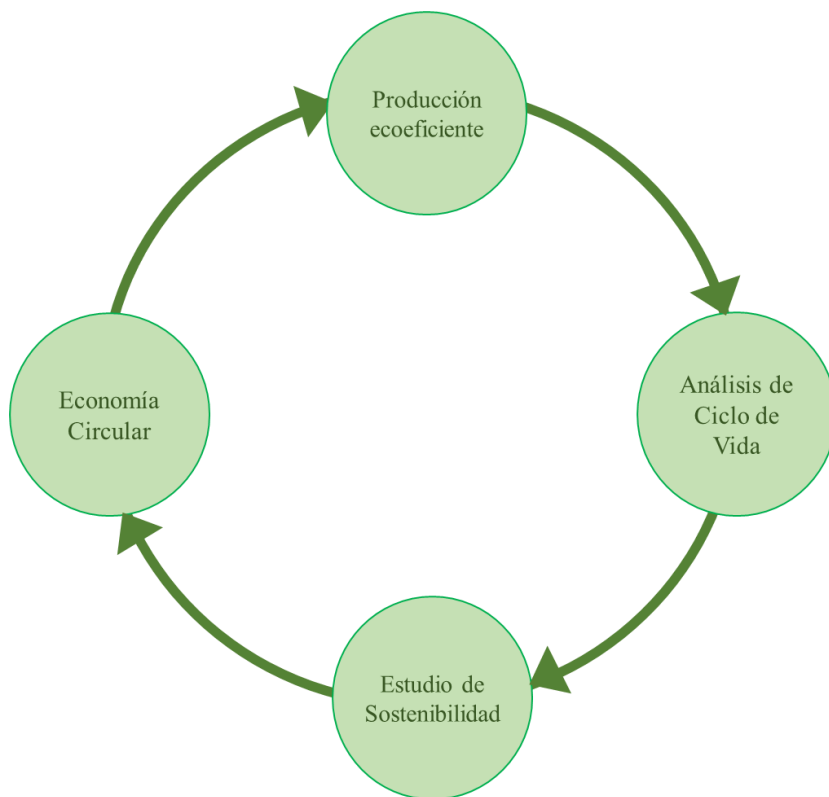


Figura 1.2. Herramientas para alcanzar la eco-sostenibilidad

Antecedentes

En concreto, hay cuatro técnicas que están interrelacionadas que permiten un análisis exhaustivo de la eco-sostenibilidad del proceso productivo de un producto (Figura 1.2). En primer lugar, lo denominado como “Producción ecoeficiente”, que lo conforman el conjunto de estrategias que se utilizan para reducir los riesgos medioambientales asociados con el proceso de producción. A continuación, se debe implementar un análisis de ciclo de vida (ACV) que permite cuantificar y optimizar el diseño del proceso. A partir del ACV, se debe llevar a cabo un estudio de la sostenibilidad del proceso para incluirlo en la red productiva de manera sostenible. Finalmente, se debe hacer uso de la economía circular con el fin de implementar en el proceso productos intermedios o residuos del propio proceso, con el fin de alcanzar una tendencia hacia el “Residuo 0”. La combinación de dichas estrategias busca lograr la sostenibilidad en el proceso.

1.4 Materia prima

Los polímeros biodegradables de origen natural (biopolímeros) están atrayendo un interés creciente como materia prima para la elaboración de materiales (bioplásticos) que podrían reducir el impacto ambiental de plásticos no degradables. Para ello, también se hace indispensable el uso de un plastificante que mejore la procesabilidad de estos biopolímeros durante la fabricación de bioplásticos.

1.4.1. Biopolímeros

Tal y como se ha mostrado en la Tabla 1.1, los biopolímeros son moléculas naturales de gran tamaño formadas por unidades de repetición que reciben el nombre de “monómeros”. En función del tipo de biopolímero, cambian los monómeros que lo conforman.

- Polisacáridos: Los polisacáridos son biomoléculas cuyos constituyentes (sus monómeros) son monosacáridos o disacáridos, los cuales se unen mediante un tipo de enlace denominado enlace O-glucosídico. Estos compuestos llegan a tener un peso molecular muy elevado, que depende del número de residuos o unidades de monosacáridos que participen en su estructura (de diez a decenas de miles). Estos biopolímeros cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales (Lárez Velásquez, 2006).

- Lípidos: Se pueden considerar lípidos los ácidos grasos, sus derivados y cualquier otro compuesto que pueda tener un comportamiento o funcionalidad similar. A menudo son hidrófobos, solubles en disolventes hidrocarbonados o aromáticos e insolubles en agua. En este sentido, para definir claramente qué es un lípido, es fundamental conocer la estructura de un ácido graso. Un ácido graso es un ácido carboxílico con una cadena de carbono alifático unida a él. La cadena de carbono generalmente tiene una longitud de entre 4 y 22 carbonos. Esta cadena de carbono puede no

Antecedentes

tener dobles enlaces (saturados), uno (monoinsaturados) o múltiples (poliinsaturados) en su estructura (Coles, 2014).

- Polipéptidos: Los polipéptidos son biopolímeros formados por la unión de aminoácidos (monómero) mediante un tipo específico de enlace covalente llamado enlace peptídico. Este enlace se forma por la unión del grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxilo del siguiente. Cuando un polipéptido tiene una estructura definida y estable (y contiene más de 50 aminoácidos) se habla de una proteína.

1.4.1.1 Proteínas

Las proteínas son un grupo diverso y complejo formadas a partir de la combinación de 20 aminoácidos, siendo una medida de su valor su abundancia, ya que al menos el 50% del peso seco de las células es proteína. Las proteínas tienen diversas funciones que sustentan la vida como biocatalizadores (enzimas), soporte estructural (colágeno), movimiento celular (actina y miosina), defensa (queratina), regulación hormonal (insulina y glucagón), transporte (hemoglobina) o de reserva de nutrientes esenciales (caseína y ovoalbúmina) (McKee & McKee, 2020).

Las proteínas son biopolímeros que se organizan mediante el enlace de los diferentes aminoácidos formando secuencias (cadenas), estableciéndose cuatro niveles estructurales distintos en función de la organización de estas cadenas entre sí (Figura 1.3).

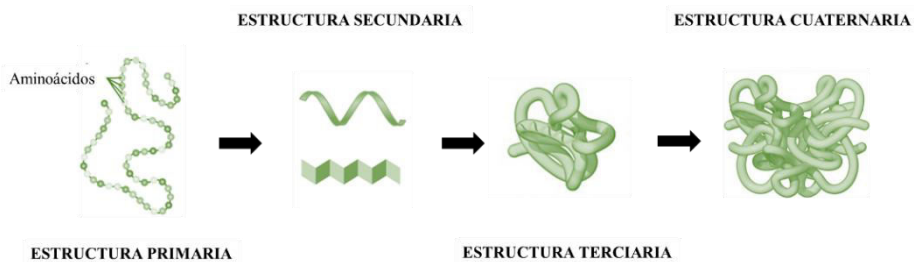
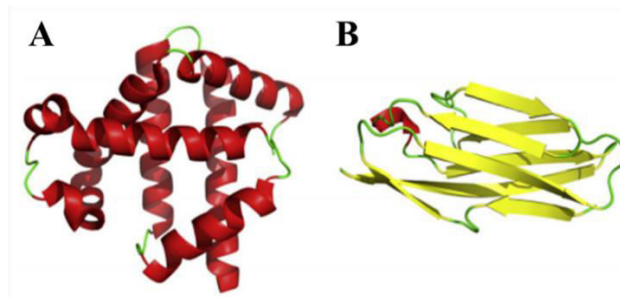


Figura 1.3. Estructuras de las proteínas.

En primer lugar, la estructura primaria, que consiste en una combinación lineal de monómeros denominados aminoácidos unidos por un tipo de enlace denominado enlace peptídico. La estructura secundaria se origina a partir del plegamiento de la estructura primaria mediante la formación de enlaces α (hélice α) y estructuras β (láminas β) (Figura 1.4):

- Hélice α : Esta estructura está formada por el plegamiento de la cadena polipeptídica alrededor de un eje longitudinal imaginario hacia el centro de la hélice propia, dejando a los grupos fuera del esqueleto helicoidal dextrógiro.

- Láminas β : Está formado por el alineamiento de dos o más segmentos de las cadenas polipeptídicas, que se extienden en zigzag, uniéndose entre sí mediante puentes de hidrógeno. Las cadenas polipeptídicas adyacentes de una lámina β pueden ser paralelas o antiparalelas, dependiendo de si tienen la misma orientación amino-carboxi u opuesta; el período de repetición es menor para la secuencia paralela (6,5 Å frente a los 7 Å de la secuencia antiparalela).



*Figura 1.4. Estructuras secundarias de las proteínas: (A) α -hélice and (B) láminas β .
Imagen adaptada de Reeb and Rost (2019)*

La estructura terciaria es la estructura tridimensional definitiva para la mayoría de las proteínas, obtenida por el plegamiento de la cadena polipeptídica debido a la formación de enlaces adicionales (enlaces de

Antecedentes

hidrógeno, enlaces hidrofóbicos o enlaces disulfuro). Finalmente, la estructura cuaternaria está formada por el acoplamiento de diferentes cadenas proteicas. Estas dos estructuras son realmente interesantes porque es posible formarlas con la ayuda de diferentes agentes de entrecruzamiento, dando un marco más estructurado a las proteínas (Cox & Nelson, 2000; McKee et al., 2003).

La estabilización de las cadenas poliméricas se obtiene por la formación de los enlaces descritos anteriormente, pero también por las cargas superficiales que están presentes en la proteína, debido a que afectan a la estructuración y plegamiento de la proteína (y por tanto a su funcionalidad) por el impedimento de carga entre el polipéptido cadenas. Los cambios conformacionales de la cadena proteica que da lugar a la estructura terciaria se deben principalmente a interacciones débiles, aunque en ocasiones también puede deberse a enlaces covalentes como: enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas o enlaces disulfuro (Biesecker et al., 1977; Cox & Nelson, 2000).

1.4.1.2 Proteína de guisante

El origen etimológico del guisante proviene del griego *pison*, que en inglés tradicional se convirtió en *pease* y con los años se acortó a *pea* (guisante). Existen diferentes tipos de guisante, siendo el género *Pisum* la gran mayoría de ellos.

El guisante verde (*Pisum sativum*) es uno de los cultivos leguminosos más antiguo e importante del mundo, cultivándose en 84 países diferentes, lo que constituye el mayor porcentaje (36%) de la producción total de legumbres en el mundo (Dahl et al., 2012). Los guisantes son cultivados extensamente en todos los países del trópico y subtropical del

mundo, siendo los cinco países con mayor producción Canadá, Rusia, China India y Estados Unidos. De hecho, debido a la significativamente alta demanda de proteínas vegetales y el coste de producción relativamente bajo del guisante, el mercado mundial de proteína de guisante está aumentando rápidamente y se espera que alcance los 35 millones de dólares para 2020 (Lu et al., 2020). En este sentido, la proteína de guisante se está volviendo cada vez más popular en la industria alimentaria mundial, además de por su disponibilidad y bajo precio (2-2,8 €/kg), por su buena biodegradabilidad, su falta de modificaciones genéticas en especies comerciales y su baja alergenicidad (Lu et al., 2020).

Composición

La proteína de guisante está compuesta de cuatro familias de proteínas: globulina, albúmina, prolamina y glutelina (Lam et al., 2018). La globulina es el principal componente de la proteína de guisante (60-70%) y se puede clasificar en leguminosas y vicilinas. La albúmina (15-25%) es soluble en agua y está compuesta de moléculas cuya función principal está relacionada con la germinación. La prolamina es un grupo de proteínas que se presenta en una pequeña cantidad en las semillas de guisantes (4-5%). Se caracteriza por un alto contenido de glutamina y prolina. Finalmente, el cuarto componente de la proteína de guisante, la glutelina (4-5%) es una porción insoluble de la proteína de guisante que está formada por aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina, valina, tirosina y prolina (Shand et al., 2007). Respecto a su composición aminoacídica, la proteína de guisante presenta un perfil aminoacídico balanceado, con un alto contenido en lisina, leucina y fenilalanina, pero con bajos contenidos en metionina y cisteína (Gruber et al., 2005).

Propiedades fisicoquímicas

La solubilidad es una de las propiedades funcionales más comúnmente medidas de las proteínas alimentarias. la proteína de guisante es fuertemente dependiente del pH con una solubilidad mínima entre pH 4 y 6. Se ha informado que la solubilidad máxima de la proteína de guisante varía entre el 20 y 90%, siendo atribuidas estas diferencias por la etapa de secado por atomización. El proceso de extracción de la proteína puede afectar a su hidrofobicidad superficial al aumentar las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y/o péptidos. En este sentido, durante el proceso de extracción, la aplicación de temperatura puede inducir la desnaturalización y posible agregación proteica. Cabe mencionar que la temperatura de desnaturalización del guisante se encuentra entre 70-90 °C (Adebiyi & Aluko, 2011).

El tipo y composición de la proteína de guisante, así como su procesado son parámetros que afectan a sus propiedades gelificantes. En general, la proteína de guisante presenta una baja capacidad emulsionante ya que forma emulsiones muy viscosas incluso a baja concentración. Karaca y colaboradores declararon que la baja capacidad emulsificante del aislado de proteína de guisante se debe a su baja carga superficial y su baja solubilidad (Karaca et al., 2011).

Aplicaciones

En cuanto a las aplicaciones, al tratarse de una fuente barata y sostenible con menor huella de carbono, la proteína de guisante (y en general las proteínas vegetales) proporciona una alternativa nutricional preferida a las proteínas de origen animal. La proteína de guisante es un suplemento popular en la industria alimentaria mundial (Shand et al., 2007). De hecho, el guisante y el arroz son excelentes fuentes de proteínas para formar mezclas proteicas debido a su disponibilidad y valores

nutricionales (Boye et al., 2010). Sin embargo, las características anteriormente comentadas para la proteína de guisante deben servir para fomentar el interés del sector industrial e investigador mediante el desarrollo de materiales basados en guisante en diversas aplicaciones (embalaje, biomédicas, etc.). En concreto, la proteína de guisante se ha utilizado para la fabricación de *films*. Entre las técnicas empleadas, se ha utilizado la técnica de casting o mediante moldeo por compresión, dando lugar a materiales con un buen módulo (5,0 -7,5 MPa) combinado con una elevada deformabilidad (150%) (Tömösközi et al., 2001).

En definitiva, en los últimos años ha habido un creciente interés en la industria mundial por utilizar la proteína de guisante como un nuevo sustituto de la soja o las proteínas animales (Lam et al., 2018). En este sentido, se puede esperar que el mercado mundial del guisante crezca continuamente y que la utilización de la proteína de guisante aumente significativamente.

1.4.2. Plastificante

Los bioplásticos a base de biopolímeros son generalmente frágiles cuando se someten a la acción de la presión y la temperatura, debido a las altas interacciones entre las cadenas de proteínas a través de los enlaces de hidrógeno, las fuerzas electrostáticas y los efectos de entrecruzamiento de los enlaces de azufre. Se añaden plastificantes para facilitar el procesamiento y modificar las propiedades de la estructura final de los bioplásticos. Las sustancias de bajo peso molecular y baja volatilidad se utilizan a menudo como plastificantes (Hernandez-Izquierdo & Krochta, 2008). Generalmente, los plastificantes actúan colocándose entre cadenas de biopolímeros, asociándose de forma fisicoquímica con el polímero, reduciendo la cohesión dentro de la matriz y, por tanto, esparciendo y liberando la estructura (Gennadios,

Antecedentes

2002). Por lo tanto, el estudio y selección del plastificante es un factor que considerar durante la producción de bioplásticos. Entre los diferentes plastificantes, la glicerina se ha utilizado ampliamente con diferentes proteínas (Carvajal-Piñero et al., 2019; Gomez-Martinez et al., 2011; Gonzalez-Gutierrez et al., 2010; González-Gutiérrez et al., 2011; Jiménez-Rosado et al., 2018; Martínez et al., 2013; Zárate-Ramírez et al., 2011), demostrando su compatibilidad con varios biopolímeros de diferentes orígenes. Sin embargo, también se han investigado otros plastificantes, como en el trabajo de Perotto et al. (2020), que evalúan el efecto del agua como plastificante en las propiedades mecánicas y térmicas de películas bioplásticas de origen vegetal (Perotto et al., 2020). Los resultados mostraron que el uso de agua producía bioplásticos muy rígidos, aunque se degradaba a temperaturas superiores a los 75 °C. En esta línea, Wang et al. (1996) exploraron el efecto de diferentes plastificantes en las propiedades mecánicas de los bioplásticos a base de proteínas (Wang et al., 1996). Más recientemente, Tummala et al. (2006) y Aguilar et al. (2020), evaluaron la influencia de algunos plastificantes (glicerol, sorbitol, etilenglicol, dietilenglicol y trietilenglicol) sobre las propiedades mecánicas, funcionales y morfológicas de bioplásticos producidos con aislado proteico de soja (Aguilar et al., 2020; Tummala et al., 2006). Los resultados de ambos estudios fueron similares, obteniendo materiales más deformables y transparentes al utilizar glicerina como plastificante.

1.5 Fabricación de bioplásticos

El procesado de materiales a base de proteínas requiere tres pasos principales: rotura de enlaces intermoleculares (no covalentes y covalentes, si es necesario) que estabilizan las proteínas en sus formas nativas mediante el uso de agentes químicos o físicos; disponer y orientar cadenas poliméricas móviles en la forma deseada; y, finalmente, permitir la formación de nuevos enlaces e interacciones intermoleculares para estabilizar la red tridimensional (Gennadios, 2002).

Tabla 1.2. Ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de procesado: Casting, moldeo por compresión, extrusión e inyección. Tabla adaptada de Perez-Puyana et al., (2022)

Técnica de procesado	Ventajas	Inconvenientes
Casting	<ul style="list-style-type: none"> -Bajos costes de equipos, herramientas y moldes. -Procesado sencillo. -Los productos tienen poca o ninguna tensión interna. -Uso de presión atmosférica y temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> -Producción lenta. -Ciclos de larga duración. -Malas tolerancias dimensionales. -La humedad y las burbujas de aire pueden ser difíciles de manejar y pueden causar problemas. -Puede ser difícil encontrar un disolvente que disuelva el polímero y sea fácilmente evaporable.
Moldeo por compresión	<ul style="list-style-type: none"> - Equipamiento de menor coste. -Método más efectivo para fabricar bioplásticos a pequeña escala. -No consume material extra. -No hay limitación en el tamaño de los productos. 	<ul style="list-style-type: none"> -No es posible el procesado continuo, requiere más mano de obra. -Tiempos de procesado más lentos. -No apto para formas complejas. -Los moldes se pueden dañar. -Caro para alta producción.
Extrusión	<ul style="list-style-type: none"> -Bajo coste. -Proceso continuo, bueno para alta producción. -Flexibilidad en la fabricación de productos con sección transversal uniforme. -Etapas adicionales fácilmente incluíbles post-extrusión. 	<ul style="list-style-type: none"> -Variaciones de tamaño (los productos se expanden). -Limitaciones del producto debido a una sección transversal constante. -Problemas de extrusión de algunos sistemas proteicos. -Configuración de alto coste inicial. -Necesita un post-procesado.
Moldeo por inyección	<ul style="list-style-type: none"> -Producción rápida y alta eficiencia. -Bajos costes a alta producción. -Estructuras complejas. -Producción de alto rendimiento. -Bajas tasas de desecho. -Buen control de color. -Consistencia del producto. 	<ul style="list-style-type: none"> -Coste elevado de herramientas y largos tiempos de preparación. -Alguna restricción en la estructura del producto. -Caro a pequeña escala.

Antecedentes

Los bioplásticos se pueden procesar con la mayoría de las técnicas tradicionales utilizadas para el plástico convencional incluidas la fundición, el moldeo por compresión, la extrusión o el moldeo por inyección. La Tabla 1.2 muestra una comparación de las ventajas y desventajas de cada técnica. En concreto, entre las posibles técnicas mostradas en la tabla anterior, para elaborar bioplásticos se ha seleccionado la técnica del moldeo por inyección (por su alta eficiencia de la técnica y la posibilidad de procesar estructuras complejas, entre otras razones) para alcanzar a cumplir la hipótesis y objetivos principales detallados anteriormente.

1.5.1 Moldeo por inyección

El moldeo por inyección se basa en la aplicación combinada de presión y temperatura para formar el bioplástico (Figura 1.5). Es una técnica de procesamiento discontinuo que implica la aplicación de presión para llenar un molde y el posterior enfriamiento y desmoldeo de la muestra (Adamy & Verbeek, 2013).

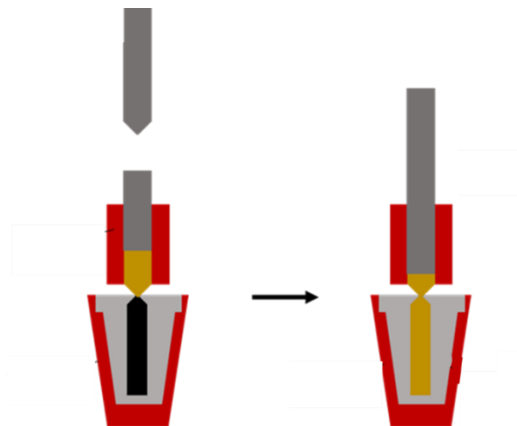


Figura 1.5. Esquema de un equipo de moldeo por inyección vertical.

Se deben considerar diferentes etapas en el procesamiento de bioplásticos basados en proteínas mediante moldeo por inyección: (i) una etapa de mezcla para formar una mezcla de proteína/plastificante para obtener una

masa homogénea moldeable, (ii) un proceso posterior de inyección de las mezclas en la cavidad del molde, (iii) una etapa de mantenimiento a presión y temperatura constantes para permitir el refuerzo de la matriz proteica (etapa de compactación) y (iv) un período de enfriamiento después del cual se extrae el bioplástico moldeado. La mezcla inicial de proteína/plastificante se puede obtener por lotes (como en el moldeo por compresión), para dispositivos de moldeo por inyección de inmersión de pequeña escala, o mediante la etapa de plastificación que se lleva a cabo dentro del cilindro de la máquina de moldeo por inyección de tornillo. A continuación, la mezcla homogénea se inyecta en un molde para producir los bioplásticos deseados (Figura 1.6).

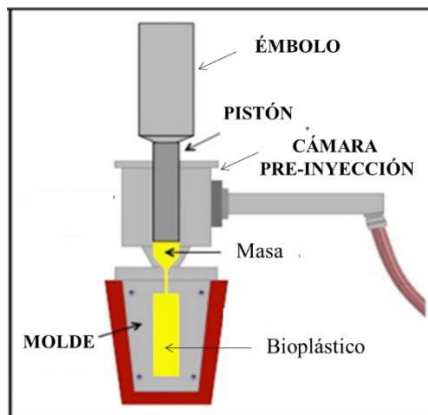


Figura 1.6. Esquema de los componentes principales de un equipo de moldeo por inyección vertical.

Es necesario establecer las condiciones ideales de procesado considerando la presión y el tiempo de inyección, así como la temperatura de la cámara o cilindro de pre-inyección, y la presión y temperatura del molde. Sin embargo, es importante evitar temperaturas tan altas en el cilindro para evitar el entrecruzamiento de proteínas por enlaces disulfuro intermoleculares covalentes o incluso la degradación de proteínas (Zárate-Ramírez et al., 2014a). Además, también es relevante controlar las condiciones en la etapa de mezclado y en el

Antecedentes

proceso de inyección anterior, seleccionando las condiciones adecuadas para asegurar una velocidad de inyección óptima relacionada con la velocidad de descenso del pistón, que permite introducir la mezcla en el molde. Dependiendo de las condiciones seleccionadas, los bioplásticos fabricados exhibirían propiedades adecuadas para considerarlos para aplicaciones específicas. De esta manera, no solo las condiciones de preparación son importantes, sino también otros componentes de la formulación, como plastificantes, pH, productos químicos, enzimas, nanocompuestos, lípidos y agentes de entrecruzamiento (Alonso-González et al., 2021).

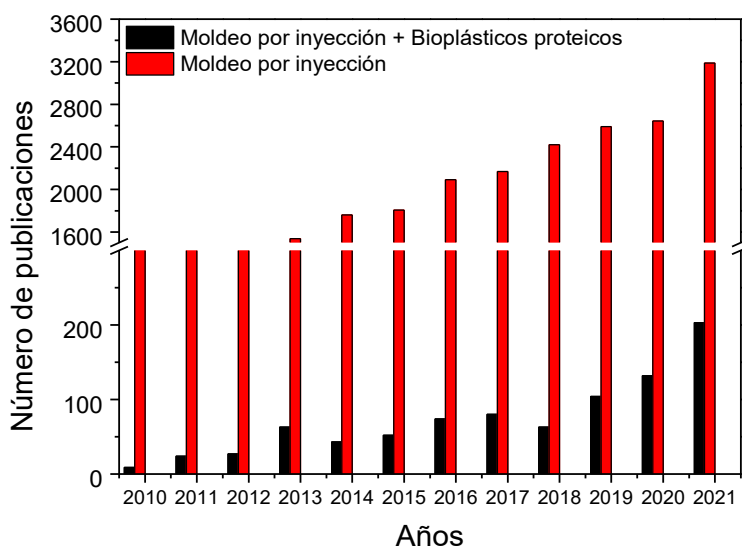


Figura 1.7. Evolución del número de publicaciones relacionadas con la técnica de 'Moldeo por inyección' y publicaciones relacionadas con la fabricación de bioplásticos proteicos por 'Moldeo por inyección'. Datos obtenidos de Scopus y Web of Science.

Un parámetro para medir la evolución de la técnica a lo largo de los años y su influencia en la ciencia de los materiales se basa en el número de publicaciones relacionadas. La Figura 1.7 muestra el número de publicaciones relacionadas con el "moldeo por inyección" desde el año 2010. Tal y como se comprueba en la figura, se observa un crecimiento

exponencial en el número de publicaciones pasando de 400 a más de 3000 en 2021 (barras rojas). También se ha realizado un estudio del uso específico del moldeo por inyección para producir bioplásticos a base de proteínas y se muestra en la Figura 1.7 (barras negras). Dicho estudio también observa un aumento exponencial con el paso de los años, teniendo un crecimiento más relevante a partir de 2019.

1.5.2 Métodos de entrecruzamiento

A pesar de la clara ventaja medioambiental de utilizar bioplásticos como potenciales sustitutos de plásticos convencionales, todavía existe un obstáculo difícil de superar. Dicho obstáculo aparece cuando se comparan las propiedades obtenidas para un bioplástico en comparación con el plástico convencional para una aplicación determinada.

Para la mejora de propiedades se han propuesto soluciones como la sustitución de la materia prima a utilizar o la adición de otros componentes como materiales reforzantes o de relleno. Sin embargo, con el fin de preservar la naturaleza polimérica (o biopolimérica) de los bioplásticos fabricados, ha surgido una línea de investigación relacionada con la modificación de las cadenas poliméricas que conforman los bioplásticos. Dicha modificación recibe el nombre de entrecruzamiento y consiste en la formación de nuevos enlaces inter e intramoleculares que originen una modificación en la estructura (bio)polimérica.

El entrecruzamiento se puede conseguir mediante la inclusión de una etapa adicional de reforzamiento durante el proceso de fabricación o mediante la adición de algún agente químico o enzimático como aditivo (glutaraldehído, transglutaminasa, etc.). Dependiendo del proceso utilizado, puede tener lugar un entrecruzamiento físico, químico o enzimático. La Tabla 1.3 muestra diferentes alternativas llevadas a cabo

Antecedentes

en estudios previos para materiales bioplásticos. Tal y como se puede apreciar, la gran mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo en los últimos cinco años, fiel reflejo de lo novedoso de estos procesos de modificación de materiales.

Tabla 1.3 Diferentes alternativas de entrecruzamiento sobre materiales bioplásticos.

Tipo	Agente de entrecruzamiento	Materia prima utilizada	Referencia
FÍSICO	Radiación UV	Succionato de polibutileno/ Lignina	(Zhang et al., 2019)
	Tratamiento térmico	Proteína de soja	(Jiménez-Rosado et al., 2020)
		Gluten	(Jansens et al., 2017)
		Celulosa/PVA	(Xie et al., 2022)
Radiación por haz de electrones	Poliamida 11	(Nagasawa et al., 2017)	
QUÍMICO	Ácido cítrico	Almidón	(Chakraborty et al., 2022; Yang et al., 2021)
		Agarosa	(Awadhiya et al., 2016)
		Proteína de trigo	(Azeredo et al., 2015)
	Glioxal	Gelatina	(Kwak et al., 2020)
	Calcio	Celulosa	(Lee et al., 2021)
	Genipina	Quitosano	(Ray et al., 2010)
			(Whitehead et al., 2020)
		Gelatina	(Bigi et al., 2002)
	Cinamaldehído	Gliadina	(Jia et al., 2021)
	Formaldehído	Gluten	(Zárate-Ramírez et al., 2014b)
	Ácido succínico	Agar	(Belay et al., 2020)
	Polifenol	Proteínas	(Zhao et al., 2022)
	Ácido bórico	Polipropileno	(Suhag et al., 2022)
	Glutaraldehído	Plasma porcino	(Álvarez-Castillo et al., 2021)
		Zeína/Gluten	(Oh et al., 2019)
	Polisiloxano	Celulosa	(Hassan & Fowler, 2022)
	Ácido maleico	PVA	(Riyajan et al., 2009)
Isocianato	Agar	(Sonker et al., 2018)	
	Zeína	(Sessa et al., 2013)	
Di(tercbutilperoxi) hexano	PLA	(Nishida et al., 2015)	
ENZIMÁTICO	Transglutaminasa	Gluten	(Cui et al., 2017)
		Semilla de cáñamo	(Mirpoor et al., 2022)

Estas técnicas han sido previamente utilizadas para la modificación de biocomposites, pero su aplicación en el campo de los bioplásticos es muy reciente. En definitiva, queda reflejado el esfuerzo llevado a cabo en modular las propiedades (mecánicas, microestructurales y/o funcionales) de los bioplásticos mediante diferentes procesos de entrecruzamiento físico, químico o enzimático.

1.5.2.1 Entrecruzamiento físico

El entrecruzamiento físico consiste en la modificación de la estructura de un material a través de interacciones secundarias no covalentes como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas hidrofóbicas (Garavand et al., 2017; Yu et al., 2021). Generalmente requieren de una etapa adicional al proceso de fabricación empleado para la fabricación de los materiales. Existen múltiples alternativas para proceder, como pueden ser tratamientos térmicos, por ultravioleta (UV) o por ultrasonidos (Jiménez-Rosado et al., 2020a).

El tratamiento térmico consiste en una etapa térmica en el que la temperatura desdobra parcialmente las cadenas proteicas y, por tanto, aumenta la reactividad de los grupos amino potenciando la susceptibilidad de las diferentes cadenas proteicas a interactuar (Cheung et al., 1990) (Figura 1.8). Por otra parte, la interacción con radiación UV con las proteínas a nivel molecular implica la formación de sitios activos en aminoácidos como la arginina o el triptófano, tal y como han descrito previamente otros autores (Ahsan, 2018) (Figura 1.8). De hecho, la radiación UV se ve como un candidato prometedor ya que se puede realizar una doble función. Esta técnica no solo puede inducir el entrecruzamiento intramolecular, produciendo propiedades mejoradas, sino también esterilizar los materiales.

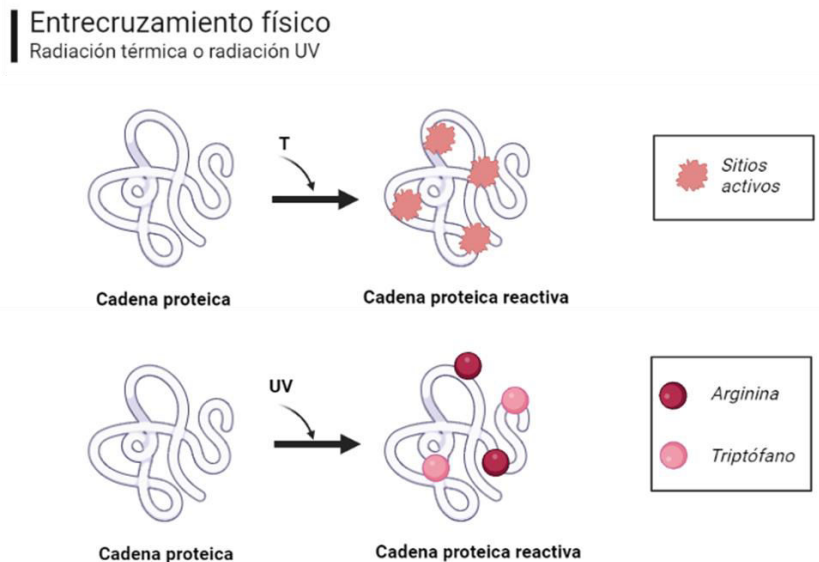


Figura 1.8. Esquema del proceso de entrecruzamiento mediante radiación térmica o radiación UV sobre materiales basados en proteínas.

Hay varias ventajas en el uso del entrecruzamiento físico. Primero, el entrecruzamiento físico es más barato que los métodos de entrecruzamiento químico que necesitan el uso de la adición de sustancias adicionales. De hecho, el uso de un método de entrecruzamiento físico evita la controversia del uso de productos químicos en un producto natural. En este sentido, no requiere la adición de reactivos que pudieran producir reacciones secundarias indeseables o incluso aumentar la toxicidad del material o posibles productos secundarios, especialmente relevantes para aplicaciones en la industria alimentaria.

1.5.2.2 Entrecruzamiento químico

El entrecruzamiento químico es aquel que se consigue mediante la adición de agentes de entrecruzamiento (añadidos a concentraciones bajas), que son compuestos químicos que favorecen reacciones cuyo resultado es la formación de enlaces covalentes entre los átomos de las

cadena (Figura 1.9). En concreto para las proteínas, pueden originarse enlaces entre diferentes proteínas (entrecruzamiento intermolecular) o entre cadenas de la misma proteína (entrecruzamiento intramolecular) (Mohammed et al., 2000). Dichos procesos químicos generan enlaces covalentes nuevos y, en general, irreversibles (Azeredo & Waldron, 2016).



Figura 1.9 Esquema de un proceso de entrecruzamiento químico mediante agente de entrecruzamiento.

Las reacciones de entrecruzamiento se pueden dar en uno o más pasos. Las reacciones de un único paso consisten en la unión directa del agente de entrecruzamiento con los polímeros que se pretende entrecruzar. Tienen la desventaja de que, si los polímeros a entrecruzar tienen dificultades para asociarse entre sí, entonces es posible que se den reacciones secundarias y, como consecuencia, el resultado del entrecruzamiento no sea el deseado. Si se da este último caso, lo mejor es utilizar un entrecruzamiento con más pasos, por ejemplo, una reacción de entrecruzamiento en dos pasos. En este tipo de reacciones, uno de los componentes que se pretende unir reacciona primero con el agente de entrecruzamiento, aislando las moléculas modificadas o retirando las que no han reaccionado y, a continuación, se añade el segundo componente. La técnica más utilizada para eliminar el exceso de agente tras el primer paso es la diálisis (siempre que estuviera en disolución).

Entre los diferentes agentes de entrecruzamiento químicos, se recomienda el uso de aldehídos, ya que permiten la formación de enlaces covalentes entre cadenas de polímeros, lo que conduce a una

Antecedentes

modificación microestructural del sistema (Silva et al., 2004). El formaldehído y el glutaraldehído se han estudiado ampliamente como agentes de entrecruzamiento, pero su toxicidad limita su uso. A pesar de esto, el glutaraldehído es el agente de entrecruzamiento más utilizado para varias aplicaciones (Gomes et al., 2013; Zhang et al., 2016). Estos agentes de entrecruzamiento presentan un doble enlace carbono-oxígeno (C=O) cuya polaridad hace que el átomo de carbono sea reactivo frente a las aminas primarias, dando lugar a estructuras químicamente entrecruzadas (Feeney et al., 1975) (Figura 1.10).

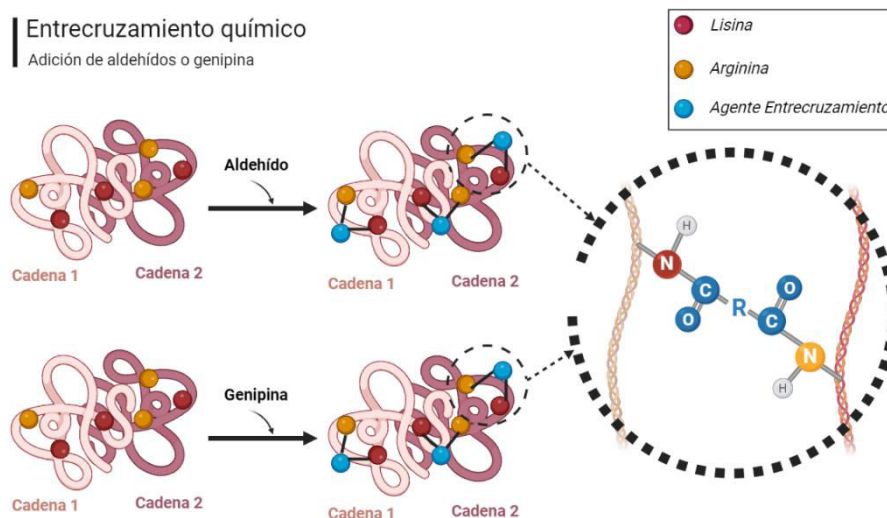


Figura 1.10. Esquema del proceso de entrecruzamiento mediante el uso de aldehídos o por la adición de genipina en materiales basados en proteínas.

Aparte del uso de aldehídos, existen sustancias naturales que pueden actuar como agentes de entrecruzamiento. Entre ellas destaca la genipina. La genipina es un iridoide (monoterpeno que presenta como esqueleto de carbono el 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano) glicosídico de origen natural extraído de los frutos de la gardenia. La importancia de la genipina se debe a que surge como una alternativa a los agentes de entrecruzamiento convencionales, debido a su buena

biocompatibilidad y ausencia de toxicidad. Es una molécula biodegradable con baja citotoxicidad, generadora de un pigmento azul oscuro a reaccionar espontáneamente con aminoácidos, habiendo sido usada en la fabricación de colorantes de alimentos (Makita et al., 2018). Para ello, la genipina tiene la capacidad de reaccionar de forma espontánea con aminoácidos y proteínas que contengan aminas primarias, llegando a generar sistemas con mayor estabilidad térmica y mayor resistencia al agua (Figura 1.10).

La principal ventaja del entrecruzamiento químico es que los enlaces formados son muy fuertes (enlaces covalentes), mejorando significativamente las propiedades de los bioplásticos (Wong & Jameson, 2011).

Por otro lado, las principales desventajas de este tipo de entrecruzamiento son (Oryan et al., 2018):

- Si se añaden en exceso suelen generar productos secundarios tóxicos, por lo que su control ha de ser minucioso. De hecho, a menudo es necesario un lavado para remover la porción de agente de entrecruzamiento sobrante (ya que dicha porción puede generar toxicidad).
- El proceso en sí es más caro y complejo que el del entrecruzamiento físico por la necesidad de adicionar reactivos a la composición inicial.

1.5.2.3 Entrecruzamiento enzimático

El entrecruzamiento enzimático es un tipo de entrecruzamiento químico en el que los reactivos empleados son enzimas para reducir la potencial toxicidad de los reactivos químicos tradicionalmente utilizados. Este tipo de entrecruzamiento se suelen emplear sobre todo en el entrecruzamiento

Antecedentes

de biopolímeros. De ellas, las transglutaminasas son las más utilizadas para llevar a cabo este tipo de entrecruzamiento (Figura 1.11).

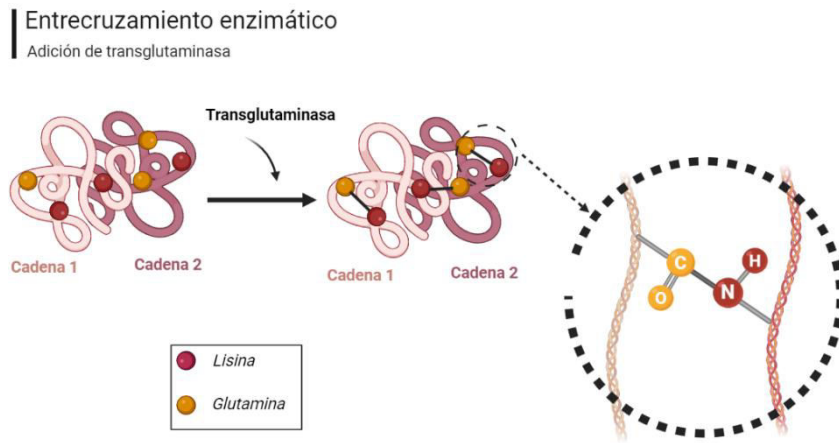


Figura 1.11. Esquema del proceso de entrecruzamiento mediante la adición de transglutaminasa en materiales basados en proteínas.

Las transglutaminasas son una familia de enzimas con grupo tiol, presentes en multitud de seres vivos (vertebrados, invertebrados, plantas, microorganismos, etc.), que constituyen una alternativa al entrecruzamiento químico habitual. Estas enzimas catalizan la formación de un enlace covalente entre el grupo γ -carboxamida de la glutamina y grupos amino libres de lisina. La reacción de entrecruzamiento es rápida en comparación con la mayoría de procesos y los enlaces resultantes son extremadamente resistentes a la proteólisis (Nezhad-Mokhtari et al., 2019). Además, existen otras enzimas, como la tirosinasa, que se han empleado para provocar el entrecruzamiento de materiales, pero generalmente los resultados han presentado peores propiedades que los obtenidos mediante transglutaminasa (Oryan et al., 2018).

1.6 Justificación

Un resumen general de las diferentes etapas relacionadas con el desarrollo de bioplásticos, en la presente Tesis Doctoral, puede observarse en el siguiente esquema (Figura 1.12):

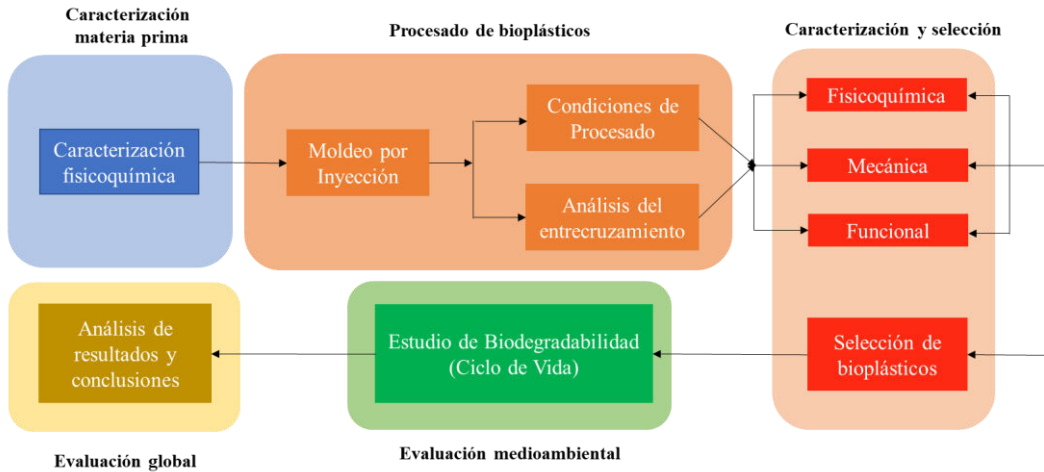


Figura 1.12. Etapas en el desarrollo de bioplásticos proteicos

1.6.1. Hipótesis y objetivos

El desarrollo de bioplásticos con múltiples potenciales aplicaciones permite tener una menor dependencia del petróleo, además de originar un menor impacto ambiental que el originado por los plásticos convencionales. Por otra parte, el uso de subproductos de la industria (en nuestro caso agroalimentaria) permite su valorización conectando con uno de los principios de la economía circular. En este sentido, la hipótesis inicial consiste en el desarrollo de bioplásticos a partir de concentrado proteico de guisante. La propuesta implica el empleo de una técnica clásica de procesamiento de polímeros como es el moldeo por inyección.

Tomando esta hipótesis como objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos para su consecución:

Antecedentes

- Caracterización fisicoquímica de la materia prima (concentrado proteico de guisante).
- Desarrollo de bioplásticos a partir de proteína de guisante mediante moldeo por inyección.
- Optimización de los parámetros de procesado, que permitirá seleccionar aquellas condiciones más adecuadas.
- Evaluación de los diferentes sistemas procesados mediante una caracterización fisicoquímica, mecánica, morfológica y funcional de los mismos.
- Selección de los sistemas más prometedores en base a los resultados obtenidos en los objetivos anteriores.
- Estudio preliminar del ciclo de vida de los sistemas seleccionados mediante el estudio del impacto medioambiental y una evaluación económica del procesado, además del estudio de su biodegradabilidad.

1.6.2. Impacto de la investigación

El estudio de bioplásticos beneficia al fortalecimiento directo de cuatro de los ODS, además de colaborar de forma indirecta sobre tres de ellos. Por tanto, el desarrollo de la presente Tesis Doctoral plantea generar un impacto en cuatro vertientes diferentes (Figura 1.13):

- Impacto científico: Este estudio contribuye al desarrollo tecnológico y la generación de conocimiento.
- Impacto medioambiental: El impacto tecnológico de este trabajo va a contribuir a la valorización de un subproducto de la industria agroalimentaria, fomentando una gestión óptima de los recursos disponibles. Por otra parte, se pretende reducir el impacto mediante la disminución de la generación de residuos plásticos no biodegradables.

- Impacto económico: El impacto económico relacionado con la presente Tesis Doctoral va relacionado con la obtención de nuevos bioproductos que derivan en nuevas oportunidades para el sector industrial.
- Impacto social: Todo lo anterior va a generar un impacto social asociado a una potencial mejora de la calidad de vida de la población al contribuir a la no dependencia del petróleo e intentar mejorar la huella medioambiental de los materiales plásticos, como por ejemplo con la mejora de la calidad del agua por el impacto de los plásticos.



Figura 1.13. Relación entre los impactos y los ODS implicados en la presente Tesis Doctoral

Capítulo 2: Materiales y métodos



En este capítulo se describen la materia prima y los reactivos utilizados, el método de fabricación seleccionado y las técnicas de caracterización empleadas tanto para la materia prima como para las masas intermedias y bioplásticos desarrollados.

2.1 Materiales utilizados

Se ha utilizado harina de proteína de guisante obtenida a partir de los desechos del guisante. Dicho subproducto ha sido proporcionado por la empresa Roquette (Francia) (Figura 2.1). La ficha técnica de la proteína revela que presenta un contenido en materia proteica de un 84% p/p y una humedad del 7,6% p/p. Hasta completar el 100%, dicha materia prima se compone además de lípidos y cenizas, entre otros componentes.



Figura 2.1. Imagen de la harina de proteína de guisante

Además, se ha utilizado glicerina como plastificante. Se trata de un alcohol que tiene 3 grupos hidroxilo en una cadena con 3 átomos de carbono (Figura 2.2). Dicho plastificante ha sido suministrado por PANREAC Química S.A. (España).

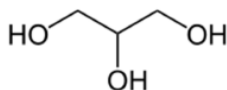


Figura 2.2. Imagen y fórmula de la glicerina

Por otra parte, como agentes de entrecruzamiento químico se han utilizado aldehídos con diferente longitud de cadena alifática (formaldehído, glioxal y glutaraldehído) suministrados por Panreac Química S.A. (España); además de genipina como agente de entrecruzamiento químico natural (pureza superior al 98%, extraída de la planta *Gardenia jasminoides* y suministrada por Guangxi Shanyun Biochemical Science and Technology Co., China). En cuanto al estudio de entrecruzamiento enzimático, se ha utilizado transglutaminasa como enzima (ProbindTX-TG, con una actividad enzimática de 100 unidades/g, suministrada por BDF Ingredients España).

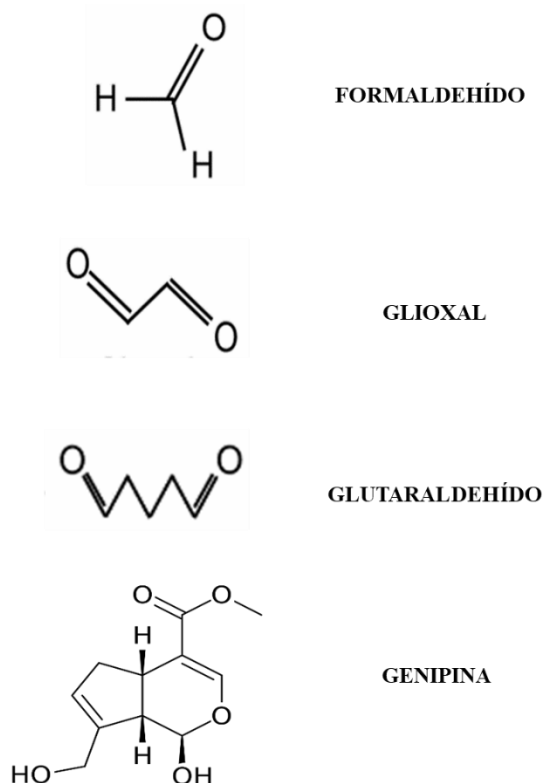


Figura 2.3. Fórmula del formaldehído, glioxal, glutaraldehído y genipina, respectivamente

2.2 Experimental

2.2.1 Fabricación de bioplásticos proteicos

En el proceso de preparación de bioplásticos hay que distinguir dos etapas: Inicialmente un mezclado discontinuo y, posteriormente, un proceso de inyección de las masas obtenidas en el paso anterior.

2.2.1.1 Mezclado

El proceso de mezclado se lleva a cabo en un reómetro de mezclado HAAKE POLYLAB de la marca Thermo Scientific (Alemania) (Figura 2.4). La sección de mezclado consiste en una doble cámara cilíndrica con dos rodillos amasadores que giran en sentido contra-rotatorio. La velocidad se estableció en 50 rpm y la temperatura inicial en 25 °C, aunque suelen producirse variaciones de esta última a lo largo del tiempo de mezclado. Este reómetro de mezclado permite controlar, además de la temperatura de la mezcla, el par de torsión que se genera en los rodillos como consecuencia de la resistencia que ofrece la muestra al movimiento de mezclado. Además, se puede trabajar en régimen isotérmico o adiabático, trabajando en este estudio de forma adiabática.



Figura 2.4. Reómetro de mezclado HAAKE POLYLAB

Un parámetro que se ha tenido en cuenta a la hora de seleccionar la masa idónea es la energía mecánica específica (*SME*), que es la energía proporcionada por la mezcladora por unidad de masa (Ecuación 2.1):

$$SME = \frac{W}{m} \int_0^{t_{min}} M(t) dt \quad (2.1)$$

Donde W representa la velocidad de rotación (en rad/s) de la mezcladora, m es la masa total que se introduce (en kg) y la integral es el área bajo la curva para el perfil del par de torsión hasta el tiempo seleccionado (t_{min}).

2.2.1.2 Inyección

La inyectora es el equipo que permite la formación de los bioplásticos a partir de las masas. El equipo utilizado es una inyectora de pistón neumático “MiniJet Piston Moulding System II” de Haake Thermo Scientific (Alemania) (Figura 2.5).



Figura 2.5. Inyectora “Mini Jet II”

El equipo dispone de un cilindro como cámara de preinyección, un molde y un pistón que hace pasar la mezcla de la cámara de preinyección al molde, que se encuentra a una temperatura determinada, a una presión específica. Tras la inyección, tiene lugar una etapa de post-inyección, o compactación, que permite mantener la integridad estructural de los bioplásticos obtenidos. Para ello, el equipo dispone de sistemas de control de la presión ejercida y el tiempo de inyección y polimerización, así como el control de temperatura en la cámara de inyección y del molde. Se han obtenidos dos tipos de probetas: (I) probetas rectangulares (60x10x1 mm) y (II) probetas tipo “dumbbell-shape” de acuerdo a la

Materiales y Métodos

norma ISO 527-1:2012 (ISO 527-2:2012. *Plastics—Determination of Tensile Properties-Part 2: Test Conditions for Moulding and Extrusion Plastics*, 2012) (Figura 2.6).

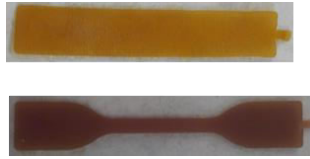


Figura 2.6. Imágenes de las probetas elaboradas (tipo rectangular y dumbbell-shape)

Antes de llevar a cabo la inyección y una vez que tenemos las masas de proteína/plastificante se establecen las condiciones idóneas de procesado. Para ello, se han estudiado diferentes condiciones de procesado (Figura 2.7).

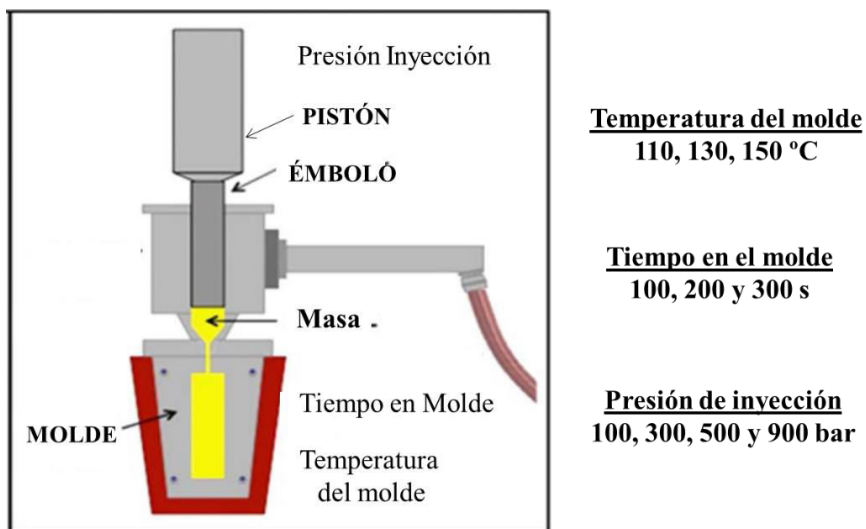


Figura 2.7. Imagen del proceso de inyección y condiciones de procesado estudiadas

A modo de resumen, en el siguiente diagrama de flujo puede observarse un esquema del proceso con los productos intermedio y final del método de fabricación (Figura 2.8):

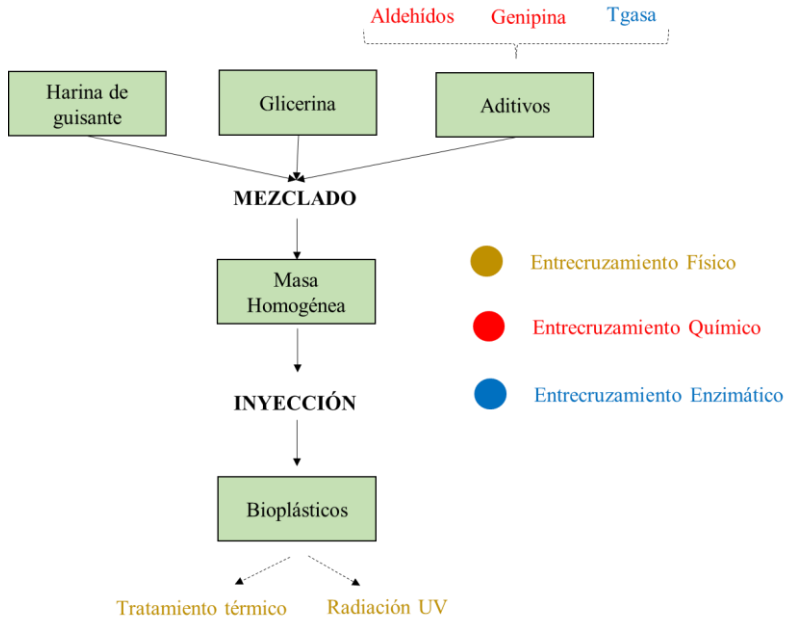


Figura 2.8. Esquema del proceso de fabricación de bioplásticos

2.2.1.3 Métodos de entrecruzamiento

Para mejorar las propiedades de los bioplásticos proteicos se han llevado a cabo etapas adicionales de entrecruzamiento. En este sentido, se ha realizado un entrecruzamiento físico, químico y enzimático sobre los distintos sistemas elaborados.

Entrecruzamiento físico

En esta investigación se van a realizar dos tratamientos como una etapa adicional al proceso de fabricación de los bioplásticos. En concreto, un tratamiento térmico a diferente temperatura (50 y 120 °C) durante un tiempo determinado (4 y 24 h) utilizando una estufa convencional (Memmert, Alemania) (Figura 2.9A); o un tratamiento por radiación UV durante 30 minutos a diferentes intensidades (50, 120 y 500 mJ/cm²) utilizando un “Microprocessor-Controlled UV Crosslinkers XLE-1000” (Select, EE. UU.) (Figura 2.9B).

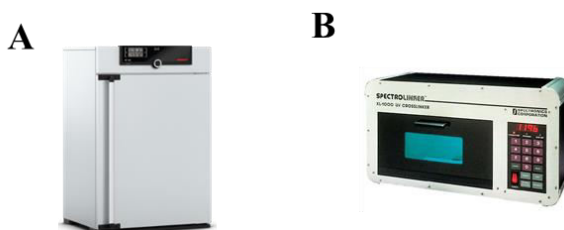


Figura 2.9. (A) Estufa Memmert y (B) equipo de radiación UV

Entrecruzamiento químico

En este estudio se ha utilizado formaldehído al 1 y 3%, glioxal al 3% y glutaraldehído al 3% (respecto a la cantidad de proteína), con el fin de evaluar el efecto de la longitud de cadena de los aldehídos utilizados.

Por otra parte, existen sustancias naturales que también pueden originar la formación de nuevos enlaces que deriven en el entrecruzamiento del sistema, como por ejemplo la genipina. Para el entrecruzamiento de los bioplásticos proteicos se ha utilizado genipina a diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %) evaluando el tiempo de curado de la masa una vez mezclada y realizando la etapa de inyección a diferentes tiempos (día 0, día 1, día 5 y día 10). Además, se ha seguido la reacción que ha tenido lugar analizando las masas con el tiempo.

Tanto para el uso de los diferentes aldehídos como de la genipina, se han añadido a la formulación inicial antes del mezclado.

Entrecruzamiento enzimático

Un tipo de entrecruzamiento químico es aquel que hace uso de enzimas para originar reacciones de entrecruzamiento. En esta línea se sitúa la transglutaminasa, enzima empleada en procesos de entrecruzamiento de proteínas y que presenta una temperatura óptima de operación en 50 °C. En este estudio se ha utilizado transglutaminasa al 0,25 y 0,50% (respecto a la cantidad de proteína). De nuevo, al igual que para el

entrecruzamiento químico, la transglutaminasa se ha añadido a la formulación inicial antes del mezclado.

La siguiente tabla (Tabla 2.1) muestra todos los sistemas que se han estudiado con los diferentes métodos de entrecruzamiento seguidos:

Tabla 2.1. Tabla resumen de los diferentes entrecruzamientos llevados a cabo

ENTRECRUZAMIENTO DE BIOPLÁSTICOS					
SISTEMAS	CÓDIGO	TIPO	AGENTE	PROCESO	
50°C/24h	50°C-24h	Físico	Temperatura	50°C durante 24 h	
120°C/4h	120°C-4h	Físico		120°C durante 4 h	
120°C/24h	120°C-24h	Físico		120°C durante 24 h	
50 mJ/cm ²	50 mJ/cm ²	Físico	Radiación UV	50 mJ/cm ² durante 30 min	
120 mJ/cm ²	120 mJ/cm ²	Físico		120 mJ/cm ² durante 30 min	
500 mJ/cm ²	500 mJ/cm ²	Físico		500 mJ/cm ² durante 30 min	
Formaldehído 1%	F1%	Químico	Formaldehído	1%	
Formaldehído 3%	F3%	Químico		3%	
Glioxal 3%	Gly3%	Químico	Glioxal	3%	
Glutaraldehído 3%	Glu3%	Químico	Glutaraldehído	3%	
0,25% Día 0	25D0	Químico	Genipina	0,25% (día 0 tras mezclado)	
0,25% Día 1	25D1	Químico		0,25% (día 1 tras mezclado)	
0,25% Día 5	25D5	Químico		0,25% (día 5 tras mezclado)	
0,25% Día 10	25D10	Químico		0,25% (día 10 tras mezclado)	
0,50% Día 0	50D0	Químico		0,50% (día 0 tras mezclado)	
0,50% Día 1	50D1	Químico		0,50% (día 1 tras mezclado)	
0,50% Día 5	50D5	Químico		0,50% (día 5 tras mezclado)	
0,50% Día 10	50D10	Químico		0,50% (día 10 tras mezclado)	
Tgasa 0,25%	TG25	Enzimático		Transglutaminasa	0,25%
Tgasa 0,50%	TG50	Enzimático			0,50%

2.2.2 Técnicas de caracterización

2.2.2.1 Caracterización de la harina de guisante

Composición química

- Contenido proteico: El contenido proteico se determinó utilizando un microanalizador LECO CHNS-932 (Leco Corporation, EE.UU.) para medir el contenido de nitrógeno de la muestra y multiplicarlo por 6,25 (Figura 2.10). Este analizador permite conocer el contenido de C, N, H y S medidos en porcentaje con respecto al peso total. La técnica de análisis está totalmente automatizada y se basa en la combustión de las muestras en condiciones óptimas ($T = 950-1.100\text{ }^{\circ}\text{C}$, atmósfera de oxígeno puro) para convertir los elementos antes mencionados en gases simples (CO_2 , N_2 , H_2O y SO_2) para obtener un resultado cuantitativo.



Figura 2.10. Microanalizador LECO CHNS-932

Asimismo, se determinaron los contenidos de lípidos, humedad y cenizas según los métodos AOAC (2005) con ligeras modificaciones.

- Contenido en lípidos: Mediante el método Soxhlet se cuantificó el contenido de lípidos. Dicho proceso consistió en calentar y volatilizar un solvente (hexano) a 80°C y, posteriormente, condensarlo para ponerlo en contacto con la muestra (concentrado proteico de guisante). El proceso se repite un número de ciclos, aproximadamente unos 5 ciclos

permitiendo que el disolvente lixivie a los lípidos. El contenido de lípidos se calculó utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 2.2):

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{\text{Peso inicial muestra} - \text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Para su cuantificación se ha utilizado el equipo mostrado en la Figura 2.11:



Figura 2.11. Equipo de extracción Soxhlet

- Contenido en cenizas: En primer lugar, se calcinaron 2 g de muestra a 550 °C en una mufla Hobersal HD-230 (España) durante 4-5 h, eliminando toda la materia orgánica y quedando solo las cenizas (Figura 2.12). Luego, se mantuvo la muestra en un desecador, enfriando a temperatura ambiente y se pesó nuevamente. El contenido de cenizas se calculó a partir de la diferencia de peso del concentrado de proteína antes y después del tratamiento.



Figura 2.12. Mufla Hobersal HD-230

- Contenido en humedad: La humedad se determinó tratando una muestra de 1,5-2,0 g en un horno Memmert B216.1126 (Alemania) a 105 °C durante 24 h (Figura 2.9A).

El porcentaje de humedad se obtuvo mediante la Ecuación 2.3.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso inicial muestra} - \text{Peso final muestra}}{\text{Peso inicial muestra}} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Composición aminoacídica

La composición de aminoácidos de cada concentrado de proteína se obtuvo utilizando un método previamente descrito por Felix et al. (2017). Las muestras de concentrado proteico de guisante se disolvieron en ácido clorhídrico 6 M y se incubaron en una estufa a 110 °C durante 24 h. Después de la hidrólisis, el pH se ajustó a 7 usando NaOH 6 M y las muestras se filtraron a través de un filtro de microfibra de vidrio Whatman. Finalmente, las muestras se diluyeron (1:500) mediante la adición de agua bidestilada. Se realizó HPLC de fase inversa mediante derivatización de fluorescencia precolumna con o-ftaldialdehído (inyector automático SIL-9A, cromatógrafo de líquidos LC-9A (Figura 2.13), monitor de HPLC de fluorescencia RF-530, todas las partes de Shimadzu Corporation, Japón) utilizando un cartucho NovaPak C18 (Waters, EE. UU.), por el método de Lindroth y Mopper (1979) (Lindroth & Mopper, 1979).



Figura 2.13. Cromatógrafo LC-9A

Electroforesis

Los ensayos de electroforesis se realizaron con un equipo MiniProtein IV (Bio-Rad, EE.UU.). Se utilizó geles de poliacrilamida (10%) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) según el método de Laemmli (1970) (Laemmli, 1970). Los pesos moleculares de las fracciones de proteínas extraídas han sido determinados en geles SDS-PAGE, considerando la relación entre el logaritmo del peso molecular de la proteína y la movilidad electroforética, utilizando como patrón analítico “Protein Plus Protein Standards” (Bio-Rad, EE.UU.). La Figura 2.14 muestra el equipo necesario para llevar a cabo esta técnica.



Figura 2.14. Esquema de incorporación de muestra al gel de electroforesis y equipo de electroforesis MiniProtein IV

Solubilidad y Potencial-Z

Solubilidad: La solubilidad de la proteína se determinó a diferentes valores de pH (rango entre 2-10). Se prepararon dispersiones acuosas (aprox. 1 g de proteína/40 ml) con tampones a diferentes valores de pH. Las muestras se homogeneizaron mediante agitación durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron durante 20 min a 15.000 rpm y 10 °C. Los sobrenadantes se recogieron para medir el contenido de proteína por el método de Markwell (Markwell et al., 1978). Este método de análisis es una adaptación del método de Lowry, que consiste en la formación de un complejo entre la proteína soluble y

Materiales y Métodos

el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio alcalino. Para ello, una muestra de 0,4 mL se coloca en un tubo de ensayo seco y se diluye con agua hasta 10 mL. La disolución de proteínas (0,5 mL) se mezcla con 2,5 mL de una disolución alcalina de cobre (49 mL de hidróxido sódico 0,2 M + 49 mL de carbonato de sodio al 4% + 1 mL de sulfato de cobre al 1% y 1 mL de tartrato sódico-potásico al 2%) y se deja reposar durante 10 minutos. A continuación, se añaden 0,25 mL de Folin-Ciocalteu (10 mL de Folin-Ciocalteu + 10 mL de agua) y se espera durante 30 minutos. Tras este periodo, las muestras se transfieren a una cubeta de 3 mL donde se mide la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, tomando como blanco agua destilada con la misma cantidad de Folin-Ciocalteu y utilizando una curva de calibración para la cual se utiliza BSA (seroalbúmina bovina) para determinar la cantidad de proteína (Mohammed et al., 2000).

Para ello, se ha utilizado un espectrofotómetro Genesys-20 (Thermo Scientific, EE.UU.) para medir la absorbancia (Figura 2.15). La solubilidad se expresó como porcentaje (g de proteína soluble/100 g de aislado proteico en la muestra).



Figura 2.15. Espectrofotómetro Genesys-20

Potencial-Z: El punto isoelectrico se midió con un “Nano Zetasizer 2000” (Malvern Instruments, Reino Unido) (Figura 2.16). Se prepararon

muestras al 1% en peso con *buffers* a diferentes valores de pH. Antes del análisis, las muestras se agitaron a 20 °C y luego se centrifugaron a 10.000xg durante 10 min en una centrífuga RC5C Sorvall (Sorvall Instruments, EE.UU.). Posteriormente, las muestras se midieron por triplicado a 20 °C. Los valores de Potencial-Z se calcularon a partir de la movilidad electroforética utilizando la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski. El punto isoeléctrico corresponde al punto donde el valor potencial es cero, en el cual todas las cargas de las partículas son neutralizadas (Tan et al., 2008).



Figura 2.16. Analizador de potencial zeta “Nano Zetasizer 2000”

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es un tipo de espectroscopia vibracional que mide la absorción de radiación infrarroja por parte de una muestra y proporciona información sobre los grupos funcionales presentes en ella. El espectro de espectroscopia infrarroja (FTIR) se obtuvo con discos que contenían unos 2 mg de muestra usando un espectrofotómetro FT/IR-4100 (Jasco, Japón) (Figura 2.17). Los espectros se obtuvieron para un rango de número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} (con una media de 200 escaneos y con una apertura de 4 cm^{-1}) y se procesaron con el software Jasco Spectra Manager™.



Figura 2.17. Espectrofotómetro Jasco FTIR-4100

2.2.2.2 Caracterización de las masas proteicas

Propiedades fisicoquímicas

Color: El color se analizó utilizando un espectrocolorímetro KONICA MINOLTA CM-700D (Japón) (Figura 2.18). Se utilizó el promedio de 5 escaneos para determinar el valor de a y b como las coordenadas cromáticas CIELAB y L^* como la luminosidad perceptual de cada sistema. Para comparar los diferentes sistemas se obtuvieron Δa , Δb y ΔL como la diferencia entre cada sistema y el sistema de referencia.

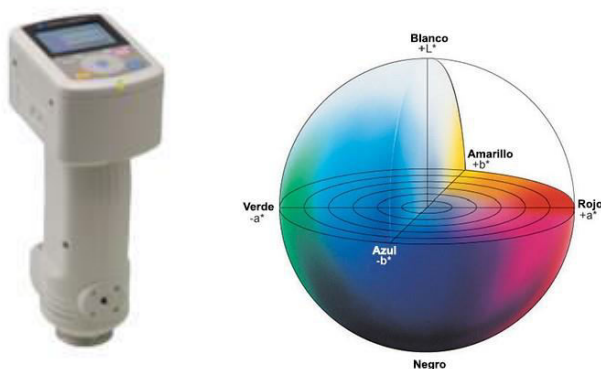


Figura 2.18. Colorímetro Konica Minolta 700D y espectro de color CIELAB.

Espectroscopía Infrarroja (FTIR): Los espectros FTIR de las mezclas a base de proteína de guisante se adquirieron en modo de transmisión utilizando un espectrómetro FTIR-4200 (JASCO, Japón) (Figura 2.19) en un rango de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} (4 cm^{-1} de

resolución). Se utilizó bromuro de potasio (KBr) como medio para preparar las diferentes muestras, que se colocaron en un soporte en el dispositivo FTIR.



Figura 2.19. Espectrómetro FTIR-4200

Calorimetría diferencial de barrido (DSC): De 10 a 20 mg de las diferentes muestras se sellaron en bandejas de aluminio y se colocaron en el calorímetro DSC Q250 (TA Instruments, EE. UU.) (Figura 2.20). Las pruebas se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno a un caudal de $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ mientras se aplicaba un programa de temperatura por calentamiento de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $280 \text{ }^\circ\text{C}$ a $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.



Figura 2.20. Calorímetro DSC Q250

Análisis termogravimétrico (TGA): La pérdida de masa de las diferentes mezclas a base de proteína de guisante, así como de los materiales puros a medida que aumenta la temperatura se determinó mediante pruebas TGA, las cuales se realizaron con un analizador térmico Q-50 (TA Instruments, EE.UU.) en atmósfera de nitrógeno (Figura 2.21). Se

colocaron entre 10 y 20 mg de muestra en una bandeja de platino y posteriormente se aplicó una rampa de temperatura de 30 °C a 600 °C, a 10 °C min⁻¹.

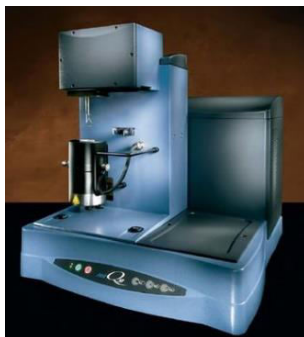


Figura 2.21. Analizador térmico Q-50

Estudio reológico: Rampas de temperatura

Los ensayos de caracterización reológica de masas se realizan en un equipo de deformación controlada ARES (TA Instruments, EE.UU.) (Figura 2.22). En dicho equipo se llevaron a cabo rampas de temperatura a una velocidad de 5°C/min desde 20 a 100 °C a una deformación inferior a la deformación crítica. Para ello, anteriormente se realizan barridos de deformación (0,002-1% a una frecuencia constante de 1 Hz) a diferentes temperaturas entre el intervalo evaluado para conocer el intervalo viscoelástico lineal. Estas rampas de temperatura permiten conocer la evolución del comportamiento reológico de las masas con la temperatura y así seleccionar las condiciones de inyección. Para ello se evalúan los módulos viscoelásticos (G' y G''), así como la viscosidad compleja (η^*) que se calcula matemáticamente con la Ecuación 2.4:

$$|\eta^*| = \frac{\sqrt{(G')^2 + (G'')^2}}{\omega} \quad (2.4)$$

siendo G' y G'' los módulos elástico y viscoso, respectivamente, y ω es la frecuencia angular.

La temperatura se controla mediante un sistema Peltier conectado a un baño termostatzado. Los sistemas sensores utilizados son del tipo placa-placa con un diámetro de 40 mm, una distancia entre placas (gap) de 2 mm y superficie rugosa para evitar el fenómeno de deslizamiento.



Figura 2.22. Reómetro de deformación controlada ARES.

Propiedades morfológicas

Microscopía Confocal: La masa seleccionada fue observada con el microscopio confocal LSM7 DUO (Alemania) (Figura 2.23), usando luz transmitida, con el objetivo de evaluar el grado de mezcla entre la glicerina y el concentrado proteico. La lente usada fue de $x100$ usando el láser de Argón a una longitud de onda de excitación de 488 y la emisión fue recogida entre 520 y 690 nm. En este caso se aprovecha el hecho de que las proteínas de guisante son autofluorescentes (Novák, 2011).



Figura 2.23. Microscopio confocal LSM7 DUO.

2.2.2.3 Caracterización de los bioplásticos proteicos

Una vez que se han conformado los bioplásticos, se procede a caracterizarlos. A continuación, se describen los ensayos realizados:

Propiedades fisicoquímicas

Grado de entrecruzamiento: El grado de entrecruzamiento se determina con la finalidad de evaluar las modificaciones producidas en la microestructura de los bioplásticos con la adición de la etapa de entrecruzamiento. Para ello, se utiliza el mismo protocolo usado en trabajos anteriores (Jiménez-Rosado et al., 2020; Zárate-Ramírez et al., 2014c). Este protocolo consiste en desnaturalizar la proteína no entrecruzada durante la elaboración del bioplástico para solubilizarla y poder calcular su concentración. Así, se prepara una disolución desnaturalizante fresca consistente en una mezcla de 0,086 mol/L de tris base, 0,045 mmol/L de glicina, 2 mmol/L EDTA, 10 g/L de dodecilsulfato de sodio (SDS) a pH 6. Una porción de cada bioplástico ($15 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$) se sumerge en 10 mL de esta disolución desnaturalizante durante 2 h en agitación magnética a 500 rpm. Tras estas 2 h el bioplástico se retira y se procede a evaluar la proteína disuelta en la disolución, la cual corresponde con la proteína no entrecruzada del bioplástico. Esta fracción de proteínas se determina a través del método de Lowry (Markwell et al., 1978).

Para seguir el método Lowry, a 1 mL de muestra se le añade 3 mL de reactivo C. Este reactivo se prepara mezclando el reactivo A (consistente en 30 g de Na_2CO_3 , 4 g de NaOH, 1,6 g de tartrato sodio-potasio y 10 g SDS disueltos en 1 L de agua MiliQ) y B (consistente en 2 g de CuSO_4 disueltos en 50 mL de agua destilada) en una proporción 100:1. Esta mezcla se deja incubar durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se le añaden 0,3 mL de reactivo de Folin previamente

diluido 1:1 con agua destilada. La mezcla se deja incubar nuevamente durante 45 min en oscuridad, donde se teñirá de azul dependiendo de la cantidad de proteína disuelta. Este color azul se mide mediante un espectrofotómetro Genesys20 (Thermo Scientific, EE.UU.) a 660 nm (Figura 2.15).

Cabe recalcar que todo este procedimiento se realiza también con un bioplástico de referencia (control) sin ningún tratamiento de entrecruzamiento y con la disolución desnaturalizante sin ningún bioplástico (blanco). El grado de entrecruzamiento de cada bioplástico se estima en relación con el control (0% entrecruzado) y el blanco (100% entrecruzado) a través de una recta de regresión. De esta forma, el entrecruzamiento producido a los bioplásticos por los diferentes tratamientos de entrecruzamientos estudiados puede evaluarse respecto al bioplástico procesado por el método tradicional (sin ningún tratamiento de entrecruzamiento).

Transparencia: Las medidas de transparencia se llevan a cabo en un espectrofotómetro Genesys-20 (Thermo Scientific, EE.UU.) (Figura 2.15). En este dispositivo se mide la transmitancia (%) de muestras rectangulares, 1 mm de espesor, a una longitud de onda seleccionada de 600 nm. El aire es usado como blanco (100% de transmitancia).

Con el objeto de comparar adecuadamente los índices de refracción en función del contenido de cada una de las proteínas se plantean el índice de transparencia (IT) (Ecuación 2.5), normalizando el valor de la transmitancia con el valor de la misma para el bioplástico tomado como referencia.

$$IT = \frac{\% \text{Transmitancia}}{\% \text{Transmitancia de Bioplástico de referencia (A)}} \cdot 100 \quad (2.5)$$

Color: El color se analizó utilizando un espectrocolorímetro KONICA MINOLTA CM-700D (Japón) (Figura 2.18). Se utilizó el promedio de 5 escaneos para determinar el valor de a y b como las coordenadas cromáticas CIELAB y L^* como la luminosidad perceptual de cada sistema. Para comparar los diferentes sistemas se obtuvieron Δa , Δb y ΔL como la diferencia entre cada sistema y el sistema de referencia.

Ángulo de contacto: La hidrofobicidad de los bioplásticos se ha determinado con medidas de ángulo de contacto utilizando el análisis de la gota sésil (5 μL) con un tensiómetro óptico (Theta Flex, Biolin Scientific) (Figura 2.24).



Figura 2.24. Tensiómetro óptico (Theta Flex, Biolin Scientific)

El valor del ángulo de contacto se ha obtenido a partir del valor promedio de los ángulos obtenidos a izquierda y derecha de la gota (Figura 2.25).

$$\text{Ángulo} = (x+y) / 2$$



Figura 2.25. Ilustración del cálculo del ángulo de contacto

Propiedades mecánicas

Ensayos de flexión: Se llevaron a cabo ensayos de flexión siguiendo la norma D5023 y utilizando probetas rectangulares en un analizador mecánico-dinámico RSA3 (TA Instruments, EE.UU.) con una geometría “dual cantilever” (Figura 2.26). Para ello, la probeta se sujeta por los extremos mientras se somete a flexión oscilatoria en el centro. En primer lugar, se realizaron barridos de deformación (0,002-1% de deformación a una frecuencia constante de 1 Hz) para evaluar el rango viscoelástico lineal de los diferentes sistemas. Luego, se realizaron barridos de frecuencia (0,02-20 Hz) a una deformación constante dentro del rango viscoelástico lineal obtenido de barridos de deformación realizados anteriormente. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. En estos ensayos se recogen los valores de los módulos viscoelásticos (E' y E'' correspondientes a los módulos elásticos y viscosos, respectivamente) así como la relación entre ellos ($\tan \delta = E''/E'$). E' y $\tan (\delta)$ a 1 Hz (E'_1 y $\tan (\delta)_1$ respectivamente) fueron seleccionados y tabulados para una mejor comparación entre los sistemas.

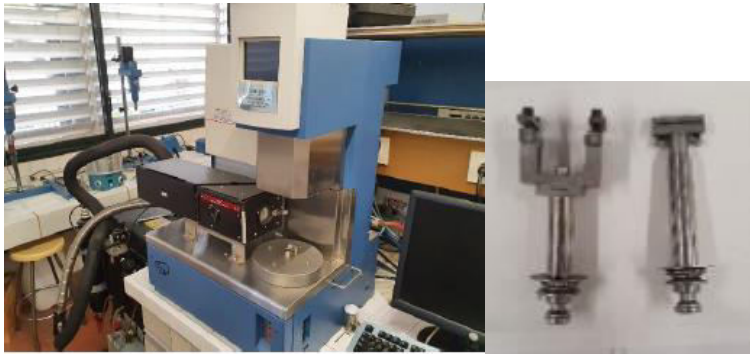


Figura 2.26. Analizador dinámico-mecánico RSA3 y geometría “dual cantilever” utilizada.

Ensayos de tracción: Uno de los ensayos realizados para determinar alguna de las propiedades mecánicas de los bioplásticos se realizan

Materiales y Métodos

ensayos de elongación hasta la ruptura de las probetas, de acuerdo a la norma ISO 527-2:1993, empleando la máquina universal de ensayos “Insight” 10 kN de MTS (EE.UU.). 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, conducido por el movimiento de los tornillos de bola con los que se conecta a las columnas. Las probetas se sujetan al sistema por dos mordazas (Figura 2.27). 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 probetas por sistema, empleando probetas definidas por la norma ISO 527-2 (*ISO 527-2:2012. Plastics—Determination of Tensile Properties-Part 2: Test Conditions for Moulding and Extrusion Plastics*, 2012) y una velocidad extensional de 10 mm/min a temperatura ambiente. En los ensayos de tracción vamos a estudiar cómo influyen las condiciones de inyección en la deformación en la rotura, el módulo de Young y el esfuerzo máximo.



Figura 2.27. Máquina universal de ensayos “Insight”

Propiedades funcionales

Capacidad de absorción de agua: La capacidad de absorción de agua de los bioplásticos se mide de acuerdo con la norma ASTM D570 (*ASTM D570-98: Standard Test Method for Water Absorption Of Plastics*, 2005), método estandarizado para la determinación de absorción de agua en plásticos. Para tal fin se utilizan las probetas rectangulares. Las muestras se someten a secado (acondicionamiento) en estufa a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ durante unas 1-2 horas para determinar su peso en seco, luego se introducen en agua destilada y se pesan a las 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 (Ecuaciones 2.6 y 2.7):

$$\% \text{ Absorción Agua} = \frac{\text{Peso Húmedo} - \text{Peso Seco Inicial}}{\text{Peso Seco Inicial}} \cdot 100 \quad (2.6)$$

$$\% \text{ Pérdida Soluble} = \frac{\text{Peso Seco Inicial} - \text{Peso Seco Final}}{\text{Peso Seco Inicial}} \cdot 100 \quad (2.7)$$

Estudios de biodegradabilidad: La biodegradabilidad de los bioplásticos se ha medido de manera indirecta evaluando la compostabilidad. Dicho estudio se ha llevado a cabo enterrando los bioplásticos a temperatura ambiente en un medio de compostaje con una saturación en agua del 80% (2:1 tierras de cultivo: compost, la misma proporción de materiales inertes/orgánicos especificada por ISO 20200 (*ISO 20200:2004. Plastics — Determination of the Degree of Disintegration of Plastic Materials under Simulated Composting Conditions in a Laboratory-Scale Test*,

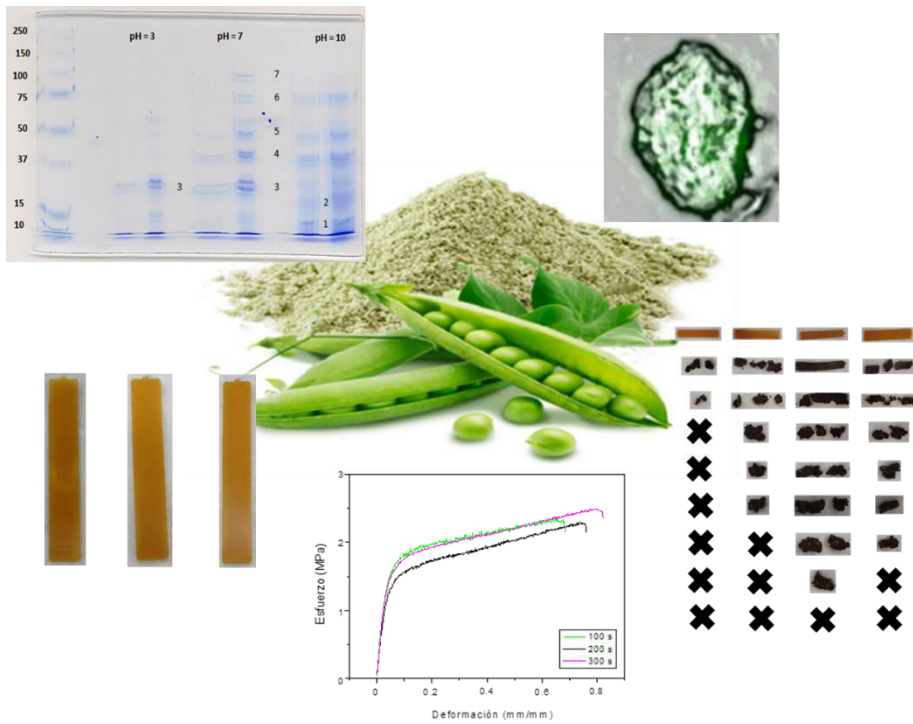
Materiales y Métodos

2004). Se evaluaron al menos tres bioplásticos rectangulares de cada sistema desenterrándolos para ser evaluados visualmente en diferentes días, tomándose fotografías de todos los sistemas para este fin. El ensayo finaliza cuando el bioplástico no pudo ser desenterrado (tiempo total de degradación).

2.2.3. Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres repeticiones para cada medición. La prueba t de Student y el análisis de varianza unidireccional ($p < 0,05$) se realizaron utilizando PASW Statistics para Windows (Versión 18: SPSS, Chicago, IL). Se calcularon las desviaciones estándar para los parámetros seleccionados.

Capítulo 3: Resultados y Discusión



3.1 Caracterización de la materia prima

3.1.1. Caracterización de la harina de guisante

3.1.1.1 Composición química y aminoacídica

La composición química de la harina de guisante se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición química de la harina de guisante

Materia Prima	COMPOSICIÓN			
	Proteína (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)	Humedad (%)
Harina de Guisante	89,5 ± 0,7	3,5 ± 0,2	1,4 ± 0,6	5,1 ± 0,1

La cantidad de proteína se ha obtenido multiplicando la cantidad de nitrógeno, obtenido mediante microanálisis, por el factor 6,25 (Etheridge et al., 1998). Como la concentración de proteína presente es superior a un 90% en base seca, se puede considerar como aislado proteico según la clasificación de Pearson (1983). Por otro lado, y utilizando los métodos expuestos en la parte experimental se llegan a encontrar bajos porcentajes de cenizas, lípidos y humedad. Estos resultados son similares a los obtenidos por Tömösközi et al. (2001).

Además, la Tabla 3.2 muestra la composición aminoacídica del aislado proteico de guisante. El perfil aminoacídico muestra que los ácidos glutámico y aspártico como los aminoácidos presentes en una mayor proporción (17,4 and 11,9 g/100g, respectivamente). Además, presenta un elevado contenido en lisina, leucina y arginina (8,2; 7,9 y 8,6 g/100g, respectivamente). Resultados similares fueron encontrados por otros autores para el aislado proteico de guisante (Gorissen et al., 2018; Leterme et al., 1990).

Tabla 3.2. Composición aminoacídica de la proteína de guisante (g/100g). *se refiere a los aminoácidos esenciales.

Aminoácido	Proteína de guisante
Alanina	4,1 ± 0,1
Arginina	8,6 ± 0,1
Ácido aspártico	11,9 ± 0,1
Cisteína	1,8 ± 0,1
Ácido glutámico	17,4 ± 0,1
Glicina	3,8 ± 0,1
Histidina*	1,9 ± 0,1
Isoleucina*	3,3 ± 0,1
Leucina*	7,9 ± 0,1
Lisina*	8,2 ± 0,1
Metionina*	0,7 ± 0,1
Fenilalanina*	5,3 ± 0,1
Prolina	3,6 ± 0,1
Serina	5,4 ± 0,1
Treonina*	3,4 ± 0,1
Triptófano*	0,2 ± 0,1
Tirosina	3,4 ± 0,1
Valina*	3,6 ± 0,1

3.1.1.2 Electroforesis

En la Figura 3.1 se puede observar las bandas resultantes de la electroforesis del aislado proteico de guisante donde aparecen las distintas fracciones proteicas. Es importante mencionar que la movilidad de cada fracción proteica depende de su tamaño. Cuanto más grandes son las fracciones, más dificultades encuentran para moverse a través de la red interna del gel de electroforesis y, por tanto, aparecen en la zona alta de la figura y viceversa. Por lo tanto, a partir de los pesos moleculares del patrón, se puede calcular el peso de las siete fracciones proteicas, comprobando qué proteína se corresponde con cada peso molecular (PM).

Resultados y Discusión

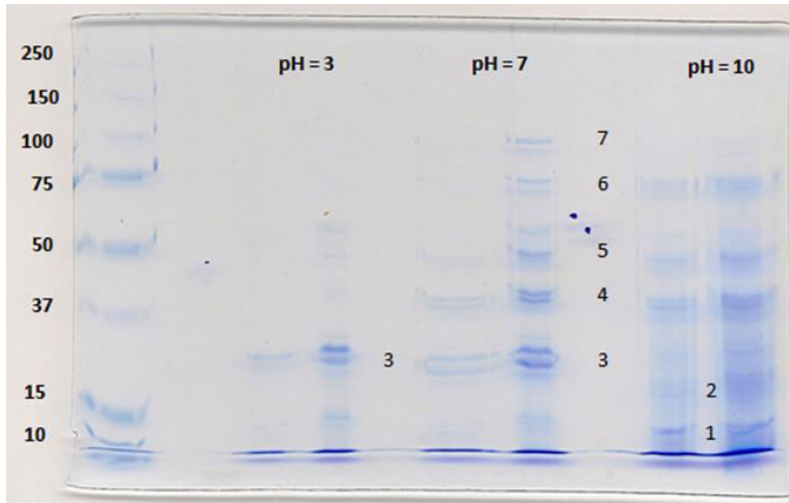


Figura 3.1. SDS-PAGE Electroforesis del aislado proteico de guisante.

La presente placa de electroforesis (Figura 3.1) muestra bandas entre 13 y 97 kDa que proceden principalmente de legumina y vicilina. Esta última es una proteína trimérica compuesta de 3 subunidades polipeptídicas principales con un peso molecular de 30-35, 50 y 70 kDa (ésta última recibe el nombre de convicilina), además de otros componentes de menor PM (12,5-19 kDa) (Shand et al., 2007; Taherian et al., 2011). Por otro lado, se observan una señal a 23 kDa a pH = 3 que corresponde con la subunidad básica (β) (19-22 kDa) de la legumina y una señal característica a 38 kDa a pH = 10 correspondiente a su subunidad ácida (α) (38-40 kDa), que aparece sobre todo en condiciones reductoras de acuerdo a los encontrado por otros autores (Liang & Tang, 2013; Shand et al., 2007; Taherian et al., 2011). La fracción proteica que se corresponde con el peso molecular más elevado (90-97 kDa) es la lipooxigenasa, que suele aparecer en proteínas de leguminosas, tales como soja como de guisante (Liang & Tang, 2013; Shand et al., 2007). Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Fracciones proteicas del aislado proteico de guisante identificadas en función del análisis y en comparación con la bibliografía

Patrón		Señal	Peso Molecular (P.M.) (kDa)	Proteína	Peso encontrado en bibliografía (kDa)
Marca	P.M. (kDa)	1	13	Vicilina	12,5-19
1	10	2	18	Vicilina	12,5-19
2	15	3	23	Legumina Básica	19-22
3	37	4	38	Legumina Ácida	38-40
4	50	5	47	Vicilina	50
5	75	6	73	Convicilina	70
6	100	7	97	Lipooxigenasa	90-97
7	150				
8	250				

3.1.1.3 Solubilidad proteica y Potencial-Z

Los valores de solubilidad y potencial-Z de la proteína de guisante se muestra en la Figura 3.2.

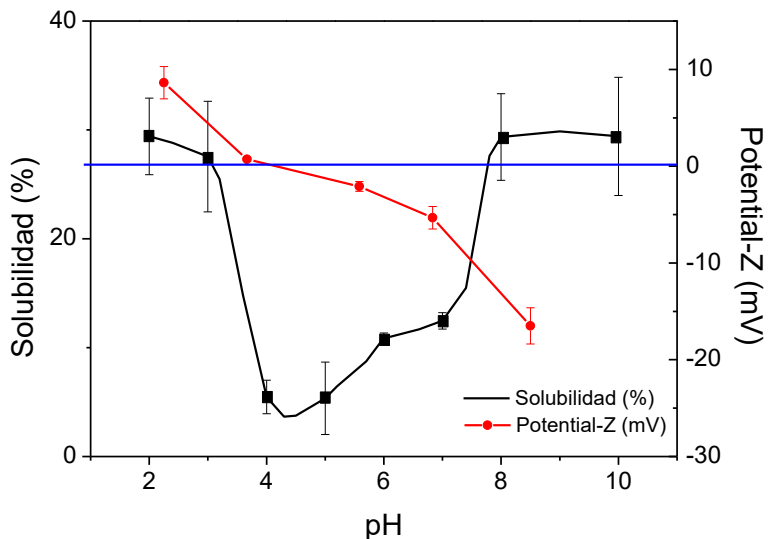


Figura 3.2. Solubilidad proteica (%) y Potencial-Z (mV) de la proteína de guisante.

Resultados y Discusión

Se puede observar como para la proteína de guisante, la solubilidad alcanza unos valores máximos cercanos al 30 %. El perfil obtenido concuerda con anteriores estudios llevados a cabo por otros autores, apareciendo un mínimo de solubilidad entre pH 4-6 que corresponde con su punto isoeléctrico (Osen et al., 2014; Shand et al., 2007). Por otro lado, el perfil de potencial-Z mostró un cambio en el potencial eléctrico de valores positivos a negativos de pH ácido a básico, pasando por un valor nulo cercano a pH 4-6, coincidiendo con el perfil de solubilidad de la proteína de guisante.

3.1.1.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro FTIR de la proteína de guisante se muestra en la Figura 3.3.

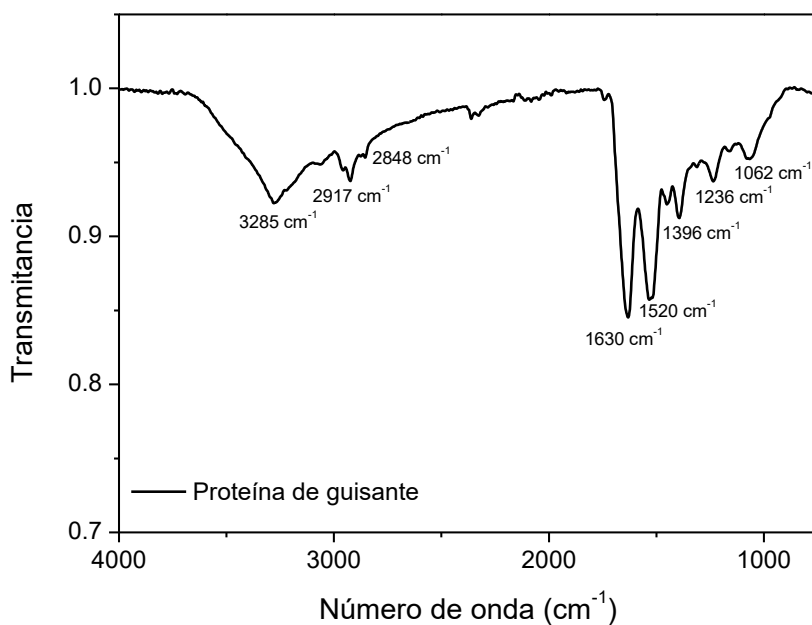


Figura 3.3. Espectro FTIR de la proteína de guisante.

A partir de dicho perfil se han obtenido los picos más destacados, encontrándose resumidos en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Picos y asignaciones observados en el espectro FTIR para la proteína de guisante.

SEÑAL	REGIÓN	PICO (cm ⁻¹)	ASIGNACIÓN	REFERENCIA
		Proteína de Guisante		
A	Amida A	3285	Tensión N-H	(Muyonga et al., 2004)
B	Amida B	2917	Tensión asimétrica CH ₂	
C		2848	Tensión simétrica CH ₂	
D	Amida I	1630	Tensión C=O	(Vidal & Mello, 2011)
E	Amida II	1520	Flexión N-H acoplada con Tensión C-N	(Türker-Kaya & Huck, 2017)
F		1396	Vibración CH ₂ de la prolina	
G	Amida III	1236	Flexión N-H	
H		1062	Tensión cadena	

El espectro obtenido para la proteína de guisante presenta picos característicos de FTIR según la tensión y la flexión de sus diferentes enlaces. Una banda correspondiente a la tensión N-H (señal Amida A) aparece en el rango 3400-3200 cm⁻¹, ocurriendo a 3285 cm⁻¹ para la proteína de guisante. Otra señal asociada a la tensión asimétrica de CH₂ se presenta entre 2940 y 2900 cm⁻¹ (señal de Amida B, mostrada en 2917 cm⁻¹ para el guisante). Además, la absorción de la banda amida I producida por la tensión C=O está entre 1700-1600 cm⁻¹, siendo característica para la proteína de guisante a 1630 cm⁻¹. Finalmente, las señales para la flexión N-H (bandas Amida II y III) se presentan en el rango 1550-1520 cm⁻¹ y 1245-1235 cm⁻¹, respectivamente. Específicamente, para la proteína de guisante, estas señales aparecen a 1520 y 1236 cm⁻¹ (Türker-Kaya & Huck, 2017).

3.2 Optimización de las condiciones de procesado

3.2.1. Evaluación de la etapa de mezclado

Durante el mezclado se lleva a cabo un control de la temperatura y registrando el par de torsión a lo largo del tiempo con el objeto de optimizar las condiciones de mezclado. Esto es, obtener una masa homogénea (buen grado de mezcla) evitando tiempos muy elevados, ya que supondrían una estructuración de la masa al empezar a ocurrir reacciones de entrecruzamiento.

El primer paso es la elección de una adecuada mezcla proteína/plastificante que permita llevar a cabo el proceso de inyección de manera óptima. Para ver qué cantidad era la óptima para crear el bioplástico, se estudiaron cuatro mezclas con diferentes proporciones de aislado proteico de guisante y glicerina: 50/50, 60/40, 70/30 y 80/20 (porcentaje en peso, p/p). Las masas se han preparado controlando el par de torsión y la temperatura de la mezcla (60 minutos, 50 rpm y 25 °C).

En la Figura 3.4 se muestran los perfiles del par de torsión y de temperatura obtenidos experimentalmente para un tiempo determinado (60 minutos) para cada una de las diferentes proporciones de aislado proteico de guisante y glicerina. A partir de las imágenes obtenidas de las masas anteriores se han rechazado las concentraciones 80/20 y 70/30 al ser demasiado pulverulenta debido a que no tienen suficiente plastificante (Figuras 3.4F y 3.4H), lo que se comprueba por su perfil al tener un par de torsión muy elevado e irregular y un marcado aumento abrupto de la temperatura desde los primeros momentos de mezclado. Además, la mezcla 50/50 es demasiado líquida por tener un exceso de glicerina en la mezcla (Figura 3.4B), haciendo que el par de torsión se mantenga muy bajo en todo momento (entre 1,5 y 2 N·m) y evidenciando una exudación del plastificante.

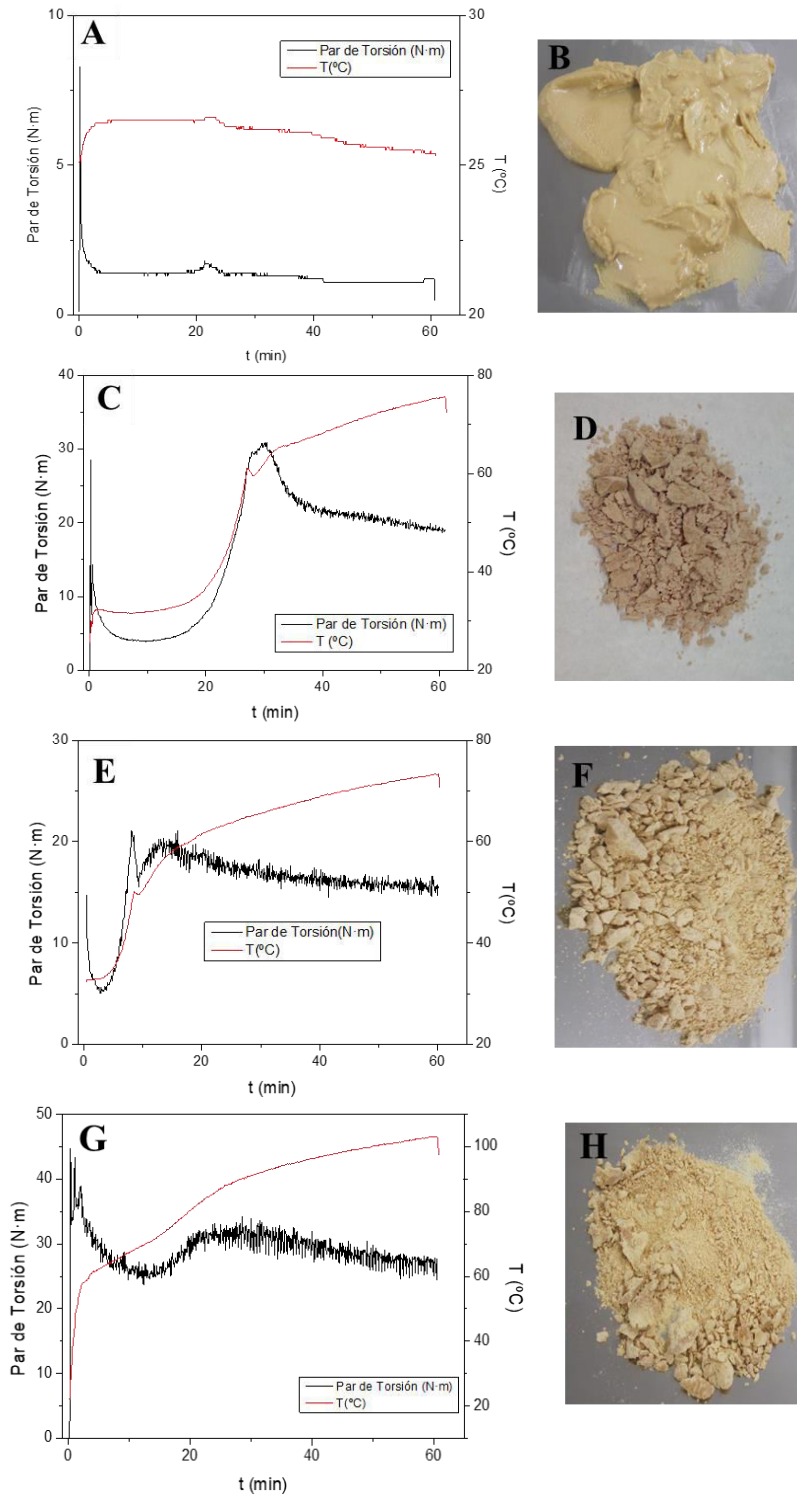


Figura 3.4. Perfil de mezclado e imágenes de las masas obtenidas: (A) y (B) (50/50), (C) y (D) (60/40), (E) y (F) (70/30) y (G) y (H) (80/20).

Resultados y Discusión

En este sentido, se selecciona la proporción 60/40 como la más adecuada para la fabricación de bioplásticos. A continuación, una vez decidida cuál será la proporción adecuada (60/40), se debe de comprobar qué tiempo de mezclado será el óptimo, escogiendo zonas donde el par se mantenga constante y no se produzcan aumentos del par de torsión y de la temperatura relacionados con reacciones de entrecruzamiento.

En la siguiente figura (Figura 3.5) se muestra el perfil del par de torsión y temperatura para la mezcla preparada (60/40) durante los 60 minutos de mezclado. Para la mezcla se seleccionaron, de forma preliminar, tres posibles tiempos de mezclado: uno correspondiente con el mínimo par de torsión, otro cuando se produce el aumento del par de torsión y un tercero cuando el par de torsión ya se encuentra estabilizado.

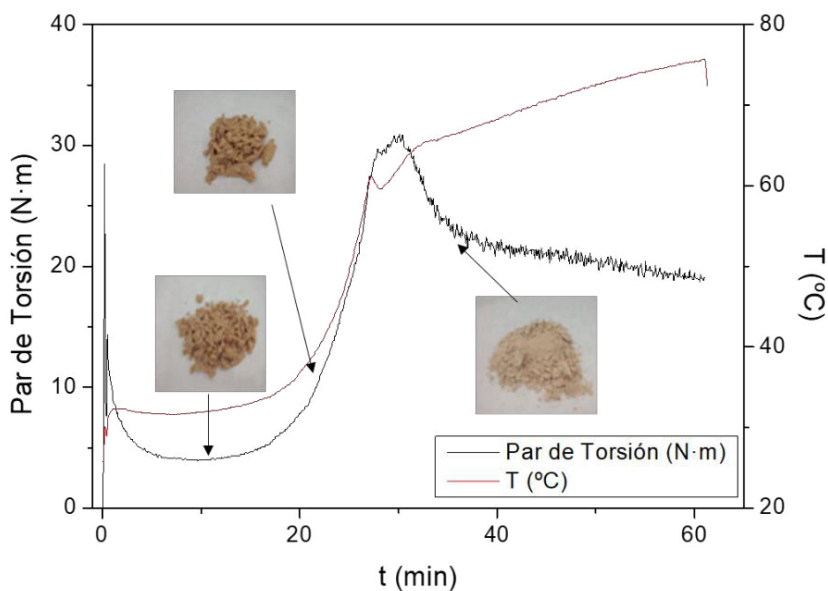


Figura 3.5. Evolución del par de torsión y temperatura durante el mezclado. Fotografías de las masas de aislado proteico de guisante/glicerina (60/40) con diferentes tiempos de mezclado

En primer lugar, se rechaza el tiempo de mezclado más elevado ya que se están produciendo fenómenos de entrecruzamiento que se constata con el aumento de temperatura observado (además de tratarse de una mezcla bastante pulverulenta). Para distinguir entre los dos tiempos de mezclado más bajos, se escoge la de menor tiempo de mezclado (10 min) evitando así los efectos de entrecruzamiento relacionados con un tratamiento prolongado a una elevada temperatura y por presentar los menores valores de SME (611 kJ/kg a los 10 min frente a 873 kJ/kg a los 21 min).

Con el fin de optimizar las condiciones de inyección se ha estudiado el comportamiento reológico de la masa seleccionada. El objetivo es conseguir la máxima eficiencia en el flujo de la masa desde la cámara de preinyección al molde. Para ello la viscosidad de la mezcla ha de ser mínima para que la energía que se precise para la inyección sea menor. Además, al ser mínima la viscosidad la presión aplicada en la inyección es mínima, facilitando el llenado y la homogeneidad del molde, dando lugar a mejores piezas plásticas con comportamientos más reproducibles. Para el estudio de la viscosidad con la temperatura, se realizaron rampas de temperaturas (Figura 3.6), monitorizando la evolución de la viscosidad compleja. En todo el intervalo de temperatura, G' se encuentra por encima de G'' ya que, en todos los casos estudiados la masa tiene más carácter elástico que viscoso. Se observa que, para la mezcla seleccionada, el mínimo de viscosidad compleja se encuentra en el rango de temperatura entre 65 y 80 °C. Esta información es de utilidad para el procesado por inyección, en concreto para la selección de las temperaturas de trabajo. Por un lado, en la cámara de pre-inyección se debe elegir una temperatura próxima al mínimo de viscosidad para permitir que fluya la muestra hacia el molde (50-60 °C), por otro, en el

Resultados y Discusión

molde se ha de escoger una temperatura elevada para que tenga lugar la estructuración del material.

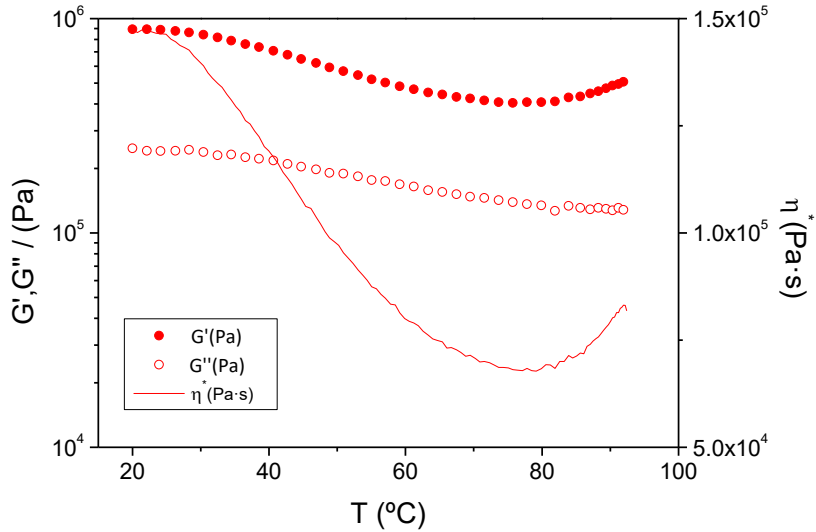


Figura 3.6. Rampa de temperatura de la masa 60/40 (proteína/glicerina)

A continuación, en la Figura 3.7 se muestran las imágenes de microscopía confocal del sistema seleccionado.

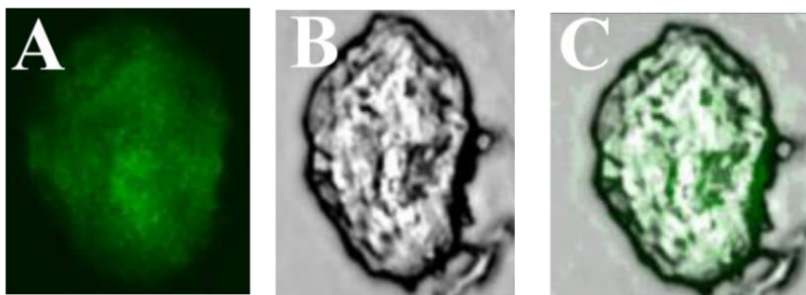


Figura 3.7. Imágenes de microscopía confocal (A) fluorescencia, (B) luz transmitida y (C) la superposición de ambas para la masa obtenida para el sistema seleccionado con un aumento del 40x.

Esta técnica se emplea con el objetivo de comprobar de manera cualitativa la homogeneidad (grado de mezcla) de las mezclas tras el

proceso de mezclado. En la figura anterior se pueden observar tres imágenes del sistema estudiado. La primera imagen (Figura 3.7A) corresponde a la fluorescencia hallada en la muestra que en este caso corresponde a las proteínas de guisante que se ha observado que son autofluorescentes (Haynes et al., 2004). La segunda imagen (Figura 3.7B) corresponde a la reflexión con tonalidades de grises y permite ver la perspectiva tridimensional de los granos de la mezcla. Finalmente, la Figura 3.7C corresponde a la que tiene tonos de grises y verde, siendo una unión de las dos anteriores. De acuerdo con lo observado en las imágenes, se puede comprobar que el sistema presenta una buena homogeneización al mostrar una distribución homogénea de color por toda la imagen.

3.2.2. Evaluación de la etapa de inyección

Tras los resultados obtenidos de los barridos de calorimetría diferencial y de las rampas de temperatura, se seleccionan las condiciones para la inyección de las masas. La temperatura de la cámara de pre-inyección de referencia de la masa es de 50 °C, temperatura cercana al mínimo de viscosidad. Se selecciona una temperatura del molde de 130 °C la cual no alcanza la temperatura de desintegración de la proteína, pero permite una adecuada estructuración. Por último, tanto la presión de inyección como el tiempo en el molde se tomaron a 500 bar y 200 s por estudios previos que demostraron que con esos parámetros se obtenía una probeta adecuada (Félix et al., 2014). A partir de esas condiciones de referencia se irán modificando algunos parámetros (la temperatura del molde, el tiempo en el molde y la presión de inyección) para ver cómo influyen en las probetas finales de bioplásticos. La variación de estos parámetros durante el proceso de inyección son los siguientes:

- Temperatura del molde: 110, 130 y 150 °C
- Tiempo en el molde: 100, 200 y 300 s
- Presión de Inyección: 100, 300, 500 y 900 bar

En la Tabla 3.5 se presentan las condiciones de inyección llevadas a cabo para la obtención de los bioplásticos estudiados.

Tabla 3.5. Condiciones de inyección seleccionadas para los diferentes sistemas

SISTEMAS	Temperatura Cilindro (°C)	Temperatura Molde (°C)	Presión Inyección (bar)	Tiempo en Molde (s)
Referencia	50	130	500	200
Tiempo en el molde	50	130	500	100
	50	130	500	300
Temperatura en molde	50	110	500	200
	50	150	500	200
Presión de Inyección	50	130	100	200
	50	130	300	200
	50	130	900	200

A cada grupo de sistemas con condiciones diferentes se les ha designado con una letra, teniendo 4 grandes grupos: Sistema de referencia, variación del tiempo en el molde, variación de temperatura del molde y variación de la presión de inyección.









Referencia	Efecto tiempo en molde		Efecto temperatura del molde		Efecto presión de inyección		
130 °C 500 bar 200 s	130 °C 500 bar 100 s	130 °C 500 bar 300 s	110 °C 500 bar 200 s	150 °C 500 bar 200 s	130 °C 100 bar 200 s	130 °C 300 bar 200 s	130 °C 900 bar 200 s
							

Figura 3.8. Imágenes de los bioplásticos resultantes de las diferentes condiciones estudiadas

Tal y como puede verse en la Figura 3.8, todas las probetas presentan una apariencia similar a la tomada como estándar o referencia, salvo la probeta procesada a 150 °C que se descarta al estar quemada como consecuencia de la elevada temperatura utilizada.

3.2.2.1. Efecto de la temperatura del molde

En primer lugar, se estudia el efecto de la temperatura del molde (110 y 130 °C) (Tabla 3.5) sobre las propiedades mecánicas y funcionales de los bioplásticos obtenidos a partir de proteína de guisante. La Figura 3.9 muestra los resultados de los ensayos de tracción hasta rotura.

Todas las curvas esfuerzo–deformación presentan una elevada pendiente inicial (que se corresponde con el módulo de Young), debido a una buena resistencia a bajas deformaciones (85 y 50 MPa para los sistemas obtenidos a 110 y 130 °C, respectivamente). A continuación, va

Resultados y Discusión

disminuyendo la pendiente hasta que finalmente se produce la rotura de las probetas. En este punto de rotura se produce una caída súbita en el valor del esfuerzo. Los valores inmediatamente anteriores a la ruptura proporcionan los parámetros denominados esfuerzo máximo y deformación en la rotura.

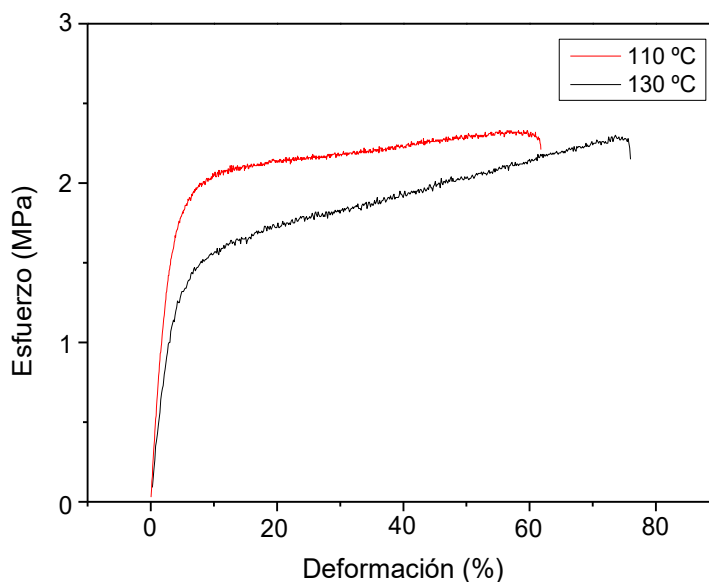


Figura 3.9. Perfiles de tracción de bioplásticos de guisante obtenidos variando la temperatura de molde (110 y 130 °C)

A partir de los perfiles de tracción se obtienen los diferentes parámetros (módulo de Young, esfuerzo máximo y deformación en la rotura) mostrados en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción: Módulo de Young (MPa), esfuerzo máximo (MPa) y deformación en la rotura (%) de bioplásticos de guisante obtenidos variando la temperatura de molde (110 y 130 °C)

Temperatura del Molde	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
110 °C	84,56 ± 1,88 ^A	2,82 ± 0,34 ^a	56,8 ± 2,5 ^α
130 °C	59,58 ± 5,95 ^B	2,83 ± 0,32 ^a	71,8 ± 2,0 ^α

Comparando los datos obtenidos para las probetas de referencia y para aquellas elaboradas a una temperatura de molde inferior se observa que el esfuerzo máximo se mantiene constante, mientras que el módulo de Young aumenta al disminuir la temperatura del molde. Sin embargo, la deformación en la rotura disminuye cuando la temperatura del molde es menor. En otras palabras, un aumento de la temperatura del molde produce sistemas menos rígidos y más deformables.

Además de evaluar las propiedades mecánicas, se han analizado la capacidad de absorción de agua y la transparencia de los sistemas. La evolución de la capacidad de absorción de agua de los sistemas con la temperatura del molde se muestra en la Figura 3.10.

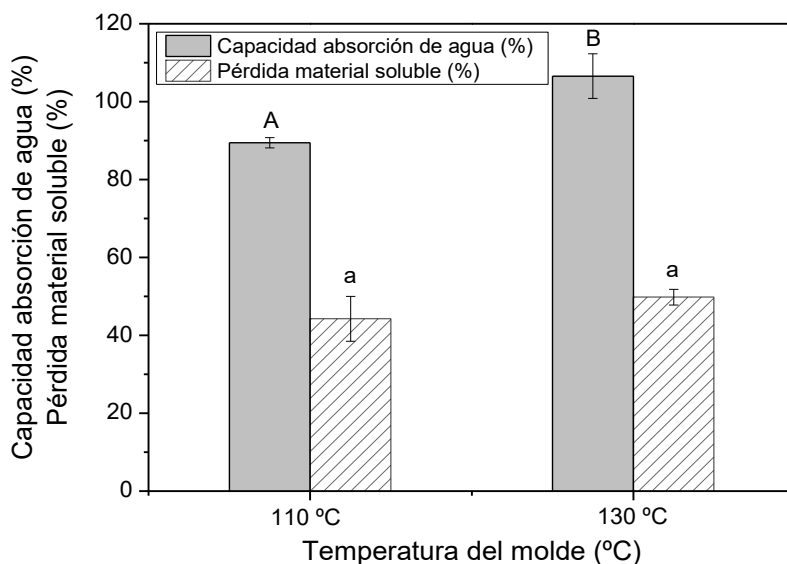


Figura 3.10. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de bioplásticos de guisante obtenidos variando la temperatura de molde (110 y 130 °C)

Tal y como puede comprobarse, la pérdida de material soluble se sitúa en torno un 45-48%, correspondiéndose con la cantidad de glicerina presente (un 40%), además de un pequeño porcentaje de proteína debido a su alta solubilidad. Por otro lado, la capacidad de absorción de agua es

Resultados y Discusión

muy elevada, situándose por encima del 90%, denotando el carácter hidrofílico de estos sistemas. Los valores de absorción son superiores cuando la temperatura del molde es inferior, probablemente debido a la menor estructuración de la probeta de bioplásticos, como consecuencia de un menor grado de entrecruzamientos inducidos durante el procesado. Por otra parte, el estudio de la transparencia (Figura 3.11) de las probetas reveló que al aumentar la temperatura del molde disminuye la transparencia de la probeta obtenida. La transparencia de las probetas disminuye cuanto más cristalinas sean (Menges et al., 2002), por lo tanto, el aumento de la temperatura de molde aumenta la cristalinidad de los sistemas.

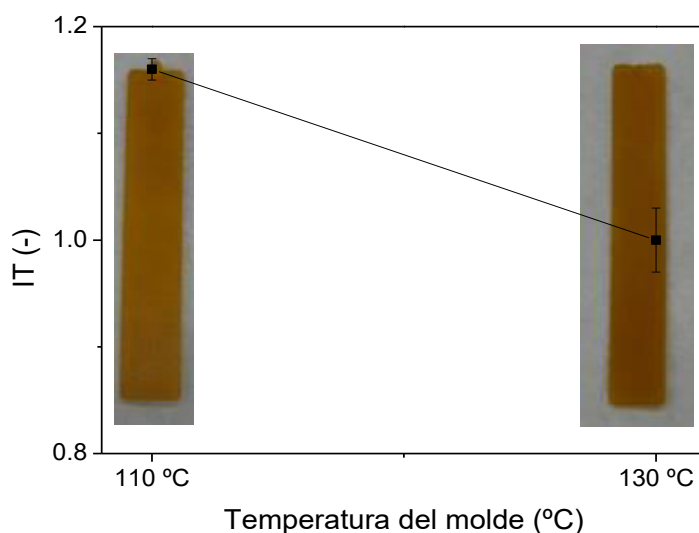


Figura 3.11. Índice de transparencia (IT) de bioplásticos de guisante obtenidos variando la temperatura de molde (110 y 130 °C).

3.2.2.2. Efecto del tiempo en el molde

En este caso se han estudiado diferentes tiempos de permanencia en el molde para conocer cómo influye en la conformación del bioplástico. Para ello, se han fijado las condiciones de procesado y únicamente se modifica el tiempo en el molde (100, 200 y 300 s) (Tabla 3.5).

Al igual que en el estudio anterior, primero se han analizado las propiedades mecánicas de los sistemas, obteniéndose unos perfiles de tracción similares independientemente del tiempo en el molde (Figura 3.12). Los parámetros de tracción obtenidos a partir de la Figura 3.12 se muestran en la Tabla 3.7.

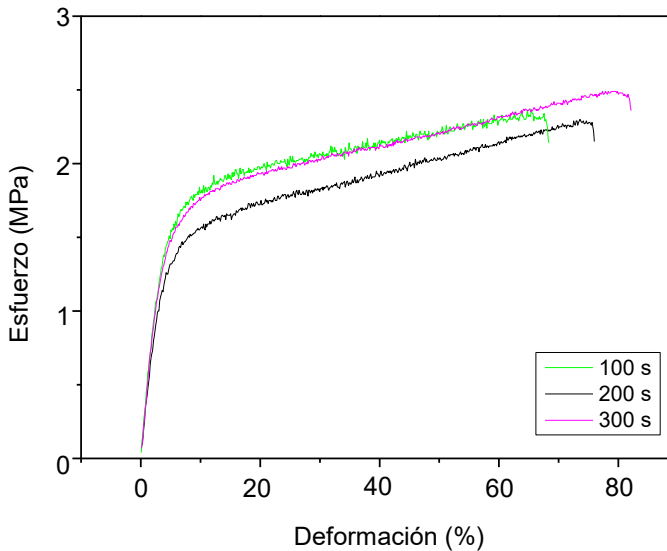


Figura 3.12. Perfiles de tracción de bioplásticos de guisante obtenidos variando el tiempo de residencia en el molde (100, 200 y 300 s)

De acuerdo a los datos obtenidos, el tiempo en el molde no influye en el módulo de Young ya que los valores para los tres sistemas no muestran diferencias significativas. Otro parámetro que no se ve afectado es el esfuerzo máximo ya que los tres sistemas presentan prácticamente el mismo valor. Sin embargo, la deformación en la rotura varía significativamente con el tiempo en el molde, ya que al aumentar el tiempo en el molde el valor de la deformación es mayor. Es un efecto bien conocido el hecho de que al aumentar el Módulo de Young se produzca un descenso de la deformación y viceversa (Beltrán Rico & Marcilla Gomis, 2012).

Resultados y Discusión

Tabla 3.7. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción: Módulo de Young (MPa), esfuerzo máximo (MPa) y deformación en la rotura (%) de bioplásticos de guisante obtenidos variando el tiempo de residencia en el molde (100, 200 y 300 s)

Tiempo en el molde	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
100 s	65,25 ± 5,34 ^A	2,78 ± 0,28 ^α	61,7 ± 3,9 ^a
200 s	59,58 ± 5,95 ^A	2,83 ± 0,32 ^α	71,8 ± 2,0 ^b
300 s	60,54 ± 3,16 ^A	3,02 ± 0,11 ^α	78,6 ± 2,7 ^c

Por otra parte, la Figura 3.13 muestra la influencia del tiempo en el molde sobre la capacidad de absorción de agua de los bioplásticos obtenidos.

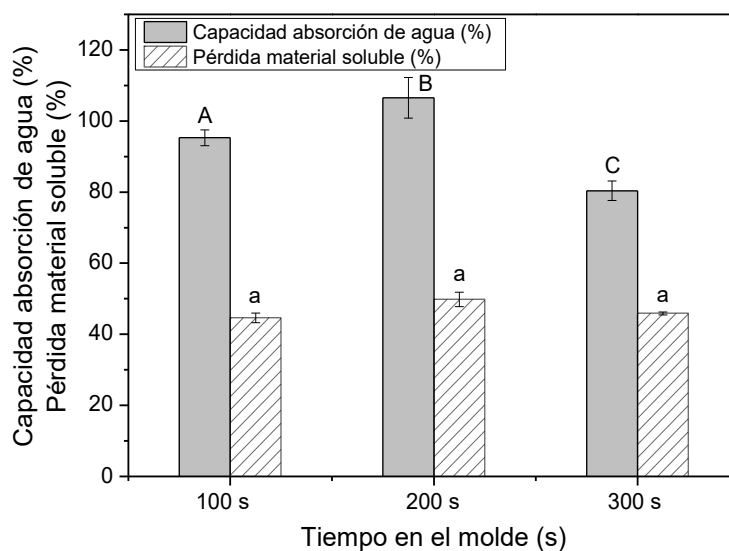


Figura 3.13. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de bioplásticos de guisante obtenidos variando el tiempo de residencia en el molde (100, 200 y 300 s)

En este caso, al igual que sucedía en los sistemas anteriores, la pérdida de material soluble se encuentra próxima al 40 % coincidiendo de nuevo ese valor con la cantidad de glicerina presente en las probetas. Por otra parte, la cantidad de agua que la probeta es capaz de absorber depende del tiempo que la probeta se encuentre en el molde, ya que conforme aumenta el tiempo, la capacidad para absorber agua de las probetas disminuye para un tiempo de 100 s o 300 s en el molde, el porcentaje de

absorción de agua no supera el 100%, mientras que para 200 s supera el 100% de absorción.

La evolución de la transparencia de los sistemas se muestra en la Figura 3.14. El Índice de transparencia (IT) es menor para el sistema a 300 s que para 100 s, situándose el sistema de referencia en una zona intermedia. Esto quiere decir que la cristalinidad de las probetas aumenta conforme aumenta el tiempo en el molde (Menges et al., 2002).

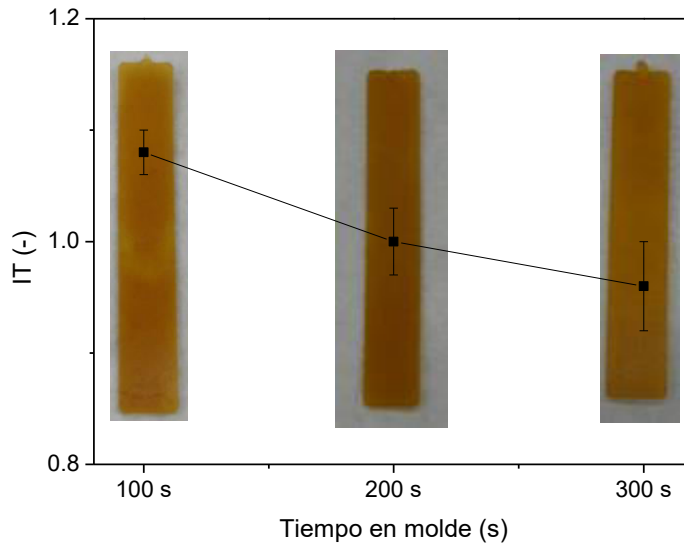


Figura 3.14. Índice de transparencia (IT) de bioplásticos de guisante obtenidos variando el tiempo de residencia en el molde (100, 200 y 300 s)

3.2.2.3. Efecto de la presión de inyección

Por último, se ha estudiado el efecto de la presión de inyección sobre las propiedades de los bioplásticos de proteína de guisante. Para ello, se fijan las condiciones de procesado (50 °C de temperatura en la cámara de pre-inyección, 130 °C de temperatura de molde y 200 s de tiempo en el molde) y únicamente se modifica la presión de inyección (100, 300, 500 y 900 bar) (Tabla 3.5).

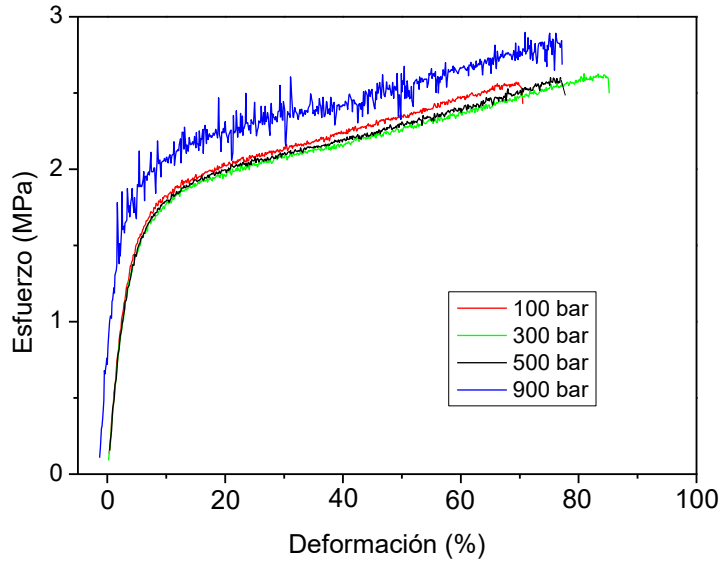


Figura 3.15. Perfiles de tracción de bioplásticos de guisante obtenidos variando la presión de inyección (100, 300, 500 y 900 bar)

Tal y como se observa en la Figura 3.15 y en la Tabla 3.8, la presión de inyección no afecta ni al módulo de Young (en el rango entre 53 y 59 MPa) ni al esfuerzo máximo (en el rango entre 2,6 y 2,8 MPa) ya que los valores obtenidos no son significativamente diferentes. Sin embargo, donde se observa una mayor variación es en la deformación en rotura, ya que al aumentar la presión de 100 bar a presiones superiores se observa un aumento en la deformación, sin observar diferencias significativas entre los sistemas de 300, 500 y 900 bar.

Tabla 3.8. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción: Módulo de Young (MPa), esfuerzo máximo (MPa) y deformación en la rotura (%) de bioplásticos de guisante obtenidos variando la presión de inyección (100, 300, 500 y 900 bar).

Presión de inyección	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
100 bar	53,61 ± 3,13 ^A	2,64 ± 0,19 ^α	67,1 ± 3,2 ^a
300 bar	55,94 ± 1,63 ^A	2,72 ± 0,21 ^α	74,2 ± 9,2 ^a
500 bar	59,58 ± 5,95 ^A	2,83 ± 0,32 ^α	71,8 ± 2,0 ^a
900 bar	58,23 ± 4,41 ^A	2,84 ± 0,15 ^α	80,1 ± 12,6 ^a

Por otra parte, tanto la pérdida de material soluble como la capacidad de absorción de agua no sufren cambios significativos con la presión de inyección (Figura 3.16).

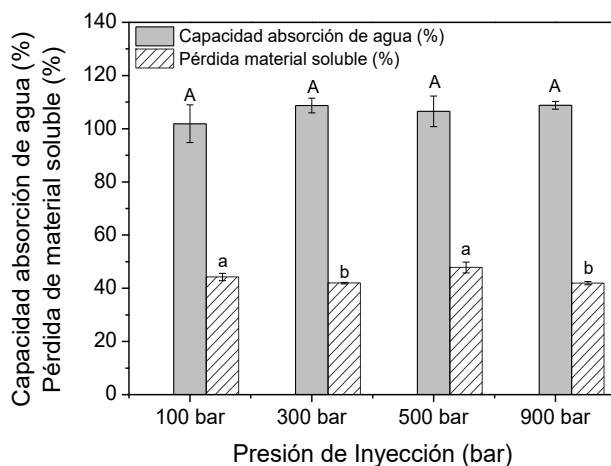


Figura 3.16. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de bioplásticos de guisante obtenidos variando la presión de inyección (100, 300, 500 y 900 bar)

Finalmente, la evolución de la transparencia con la presión de inyección (Figura 3.17) demuestra como presiones intermedias producen bioplásticos con un grado de transparencia menor, es decir, con una mayor cristalinidad.

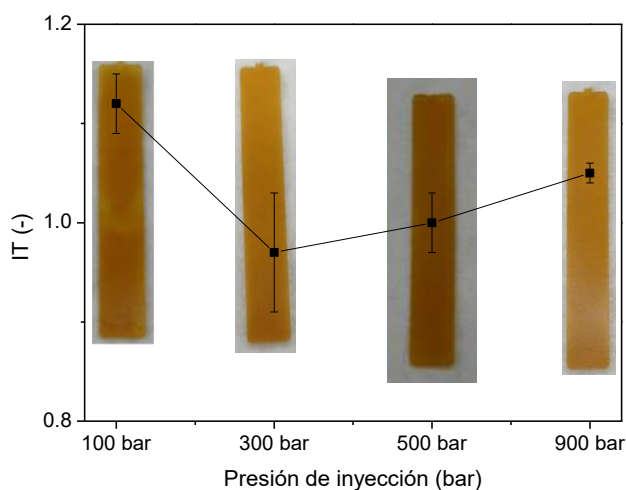


Figura 3.17. Índice de transparencia (IT) de bioplásticos de guisante obtenidos variando la presión de inyección (100, 300, 500 y 900 bar)

Resultados y Discusión

Considerando estas propiedades y aquellas obtenidas con las diferentes condiciones de procesado estudiadas, los parámetros de inyección más adecuados para llevar a cabo la fabricación de bioplásticos son:

Temperatura de cámara de pre-inyección: 50 °C

Temperatura de molde: 130 °C

Presión de inyección (tiempo de inyección): 500 bar (20 s)

Presión de post-inyección (tiempo de post-inyección): 200 bar (200 s)

3.3 Efecto del entrecruzamiento en bioplásticos basados en proteína de guisante

3.3.1. Efecto del entrecruzamiento físico

El estudio del entrecruzamiento físico sobre los bioplásticos proteicos se ha realizado mediante la aplicación de un tratamiento térmico a 50 °C (durante 24 h) o 120 °C (durante 4 o 24 h); o mediante una etapa de radiación UV durante 30 minutos a diferentes intensidades (50, 120 y 500 mJ/cm²). Para ello, se va a comparar con un sistema de referencia sin ningún tipo de tratamiento físico adicional (inyectado a 500 bar en un molde a 130 °C) (Tabla 3.5).

3.3.1.1. Influencia de un tratamiento térmico

La Tabla 3.9 muestra el grado de entrecruzamiento de los sistemas modificados con un tratamiento térmico adicional. Los grados de entrecruzamiento incluidos están referidos al sistema de referencia sin ningún tratamiento adicional.

Tabla 3.9. Grado de entrecruzamiento de los bioplásticos entrecruzados mediante un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento. Además, se han incluido letras diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores.

SISTEMAS		Grado de entrecruzamiento (%)
Tratamiento térmico	50 °C – 24 h	16,8 ± 2,9 ^A
	120 °C – 4 h	14,4 ± 6,8 ^A
	120 °C – 24 h	24,3 ± 0,3 ^B

De acuerdo con los resultados obtenidos, todos los sistemas presentaron un grado de entrecruzamiento entre 14 y 25 % superior respecto al

Resultados y Discusión

sistema de referencia, siendo más significativo cuando el tratamiento térmico se realiza a mayor temperatura y tiempo ($24,3 \pm 0,3$ % para el sistema a 120 °C y 24 h).

Tal y como estudiaron otros autores, el desdoblamiento de la proteína se produce al calentarse, lo que conduce a la ramificación del biopolímero hacia una estructura más entrecruzada (Domenek et al., 2003).

A continuación, se estudió la influencia del tratamiento térmico sobre la apariencia de los bioplásticos (Figura 3.18).

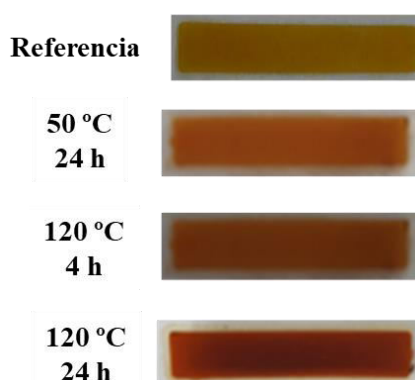


Figura 3.18. Aspecto visual de bioplásticos a base de proteína de guisante sometidos a un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h) o a radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²).

La aplicación de un tratamiento térmico induce la formación de enlaces secundarios promovidos por la reacción de Maillard, dando lugar a bioplásticos con un color más oscuro/pardo (Gerrard & Brown, 2002; Zárate-Ramírez et al., 2014a). Los resultados de los análisis de color se resumen en la Tabla 3.10. El sistema entrecruzado a 50 °C es más brillante ($\Delta L > 0$) y más amarillo ($\Delta b > 0$) que el sistema de referencia. Además, los sistemas entrecruzados a 120 °C presentan un color más pardusco ($\Delta a > 0$ y $\Delta b < 0$), que también es más oscuro ($\Delta L < 0$) a tiempos más prolongados (24 h).

Tabla 3.10. Parámetros de color de los bioplásticos entrecruzados mediante un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h). Se utilizó como referencia un bioplástico sin ningún método de entrecruzamiento.

SISTEMAS	<i>a</i>	Δa	<i>b</i>	Δb	<i>L*</i>	ΔL
Referencia	3,7 ± 0,2	-	13,1 ± 0,8	-	31,5 ± 0,6	-
50 °C - 24 h	4,5 ± 0,3	0,8	14,8 ± 1,2	1,7	33,8 ± 0,7	2,4
120 °C - 4 h	5,7 ± 0,1	2,0	11,2 ± 0,4	-1,9	31,7 ± 0,3	0,2
120 °C - 24 h	4,9 ± 0,1	1,3	8,2 ± 0,1	- 4,9	27,5 ± 0,3	-4,0

La Figura 3.19 muestra la evolución del módulo elástico con la frecuencia para bioplásticos a base de proteína de guisante con y sin tratamiento térmico.

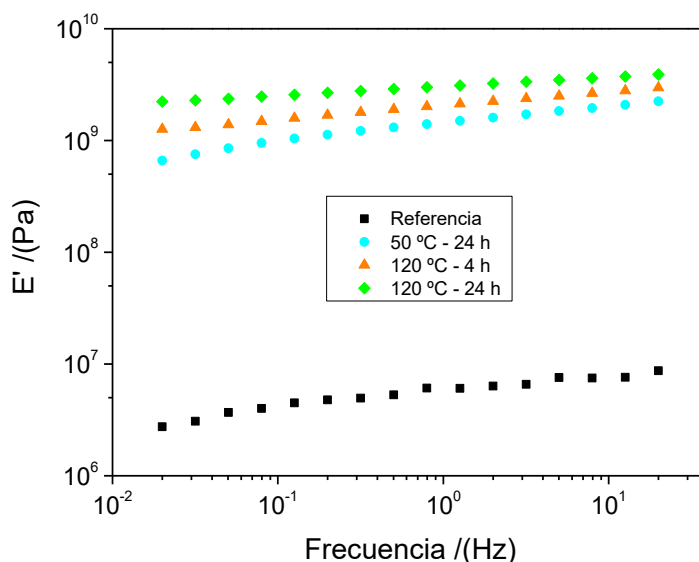


Figura 3.19. Barridos de frecuencia de los bioplásticos reforzados mediante un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h). Se utilizó como referencia un bioplástico sin ningún método de entrecruzamiento.

Todos los perfiles muestran un comportamiento similar, con un ligero aumento en los valores de E' al aumentar el tiempo y la temperatura en el rango de frecuencia estudiado. Comparando los diferentes sistemas, la aplicación del tratamiento térmico indujo un pronunciado aumento en el

Resultados y Discusión

carácter elástico de los bioplásticos, como se muestra en la Tabla 3.10 por el marcado aumento en los valores de E'_1 (1 Hz), desde $5,5 \pm 0,18$ MPa para el sistema de referencia hasta el rango 2600-3300 MPa para los sistemas entrecruzados. Junto con el aumento de los valores de E' , se produce una disminución significativa de los valores de $\tan(\delta)_1$ (1 Hz). El efecto fue mayor cuando se aplicó mayor temperatura (120 °C) y tiempo (24 h). Además, también se observa una ligera disminución de la pendiente con el tratamiento térmico, por lo tanto, una menor dependencia de los valores de E' con la frecuencia, dando lugar a sistemas más estables.

Tabla 3.11. Parámetros obtenidos a partir de ensayos de flexión dinámica (módulo elástico a 1 Hz, E'_1 ; tangente de pérdidas a 1 Hz: $\tan(\delta)_1$) de los bioplásticos reforzados mediante un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h). Además, se han incluido letras diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores de cada columna.

SISTEMAS	E'_1 (Pa) · 10 ⁻⁷	$\tan(\delta)_1$
Referencia	$0,55 \pm 0,18^A$	$0,220 \pm 0,010^a$
50 °C - 24 h	$260,7 \pm 7,4^B$	$0,214 \pm 0,011^a$
120 °C - 4 h	$262,1 \pm 15,5^B$	$0,187 \pm 0,004^b$
120 °C - 24 h	$328,3 \pm 9,3^C$	$0,149 \pm 0,006^c$

Por otro lado, en cuanto a los ensayos de tracción, en la Figura 3.20 se muestran los perfiles de los diferentes bioplásticos evaluados.

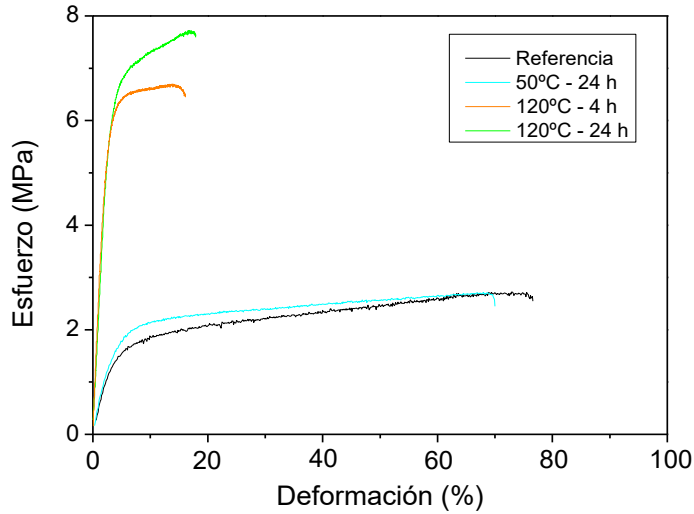


Figura 3.20. Perfiles de tracción de bioplásticos de guisante reforzados mediante un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h). Se utilizó como referencia un bioplástico sin ningún método de entrecruzamiento.

Los bioplásticos sometidos al tratamiento térmico de 120 °C mostraron una marcada región elástica seguida de una pequeña zona plástica hasta su rotura. Sin embargo, el sistema de referencia y el entrecruzado a 50 °C mostraron una región plástica más extensa definida por la mayor deformabilidad de estos sistemas.

En la Tabla 3.12 se muestra un resumen de los parámetros obtenidos a partir de los perfiles de esfuerzo-deformación. El sistema a 50 °C no presentó diferencias significativas con respecto al sistema de referencia, mientras que los sistemas entrecruzados a 120 °C mostraron un aumento significativo tanto en el módulo de Young como en el esfuerzo máximo, aunque con una marcada reducción de la deformación a rotura. Por lo tanto, el tratamiento térmico a 120 °C produjo sistemas más rígidos y con un carácter más frágil.

Resultados y Discusión

Tabla 3.12. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción (módulo de Young, esfuerzo máximo y deformación a la rotura) de los bioplásticos reforzados mediante un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento. Además, se han incluido letras diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores.

SISTEMAS	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
Referencia	59,58 ± 8,95 ^A	2,83 ± 0,32 ^a	71,8 ± 2,0 ^α
50 °C - 24 h	58,69 ± 10,40 ^A	2,60 ± 0,17 ^a	66,4 ± 11,1 ^α
120 °C - 4 h	216,91 ± 33,52 ^B	5,71 ± 0,89 ^b	18,2 ± 3,9 ^β
120 °C - 24 h	238,28 ± 9,11 ^B	7,92 ± 0,28 ^c	22,0 ± 12,4 ^β

En resumen, un tratamiento térmico a 120 °C (tanto a las 4 como a las 24 h) produjo bioplásticos más rígidos y menos deformables, mientras que la aplicación de un tratamiento térmico a 50 °C no influyó en las propiedades de tracción de los bioplásticos, aunque aumentó su módulo elástico con respecto al sistema de referencia sin ningún método de entrecruzamiento.

Por otra parte, la Figura 3.21 muestra la evolución de la capacidad de absorción de agua y la pérdida de materia soluble de los bioplásticos a base de proteína de guisante sometidos a un tratamiento térmico junto con el sistema de referencia. De forma similar a las propiedades mecánicas, los resultados del tratamiento térmico a 50 °C y 24 h fueron similares a los del sistema de referencia, con una capacidad de absorción superior al 100 %. Además, el tratamiento térmico a 120 °C disminuyó la capacidad de absorción de agua de las probetas, disminuyendo un 22 % y un 50 % cuando el tratamiento duró 4 y 24 h. Esta disminución está relacionada con el aumento de las propiedades mecánicas de los sistemas. En otras palabras, el tratamiento térmico a 120 °C produjo

sistemas con mejores propiedades mecánicas y menor capacidad de absorción de agua.

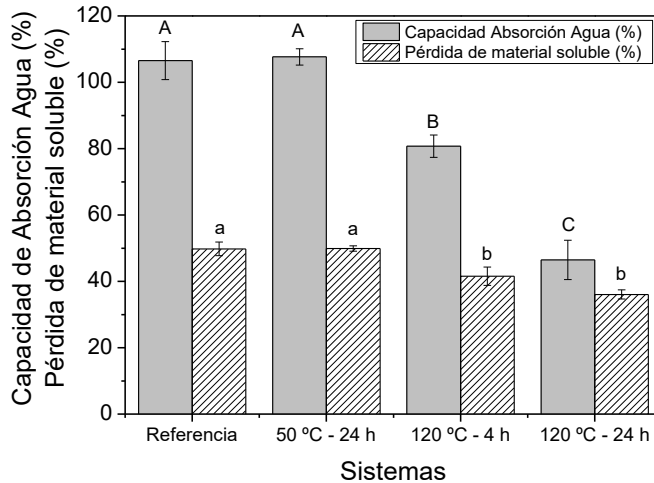


Figura 3.21. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de los bioplásticos entrecruzados mediante un tratamiento térmico (50 °C – 24 h, 120 °C – 4 h, 120 °C – 24 h). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento.

La etapa de entrecruzamiento dio lugar a sistemas más estructurados con una estructura más interconectada. Dicha estructuración producida por el tratamiento térmico adicional da como resultado una menor pérdida de materia soluble, lo que indica el fortalecimiento del sistema (Jiménez-Rosado et al., 2021). Resultados similares se encontraron en estudios previos, quienes observaron una reducción en la capacidad de absorción de agua con el tiempo de exposición y la temperatura del tratamiento térmico en bioplásticos similares obtenidos con aislado de proteína de soja (Álvarez-Castillo et al., 2018).

3.3.1.2. Influencia de la radiación UV

El grado de entrecruzamiento de los sistemas tratados bajo radiación UV se muestra en la Tabla 3.13. Todos los sistemas presentaron un grado de entrecruzamiento entre 3 y 18 % superior respecto al sistema de

Resultados y Discusión

referencia. La evolución del grado de entrecruzamiento presentó un incremento respecto a la intensidad UV, de $3,6 \pm 1,7$ % a $18,1 \pm 2,2$ % para los sistemas a 50 y 500 mJ/cm², respectivamente.

Tabla 3.13. Grado de entrecruzamiento de los bioplásticos entrecruzados mediante radiación ultravioleta (50, 120 y 500 mJ/cm²). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento. Además, se han incluido letras diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores.

SISTEMAS	Grado de entrecruzamiento (%)
50 mJ/cm ²	$3,6 \pm 1,7$ ^A
120 mJ/cm ²	$14,1 \pm 2,6$ ^B
500 mJ/cm ²	$18,1 \pm 2,2$ ^B

Entre los diferentes aminoácidos, la fenilalanina y la tirosina se excitan con la luz UV mejorando el efecto de entrecruzamiento (Fernández-d'Arlas, 2019), como lo muestra el aumento en el grado de entrecruzamiento de los sistemas UV relacionados con el sistema de referencia. En este sentido, la radiación UV puede mejorar las propiedades de los bioplásticos a base de proteína de guisante, considerando el contenido relativamente alto de estos aminoácidos en la proteína de guisante (Tabla 3.2). Por ello, el efecto beneficioso de este tratamiento es doble: Por un lado, la mejora de las propiedades de los bioplásticos mediante la aplicación de un tratamiento UV, mientras que, por otro lado, permite la esterilización de las muestras (Tiedge, 1991). Este último efecto es bastante útil en numerosas potenciales aplicaciones como para embalaje o cicatrización de heridas (Riley et al., 2005).

El efecto del tratamiento UV sobre las propiedades de color de los bioplásticos a base de proteína de guisante también se midió mediante un análisis colorimétrico. La Tabla 3.14 muestra los valores de los

parámetros a , b y L^* de los diferentes sistemas estudiados. Los valores de color mostraron que el tratamiento UV produjo sistemas más brillantes ($\Delta L > 0$) y, en general, ligeramente más amarillentos ($\Delta b > 0$).

Tabla 3.14. Parámetros de color de los bioplásticos reforzados mediante radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico no entrecruzado.

SISTEMAS	a	Δa	b	Δb	L^*	ΔL
Referencia	3,7 ± 0,2	-	13,1 ± 0,8	-	31,5 ± 0,6	-
50 mJ/cm ²	4,8 ± 0,1	1,1	15,9 ± 0,8	2,8	34,0 ± 1,0	2,5
120 mJ/cm ²	3,4 ± 0,5	-0,3	13,8 ± 1,0	0,7	33,7 ± 0,2	2,2
500 mJ/cm ²	3,4 ± 0,2	-0,3	12,5 ± 0,7	-0,6	33,7 ± 0,3	2,2

Sin embargo, como se puede observar en las imágenes de bioplásticos incluidas en la Figura 3.22, este efecto no es tan significativo como los bioplásticos resultantes al aplicar el tratamiento térmico.

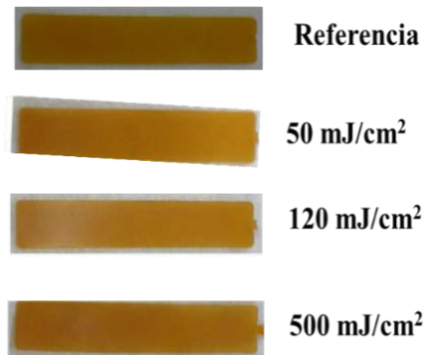


Figura 3.22. Aspecto visual de bioplásticos a base de proteína de guisante sometidos a radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²).

Además, se ha analizado la influencia del tratamiento UV en las propiedades mecánicas (Figuras 3.23 y 3.24).

Resultados y Discusión

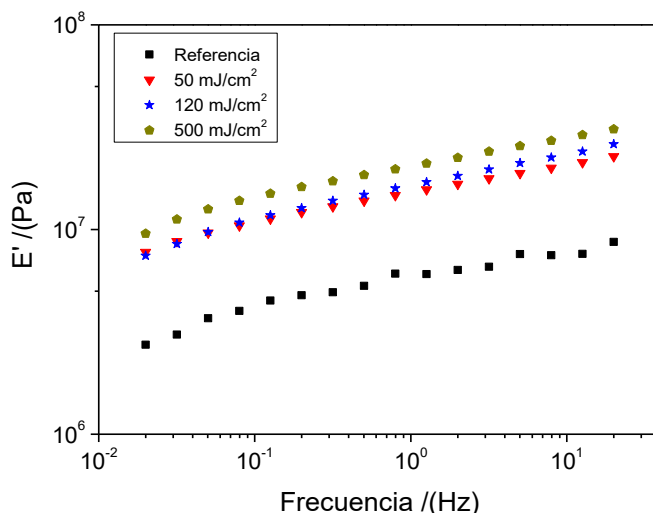


Figura 3.23. Barridos de frecuencia de los bioplásticos entrecruzados mediante radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento.

Los módulos elásticos de las muestras son ligeramente superiores a los del sistema de referencia (como se muestra en la Tabla 3.15), independientemente de la intensidad utilizada.

Tabla 3.15. Parámetros obtenidos a partir de ensayos de flexión dinámica (módulo elástico a 1 Hz, E'_1 ; tangente de pérdidas a 1 Hz: $\tan(\delta)_1$) de los bioplásticos reforzados mediante radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento. Además, se han incluido letras diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores.

SISTEMAS	E'_1 (Pa) · 10 ⁻⁷	$\tan(\delta)_1$ (-)
Referencia	0,55 ± 0,18 ^A	0,22 ± 0,01 ^α
50 mJ/cm ²	1,82 ± 0,11 ^D	0,20 ± 0,01 ^δ
120 mJ/cm ²	1,81 ± 0,27 ^D	0,20 ± 0,01 ^{αδ}
500 mJ/cm ²	1,99 ± 0,06 ^D	0,20 ± 0,01 ^{αδ}

En cuanto a sus propiedades de tracción, el perfil de los sistemas entrecruzados con radiación UV fue similar al del sistema de referencia sin ningún método de entrecruzamiento (Figura 3.24).

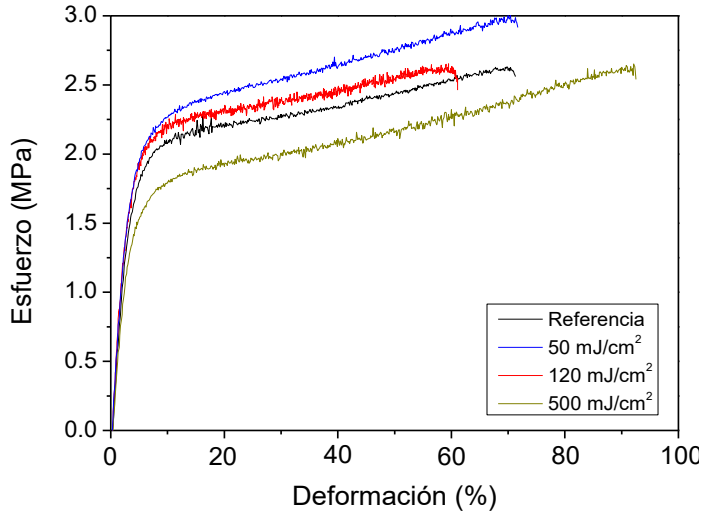


Figura 3.24. Perfiles de tracción de bioplásticos de guisante reforzados mediante radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento.

Con respecto a los parámetros obtenidos de las medidas de esfuerzo-deformación (Tabla 3.16), se obtuvo un máximo en módulo de Young y esfuerzo máximo a 120 mJ/cm², aunque sin diferencias significativas con respecto al de referencia. Sin embargo, la deformación a la rotura alcanza su máximo en el máximo valor de intensidad de radiación estudiada (500 mJ/cm²), por lo que los bioplásticos sometidos al tratamiento UV a 500 mJ/cm² son más deformables, con valores mayores de deformación a la rotura. Esta mayor deformabilidad puede deberse a la reorganización estructural producida por los nuevos enlaces formados entre los residuos de tirosina y fenilalanina de la proteína (Davidenko et al., 2016).

Resultados y Discusión

Tabla 3.16. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción (Módulo de Young, esfuerzo máximo o deformación a la rotura) de los bioplásticos reforzados mediante radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento. Además, se han incluido letras diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores de cada columna.

SISTEMAS	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
Referencia	59,6 ± 8,9 ^A	2,83 ± 0,32 ^α	71,8 ± 2,0 ^a
50 mJ/cm ²	67,1 ± 4,8 ^{AB}	2,80 ± 0,10 ^α	74,1 ± 4,3 ^a
120 mJ/cm ²	78,5 ± 8,3 ^B	3,00 ± 0,22 ^α	60,4 ± 9,7 ^a
500 mJ/cm ²	63,5 ± 5,5 ^A	2,90 ± 0,20 ^α	88,2 ± 8,8 ^b

Las mediciones de la capacidad de absorción de agua (Figura 3.25) mostraron una disminución progresiva desde el sistema de referencia hasta el bioplástico entrecruzado producido en la intensidad más alta (500 mJ/cm²). Comparando el efecto del tratamiento UV con el tratamiento térmico, el efecto producido no es pronunciado como en los sistemas entrecruzados a 120 °C (en el rango entre 210-240 MPa para el módulo de Young y 5,7-8 MPa para el esfuerzo máximo). Por otro lado, la pérdida de materia soluble de los sistemas estudiados no mostró diferencias significativas con respecto al bioplástico de referencia.

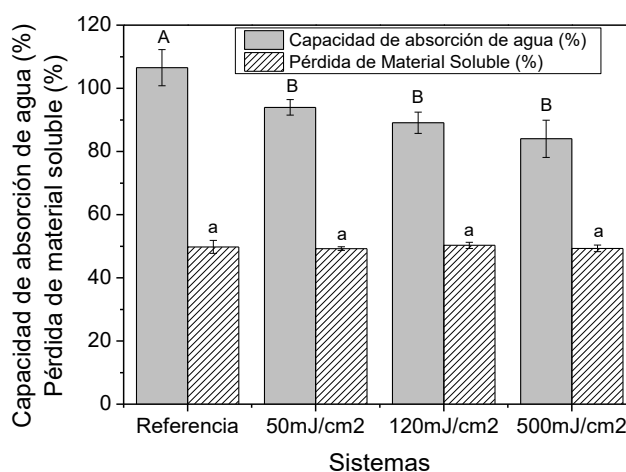


Figura 3.25. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de los bioplásticos reforzados mediante radiación UV (50, 120 and 500 mJ/cm²).

3.3.2. Efecto del entrecruzamiento químico

El estudio del entrecruzamiento químico de los bioplásticos obtenidos a partir de proteína de guisante se ha llevado a cabo mediante el estudio de compuestos químicos que fomentan interacciones con los grupos funcionales de los aminoácidos presentes en las cadenas poliméricas de las proteínas. En concreto, se han utilizado 3 aldehídos diferentes (formaldehído, glioxal y glutaraldehído), así como una sustancia natural como la genipina.

3.3.2.1. Influencia de la adición de aldehídos

La reacción que tiene lugar con cada uno de los aldehídos utilizados se muestra en la Figura 3.26. De los diferentes aldehídos estudiados, el formaldehído genera un enlace NH-C, mientras que el glutaraldehído y el glioxal forman enlaces N=C cuando reaccionan con biopolímeros, lo que da como resultado una red más fuertemente entrecruzada en los bioplásticos.

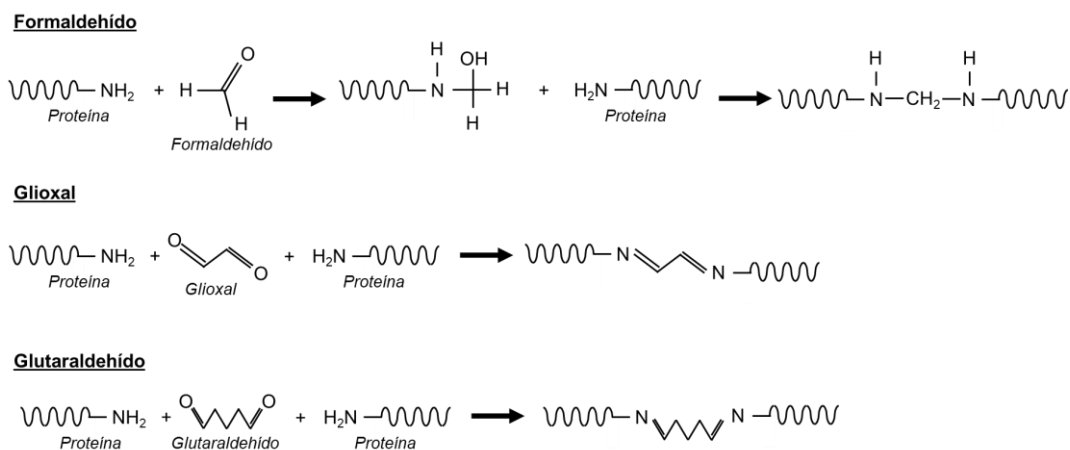


Figura 3.26. Imagen esquemática de la reacción de entrecruzamiento de diversos aldehídos en materiales proteicos.

Resultados y Discusión

En primer lugar, se ha estudiado el grado de entrecruzamiento de los sistemas obtenidos mediante la adición de aldehídos a su formulación inicial. De acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla 3.17, una mayor concentración del agente de entrecruzamiento condujo a un aumento en el grado de entrecruzamiento del sistema comparando los valores de formaldehído al 1 y al 3 %. El aumento observado en el grado de entrecruzamiento se debe a la presencia de más sitios de unión entre las diferentes cadenas proteicas (provocado por el aumento en la concentración del agente de entrecruzamiento encargado de llevar a cabo estas nuevas uniones).

Tabla 3.17. Grado de entrecruzamiento de los bioplásticos proteicos con los diferentes agentes de entrecruzamiento.

SISTEMAS	Grado de entrecruzamiento (%)
F1%	69,2 ± 3,4 ^A
F3%	86,8 ± 1,1 ^B
Gly3%	73,2 ± 0,6 ^A
Glu3%	78,5 ± 0,3 ^C

Es remarcable el aumento del grado de entrecruzamiento con el método químico en comparación al obtenido en los métodos físicos descritos en las secciones anteriores, con un máximo de un 24 % para el tratamiento térmico (Tabla 3.12) y un máximo de un 18 % para la radiación UV (Tabla 3.16). Comparando los diferentes agentes de entrecruzamiento, se observa que el mayor entrecruzamiento se alcanza con la molécula de un solo átomo de carbono (formaldehído). Favorece la formación de enlaces tanto intramoleculares como intermoleculares, siendo el aldehído más pequeño y susceptible de reaccionar con grupos amino N-terminales y

cadena laterales de cisteína, histidina, lisina, triptófano y arginina (Metz et al., 2004). Sin embargo, se demuestra que una cadena alifática de dos átomos de carbono (glioxal) dio lugar a una disminución del grado de entrecruzamiento, probablemente debido a que el formaldehído deja el grupo -NH dentro de la estructura entrecruzada, mientras que el glioxal y el glutaraldehído no lo hacen. La presencia de dichos grupos -NH puede respaldar el mayor entrecruzamiento observado para el formaldehído. Por otro lado, cuando se utilizó glutaraldehído, se observa un ligero aumento en el entrecruzamiento de los bioplásticos en comparación con el glioxal, ya que la reactividad de la molécula es mayor (Migneault et al., 2004).

Los cambios derivados de la adición de diferentes aldehídos a la formulación inicial también fueron visibles en el aspecto físico final de los bioplásticos (Figura 3.27). En este sentido, se ha estudiado la influencia de los aldehídos sobre apariencia de los sistemas mediante un estudio del color de los sistemas (Tabla 3.18).

En primer lugar, como se muestra en la Figura 3.27, la adición de formaldehído no produjo diferencias significativas en el color de los bioplásticos con respecto al sistema de referencia. Sin embargo, el uso de glutaraldehído cambió el color del bioplástico hacia un tono oscuro/pardo, mientras que el uso de glioxal produjo un oscurecimiento completo de la muestra. Estos cambios podrían ser producidos por reacciones de Maillard debido al uso de estos reactivos, los llamados agentes de entrecruzamiento de Maillard, como comentan, entre otros, Montha y colaboradores (2016) (Gerrard et al., 2002; Montha et al., 2016).

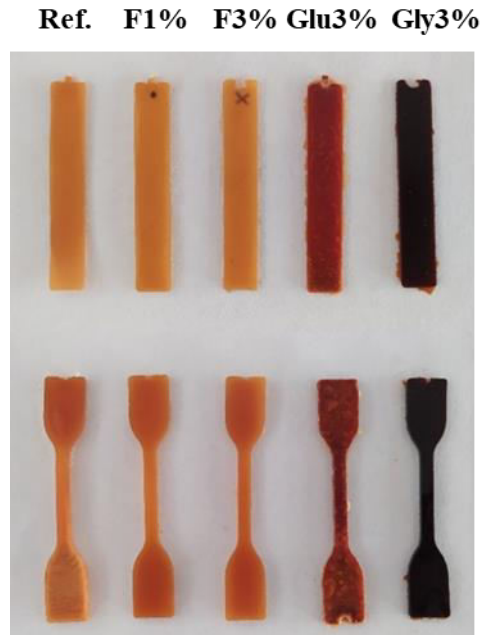


Figura 3.27. Aspecto visual de bioplásticos a base de proteína de guisante con los diferentes agentes de entrecruzamiento químico. De izquierda a derecha: referencia (sin agente de entrecruzamiento), formaldehído al 1%, formaldehído al 3%, glutaraldehído al 3% y glioxal al 3%.

Respecto a los parámetros de color, considerando los diferentes aldehídos utilizados, la adición de formaldehído produjo bioplásticos sin diferencias significativas respecto a la referencia, con valores altos y positivos tanto para los parámetros a como b , como prueba el color amarillo/marrón del bioplástico. Sin embargo, la disminución observada en los parámetros de color para el sistema glioxal es una representación fiel del color marrón observado en la Figura 3.27. De hecho, además del cambio de color, hubo un oscurecimiento de los bioplásticos, como lo muestra la disminución del parámetro L^* (ΔL^* inferior a 0). Considerando el sistema obtenido con glutaraldehído, se produce un aumento del parámetro a , como consecuencia del color pardusco del bioplástico resultante.

Tabla 3.18. Parámetros de color de los bioplásticos entrecruzados con los diferentes aldehídos: Formaldehído (1 y 3%), glioxal (3%) y glutaraldehído (3%). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento.

SISTEMAS	<i>a</i>	Δa	<i>b</i>	Δb	<i>L*</i>	ΔL
Referencia	3,7 ± 0,2	-	13,1 ± 0,8	-	31,5 ± 0,6	-
F1%	3,9 ± 0,2	0,2	15,5 ± 0,7	2,4	33,3 ± 0,1	1,8
F3%	3,8 ± 0,1	0,1	14,9 ± 0,5	11,8	31,0 ± 0,6	-0,4
Gly3%	1,4 ± 0,1	-2,3	3,4 ± 0,1	-9,7	7,6 ± 1,8	-23,9
Glu3%	9,3 ± 1,0	5,6	13,2 ± 1,1	0,1	31,2 ± 0,8	-0,3

Según estudios previos, los cambios de color son consecuencia del uso de aldehídos para el entrecruzamiento covalente de proteínas, como resultado derivado de las reacciones de Maillard (Amaya-Farfan & Rodriguez-Amaya, 2021; Gan et al., 2009). Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, ya que el uso de diferentes agentes de entrecruzamiento producía una variación en el color inicial de los bioplásticos, como el oscurecimiento de películas bioplásticas de agarosa usando ácido cítrico (Awadhiya et al., 2016) o la modificación del color de los bioplásticos a base de gluten utilizando glutaraldehído o glioxal (Zárate-Ramírez et al., 2014a). De hecho, como comentan Jia y colaboradores (2021), el uso de aldehídos (cinamaldehído) como agentes de entrecruzamiento produjo un oscurecimiento y una mayor opacidad de películas (*films*) obtenidos a partir de gliadina (Jia et al., 2021). La influencia del entrecruzamiento con diferentes aldehídos también se analizó mediante las propiedades mecánicas de los bioplásticos, tanto mediante ensayos dinámicos como estáticos.

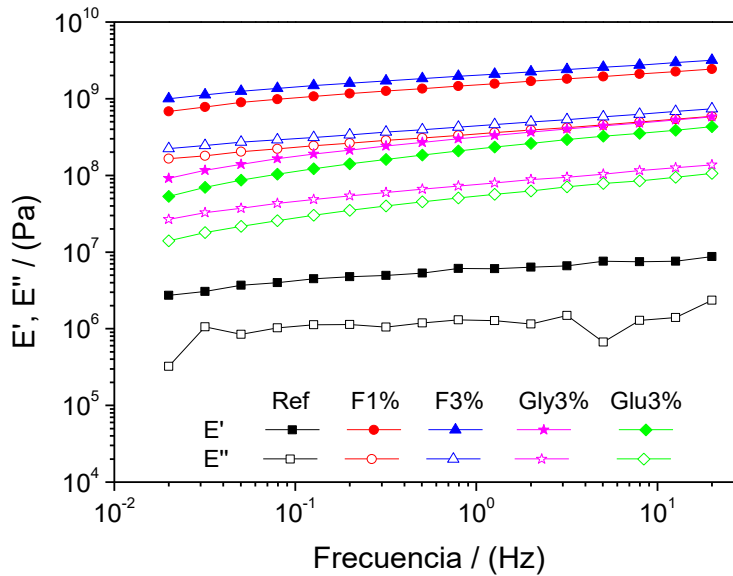


Figura 3.28. Barridos de frecuencia de bioplásticos de guisante entrecruzados con los diferentes aldehídos: Formaldehído al 1 y 3% (F1% y F3%), glioxal al 3% (Gly3%) y glutaraldehído al 3% (Glu3%). Se utilizó como referencia (Ref) un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento.

Los resultados de los ensayos dinámicos de flexión se representan en la Figura 3.28. Como puede verse por los barridos de frecuencia, hay un aumento drástico en los valores de E' con la adición de todos los aldehídos estudiados. El perfil exhibido es similar al del sistema de referencia, con una evolución de los módulos casi constantes en el rango de frecuencias estudiado, aunque el carácter elástico de los bioplásticos varió con la longitud alifática del agente de entrecruzamiento.

Los valores de E'_1 incluidos en la Tabla 3.19 se utilizaron para estudiar posibles diferencias significativas entre los sistemas. En general, aunque no se encontraron diferencias en las tangentes de pérdidas, la adición de cualquier agente de entrecruzamiento produjo un refuerzo de la estructura, ya que los módulos elásticos de todos los sistemas fueron superiores al sistema de referencia.

Tabla 3.19. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de ensayos de flexión dinámica (módulo elástico a 1 Hz, E'_1 ; y tangente de pérdidas a 1 Hz: $\tan(\delta)_1$) de los bioplásticos entrecruzados con los diferentes aldehídos: Formaldehído (1 y 3%), glioxal (3%) y glutaraldehído (3%). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento. Además, se han incluido letras diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores de cada columna.

SISTEMAS	E'_1 (Pa) · 10 ⁻⁸	$\tan(\delta)_1$ (-)
Referencia	0,06 ± 0,02 ^A	0,22 ± 0,01 ^α
F1%	15,68 ± 0,08 ^B	0,23 ± 0,02 ^{αβ}
F3%	16,11 ± 4,35 ^B	0,26 ± 0,02 ^β
Gly3%	3,08 ± 0,33 ^C	0,24 ± 0,03 ^{αβ}
Glu3%	2,07 ± 0,37 ^D	0,24 ± 0,01 ^β

Sin embargo, se ha realizado una correlación entre las propiedades a la flexión y el número de carbonos del agente de entrecruzamiento utilizado (Figura 3.29), mostrando cómo el aumento de la longitud de la cadena alifática del agente de entrecruzamiento reduce la rigidez de los bioplásticos, ya que los valores de E' se hicieron más bajos. Esta correlación reveló que la longitud de la cadena alifática tuvo un mayor impacto en el módulo elástico (E') que en el módulo viscoso (E'') ya que la pendiente decreciente es más pronunciada. Esta disminución es mayor cuando se utiliza glioxal o glutaraldehído en lugar de formaldehído, posiblemente debido al cambio de enlace discutido anteriormente (NH-C frente a N=C para formaldehído y glioxal o glutaraldehído, respectivamente).

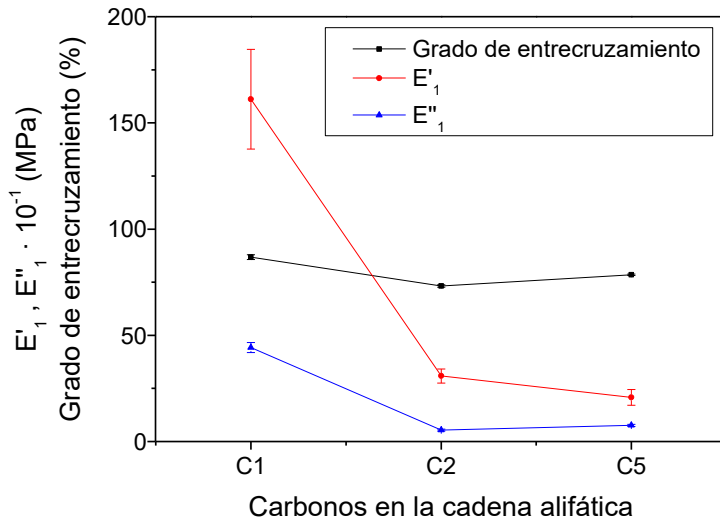


Figura 3.29. Correlación entre las propiedades de flexión y el número de carbonos del agente de entrecruzamiento utilizado: C1 (formaldehído), C2 (glioxal) y C5 (glutaraldehído).

Por otro lado, también se realizaron ensayos de tracción para el entrecruzamiento de los bioplásticos con diferentes aldehídos. En los perfiles que se muestran en la Figura 3.30, se pueden observar tres regiones bien diferenciadas en todos los sistemas. La primera región, lineal y con una fuerte pendiente, indica el rango de deformación en el que el material tiene un comportamiento elástico. A continuación, tiene lugar un cambio significativo de pendiente al pasar a la segunda región, que indica el rango de deformación en el que el material tiene un comportamiento plástico. Finalmente, una tercera región corresponde a una caída brusca de la tensión, producida por la rotura del material.

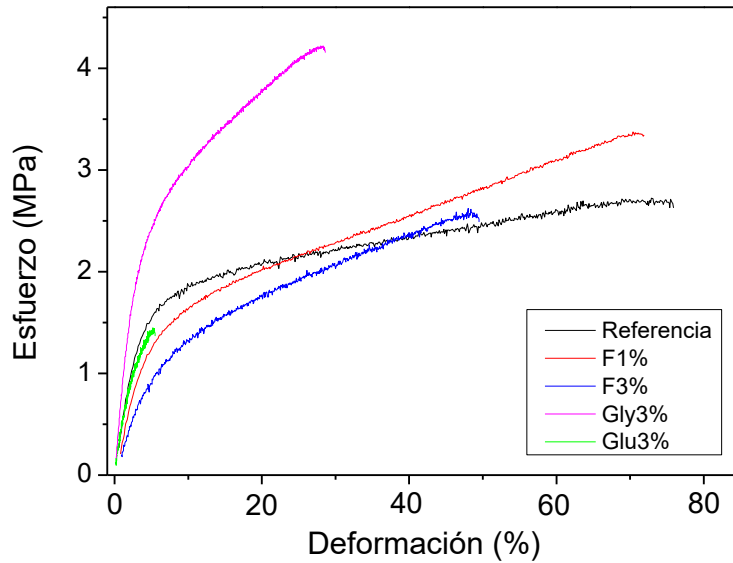


Figura 3.30. Perfiles de tracción de bioplásticos de guisante entrecruzados con los diferentes aldehídos: Formaldehído (1 y 3%), glioxal (3%) y glutaraldehído (3%). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento.

Los parámetros de tracción obtenidos de los diferentes perfiles en la Figura 3.30 se muestran en la Tabla 3.20. El bioplástico obtenido con glioxal (3%) es el sistema con mayor valor de esfuerzo máximo, pero con una deformación en la rotura inferior a la de los demás sistemas, excepto el de glutaraldehído. Este hecho, junto con el alto valor de su módulo de Young, indica que el uso de glutaraldehído produjo sistemas menos deformables, como lo demostraron Pavoni y colaboradores (2021) mediante el uso de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento en films de quitosano (Pavoni et al., 2021). Se puede comprobar que, en general, que el comportamiento a tracción es claramente diferente respecto a flexión. En este sentido, también se destacó el sistema glutaraldehído, que permite poca deformación antes de la rotura y el valor de esfuerzo más bajo. Por otro lado, cuanto mayor es la cadena alifática, menor es la deformación en la rotura (de 48 a 5

Resultados y Discusión

%), siendo también inferior al sistema de referencia (71,8 %). En estudios previos se han obtenido resultados similares al aplicar un tratamiento térmico como etapa adicional de entrecruzamiento a la fabricación de bioplásticos de base proteica, con una marcada disminución de la deformación en la rotura con respecto al sistema de referencia (Jiménez-Rosado et al., 2020a).

Tabla 3.20. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción (módulo de Young, esfuerzo máximo y deformación en la rotura) de los bioplásticos entrecruzados con los diferentes aldehídos: Formaldehído (1 y 3%), glioxal (3%) y glutaraldehído (3%). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento. Además, se han incluido símbolos diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores de cada columna.

SISTEMAS	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
Referencia	59,58 ± 8,95 ^A	2,83 ± 0,32 ^α	71,8 ± 2,0 ^a
F1%	36,50 ± 8,47 ^B	3,37 ± 0,25 ^β	61,7 ± 2,5 ^{ab}
F3%	23,25 ± 5,10 ^B	2,67 ± 0,17 ^α	48,0 ± 2,5 ^b
Gly3%	84,69 ± 4,88 ^C	4,07 ± 0,42 ^β	26,1 ± 6,3 ^c
Glu3%	53,34 ± 3,26 ^A	1,40 ± 0,08 ^γ	5,0 ± 1,0 ^d

En resumen, la correlación entre las propiedades de tracción y el número de carbonos del agente de entrecruzamiento utilizado (Figura 3.31) mostró que el uso de glioxal (C2) o glutaraldehído (C5) produjo sistemas con un módulo de Young más alto y una deformación en la rotura más baja, aunque su grado de entrecruzamiento es inferior al del formaldehído. En otras palabras, esta correlación reveló que la longitud de la cadena alifática del agente de entrecruzamiento tenía una mayor

influencia en las propiedades de tracción que el grado de entrecruzamiento conseguido. Sin embargo, hay muchos factores a considerar, como el aumento en la cantidad de sitios activos que incorpora el formaldehído (mayor número de moléculas incorporadas para la misma concentración de reactivo) o los diferentes enlaces que se forman con cada agente de entrecruzamiento, lo que podría explicar estas variaciones obtenidas en las propiedades mecánicas de los bioplásticos.

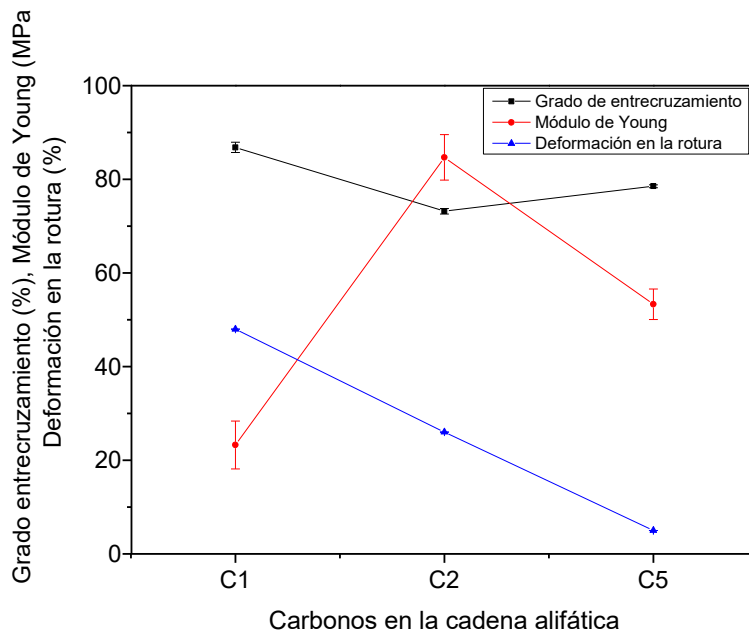


Figura 3.31. Correlación entre las propiedades de tracción y el número de carbonos del agente de entrecruzamiento utilizado: C1 (formaldehído), C2 (glioxal) y C5 (glutaraldehído).

Además de las propiedades mecánicas, también se evaluaron las propiedades funcionales de los bioplásticos entrecruzados. En este sentido, se midió y comparó su capacidad de absorción de agua.

Resultados y Discusión

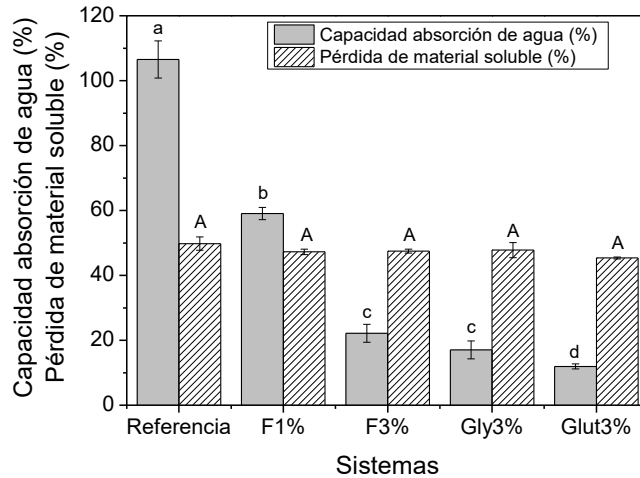


Figura 3.32. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de bioplásticos de guisante entrecruzados con los diferentes aldehídos: Formaldehído (1 y 3%), glioxal (3%) y glutaraldehído (3%). Se utilizó como referencia un bioplástico proteico sin ningún método de entrecruzamiento.

La capacidad de absorción de agua de los bioplásticos se muestra en la Figura 3.32 con y sin la adición de aldehídos como agentes de entrecruzamiento. En cuanto a la absorción de agua, se observa que existe una clara diferencia entre el sistema de referencia y los entrecruzados. El sistema compuesto únicamente de proteína de guisante y glicerol absorbió su propio peso de agua (aprox. 105 %). Por otro lado, con la adición de los diferentes agentes de entrecruzamiento, la absorción de agua disminuyó. Una mayor concentración de formaldehído, lo que significa un mayor grado de entrecruzamiento, aumentó el módulo elástico, reduciendo así su capacidad de hinchamiento y, en consecuencia, de absorber agua. Este comportamiento fue observado por otros autores como Álvarez-Castillo y colaboradores (2020) con bioplásticos obtenidos a partir de proteína de plasma (Álvarez-Castillo et al., 2020) o Jiménez-Rosado y colaboradores (2020) para bioplásticos obtenidos a partir de proteína de soja (Jiménez-Rosado et al., 2021). Por otro lado, el uso de diferentes agentes de entrecruzamiento produjo una

modificación en la morfología de los bioplásticos resultantes debido a las diferencias en la longitud de sus cadenas alifáticas. Así, aunque no se muestra un mayor grado de entrecruzamiento, la capacidad de absorción de agua se reduce con el aumento de la longitud de la cadena alifática. Esto podría deberse a posibles modificaciones en términos de hidrofobicidad o respuesta mecánica de los sistemas. Sin embargo, según los resultados que se muestran en la Figura 3.33, si bien es cierto que existe un aumento del ángulo de contacto respecto al sistema de referencia, los valores obtenidos no son suficientes para considerar la hidrofobicidad como causa principal de los valores de captación de agua obtenidos. En este sentido, puede deberse a una combinación de factores como la mayor rigidez de los enlaces que evitan el hinchamiento de la matriz o el diferente porcentaje molecular del agente de entrecruzamiento incorporado. Estos resultados son corroborados por otros autores como Jia y colaboradores (2021), quienes demostraron que la adición de cinamaldehído como agente de entrecruzamiento produjo una disminución en la absorción de agua (Jia et al., 2021).

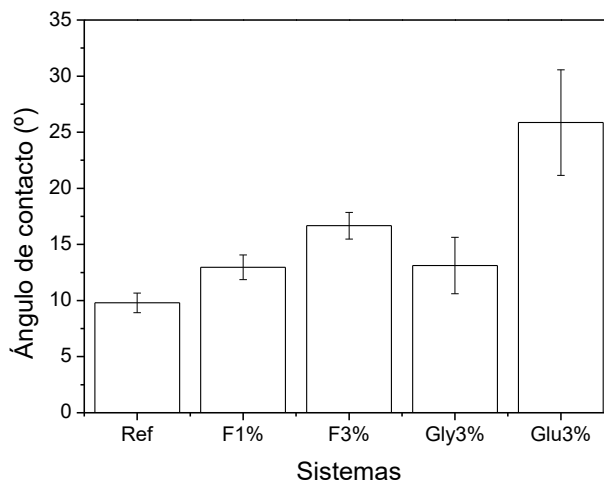


Figura 3.33. *Ángulo de contacto de los bioplásticos reforzados con diferentes agentes de entrecruzamiento. Se utilizó como referencia un bioplástico a base de proteína de guisante sin ningún agente de entrecruzamiento.*

Resultados y Discusión

Sin embargo, la pérdida de materia soluble se mantuvo constante en un 48 %, lo que significa que, además del glicerol, debido a la alta solubilidad de la proteína de guisante, también se perdió una pequeña cantidad de proteína soluble durante la inmersión (Perez et al., 2016).

3.3.2.2. Influencia de la adición de genipina

Además de estudiar el efecto del entrecruzamiento químico con sustancias químicas (aldehídos) sobre los bioplásticos elaborados a partir de proteína de guisante, también se ha estudiado el efecto de la adición de una sustancia natural como la genipina, que tiene la capacidad de reaccionar con aminoácidos (la reacción que tiene lugar se puede observar en la Figura 3.34).

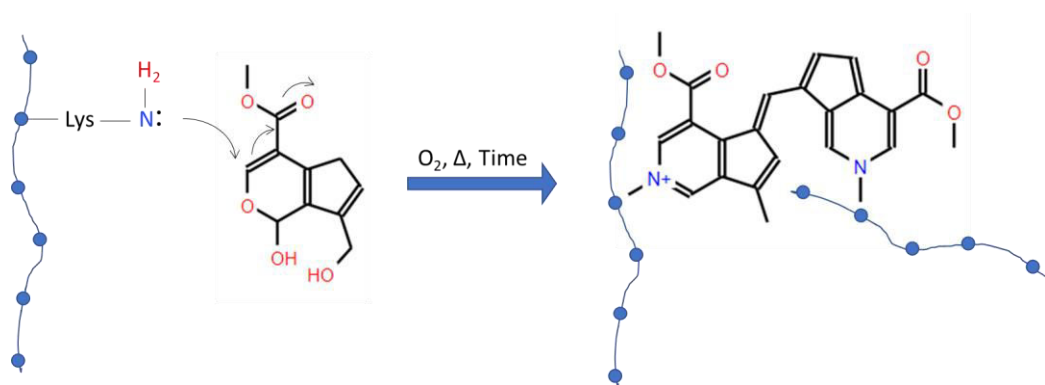


Figura 3.34. Imagen esquemática de la reacción de entrecruzamiento de genipina en materiales proteicos.

Para ello, se ha utilizado genipina a diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %) evaluando el tiempo de curado de la masa (tras la etapa de mezclado) y llevando a cabo la etapa de inyección a diferentes días (día 0, día 1, día 5 y día 10). Para un mejor análisis y comprensión de los

resultados, en la siguiente tabla (Tabla 3.21) se resumen los sistemas elaborados:

Tabla 3.21. Resumen de los diferentes sistemas obtenidos con genipina.

SISTEMAS		MATERIAL	CÓDIGO
Referencia		Masa	PP
		Bioplástico	PPB (Referencia)
Genipina 0,25 %	Día 0	Masa	25D0
		Bioplástico	25D0B
	Día 1	Masa	25D1
		Bioplástico	25D1B
	Día 5	Masa	25D5
		Bioplástico	25D5B
	Día 10	Masa	25D10
		Bioplástico	25D10B
Genipina 0,50 %	Día 0	Masa	50D0
		Bioplástico	50D0B
	Día 1	Masa	50D1
		Bioplástico	50D1B
	Día 5	Masa	50D5
		Bioplástico	50D5B
	Día 10	Masa	50D10
		Bioplástico	50D10B

Caracterización de las masas proteicas

Para ello, en primer lugar, se hace un seguimiento de las masas antes de ser procesadas para fabricar bioplásticos. Tal y como se observa en la Figura 3.35, las masas tras ser preparadas durante el mezclado (tiempo de curado) experimentan un cambio de color tanto para 0,25 % como para 0,50 % de genipina. Las mezclas de genipina al 0,25 % exhibieron el cambio de color más notorio a partir del día 5 (25D5 y 25D10), obteniendo una tonalidad verde azulada. De acuerdo a otros autores, los grupos intermedios producidos durante la reacción podrían dar lugar a esta modificación de color gracias al ataque nucleofílico de la metilamina sobre el átomo de carbono olefinico en C3 de la desoxiloganina aglicona, junto con la apertura del anillo de dihidropirano y atacado por el grupo amino secundario sobre el grupo aldehído resultante, lo que genera la formación de monómeros de genipina-metilamina (Touyama et al., 1994).

Por otro lado, las mezclas de 0,50 % de genipina presentaron un color más azulado desde el día 1 (50D0) hasta el día 10 (50D10). Sin embargo, ambos sistemas en el día 0 (25D0 y 50D0) mostraron un aspecto y color similar al sistema de referencia. Respecto a la mezcla de referencia, a diferencia de las mezclas con genipina, no sufrió ningún cambio a lo largo del tiempo.

Los valores de los parámetros de color obtenidos tanto para la proteína de guisante como para las mezclas con y sin genipina se muestran en la Tabla 3.22. La mezcla de referencia y la harina proteica presentaron un color amarillento como lo demuestran los valores positivos altos de todos los parámetros (a , b y L^*).

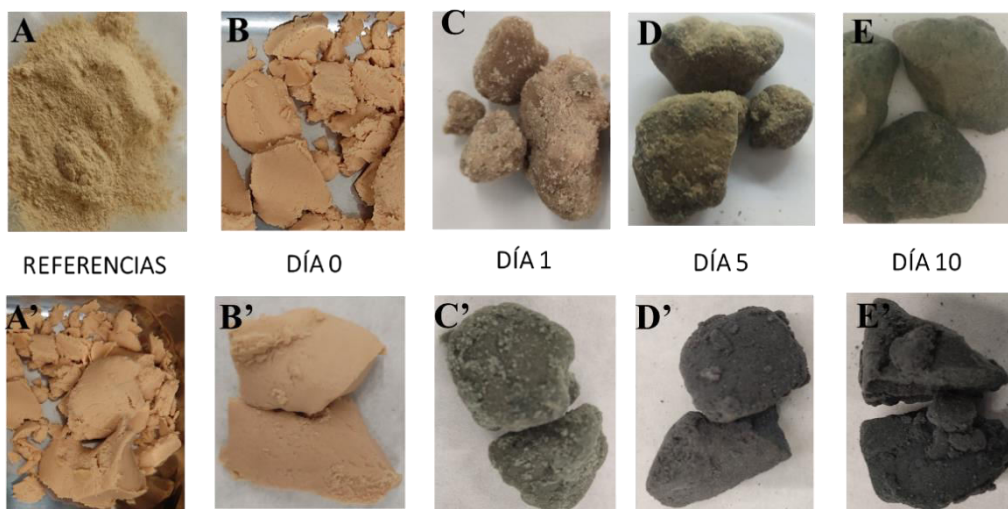


Figura 3.35. Imágenes de las mezclas de proteína de guisante entrecruzadas por adición de genipina al 0,25% (B, C, D y E) y al 0,50% (B', C', D' y E') en diferentes tiempos de curado de la mezcla (día 0, día 1, día 5 y día 10). También se incluyen imágenes de la harina de proteína de guisante (A) y la mezcla de referencia sin ningún agente de entrecruzamiento (A').

En cuanto a las mezclas de los sistemas con genipina, se puede observar la evolución con el tiempo de curado. Los sistemas 25D0 y 25D1 mostraron valores similares a los obtenidos por la mezcla de referencia. Sin embargo, a partir del sistema 25D5 hubo un cambio de coloración hacia un tono verde azulado provocado por la genipina presente (Figura 3.35).

Resultados y Discusión

Tabla 3.22. Parámetros de color de las masas de proteína de guisante entrecruzadas con genipina al 0,25 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0), Día 1 (25D1), Día 5 (25D5), Día 10 (25D10); y con genipina al 0,50% a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0), Día 1 (50D1), Día 5 (50D5), Día 10 (50D10). También se incluyeron como referencia la mezcla a base de proteína de guisante (PP) y la harina sin ningún método de entrecruzamiento. Se han añadido diferentes símbolos como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores de cada columna.

SISTEMAS	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>L*</i>
Harina de guisante	6,07 ± 0,29 ^a	23,40 ± 0,31 ^A	77,95 ± 4,88 ^α
PP	10,18 ± 0,09 ^b	29,85 ± 0,01 ^B	63,86 ± 0,22 ^β
25D0	10,29 ± 0,20 ^b	31,08 ± 0,25 ^C	67,97 ± 1,06 ^γ
25D1	10,24 ± 0,07 ^b	29,16 ± 0,11 ^B	68,10 ± 0,18 ^γ
25D5	-4,12 ± 0,15 ^c	7,82 ± 0,01 ^D	40,97 ± 0,16 ^δ
25D10	-4,53 ± 0,27 ^c	6,24 ± 0,28 ^E	42,88 ± 1,59 ^δ
50D0	7,60 ± 0,19 ^d	27,21 ± 0,53 ^F	64,73 ± 1,08 ^β
50D1	-4,94 ± 0,99 ^{cd}	8,07 ± 0,30 ^D	39,31 ± 1,17 ^δ
50D5	-5,12 ± 0,05 ^d	7,82 ± 0,01 ^D	40,60 ± 0,78 ^δ
50D10	-5,23 ± 0,11 ^d	7,94 ± 0,08 ^D	40,88 ± 1,24 ^δ

Por otro lado, el sistema procesado con genipina al 0,50 % mostró valores similares en el día 0 (50D0) que la mezcla de referencia. Sin embargo, el efecto de la genipina se hizo más significativo a partir del día 1 (50D1), produciéndose una disminución significativa en todos los parámetros, no mostrando cambios significativos hasta el día 10 (50D10), como se puede observar en la Figura 3.35 y la Tabla 3.22. Comparando ambos sistemas en el día 10 se puede comprobar como el

sistema con más concentración da lugar a una masa con un color azulado más oscuro.

El entrecruzamiento químico de mezclas a base de proteína de guisante con genipina fue seguido por análisis FTIR. La Figura 3.36 muestra los espectros infrarrojos de todas las mezclas en comparación con las materias primas (harina de proteína de guisante y genipina), así como el sistema de referencia no entrecruzado (PP) en función del tiempo de curado (Figura 3.36A y 3.36B).

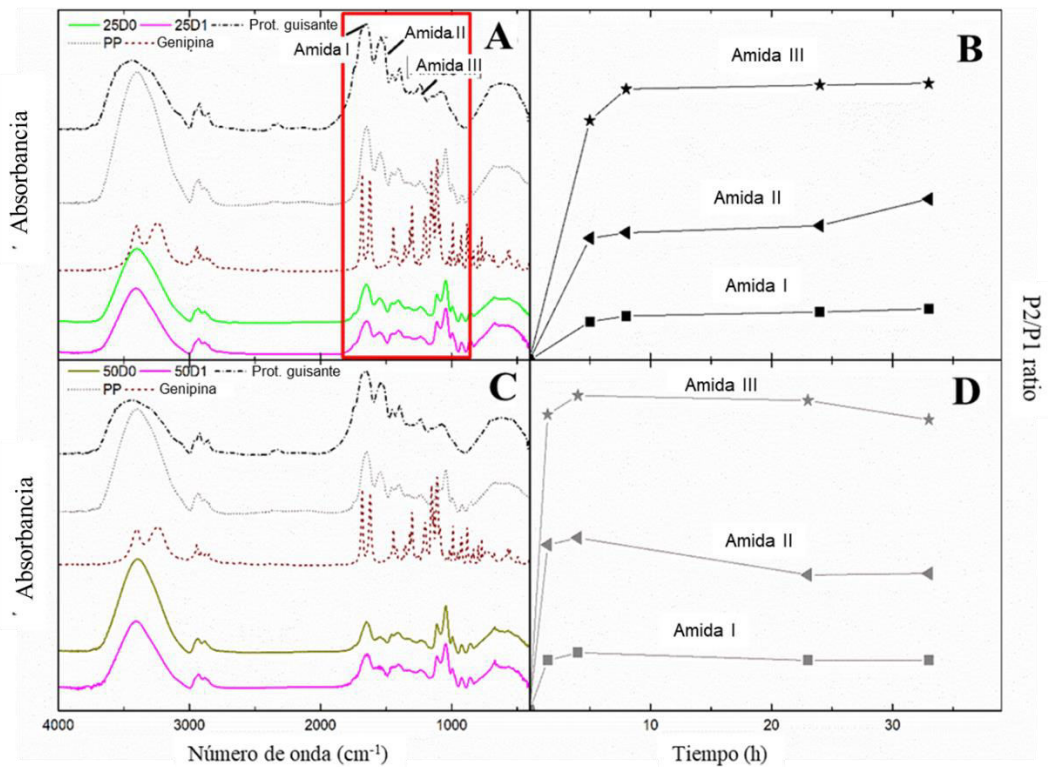


Figura 3.36. Espectroscopia infrarroja de las masas de proteína de guisante entrecruzadas (A) con genipina al 0,25 % en diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0), Día 1 (25D1), Día 5 (25D5), Día 10 (25D10); y (C) con genipina al 0,50% en diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0), Día 1 (50D1), Día 5 (50D5), Día 10 (50D10). También se representó la evolución de los picos de amida I, II y III a lo largo del tiempo para las masas entrecruzadas (B) con 0,25 % de genipina y (D) con 0,50 % de genipina a diferentes tiempos de curado. También se han añadido la masa de proteína de guisante no entrecruzada (PP) y la materia prima (proteína de guisante y genipina).

Resultados y Discusión

Como se puede apreciar, se realizaron medidas de FTIR de varios sistemas entrecruzados (25D0, 25D1, 50D0 y 50D1), y se pudieron detectar varias diferencias en sus bandas fundamentales a medida que se desarrollaba la reacción química, especialmente en el rango de número de onda de 2000-1000 cm^{-1} . En trabajos anteriores, algunos autores han analizado el perfil de espectroscopia infrarroja de la proteína de guisante (Türker-Kaya & Huck, 2017), identificando los picos más relevantes en 3000-3500 cm^{-1} (vibración de los grupos OH y NH_2), 2933 cm^{-1} (tensión -CH), 1600-1700 cm^{-1} (tensión de amida I, C=O y C-N y la conformación del esqueleto de las proteínas), 1500-1600 cm^{-1} (bandas de vibración de amida II, N-H y C-N) y a 1200 cm^{-1} (amida III, tensión C-N y deformación N-H) (Acquah et al., 2020a). Por otro lado, el agente de entrecruzamiento (molécula de genipina) mostró dos bandas de vibración significativas alrededor de 1680 y 1620 cm^{-1} , relacionadas con la vibración de tensión del grupo carboximetilo (C=O) y la vibración C=C del anillo de olefina en la genipina, respectivamente (Kahoush et al., 2021). En este sentido, la reacción química que se produce entre la genipina y la harina de proteína de guisante (ver Figura 3.34) y el posterior entrecruzamiento se puede deducir de las curvas FTIR mostradas en la Figura 3.36. La interacción química entre los grupos NH_2 de la molécula de lisina de la proteína de guisante y la estructura molecular de la genipina (ver reacción química en la Figura 3.34) pudo corroborarse gracias a un aumento en las bandas de vibración relacionadas con las regiones amida I, II y III (1650, 1550 y 1200 cm^{-1} , respectivamente). Este notable aumento confirma la presencia de un mayor número de grupos C=O, C=C y N-C en la estructura química de la mezcla final debido tanto a la introducción de la molécula de genipina como a la formación de grupos amino aromáticos como consecuencia del

entrecruzamiento químico (Kahoush et al., 2021). Así, calculando las áreas de los picos de estas principales bandas de vibración y considerando el pico de absorción de glicerol (1040 cm^{-1} , que permanece constante durante la reacción química) como señal de absorción de vibraciones de referencia (Acquah et al., 2020a), el progreso de la reacción de entrecruzamiento puede seguirse mediante técnicas FTIR. La evolución de estas áreas (P2) se puede observar en las Figuras 3B y 3D, donde los valores de dichas áreas pico (amida I (1650 cm^{-1}), amida II (1550 cm^{-1}) y amida III (1200 cm^{-1})) se han trazado como una función del área de la banda de vibración de referencia (P1) frente al tiempo ($P2/P1$). Como se puede deducir de las curvas, el mayor aumento en los valores de tales áreas se obtuvo para la banda relacionada con la amida III (enlaces C-N), que también se hizo más amplia para las mezclas entrecruzadas (las que contienen genipina). Se relacionó con una mayor cantidad de enlaces amida que comprenden las formulaciones como consecuencia de la formación de enlaces C-N durante el desarrollo de compuestos entrecruzados heterocíclicos de genipina (Liu et al., 2017). Por otro lado, cabe señalar que, aunque el proceso de curado fue monitoreado por pruebas FTIR solo para los sistemas D0 (25D0 y 50D0) y D1 (25D1 y 50D1), se pudo detectar una mayor tasa en el proceso de curado al aumentar la cantidad de genipina utilizada durante el proceso de reacción, como se deduce de las pendientes trazadas en la Figura 3.36B y 3.36D. El sistema 50D0 mostró el área de pico más alta al entrecruzarse con un 0,50 % de genipina, mientras que para el 0,25 % de genipina el sistema 25D1 fue el que logró el área de pico más alta en la región Amida III. Estos resultados concuerdan con las imágenes observadas para el análisis de color, con un cambio más rápido y marcado en los sistemas con mayor concentración de genipina.

Resultados y Discusión

Además, la reacción de entrecruzamiento químico también se analizó mediante un estudio termogravimétrico. La Figura 3.37 muestra una representación comparativa de la pérdida de peso (Figuras 3.37A y 3.37C) como la derivada del peso (Figuras 3.37B y 3.37D) de las materias primas (harina de guisante y muestra de genipina en polvo) y sus mezclas con diferentes cantidades de genipina en función del tiempo de curado (25D0, 25D1, 50D0 y 50D1). La descomposición térmica de la proteína de guisante mostró una pérdida inicial de peso por pérdida de humedad a temperatura inferior a 100 °C. Además, al elevar la temperatura más de 200 °C ocurrió un evento de descomposición mayor, a partir del cual la estructura de la proteína comenzó a descomponerse mediante la ruptura de los enlaces C-O-C y C-C, incluyendo también la volatilización de otros compuestos (Ricci et al., 2018).

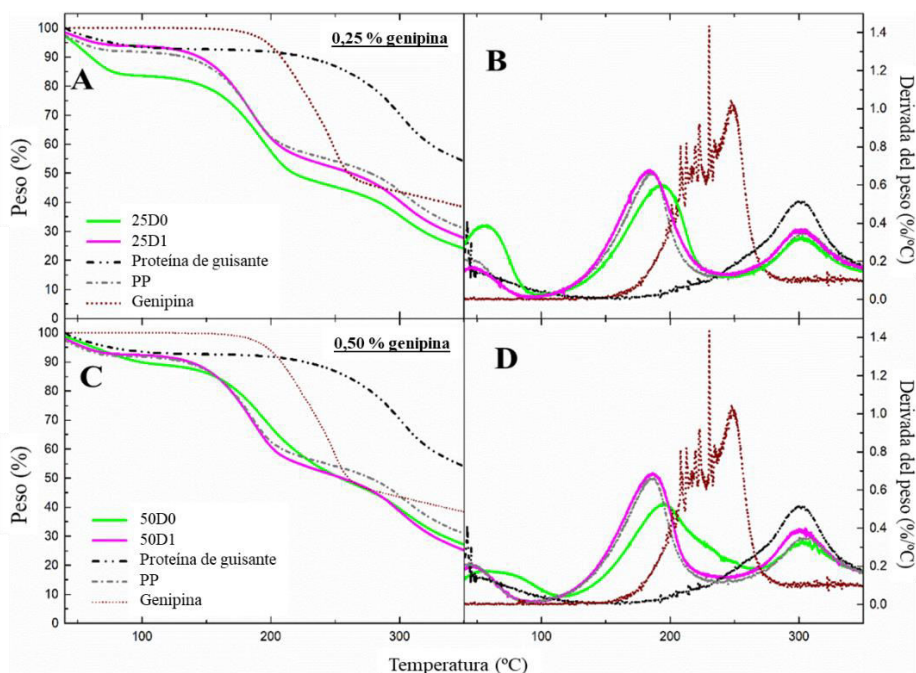


Figura 3.37. (A) TGA y (B) peso de derivados de mezclas de proteína de guisante entrecruzadas con genipina al 0,25 % a Día 0 (25D0) y Día 1 (25D1); y (C) TGA y (D) peso de derivados de las masas de guisante entrecruzadas con genipina al 0,50% a Día 0 (50D0) y Día 1 (50D1). También se incluyeron la mezcla de proteína de guisante no entrecruzada (PP) y la materia prima (harina de proteína de guisante y genipina).

Por otro lado, la genipina mostró un único pico térmico entre 180-280 °C (Figura 3.37B), donde se produjo la degradación de la red estructural de la genipina mediante la ruptura de C=C y C-O junto con la deshidratación de la molécula (Jackcina Stobel Christy et al., 2020). En este sentido, se pueden notar algunas diferencias en función del tiempo de curado en la gráfica para las masas entrecruzadas, principalmente en el rango de temperatura de 100 a 250 °C, con un desplazamiento de este pico de degradación a medida que aumenta el tiempo de curado. Así, el sistema 50D0 mostró dos picos superpuestos en este rango de temperatura (~200 y 240 °C), debido a la existencia de un sistema no homogéneo y la subsiguiente degradación térmica tanto de la matriz de mezcla como de la genipina no entrecruzada, respectivamente.

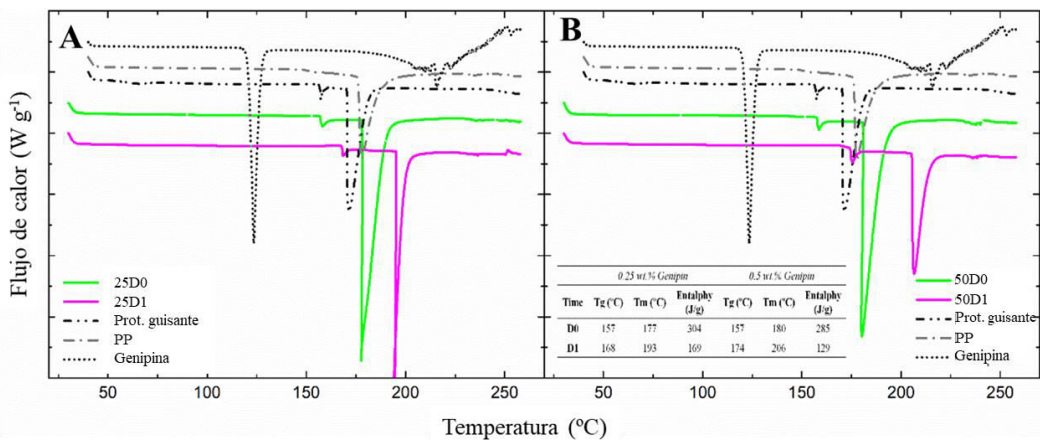


Figura 3.38. Calorimetría diferencial de barrido de las masas entrecruzadas (A) con genipina al 0,25% a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0) y Día 1 (25D1); y (B) con genipina al 0,50% a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0) y Día 1 (50D1). También se incluyeron la masa de proteína de guisante no entrecruzada (PP) y las materias primas (harina de proteína de guisante y genipina).

Sin embargo, a medida que aumentaba el tiempo de curado y avanzaba la reacción de entrecruzamiento (50D1), se obtuvo un perfil de degradación térmica similar a los mostrados por el sistema de referencia (PP) como resultado de la introducción de la cantidad total de genipina

Resultados y Discusión

en la red microestructural química del polímero. Este hecho también corrobora la red entrecruzada que se forma entre las materias primas. Sin embargo, la modificación en la microestructura causada por la genipina no genera efectos significativos en el TGA con respecto al sistema de referencia.

En la Figura 3.38 se muestran los perfiles de calorimetría diferencial de barrido que brindan información sobre las propiedades térmicas de los biopolímeros y su evolución con el tiempo de curado. El comportamiento térmico de las proteínas mostró propiedades de un polímero parcialmente amorfo, en el que se pudieron detectar dos eventos térmicos endotérmicos en el rango de 30-250 °C. Así, se identificó una transición vítrea alrededor de los 156 °C junto con una transición de fusión (171 °C, 155 J/g) en las curvas de proteína de guisante. Estas temperaturas se desplazaron al incluir glicerol en la formulación (PP), siendo 150 y 177 °C (127 J/g), respectivamente (Acquah et al., 2020b). Por otro lado, también se podrían detectar algunas diferencias en los eventos térmicos cuando se agrega genipina como agente de entrecruzamiento. De esta forma, estas mezclas comprenden numerosas interacciones que involucran polisacáridos y grupos amino, lo que resulta en un aumento de los enlaces intermoleculares, y conducen a una reducción en la movilidad de la cadena con un consecuente incremento en la Tg (de 150 a 157 °C) (Ray et al., 2010; Whitehead et al., 2020). Además, como se puede ver en la Figura 3.38, se detectó un desplazamiento de ambos eventos térmicos, Tg y punto de fusión (Tm), a medida que avanzaba la reacción de entrecruzamiento debido al mayor número de asociaciones inter (e intra) moleculares con los grupos amino de la proteína de guisante. Además, debe notarse que el entrecruzamiento generalmente induce una reducción en la entalpía de fusión (de 304 a 169 J/g para los

sistemas 25D0 y 25D1 y de 285 a 129 J/g para los sistemas 50D0 y 50D1, respectivamente) debido tanto a una disminución en los puentes de hidrógeno que forman la red microestructural, que se rompen endotérmicamente, y un aumento simultáneo en la extensión de los enlaces cruzados covalentes, que se rompen exotérmicamente (Bigi et al., 2002).

Por otra parte, también se han realizado rampas de temperatura sobre las masas elaboradas con un 0,25 % (Figura 3.39A) y 0,50 % de genipina (Figura 3.39B), además de para el sistema de referencia (PP). Dicho sistema de referencia mostró una disminución en los valores de E' hasta un punto de inflexión. A continuación hay un aumento en los valores de E' probablemente debido al bajo peso molecular de la proteína de guisante (Perez et al., 2016), que facilita la interacción entre las cadenas biopoliméricas y, en consecuencia, da lugar a un reforzamiento del bioplástico (Jiménez-Rosado et al., 2021).

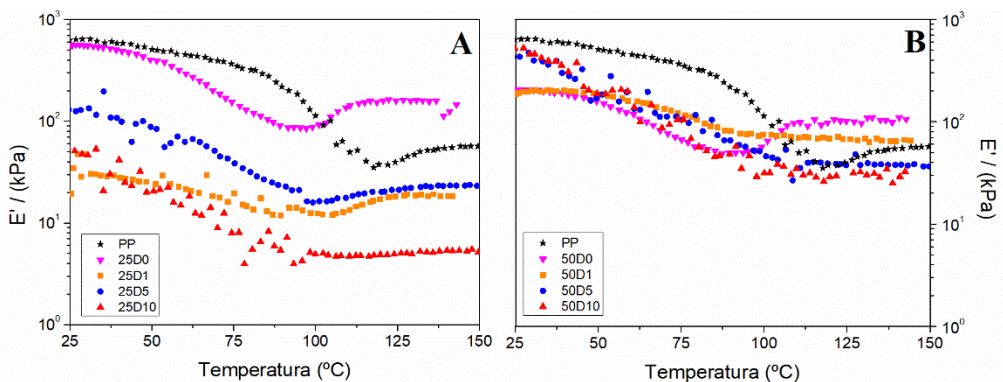


Figura 3.39. Rampas de temperatura de bioplásticos entrecruzados por la adición de genipina (A) 0,25 % y (B) 0,50% con diferentes tiempos de curado de las mezclas (día 1, día 5 y día 10). Se ha incluido como referencia el bioplástico a base de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

El fortalecimiento observado a 125 °C para el sistema PP también se observa para el 25D0 y el 25D1, probablemente porque en este sistema la interacción con la genipina ocurre más lentamente, de ahí que tenga

lugar el efecto de la temperatura. Sin embargo, para los sistemas 25D5 y 25D10 se produce una mayor interacción con la genipina y, como consecuencia, no se observa el endurecimiento del material (con el consecuente aumento de E' con la temperatura). Un comportamiento similar tuvo lugar con los bioplásticos obtenidos con genipina al 0,50 % (Figura 3.39B). El aumento en los valores de E' después del mínimo ocurre para el sistema 50D0. Sin embargo, a partir de 50D1 los valores de E' alcanzan una región de meseta donde no se observa este endurecimiento, ya que al tener genipina a mayor concentración la interacción se produce antes, por lo que no se produce aumento con la temperatura. Así, el proceso de curado ocurrió más rápido cuando la concentración de genipina es mayor, como se observó previamente en el cambio de color de las mezclas y corroborado por los análisis FTIR y TGA.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el cambio conformacional inducido por la presencia de genipina influye en las propiedades térmicas del material resultante, ya que el endurecimiento térmico se presenta a temperaturas más bajas que el sistema PP y no se presenta cuando aumenta el tiempo de curado para ambos bioplásticos entrecruzados con genipina. Además, existe una reducción de los módulos elásticos cuando los sistemas se entrecruzan, como observaron previamente otros autores (Jiménez-Rosado et al., 2020b).

Caracterización de los bioplásticos

El grado de entrecruzamiento de los bioplásticos proteicos de guisante entrecruzados con genipina al 0,25 y 0,50 % se muestra en la Tabla 3.23. Como se puede observar, hay un aumento del grado de entrecruzamiento con el tiempo. En concreto, los bioplásticos obtenidos con un 0,25 %

presentan un grado de entrecruzamiento de hasta el 11 % respecto al sistema de referencia. Por otro lado, los sistemas con genipina al 0,50 % obtuvieron un entrecruzamiento entre 20-23 %.

Tabla 3.23. Grado de entrecruzamiento de los bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,25 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0B), Día 1 (25D1B), Día 5 (25D5B), Día 10 (25D10B); y bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,50% a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0B), Día 1 (50D1B), Día 5 (50D5B), Día 10 (50D10B). Se incluyeron diferentes letras como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores.

SISTEMAS	Grado de entrecruzamiento (%)
25D0B	3,3 ± 4,1 ^a
25D1B	8,8 ± 2,3 ^{ab}
25D5B	9,6 ± 3,9 ^{ab}
25D10B	10,9 ± 0,7 ^b
50D0B	7,8 ± 1,6 ^{ab}
50D1B	10,9 ± 5,3 ^{ab}
50D5B	22,3 ± 6,9 ^c
50D10B	20,6 ± 4,2 ^c

Por otro lado, los parámetros de color (*a*, *b* y *L**) para los diferentes sistemas se muestran en la Tabla 3.24. Como se puede observar, los sistemas entrecruzados con genipina muestran una disminución significativa en los valores de los parámetros *a* y *b* debido a un cambio en el color de los bioplásticos de un tono amarillo anaranjado a un color azul oscuro. En este sentido, también se observa un oscurecimiento de la muestra como consecuencia de la disminución observada en el parámetro *L** con respecto a la referencia. Este cambio de color hacia una tonalidad azul, provocado por la adición de genipina, ha sido observado por otros autores en estudios previos (Gorczyca et al., 2014).

Resultados y Discusión

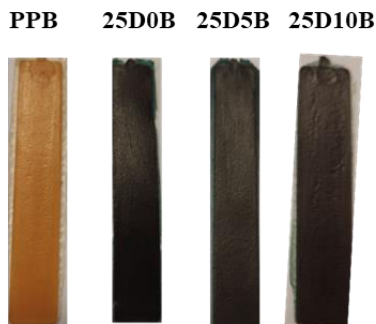


Figura 3.40. Imágenes de los bioplásticos resultantes de la reacción con genipina (de izquierda a derecha): PPB, 25D0B, 25D5B y 25D10B.

Comparando el color de los bioplásticos y las mezclas (Tabla 3.24), el proceso de moldeo por inyección promovió la reacción entre la proteína de guisante y la genipina ya que hubo un cambio de color para todos los sistemas estudiados. En otras palabras, se obtuvieron bioplásticos azulados independientemente del color de la masa (Figura 3.40).

Tabla 3.24. Parámetros de color (a , b y L^*) de los bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,25 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0B), Día 1 (25D1B), Día 5 (25D5B), Día 10 (25D10B); y bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,50 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0B), Día 1 (50D1B), Día 5 (50D5B), Día 10 (50D10B).

SISTEMAS	a	Δa	b	Δb	L^*	ΔL
PPB (Ref.)	$3,7 \pm 0,2$	-	$13,1 \pm 0,8$	-	$31,5 \pm 0,6$	-
25D0B	$1,1 \pm 0,1$	-2,6	$-0,8 \pm 0,1$	-13,9	$19,1 \pm 0,7$	-21,4
25D1B	$1,4 \pm 0,6$	-2,3	$-0,6 \pm 0,2$	-13,7	$18,5 \pm 0,3$	-13
25D5B	$0,4 \pm 0,1$	-3,3	$-0,7 \pm 0,1$	-13,8	$18,5 \pm 0,5$	-13
25D10B	$0,3 \pm 0,1$	-3,4	$-0,9 \pm 0,1$	-14,0	$20,8 \pm 1,6$	-10,7
50D0B	$2,4 \pm 0,3$	-1,3	$0,1 \pm 0,2$	-13,0	$17,9 \pm 0,3$	-13,6
50D1B	$1,1 \pm 0,1$	-2,6	$-0,4 \pm 0,3$	-13,5	$19,9 \pm 0,3$	-11,6
50D5B	$1,4 \pm 0,1$	-2,3	$-1,0 \pm 0,3$	-14,1	$18,9 \pm 0,2$	-12,6
50D10B	$1,3 \pm 0,1$	-2,4	$-1,1 \pm 0,1$	-14,2	$19,0 \pm 0,2$	-12,5

Los perfiles obtenidos para las pruebas de barrido de frecuencia se pueden ver en la Figura 3.41. Los resultados obtenidos para los bioplásticos con 0,25 % de genipina (Figura 3.41A) demuestran que tiene lugar un aumento significativo del módulo elástico con cierta inestabilidad a baja frecuencia cuando aumenta el tiempo de curado. Sin embargo, los sistemas al 0,50 % son más estables con la frecuencia (Figura 3.41B), teniendo lugar un incremento del módulo sin diferencias significativas en los perfiles, probablemente como consecuencia de que la reacción de entrecruzamiento ocurre más rápido, estabilizando antes los sistemas.

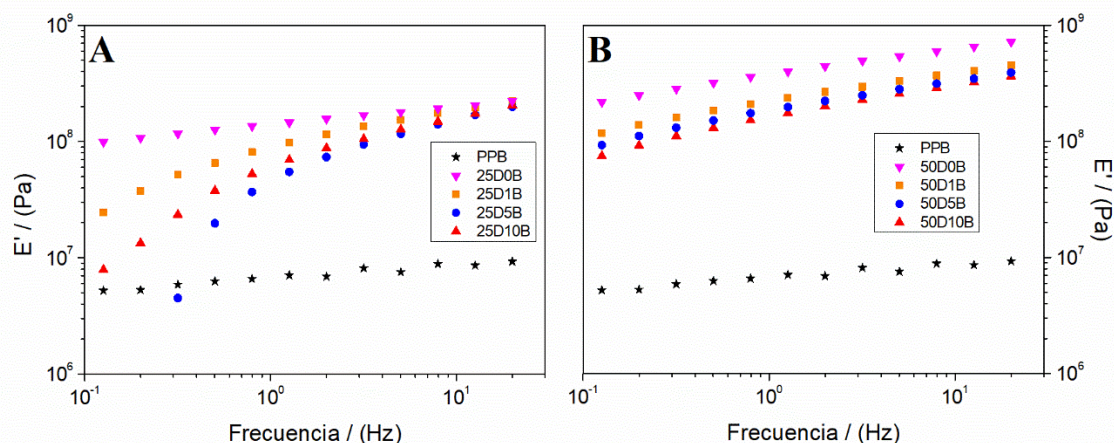


Figura 3.41. Barridos de frecuencia de (A) los bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,25 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0B), Día 1 (25D1B), Día 5 (25D5B), Día 10 (25D10B); y (B) bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,50% a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0B), Día 1 (50D1B), Día 5 (50D5B), Día 10 (50D10B). Se ha añadido como referencia el bioplástico a base de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

En general, hay un refuerzo de las estructuras entrecruzadas como se ve por los valores más altos de E' con respecto al sistema de referencia sin ningún agente de entrecruzamiento, lo que es más significativo para los bioplásticos al 0,50 %. Comparando los valores de E' a 1 Hz (E'_1) mostrados en la Tabla 3.25, se observa que los sistemas son menos

Resultados y Discusión

rígidos a medida que aumenta el tiempo de curado, aunque sin diferencias significativas para los sistemas 50D5B y 50D10B. Los bioplásticos entrecruzados con genipina presentaron valores de E' más altos que otros estudiaron bioplásticos obtenidos con proteína de arroz o soja (Felix et al., 2017; Fernández-Espada et al., 2016).

Tabla 3.25. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de ensayos de flexión dinámica (módulo elástico a 1 Hz, E'_1 ; y tangente de pérdidas a 1 Hz: $\tan(\delta)_1$) de los bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,25 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0B), Día 1 (25D1B), Día 5 (25D5B), Día 10 (25D10B); y bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,50 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0B), Día 1 (50D1B), Día 5 (50D5B), Día 10 (50D10B). Además, se ha añadido como referencia el bioplástico a base de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento (PPB). Se incluyeron diferentes letras como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores.

SISTEMAS	E'_1 (Pa) · 10 ⁻⁸	$\tan(\delta)_1$ (-)
PPB (Referencia)	0,06 ± 0,02 ^A	0,22 ± 0,01 ^a
25D0B	0,94 ± 0,06 ^B	0,26 ± 0,02 ^a
25D1B	0,89 ± 0,12 ^B	0,26 ± 0,01 ^a
25D5B	0,42 ± 0,05 ^C	0,38 ± 0,06 ^b
25D10B	0,46 ± 0,02 ^C	0,32 ± 0,04 ^b
50D0B	3,28 ± 0,72 ^D	0,30 ± 0,01 ^b
50D1B	2,52 ± 0,40 ^D	0,30 ± 0,02 ^b
50D5B	1,62 ± 0,34 ^E	0,32 ± 0,03 ^b
50D10B	1,39 ± 0,35 ^E	0,30 ± 0,02 ^b

La Figura 3.42 muestra los perfiles de tracción obtenidos para los sistemas con un 0,25 % (Figura 3.42A) y 0,50 % (Figura 3.42B). Como

se puede observar, todos los sistemas exhibieron un perfil similar, constituido por una región lineal inicial, que corresponde a la deformación elástica, seguida de una región de deformación plástica, caracterizada por una disminución continua en la pendiente esfuerzo-deformación, pasando por un valor máximo. Finalmente, cada sistema se rompió a un valor de deformación diferente.

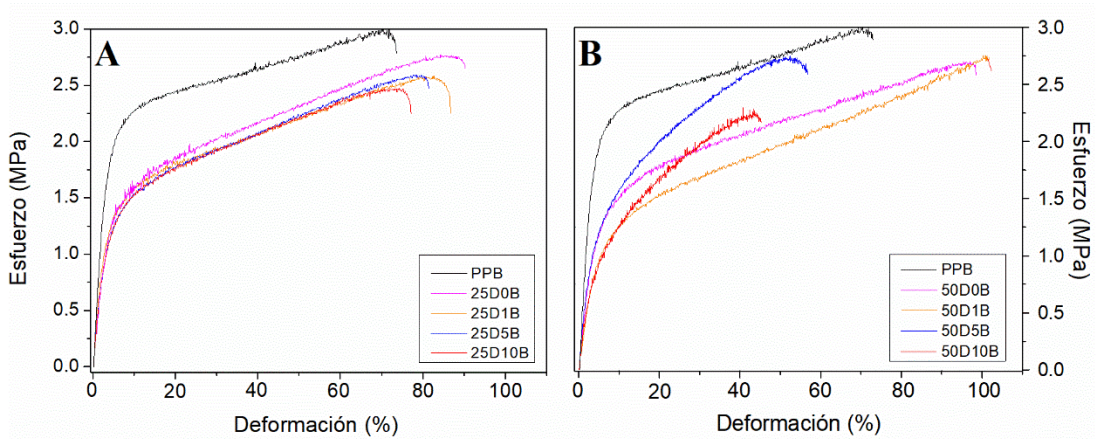


Figura 3.42. Perfiles de tracción de (A) los bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,25 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (25D0B), Día 1 (25D1B), Día 5 (25D5B), Día 10 (25D10B); y (B) bioplásticos entrecruzados con genipina al 0,50 % a diferentes tiempos de curado de la masa: Día 0 (50D0B), Día 1 (50D1B), Día 5 (50D5B), Día 10 (50D10B). Se ha añadido como referencia el bioplástico a base de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

La Tabla 3.26 muestra los parámetros obtenidos a partir de los perfiles de tracción de los sistemas entrecruzados con genipina. En cuanto al módulo de Young y el esfuerzo máximo se observa el mismo efecto, una tendencia decreciente al aumentar la concentración de genipina. Además, tuvo lugar una disminución con el tiempo de curado, siendo también menor que el sistema de referencia sin ningún agente de entrecruzamiento (este efecto es más significativo para los sistemas al 0,50%). Por otro lado, la deformación en la rotura presenta un aumento con la adición de genipina respecto al sistema de referencia.

Resultados y Discusión

Tabla 3.26. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción (módulo de Young, esfuerzo máximo y deformación en la rotura) de los bioplásticos entrecruzados con 0,25 % y 0,50 % de genipina en diferentes tiempos de curado de la masa (día 0, día 1, día 5 y día 10). Se ha añadido como referencia el bioplástico sin ningún método de entrecruzamiento. Se han incluido símbolos diferentes como superíndices para indicar diferencias significativas entre los valores de cada columna.

SISTEMAS	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
PPB	59,58 ± 8,95 ^A	2,83 ± 0,32 ^I	71,8 ± 2,0 ^a
25D0B	43,00 ± 7,88 ^B	2,70 ± 0,26 ^I	82,9 ± 9,3 ^{abc}
25D1B	36,65 ± 6,15 ^B	2,60 ± 0,10 ^I	84,0 ± 3,1 ^b
25D5B	36,34 ± 4,63 ^B	2,60 ± 0,12 ^I	81,2 ± 4,1 ^b
25D10B	36,08 ± 3,17 ^B	2,50 ± 0,11 ^I	73,6 ± 1,9 ^a
50D0B	31,67 ± 0,94 ^C	2,70 ± 0,01 ^I	93,8 ± 4,7 ^c
50D1B	20,33 ± 2,40 ^D	2,67 ± 0,21 ^I	108,1 ± 2,9 ^c
50D5B	23,89 ± 3,20 ^D	2,65 ± 0,07 ^I	50,7 ± 3,2 ^d
50D10B	22,75 ± 4,04 ^D	2,00 ± 0,26 ^{II}	42,3 ± 2,3 ^e

Por otra parte, la capacidad de absorción de agua y la pérdida de material soluble de los diferentes sistemas con y sin agentes de entrecruzamiento se han añadido en la Figura 3.43. En ella se puede observar como la adición de genipina produce una disminución de la capacidad de absorción de agua de los bioplásticos, siendo para todos los sistemas inferior al sistema de referencia. Comparando los diferentes sistemas, el tiempo de curado no afectó la captación de absorción ya que no existen diferencias significativas ni en los sistemas obtenidos al 0,25 % ni en aquellos al 0,50 % de concentración de genipina. En cuanto a la evaluación de la concentración del agente de entrecruzamiento, se demostró cómo, al aumentar la concentración de genipina se produce una

disminución de la capacidad de absorción de agua de los bioplásticos obtenidos. Esta disminución puede deberse a una combinación de dos efectos. Por un lado, la adición de genipina genera un cambio en la microestructura que confiere al material un mayor carácter hidrofóbico debido a la presencia de grupos aromáticos en la estructura final, junto con la ruptura de la formación de puentes de hidrógeno según se observa en los ensayos de DSC. Por otra parte, el mayor grado de entrecruzamiento puede inducir una menor movilidad de las cadenas proteicas y, por tanto, disminuir la capacidad de absorción de agua. Por otro lado, la adición de genipina como agente de entrecruzamiento no influyó en la pérdida de materia soluble, ya que para todos los sistemas se encontró en el rango entre 45-50 %. Dichos valores son similares a los obtenidos para otros bioplásticos estudiados basados en proteína de cangrejo o soja, aunque superiores a los obtenidos para proteína de arroz (Felix et al., 2017).

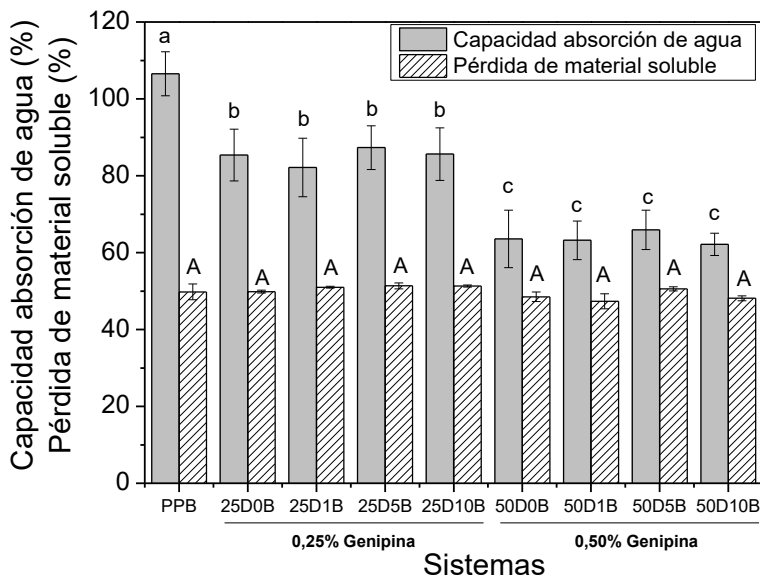


Figura 3.43. Absorción de agua y pérdida de material soluble de los bioplásticos entrecruzados con 0,25 % y 0,50 % de genipina en diferentes tiempos de curado de la masa (día 0, día 1, día 5 y día 10). Se ha incluido como referencia el bioplástico sin ningún método de entrecruzamiento.

3.3.3. Efecto del entrecruzamiento enzimático

Se ha estudiado el grado de entrecruzamiento de los sistemas obtenidos mediante la adición de transglutaminasa a su formulación inicial (Figura 3.44).

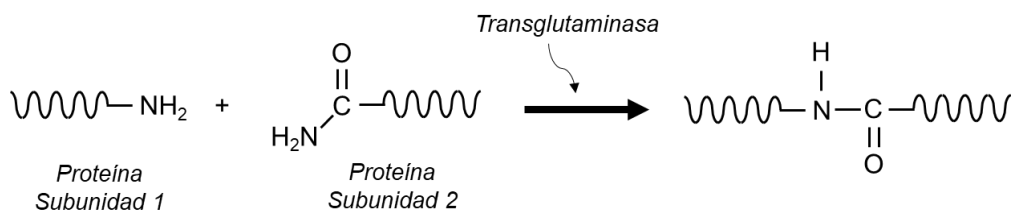


Figura 3.44. Imagen esquemática de la reacción de entrecruzamiento usando transglutaminasa en materiales proteicos.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 3.27, una mayor concentración del agente de entrecruzamiento condujo a un aumento en el grado de entrecruzamiento del sistema comparando los valores obtenidos cuando se utiliza transglutaminasa al 0,25 o al 0,50 %. Al igual que sucedía en el apartado anterior, el aumento observado en el grado de entrecruzamiento se debe a la presencia, en mayor proporción, del agente que fomenta la interacción entre las diferentes cadenas proteicas.

Tabla 3.27. Grado de entrecruzamiento de bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa en diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %).

SISTEMAS	Grado de entrecruzamiento (%)
TG25	$19,0 \pm 6,5^A$
TG50	$30,7 \pm 7,4^B$

La influencia de la adición de transglutaminasa en la apariencia de los bioplásticos se observa en la Figura 3.45.

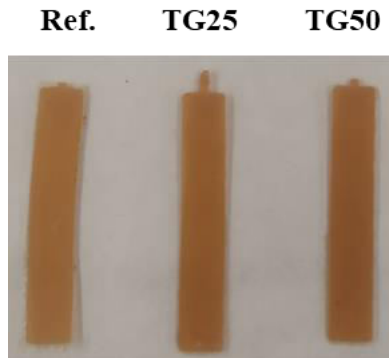


Figura 3.45. Aspecto visual de bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa. De izquierda a derecha: referencia (sin agente de entrecruzamiento), transglutaminasa al 0,25 % y transglutaminasa al 0,50 %.

Los parámetros de color calculados de los bioplásticos entrecruzados con transglutaminasa se muestran en la Tabla 3.28. La adición de transglutaminasa no genera modificaciones en el aspecto de los bioplásticos resultantes ya que no hay diferencias significativas en los bioplásticos entrecruzados respecto a la referencia.

Tabla 3.28. Parámetros de color (a, b y L) de bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa en diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %). Se ha incluido como referencia el bioplástico a base de harina de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.*

SISTEMAS	a	Δa	b	Δb	L*	ΔL
Referencia	3,7 ± 0,2	-	13,1 ± 0,8	-	31,5 ± 0,6	-
TG25	3,8 ± 0,2	0,1	14,2 ± 0,9	1,1	31,4 ± 0,3	-0,1
TG50	3,9 ± 0,2	0,2	13,9 ± 1,1	0,8	31,6 ± 0,2	0,1

Los resultados de los barridos de frecuencia de los diferentes bioplásticos entrecruzados con transglutaminasa se muestran en la Figura 3.46. Se puede observar como la presencia de la enzima conduce a un aumento en los valores de E', comparando los datos de los sistemas con 0,25 y 0,50 % con la referencia sin entrecruzar. Tal y como comentaron Mirpoor et al. (2022), la presencia de transglutaminasa fomenta la

Resultados y Discusión

formación de nuevos enlaces covalentes que dan lugar a una red morfológica más compacta (Mirpoor et al., 2022).

Sin embargo, evaluando la influencia de la concentración de transglutaminasa, se observa cómo al aumentar la cantidad de transglutaminasa añadida se observa el efecto contrario y los valores de E' para el sistema con transglutaminasa 0,50 % son menores que los obtenidos con un 0,25 %. Esta disminución observada al modificar la concentración del agente de entrecruzamiento se debe a que dichos aditivos requieren una concentración y condiciones específicas para que el proceso de entrecruzamiento ocurra de forma óptima. De hecho, este fenómeno ha sido demostrado previamente en bibliografía en otros materiales de base proteica (Perez-Puyana et al., 2016).

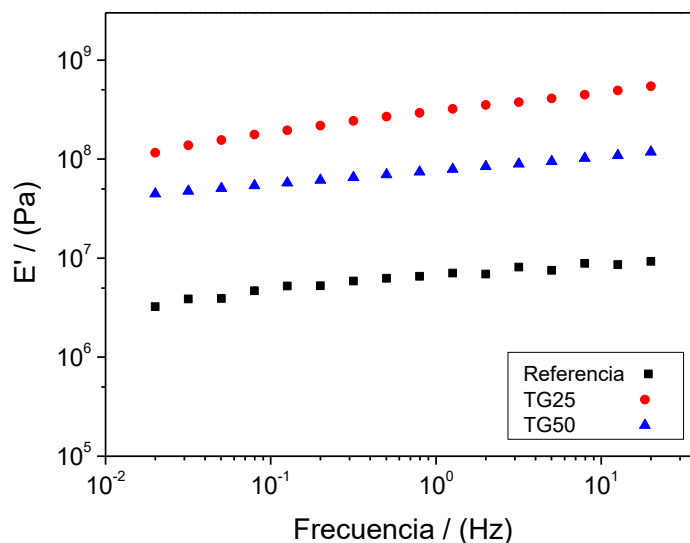


Figura 3.46. Barridos de frecuencia de los bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa en diferentes concentraciones: 0,25 % (TG25) y 0,50 % (TG50). Se ha incluido como referencia el bioplástico sin ningún método de entrecruzamiento.

La comparativa mostrada en la Tabla 3.29 corrobora las diferencias observadas en los perfiles de flexión de la Figura 3.46, pues se comprueba cómo la adición de transglutaminasa genera bioplásticos con

módulos elásticos de 1-2 órdenes de magnitud superior respecto al sistema de referencia, destacando el sistema elaborado con una concentración de 0,25 %.

Tabla 3.29. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de ensayos de flexión dinámica (módulo elástico a 1 Hz, E'_1 ; y tangente de pérdidas a 1 Hz: $\tan(\delta)_1$) de bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa en diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %). Se ha incluido como referencia el bioplástico a base de harina de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

SISTEMAS	E'_1 (Pa) · 10 ⁻⁸	$\tan(\delta)_1$ (-)
Referencia	0,06 ± 0,02 ^A	0,22 ± 0,01 ^a
TG25	2,34 ± 0,58 ^B	0,24 ± 0,02 ^a
TG50	0,84 ± 0,16 ^C	0,23 ± 0,01 ^a

Los perfiles de tracción (Figura 3.47) obtenidos para los sistemas entrecruzados con transglutaminasa presentan las mismas zonas que el sistema de referencia, con una primera parte lineal ascendente (que se corresponde con la deformación elástica del sistema), seguida de una zona de pendiente decreciente (deformación plástica del material) que finaliza con la caída súbita del esfuerzo soportado como consecuencia de la rotura de la probeta. La diferencia principal radica en la longitud de la zona plástica, esto es, en la deformabilidad de los sistemas; siendo bastante inferior cuando se añade transglutaminasa a la formulación inicial. El descenso en la elongación de sistemas entrecruzados con transglutaminasa fue previamente observado por Cui en su estudio de films de gluten, como consecuencia de la reducción de la movilidad de las cadenas proteicas tras el proceso de entrecruzamiento (Cui et al., 2017).

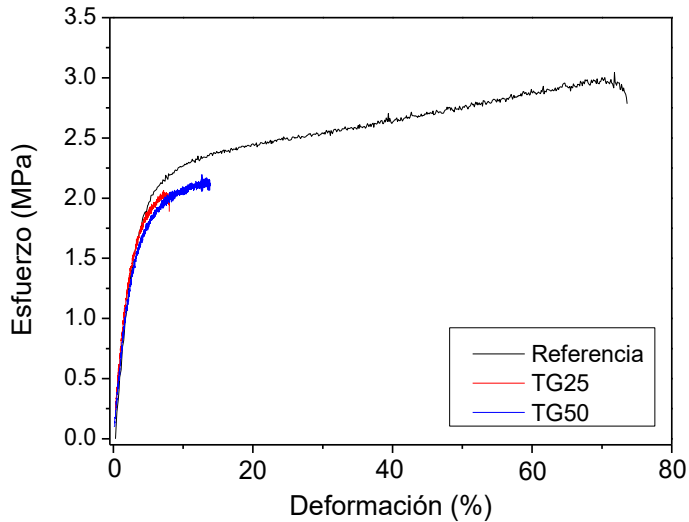


Figura 3.47. Perfiles de tracción de los bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa en diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %). Se ha incluido como referencia el bioplástico a base de harina de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

La Tabla 3.30 muestra un resumen de los parámetros obtenidos a partir de los perfiles de tracción. El módulo de Young muestra una tendencia similar a los resultados obtenidos en flexión, pues la adición de transglutaminasa produce un aumento de la rigidez del bioplástico, pero que, sin embargo, al aumentar la concentración agente de entrecruzamiento se produce un descenso, encontrando un máximo con 0,25 %. Este aumento de la rigidez va asociado a una pérdida de la deformabilidad del sistema como se observa por el descenso drástico de la deformación en la rotura de los sistemas entrecruzados respecto a la referencia.

Los cambios observados para los bioplásticos entrecruzados de proteína de guisante respecto a la referencia son más evidentes en comparación con lo obtenido por otros autores (Cui et al., 2017; Mirpoor et al., 2022) debido a la elevada concentración de lisina que presenta la proteína de guisante (Tabla 3.2).

Tabla 3.30. Parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracción (Módulo de Young, esfuerzo máximo y deformación en la rotura) de bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa en diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %). Se ha incluido como referencia el bioplástico a base de harina de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

SISTEMAS	Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación en la rotura (%)
Referencia	59,58 ± 8,95 ^A	2,83 ± 0,32 ^a	71,8 ± 2,0 ^α
TG25	90,98 ± 17,62 ^B	2,27 ± 0,60 ^{ab}	7,0 ± 1,0 ^β
TG50	70,22 ± 7,92 ^{AB}	2,15 ± 0,07 ^b	9,9 ± 4,1 ^β

La influencia de la adición de transglutaminasa sobre las propiedades funcionales de los bioplásticos proteicos se ha evaluado mediante el análisis de su capacidad de absorción de agua (Figura 3.48). Una baja concentración de transglutaminasa, aunque genera probetas de mayor rigidez, no modifica significativamente su capacidad de absorber agua. En cambio, cuando se dobla la cantidad de transglutaminasa incluida (0,50 %), se obtienen sistemas con una menor capacidad para absorber agua, que deriva en un descenso de la absorción de agua en casi un 30 % del valor del sistema de referencia.

En cambio, la adición de transglutaminasa no genera cambios significativos en la pérdida de material soluble de los sistemas, estando aproximadamente en torno al 45 %, correspondiéndose prácticamente con la cantidad de glicerina presente en el sistema.

Resultados y Discusión

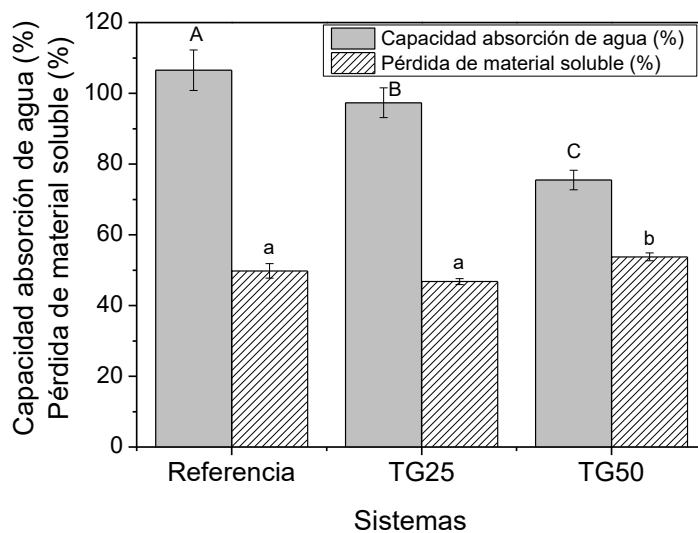


Figura 3.48. Capacidad de absorción de agua y pérdida de material soluble de bioplásticos entrecruzados por la adición de transglutaminasa en diferentes concentraciones (0,25 y 0,50 %). Se ha incluido como referencia el bioplástico a base de harina de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

3.3.4. Comparativa de resultados de los diferentes métodos de entrecruzamiento

Finalmente, tras haber estudiado el efecto de cada tipo de entrecruzamiento sobre los bioplásticos obtenidos a partir de proteína de guisante, se ha realizado una comparación entre ellos. Para ello, a modo de comparación general, se han presentado en la Tabla 3.31 un resumen de todos los métodos de entrecruzamiento estudiados incluyendo algunos de los parámetros estudiados en los apartados anteriores.

Además, para poder llevar a cabo una comparación más visual de los diferentes métodos de entrecruzamiento estudiados, la Figura 3.49 muestra una gráfica radial con diferentes propiedades evaluadas.

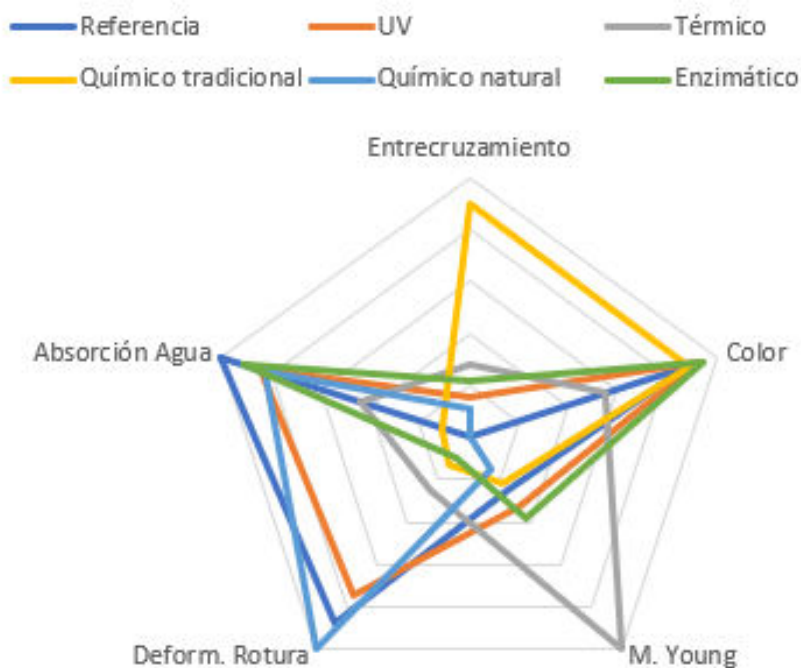


Figura 3.49. Comparativa de las propiedades obtenidas para bioplásticos sometidos a diferentes métodos de entrecruzamiento.

Resultados y Discusión

Respecto a los métodos de entrecruzamiento físico, el tratamiento térmico es el método que genera sistemas con mayor rigidez, generando sistemas con un cambio de color aparente. Por otra parte, el tratamiento UV obtiene sistemas con un perfil de propiedades similar al sistema de referencia con propiedades mejoradas para el módulo de Young, aunque con un ligero descenso de su deformabilidad.

El entrecruzamiento químico genera efectos diferentes en función de si se utiliza un agente químico tradicional (glutaraldehído) o natural (genipina). El tratamiento químico con glutaraldehído genera sistemas con un color similar a la referencia, pero con mucha menos deformabilidad y capacidad de absorción de agua. Por otra parte, el tratamiento con genipina (método químico natural) genera sistemas con un cambio de color apreciable, además de aumentar la deformación en la rotura.

El método de entrecruzamiento enzimático genera sistemas poco deformables, aunque no genere tanto entrecruzamiento como el método químico tradicional. Los sistemas obtenidos muestran un color y capacidad de absorción de agua similar a la referencia.

Tabla 3.31. Tabla resumen de los diferentes métodos de entrecruzamiento elaborados.

SISTEMAS	Entrecruzamiento (%)	<i>b</i>	$E' \cdot 10^{-7}$ (Pa)	Módulo Young (MPa)	Deformación en rotura (%)	Capacidad absorción agua (%)
Referencia	-	13,1 ± 0,8	0,6 ± 0,2	59,6 ± 8,9	71,8 ± 2,0	106,5 ± 5,7
FÍSICO	Tratamiento Térmico 120 °C / 24 h	8,2 ± 0,1	328,3 ± 9,3	238,3 ± 9,1	22,0 ± 12,4	46,5 ± 5,9
	Radiación UV 120 mJ/cm ²	13,8 ± 1,0	1,8 ± 0,3	78,5 ± 8,3	60,4 ± 9,7	89,1 ± 3,3
	Formaldehído 3%	14,9 ± 0,5	161,1 ± 43,5	23,2 ± 5,1	48,0 ± 2,5	22,2 ± 2,8
QUÍMICO	Glioxal 3%	3,4 ± 0,1	30,8 ± 3,3	84,7 ± 4,9	26,1 ± 6,3	17,0 ± 2,7
	Glutaraldehído 3%	13,2 ± 1,1	20,7 ± 3,7	53,3 ± 3,3	5,0 ± 1,0	11,9 ± 0,8
	Genipina 0,25% Día 5	-0,7 ± 0,1	4,2 ± 0,5	36,3 ± 4,6	81,2 ± 4,1	87,3 ± 5,7
	Genipina 0,50% Día 5	-1,0 ± 0,3	16,2 ± 3,4	23,9 ± 3,2	50,7 ± 3,2	65,9 ± 5,1
	Transglutaminasa 0,25%	19,0 ± 6,5	14,2 ± 0,9	23,4 ± 5,8	91,0 ± 17,6	7,0 ± 1,0
ENZIMA	Transglutaminasa 0,50%	30,7 ± 7,4	8,4 ± 1,6	70,2 ± 7,9	9,9 ± 4,1	75,5 ± 2,8

3.4 Ciclo de vida: Estimación de la biodegradabilidad de los bioplásticos proteicos

Los estudios de ciclo de vida pueden ser sobre una etapa específica de un proceso productivo, sobre un producto o sobre un proceso completo desde la extracción de la materia prima hasta el final de la vida útil del producto (comúnmente conocido como *End-of-Life* o *EoL*).

En este caso se ha llevado a cabo un estudio de ciclo de vida preliminar básico que tiene en cuenta, de manera estimada, las emisiones de CO₂ (se trata del principal gas de efecto invernadero y el que generalmente se utiliza como referencia para los cálculos de emisiones) del proceso de fabricación de bioplásticos, así como un coste estimado de producción de un lote de muestras (25 unidades). A pesar de tratarse de un estudio preliminar, permite establecer una comparativa de los costes asociados y emisiones generadas de los diferentes sistemas elaborados. De esta forma, se puede analizar los procesos de fabricación, no solamente desde un punto de vista de las propiedades de los bioplásticos obtenidos, sino desde el punto de vista del proceso en sí y las consecuencias derivadas de llevarse a cabo.

Para dicho estudio se han utilizado algunos datos necesarios para los cálculos realizados. Dichos datos se encuentran resumidos en la Tabla 3.32. En este sentido, la Tabla 3.32 muestra los datos tanto de la materia prima como del producto intermedio (masa) y del producto final (bioplástico) del proceso. Para ello, se han tenido en cuenta las cantidades utilizadas en la etapa de mezclado, así como el peso de un bioplástico obtenido tras la inyección (el lote completo lo conforman 25 unidades).

Tabla 3.32. Cantidad de materia prima, producto intermedio (masa) y bioplástico utilizado y obtenido durante el proceso de fabricación por moldeo por inyección.

Datos		
Materia Prima	Harina de guisante	36 g
	Glicerina	24 g
Masa obtenida		60 g
Bioplástico (x25 unidades)		1 g (25 g)

El diagrama de flujo del proceso puede observarse en la Figura 3.50. Únicamente se ha tenido en cuenta el proceso de fabricación de bioplásticos a partir de las materias primas (sin tener en cuenta el proceso de producción de la materia prima), teniendo como entrada adicional la energía consumida en el proceso de moldeo por inyección (fabricación).

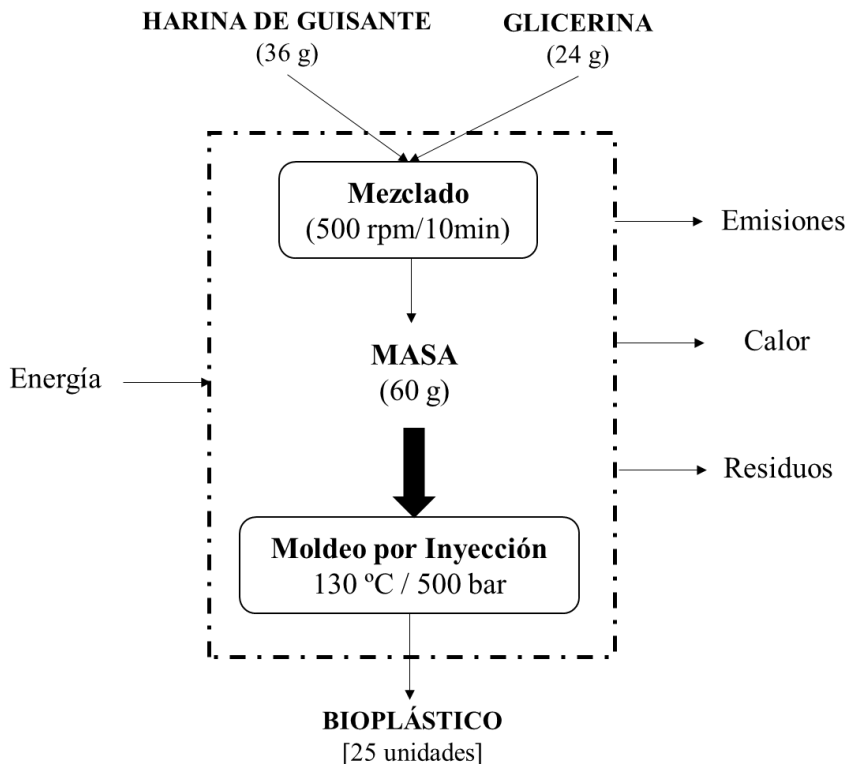


Figura 3.50. Diagrama de flujo que muestra los límites del sistema considerados en el análisis de la fabricación de bioplásticos.

Resultados y Discusión

Por otra parte, la Tabla 3.33 muestra la potencia y emisiones de cada uno de los equipos utilizados en el proceso de fabricación de bioplásticos. La energía de la mezcladora se ha obtenido a partir de la energía mecánica específica para las condiciones de trabajo seleccionadas (60 g de masa a 50 rpm durante 10 minutos). La energía de la inyectora se ha obtenido a partir de los datos técnicos del equipo. Además, una estimación de las emisiones de CO₂ del proceso a partir de la energía consumida teniendo en cuenta los datos de “*The European Environment Agency*” (0,265 kg CO₂/kWh para España) (Hřebíček et al., 2016).

Tabla 3.33. Energía y emisiones de CO₂ de cada etapa del proceso de fabricación de bioplásticos.

Parámetro	Dato
Energía mezcladora	0,010 kWh
Emisiones CO ₂ mezcladora	0,00265 kg CO ₂
Energía inyectora	2,415 kWh
Emisiones CO ₂ inyectora	0,64 kg CO ₂

Teniendo en cuenta los datos de las Tablas 3.32 y 3.33, el proceso de fabricación de bioplásticos descrito ha requerido una energía de 0,097 kWh/g bioplástico. Este valor ha sido obtenido a partir de la energía de la mezcladora y de la energía de la inyectora. Además, a partir de la energía consumida se ha calculado una estimación de las emisiones de CO₂ del proceso, obteniendo unas emisiones de 0,026 kg CO₂/g bioplástico.

Para los costes asociados del proceso de fabricación de bioplásticos, se han calculado a partir del precio de kWh en España (0,299 €/kWh tomando la media del precio medio entre enero y junio de 2022) y el precio de las materias primas, obteniendo que el coste del proceso de fabricación ha sido de 0,24 €/g bioplástico.

Además, se ha obtenidos los costes y emisiones generadas para los métodos de entrecruzamiento descritos anteriormente. Así pues, la energía consumida por el horno y el equipo de radiación UV se han obtenido a partir de los datos técnicos de los equipos. Para los diferentes agentes de entrecruzamiento, se han calculado los gramos necesarios para obtener un lote de bioplásticos (25 unidades) y su coste derivado se ha calculado a partir de los precios (obtenidos a partir de varias empresas de suministro de reactivos químico).

Entrecruzamiento Físico – Tratamiento Térmico

Los cálculos relacionados con la fabricación de bioplásticos de guisante entrecruzados con un tratamiento térmico se han llevado a cabo a partir del diagrama de flujo del proceso que puede observarse en la Figura 3.51.

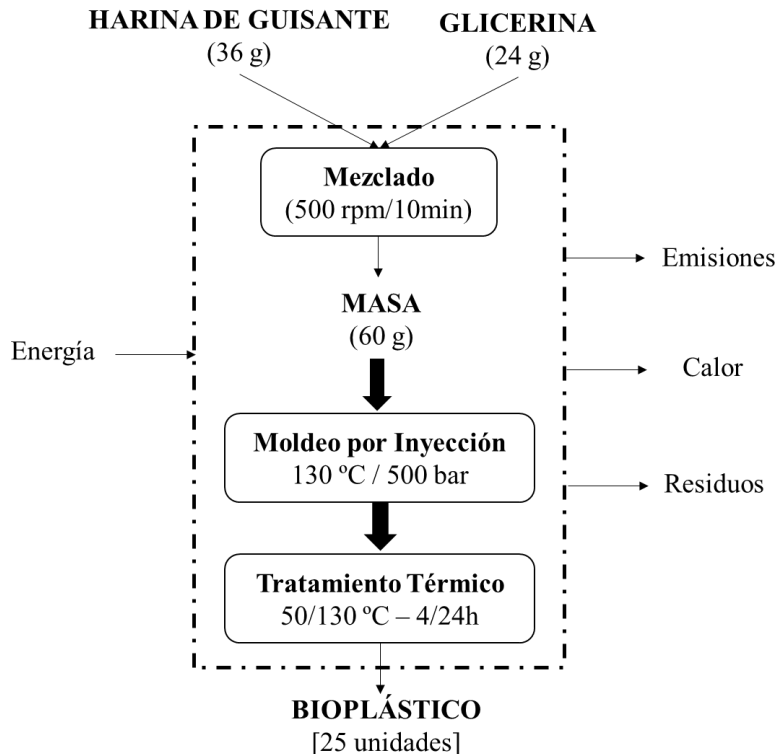


Figura 3.51. Diagrama de flujo que muestra los límites del sistema considerados en el análisis de la fabricación de bioplásticos entrecruzados por un tratamiento térmico.

Resultados y Discusión

Para ello, a lo ya obtenido para el proceso de referencia se han de añadir los datos relativos al horno utilizado para llevar a cabo el entrecruzamiento (Tabla 3.34).

Tabla 3.34. Energía y emisiones de CO₂ para el tratamiento térmico de bioplásticos.

Parámetro	Dato
Energía horno	38,4 kWh
Emisiones CO ₂ horno	10,176 kg CO ₂

Teniendo en cuenta los datos de la Tabla 3.34, para la fabricación de un lote de bioplásticos entrecruzados térmicamente ha sido necesaria una energía de 1,633 kWh/g bioplástico. En este caso, a la energía consumida en el proceso de referencia (2,425 kWh) se han de añadir la energía consumida por el horno durante 24 h (38,4 kWh), con un coste de 0,70 €/g bioplástico (193% superior al proceso de referencia) y unas emisiones asociadas de 0,43 kg CO₂/g bioplástico.

Entrecruzamiento Físico – Radiación UV

Por otra parte, los cálculos relacionados con la fabricación de bioplásticos de guisante entrecruzados mediante radiación UV se han llevado a cabo siguiendo el diagrama de flujo del proceso puede observarse en la Figura 3.52. En este caso, a lo ya obtenido para el proceso de referencia se han de añadir los datos relativos al equipo de UV utilizado para llevar a cabo el entrecruzamiento (Tabla 3.35).

Tabla 3.35. Energía y emisiones de CO₂ para el tratamiento por radiación UV de bioplásticos.

Parámetro	Dato
Energía UV	0,005 kWh
Emisiones CO ₂ UV	0,001 kg CO ₂

Teniendo en cuenta los datos de la Tabla 3.35, para la fabricación de un lote bioplásticos entrecruzados por radiación UV ha sido necesaria una energía de 0,097 kWh/g bioplástico. Este valor ha sido obtenido a partir de la energía del proceso de referencia (2,425 kWh) añadiéndole la energía consumida por el proceso de entrecruzamiento (radiación UV, 0,004 kWh). Mediante la relación energía consumida/emisiones, descrita anteriormente, este proceso ha producido unas emisiones de 0,026 kg CO₂/g bioplástico.

Los costes asociados a este proceso se han calculado a partir de los costes del sistema de referencia sumándole el coste de uso del equipo de radiación UV, obteniendo un coste total de 0,24 €/g bioplástico.

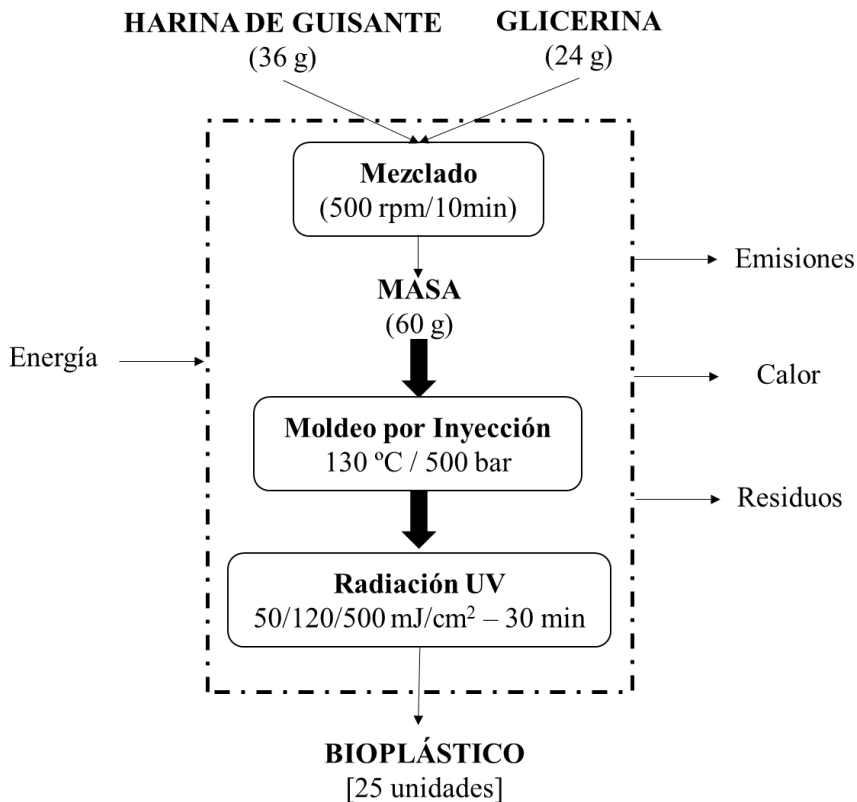


Figura 3.52. Diagrama de flujo que muestra los límites del sistema considerados en el análisis de la fabricación de bioplásticos.

Entrecruzamiento Químico – Glutaraldehído

Los cálculos relacionados con la fabricación de bioplásticos de guisante entrecruzados mediante la adición de glutaraldehído se han llevado a cabo siguiendo el diagrama de flujo del proceso puede observarse en la Figura 3.53.

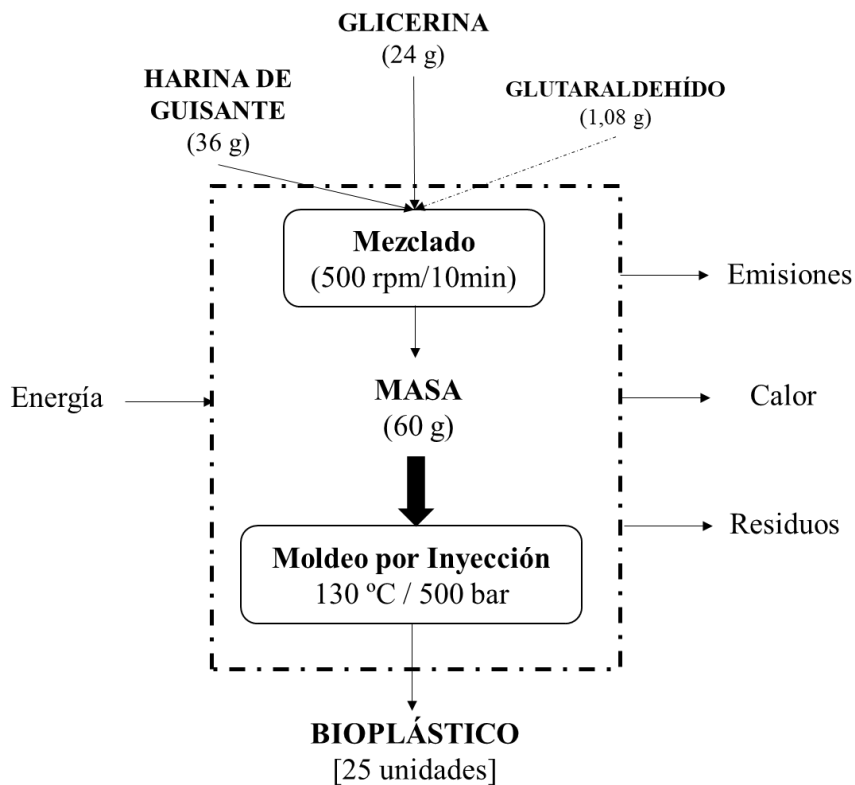


Figura 3.53. Diagrama de flujo que muestra los límites del sistema considerados en el análisis de la fabricación de bioplásticos entrecruzados con glutaraldehído (3%).

En este caso, se ha tenido en cuenta la cantidad de glutaraldehído utilizada, así como su precio (Tabla 3.36).

Tabla 3.36. Datos relacionados con el uso de glutaraldehído como método de entrecruzamiento químico de bioplásticos.

Parámetro	Dato
Cantidad glutaraldehído	1,08 g (3%)
Precio glutaraldehído	82,5 €/kg

En este proceso, la energía consumida y las emisiones de CO₂ son similares al proceso de referencia ya que no hay etapas adicionales. Sin embargo, sí varía el coste de producción ya que se ha añadido el precio de usar glutaraldehído como aditivo (3 %, 1,08 g utilizados para generar un lote de 25 bioplásticos). En este sentido, se ha producido un aumento del 1,5 % respecto al precio de referencia (0,242 €/g bioplástico frente a 0,238 €/g bioplástico).

Entrecruzamiento Químico – Genipina

Como comparativa al tratamiento químico tradicional (uso de glutaraldehído), se ha estudiado el proceso de entrecruzamiento químico por adición de genipina. El diagrama de flujo del proceso de fabricación de un lote de bioplásticos entrecruzados con genipina (0,25%) aparece en la Figura 3.54.

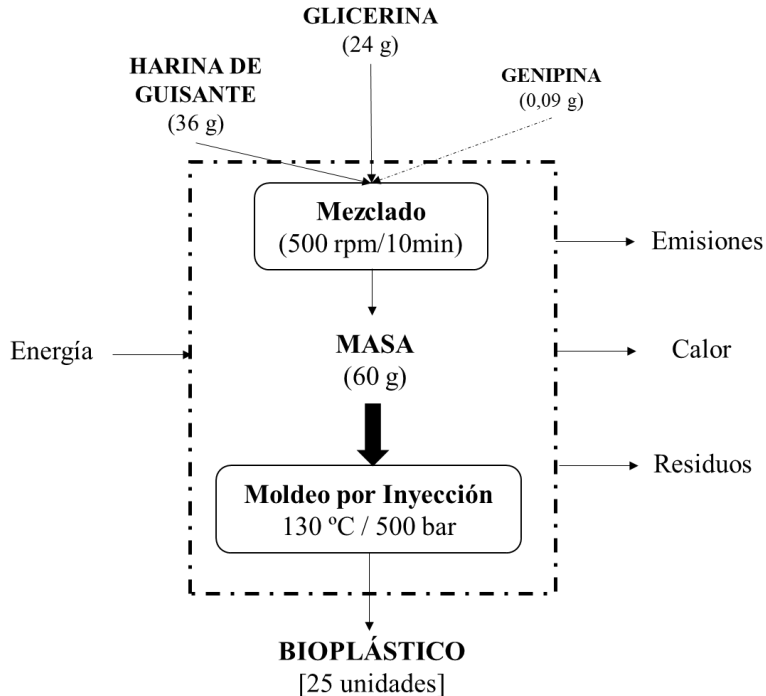


Figura 3.54. Diagrama de flujo que muestra los límites del sistema considerados en el análisis de la fabricación de bioplásticos entrecruzados con genipina (0,25%).

Resultados y Discusión

Además, al igual que en el proceso anterior, para este análisis se ha tenido en cuenta la cantidad de genipina utilizada, así como su precio (Tabla 3.37).

Tabla 3.37. Datos relacionados con el uso de genipina como método de entrecruzamiento químico de bioplásticos.

Parámetro	Dato
Cantidad genipina	0,09 g (0,25%)
Precio genipina	483 €/g

En este proceso, la energía consumida y las emisiones de CO₂ son similares al proceso de referencia ya que no hay etapas adicionales. Sin embargo, sí varía el coste de producción ya que se ha añadido el precio de usar genipina como aditivo (0,25 %, 0,09 g utilizados para generar un lote de 25 bioplásticos). En este sentido, se ha producido un aumento del 730 % respecto al precio de referencia (1,98 €/g bioplástico frente a 0,24 €/g bioplástico). Hay que remarcar que este aumento significativo del precio ha sido debido al uso del precio de la genipina pura a través de Sigma-Aldrich, mientras que sería bastante menor si se extrae a partir del producto natural o se compra de forma industrial.

Entrecruzamiento Enzimático – Transglutaminasa

Finalmente, también se ha analizado el proceso de fabricación de bioplásticos entrecruzados con transglutaminasa (Figura 3.55). De nuevo, para este estudio se ha tenido en cuenta tanto el precio como el consumo de transglutaminasa requerido (Tabla 3.38).

Tabla 3.38. Datos relacionados con el uso de transglutaminasa como método de entrecruzamiento químico de bioplásticos.

Parámetro	Dato
Cantidad transglutaminasa	0,09 g (0,25%)
Precio transglutaminasa	200 €/kg

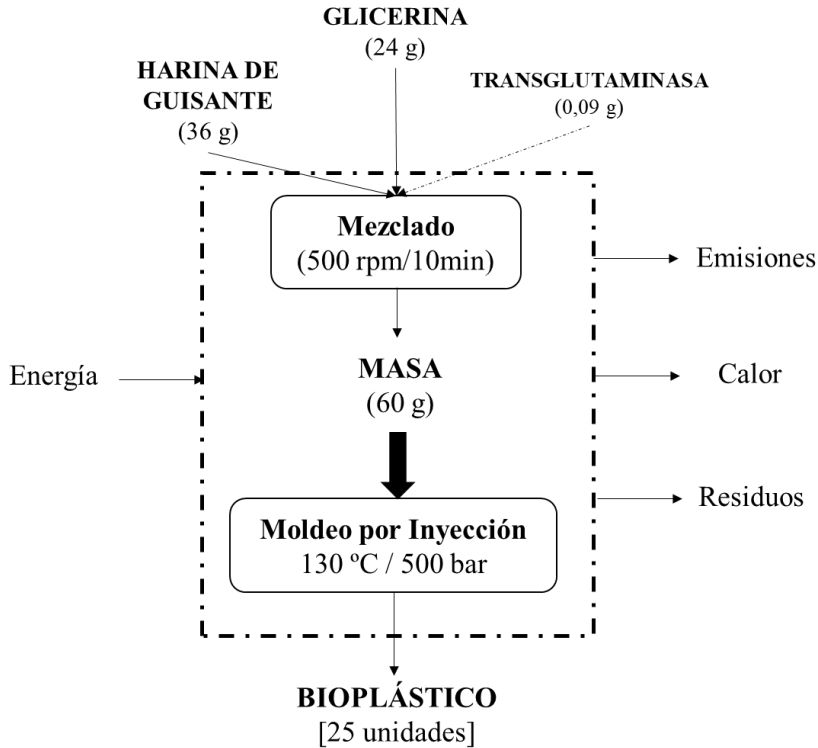


Figura 3.55. Diagrama de flujo que muestra los límites del sistema considerados en el análisis de la fabricación de bioplásticos entrecruzados con transglutaminasa (0,25%).

Al igual que antes, la energía consumida y las emisiones de CO₂ son similares al proceso de referencia ya que no hay etapas adicionales. Sin embargo, sí varía el coste de producción ya que se ha añadido el precio de usar transglutaminasa como aditivo (0,25 %, 0,09 g utilizados para generar un lote de 25 bioplásticos). En este sentido, se ha producido un aumento del 0,33 % respecto al precio de referencia (0,239 €/g bioplástico frente a 0,238 €/g bioplástico).

Los estudios de ciclo de vida de un material plástico encontrado en bibliografía contemplan diferentes alternativas para el fin de vida (*EoL*) de dicho material. En este sentido, además de las vías tradicionales de fin de vida del plástico (esto son reciclaje, incineración y vertedero), los bioplásticos pueden ser tratados como residuos orgánicos planteando

Resultados y Discusión

otras opciones como su desecho en compost o por degradación. La Tabla 3.39 muestra un resumen de datos referentes a las emisiones de CO₂ por kg de plástico para cada una de las alternativas anteriormente mencionadas (Van Roijen & Miller, 2022):

Tabla 3.39. Emisiones de CO₂ de cada una de las alternativas de fin de vida de bioplásticos. Datos obtenidos de Van Roijen and Miller (2022).

Tratamiento	Emisiones de CO₂/kg plástico
Reciclado	1,4 – 1,7 kg CO ₂
Vertederos	2 – 4 kg CO ₂
Incineración	1,5 – 2,5 kg CO ₂
Compostaje	1,1 – 1,3 kg CO ₂
Degradación	0,6 – 0,9 kg CO ₂

La gran mayoría de estudios de ciclo de vida concuerdan en que el reciclado presenta un 30-50 % menos de emisiones de CO₂ que las otras alternativas tradicionales (Van Roijen & Miller, 2022). Sin embargo, esta técnica también presenta un inconveniente relacionado con el deterioro del material. La exposición del bioplástico a temperatura, humedad o a una carga específica puede alterar sus propiedades, sin olvidar que este tipo de materiales son susceptibles al deterioro por envejecimiento.

La eliminación de recursos a través de vertederos debe ser la última opción para el fin de vida de materiales. Sin embargo, es el método más común de eliminación de residuos. Este tratamiento ineficaz puede dar lugar a importantes emisiones CO₂. De hecho, los datos mostrados en la Tabla 3.39 reflejan que se trata de la alternativa que más emisiones emite. Tras los vertederos, la incineración es la segunda ruta de eliminación más común para los plásticos a nivel mundial (Van Roijen & Miller, 2022). La combustión controlada se puede utilizar para aprovechar y convertir el poder calorífico de los desechos en calor o electricidad útil y, al mismo

tiempo, reducir el volumen de residuos presentes. En este sentido, los bioplásticos se pueden incorporar en tales instalaciones de incineración de residuos plásticos por su alto poder calorífico. Sin embargo, teniendo en cuenta la biodegradabilidad de estos materiales, la incineración puede considerarse un desperdicio.

Durante el compostaje, la materia orgánica es descompuesta por un grupo de microorganismos, produciendo CO₂ y humus. El compostaje industrial normalmente se lleva a cabo a temperaturas medias (60-70 °C) y altos contenidos de humedad (60% aprox.) (Bátori et al., 2018). Cabe mencionar que la composición del compost y los parámetros fisicoquímicos juegan un papel importante ya que el compost suministra los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. En comparación con los métodos tradicionales, esta alternativa presenta la ventaja de generar menos emisiones.

De acuerdo a los datos de Van Roijen & Miller (2022), de las posibles alternativas mencionadas, la degradación es aquella que genera una menor cantidad de emisiones de CO₂ (Tabla 3.39). Esta alternativa aprovecha la biodegradabilidad de los bioplásticos (gran ventaja respecto a los plásticos convencionales). La degradación de bioplásticos se puede llevar a cabo de diferentes maneras: degradación térmica, degradación hidrolítica, degradación oxidativa, fotodegradación o degradación microbiana (biodegradación) (Bátori et al., 2018).

La biodegradación es la descomposición del material por microorganismos sin liberar sustancias que puedan ser tóxicas para cultivos, animales o humanos. La degradación llevada a cabo por microorganismos puede realizarse en presencia de oxígeno (condiciones aerobias) o sin oxígeno (condiciones anaerobias), obteniéndose diferentes productos de degradación:

Resultados y Discusión

Bioplástico \rightarrow H_2O + sales minerales + CO_2 [condiciones aerobias]

Bioplástico \rightarrow H_2O + sales minerales + CH_4 [condiciones anaerobias]

En este estudio se ha llevado a cabo un análisis preliminar de los bioplásticos obtenidos, con las diferentes modificaciones realizadas, a través de la estimación de su tiempo de biodegradación. Para ello, se realizó un análisis cualitativo de la degradación de los bioplásticos tomando fotografías a diferentes días después de enterrar las muestras en el suelo. En primer lugar, tal y como puede observarse en la Figura 3.56, el sistema de referencia se degradó completamente después de 10 días.

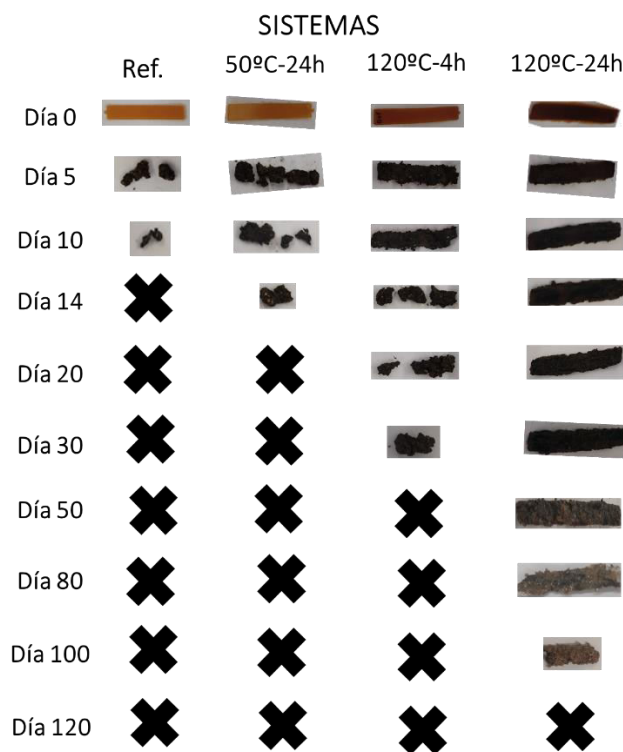


Figura 3.56. Análisis de biodegradabilidad de bioplásticos de proteína de guisante sometidos a temperatura como entrecruzamiento físico. Se utilizó como referencia un bioplástico de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

A continuación, se analizaron los sistemas sometidos a un entrecruzamiento físico. La Figura 3.56 muestra la biodegradabilidad de

los bioplásticos sometidos a un tratamiento térmico. Los resultados obtenidos demuestran que el uso de un tratamiento a 120 °C induce modificaciones en el sistema que dan lugar a bioplásticos más resistentes a la degradación. Cabe destacar el sistema sometido a un tratamiento térmico a 120 °C durante 24 h, cuya degradación completa no se consigue hasta pasados 100 días.

Además del tratamiento térmico, también se analizó la influencia de un tratamiento con radiación UV sobre la biodegradación de los bioplásticos. Tal y como se puede observar en la Figura 3.57, el tratamiento con UV ralentiza la degradación del bioplástico entre un 100 y un 200%, destacando el sistema sometido a una radiación de 120 mJ/cm² que aguanta hasta 30 días antes de su degradación completa.

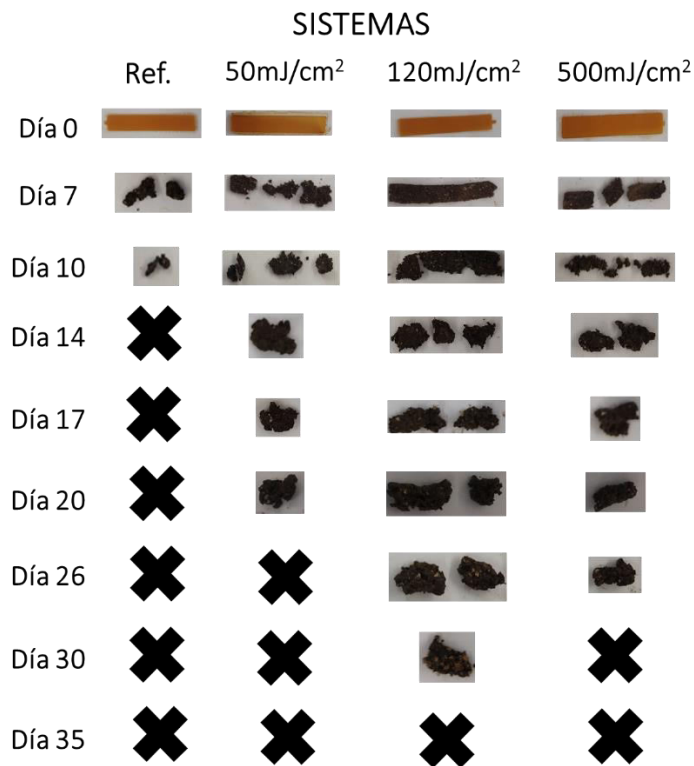


Figura 3.57. Análisis de biodegradabilidad de bioplásticos sometidos a un tratamiento UV como entrecruzamiento físico. Se utilizó como referencia un bioplástico de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

Resultados y Discusión

Por otra parte, se evaluaron los bioplásticos sometidos a un tratamiento de entrecruzamiento químico basado en el uso de aldehídos (Figura 3.58), pudiéndose comprobar que la adición de diferentes aldehídos produjo un retraso en la degradación de las muestras, prolongándose con el aumento de la longitud de la cadena alifática del agente de entrecruzamiento. En este sentido, en términos de biodegradación, hubo un aumento del 40% cuando se agregó formaldehído a la formulación (14 días en lugar de los 10 días de la referencia), un aumento del 100% al usar glioxal (20 días en lugar de los 10 días de la referencia), y un aumento del 300% al añadir glutaraldehído (40 días en lugar de los 10 días de la referencia).

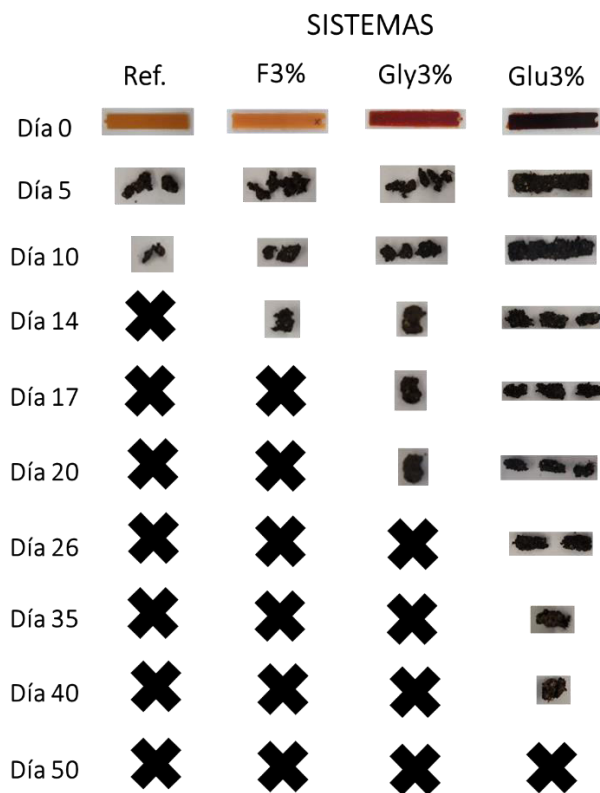


Figura 3.58. Análisis de biodegradabilidad de bioplásticos de proteína de guisante sometidos a entrecruzamiento químico basado en el uso de aldehídos: formaldehído (F3%), glioxal (Gly3%) y glutaraldehído (Glu3%). Se utilizó como referencia un bioplástico de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

Además del uso de aldehídos, se ha evaluado el entrecruzamiento químico de bioplásticos mediante el uso de una sustancia natural como la genipina. La Figura 3.59 muestra la evolución de la biodegradación de los sistemas elaborados con un 0,25 % de genipina a diferentes tiempos de curación de la masa (0, 1, 5 y 10 días). Los resultados demuestran que, al igual que la adición de glutaraldehído, la adición de genipina produce un retraso en el tiempo de degradación de las muestras hasta unos 37-50 días. En concreto, el tiempo de curado de la masa no produce diferencias en la degradación de los sistemas (destacando el sistema con 10 días de curado de la masa).

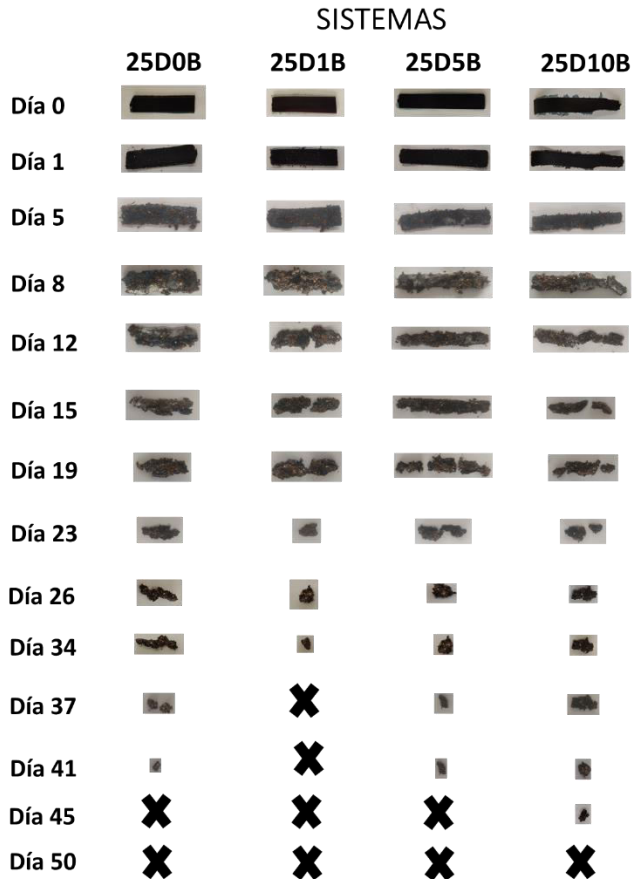


Figura 3.59. Análisis de biodegradabilidad de bioplásticos de proteína de guisante sometidos a entrecruzamiento químico basado en el uso de genipina (GE) (0,25%) a diferentes días de curado de la masa (D0, D1, D5 y D10).

Resultados y Discusión

Finalmente, se ha estudiado la influencia de la adición de una enzima (transglutaminasa) sobre las propiedades de los bioplásticos proteicos (entrecruzamiento enzimático). Los resultados de biodegradabilidad obtenidos se muestran en la Figura 3.60, quedando demostrado que la adición de transglutaminasa, ya sea 0,25 % (TG25) como 0,50 % (TG50), provoca un aumento de la resistencia a degradarse hasta unos 50 días aproximadamente, como consecuencia de la interacción de la enzima con las cadenas proteicas.

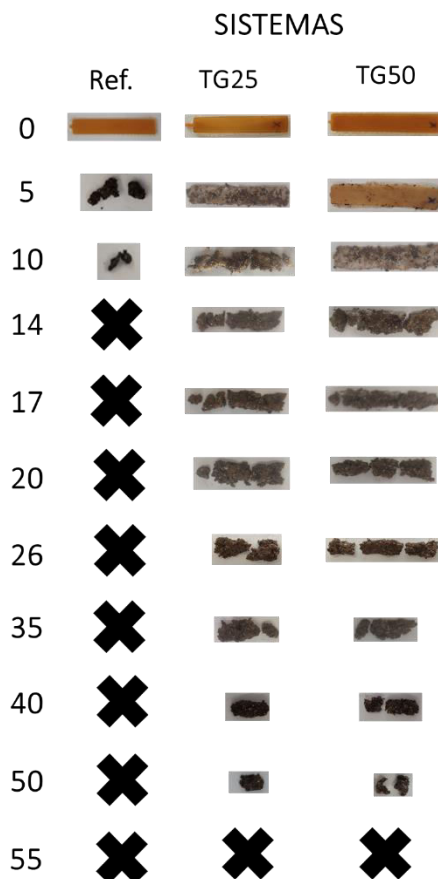


Figura 3.60. Análisis de biodegradabilidad de bioplásticos de proteína de guisante sometidos a entrecruzamiento enzimático basado en el uso de transglutaminasa. Se utilizó como referencia un bioplástico de proteína de guisante sin ningún método de entrecruzamiento.

Tal y como se ha podido comprobar, de manera general, el uso de un método de entrecruzamiento (ya sea físico, químico o enzimático) produce un aumento en el tiempo de degradación de los sistemas. Este aumento puede deberse a una mayor resistencia mecánica de los bioplásticos observada en las pruebas mecánicas; por la actividad antibacteriana de estos sistemas que mataron a las bacterias antes de que pudieran descomponer los bioplásticos; o bien por el posible aumento de la longitud de la cadena biopolimérica que dificulta la digestión de las mismas por las bacterias (Abraham et al., 2021).

A modo de resumen, en la Tabla 3.40 se muestra una comparativa de los diferentes procesos estudiados. En primer aparece el rendimiento de los diferentes procesos. Tal y como puede verse es similar y ha sido calculado como la relación entre la cantidad total de bioplásticos obtenidos (25 g) y la cantidad de masa generada tras el mezclado (60 g). A continuación, tanto el consumo de energía como las emisiones de CO₂ se comprueba que son prácticamente similares para todos los procesos, excepto por el tratamiento térmico debido al uso continuado del horno (24 h) para llevar a cabo el entrecruzamiento de los sistemas. Eso también afecta al coste del proceso (por el aumento de los kWh consumidos) en comparación con el sistema de referencia. Otro proceso que destaca por su elevado coste es aquel llevado a cabo con un entrecruzamiento por genipina debido al elevado precio que tiene este reactivo químico puro. Finalmente, se han incluido el tiempo de degradación de los diferentes sistemas, observando como el tratamiento térmico y los entrecruzamientos con genipina y transglutaminasa son los óptimos para retardar la degradación de los bioplásticos proteicos.

Tabla 3.40. Tabla resumen de los diferentes procesos de fabricación de bioplásticos estudiados.

PARÁMETRO	Degradación (días)	Coste (€/g) proceso	Emisiones CO ₂ (kg)	Consumo Energía (kWh)	Unidades producidas	Rendimiento (%)
Referencia	10	0,238	0,64	2,42	25	42
FÍSICO	Trat. Térmico (120 °C-24h)	0,70	10,82	40,82	25	42
	Radiación UV (120 mJ/cm ²)	0,238	0,64	2,43	25	42
QUÍMICO	Glutaraldehído (3%)	0,242	0,64	2,42	25	42
	Genipina (0,25%)	1,98	0,64	2,42	25	42
ENZIMA	Transglutaminasa (0,25%)	0,239	0,64	2,42	25	42

Para finalizar, la Figura 3.61 muestra una comparativa con un resumen de las propiedades obtenidas para los bioplásticos con los diferentes métodos de entrecruzamiento estudiados, así como para el sistema de referencia sin entrecruzamiento.

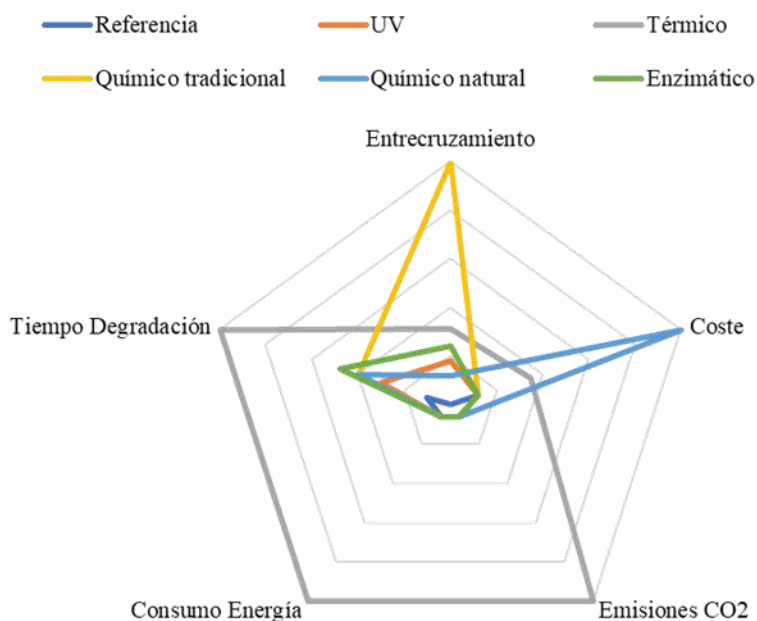


Figura 3.61. Comparativa de las propiedades obtenidas para bioplásticos sometidos a diferentes métodos de entrecruzamiento.

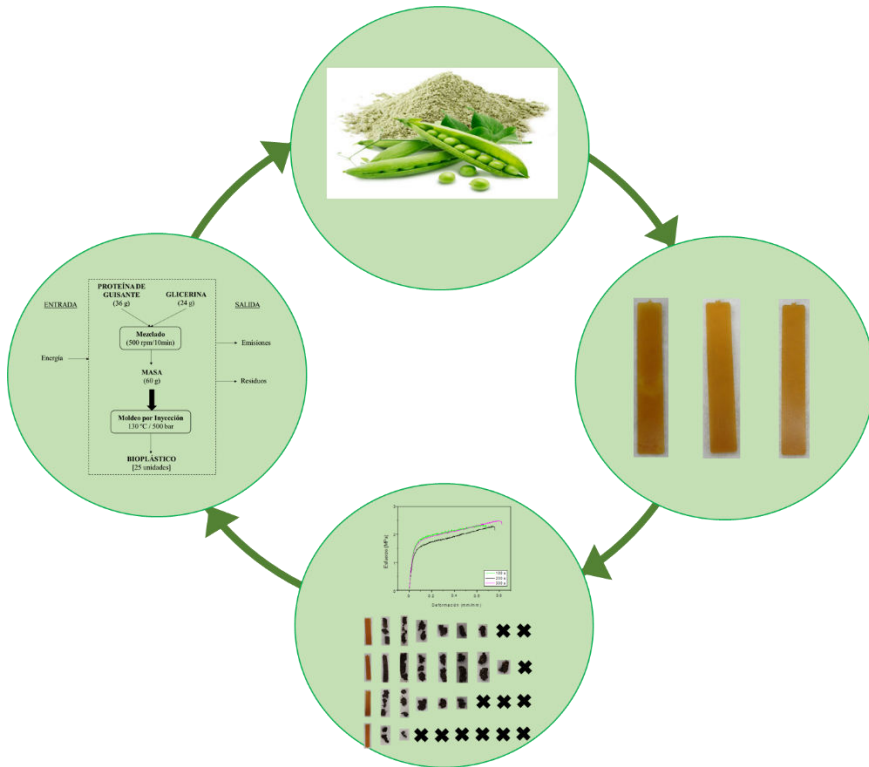
Respecto a los métodos de entrecruzamiento físico, el tratamiento térmico es el método que genera sistemas con mayor tiempo de degradación, aunque se trata del proceso con mayor cantidad de emisiones de CO₂. Por otra parte, el tratamiento UV obtiene sistemas con un perfil de propiedades similar al sistema de referencia, con propiedades mejoradas para el tiempo de degradación. Este método no genera ni emisiones ni costes adicionales al proceso de fabricación de referencia. El entrecruzamiento químico genera efectos diferentes en función de si se utiliza un agente químico tradicional (glutaraldehído) o natural (genipina). El tratamiento químico con glutaraldehído genera sistemas con mayor tiempo de degradación. Además, es el método que genera

Resultados y Discusión

mayor entrecruzamiento sin suponer en un coste o generación de emisiones adicional. Por otra parte, el tratamiento con genipina (método químico natural) es un proceso que genera bioplásticos que tardan más tiempo en degradarse, pero con un aumento significativo del coste de producción como consecuencia del precio elevado del reactivo puro.

El método de entrecruzamiento enzimático genera sistemas con un tiempo de degradación intermedio, aunque no genere tanto entrecruzamiento como el método químico tradicional. Dicho proceso presenta datos similares de emisiones y costes asociados respecto al de referencia.

Capítulo 4: Conclusiones



4.1 Conclusiones

Como conclusión general, se ha conseguido un bioplástico a partir de aislado de proteína de guisante mediante un proceso termomecánico que consta de dos etapas: la primera es un proceso de mezclado y la otra es un moldeo por inyección en condiciones adecuadas de presión y temperatura.

Caracterización de la materia prima

La caracterización de la proteína mostró un contenido proteico del 90%, por lo que se considera un aislado proteico. Por otro lado, el aislado de proteína de guisante está formado por una variedad de fracciones proteicas con diferentes pesos moleculares. En concreto, el perfil aminoacídico reveló que la proteína de guisante es rica en ácido glutámico y aspártico, arginina y lisina, pero presenta bajos porcentajes de metionina y triptófano.

De acuerdo a su perfil de solubilidad, su punto isoelectrico se encuentra entre pH 4-5, mientras que su análisis térmico indicó que su temperatura de transición vítrea está alrededor de los 100 °C.

Influencia de las condiciones de procesado

Es muy importante controlar el proceso de mezclado para obtener una adecuada consistencia y homogeneidad de la mezcla, para lo cual se deben evitar los efectos de estructuración inducidos por cizalla debido a la velocidad de agitación, el tiempo y temperatura de mezclado.

La modificación de la temperatura y el tiempo en el molde e incluso la presión de inyección conduce a bioplásticos con propiedades mecánicas y funcionales modificables:

- Efecto de la temperatura del molde: Un aumento de la temperatura conduce a un aumento en la deformación y, consecuentemente, una

disminución del módulo de Young, así como una disminución de la transparencia de los bioplásticos, sin variar la tensión máxima ni su capacidad de absorción de agua. Una temperatura superior a 150°C induce la degradación de las proteínas, no pudiendo ser inyectadas a partir de esta temperatura.

- Efecto del tiempo en el molde: Un aumento en el tiempo en el molde muestra una disminución progresiva en la absorción de agua y la transparencia de los bioplásticos (a medida que se vuelven más cristalinos). El único parámetro que muestra alguna variación (aumento) con el tiempo en el molde es la deformación en la rotura.
- Efecto de la presión de inyección: Un aumento de la presión induce un crecimiento de la deformación en la rotura por tracción. La absorción de agua apenas se ve afectada por la presión, mientras que la transparencia muestra un mínimo a presiones intermedias.

Evaluación del entrecruzamiento de bioplásticos proteicos

- Se han obtenido bioplásticos basados en proteína de guisante con propiedades mejoradas mediante la aplicación de una etapa adicional de entrecruzamiento físico durante el proceso de fabricación. Específicamente, el tratamiento térmico produjo sistemas con propiedades mecánicas mejoradas, aunque redujo significativamente su capacidad de absorción de agua y deformación crítica. De hecho, el tratamiento térmico a 50 °C produjo bioplásticos más claros, mientras que a 120 °C se obtuvieron sistemas con un tono más oscuro. En cambio, la radiación UV mejoró la deformación en la rotura de las muestras. Además, también produjo un aumento del entrecruzamiento de los bioplásticos junto con una ligera disminución de su capacidad de absorción de agua. Comparando ambos tratamientos, el tratamiento térmico produjo sistemas más rígidos y quebradizos, mientras que la

Conclusiones

- radiación UV mejoró la deformabilidad junto con una posible esterilización adicional de los bioplásticos.
- La adición de aldehídos como agentes de entrecruzamiento condujo al oscurecimiento, disminución de la transparencia y cambios de color, siendo más evidente para los bioplásticos elaborados con glioxal y glutaraldehído. Considerando las propiedades mecánicas, la adición de aldehídos mejoró la rigidez a la flexión, especialmente en los sistemas con formaldehído, aunque sin diferencias significativas con respecto a la concentración del agente (1 y 3%). Por el contrario, el análisis del comportamiento de tracción condujo a bioplásticos más rígidos y menos deformables para los sistemas de glioxal y glutaraldehído. Por otro lado, se ha demostrado que hay una relación directa entre el grado de entrecruzamiento y las propiedades funcionales. La adición de aldehídos a la formulación inicial provocó una disminución en la capacidad de absorción de agua, aunque sin influir en la pérdida de material soluble de los bioplásticos resultantes, que corresponde principalmente a la cantidad de glicerina utilizada como plastificante durante el procesado. En definitiva, el uso de aldehídos como agentes de entrecruzamiento dotó a los bioplásticos de mayor rigidez frente a esfuerzos mecánicos, perdiendo capacidad de deformación, así como una menor capacidad de absorción de agua, muy útil para aplicaciones en las que no se debe modificar la humedad del producto.
 - Considerando la adición de genipina, se observó un cambio de color en los bioplásticos hacia una tonalidad azul oscuro. Además, se encontró un mayor grado de entrecruzamiento al aumentar la concentración de genipina en la formulación inicial. Por otra parte, hubo un reforzamiento de los bioplásticos obteniendo sistemas con módulos elásticos un orden

de magnitud mayor. En cuanto a su hidrofobicidad, dicho parámetro aumentó con el contenido de genipina.

- Finalmente, la adición de transglutaminasa, aunque este agente de entrecruzamiento proporcionaba un menor grado de entrecruzamiento que otros agentes estudiados, aumentó la rigidez de los sistemas (y por tanto disminuye su deformabilidad) y reducía su capacidad de absorción de agua (acentuada al aumentar su concentración). Además, no indujo cambios en el aspecto físico del bioplástico. Como consecuencia, se ha demostrado que la transglutaminasa podría ser un claro sustituto de los agentes de entrecruzamiento basados en aldehídos debido a sus menores problemas de toxicidad.

Ciclo de vida

El análisis de los procesos de fabricación de los diferentes sistemas revela que, aunque el tratamiento térmico es el que genera más cambios en los bioplásticos, se trata del proceso que más energía consume y emisiones de CO₂ emite. Por otra parte, el tratamiento químico con genipina ha demostrado ser el más costoso por el precio de la genipina, hecho subsanable utilizando genipina extraída de manera natural.

Respecto al estudio de la biodegradabilidad de los sistemas, queda demostrado que, en general, el uso de un método de entrecruzamiento (ya sea físico, químico o enzimático) produce un aumento en el tiempo de degradación de los sistemas. Este aumento puede deberse a diferentes factores posibles: (i) la mayor resistencia mecánica de los bioplásticos observada durante la caracterización mecánica, (ii) la actividad antibacteriana de estos sistemas, no permitiendo a las bacterias descomponer los bioplásticos, o (iii) el aumento del tamaño de la cadena biopolimérica que dificulta su degradación por parte de las bacterias.

Conclusiones

Como conclusión personal, es evidente que es necesario un cambio. Los bioplásticos son considerados productos *eco-friendly* en términos de sostenibilidad y evaluación de riesgo medioambiental. Por tanto, el desarrollo de bioplásticos puede ayudar a que dicho cambio sea posible a medio plazo, aunque todavía sea necesario más investigación en aspectos como producción a gran escala, costes, durabilidad o una controlada degradación. En definitiva, para que este cambio sea posible, los bioplásticos deben ser competitivos frente a los plásticos convencionales en términos de costes de producción, compatibilidad con la tecnología industrial existente o convencimiento de los consumidores. En otras palabras, el cambio hacia una sociedad más sostenible requiere del apoyo y colaboración entre industria, academia, autoridades, consumidores, esto es, de la población en general.

4.2 Concluding remarks

As a general conclusion, it has been achieved a bioplastic from pea protein isolates by means of a thermomechanical process that consists of two stages: the first one is a mixing process and the other is an injection moulding in appropriate conditions of pressure and temperature.

Characterization of the raw material

The characterization of pea protein showed a protein content of 90%, so it could be considered as a protein isolate. On the other hand, pea protein isolate consists of a wide variety of protein fractions showing different molecular weights. Specifically, the amino acid profile of pea protein revealed that pea protein is rich in glutamic and aspartic acids, arginine and lysine but low in methionine and tryptophan.

The pea protein solubility profile revealed that its isoelectric point is around pH 4-5, while its thermal analysis indicated that its glass transition temperature is around 100 °C.

Influence of the processing conditions

It is very important to control the mixing process to obtain an appropriate consistency and homogeneity of the mixture, for which shear-induced structuration effects should be avoided by exerting strict control over agitation speed, mixing time and temperature.

The modification of the moulding temperature, moulding time and even injection pressure leads to bioplastics with tuneable mechanical and functional properties:

- Effect of moulding temperature: An increase in temperature produces an increase in the deformation and, consequently, a decrease in Young's modulus as well as a diminution in bioplastics' transparency without changing the maximum stress or water absorption capacity. A

Conclusiones

temperature higher than 150°C induces protein degradation, thus not being able to obtain suitable bioplastics from this temperature.

- Effect of moulding time: An increase in moulding time shows a progressive decrease in water absorption and transparency of the specimens (as they become more crystalline). The only mechanical parameter showing any variation (increase) with moulding time is the strain at break.
- Effect of the injection pressure: An increase in pressure induces a growth in the strain at break. Water absorption is hardly affected by pressure, while transparency shows a minimum at intermediate pressures.

Evaluation of the crosslinking of pea protein bioplastics

- Pea protein-based bioplastics with enhanced properties were obtained by carrying out an additional physical crosslinking stage to the fabrication process. Specifically, heat treatment produced systems with improved mechanical properties, although lowering significantly their critical strain and water uptake capacity. In fact, heat treatment at 50 °C produced brighter bioplastics, whereas at 120 °C it led to brownish samples. UV irradiation improved the critical strain and strain at break of the samples. Furthermore, it also produced an increase in the crosslinking of the bioplastics together with a slight decrease in the water uptake capacity. Comparing both treatments, the heat treatment produced more rigid and brittle systems, whereas the UV radiation improved the deformability together with the possible sterilization of the samples.
- The addition of aldehyde-based crosslinking agents led to browning, decreased transparency, and colour change systems, being more evident for the glyoxal and glutaraldehyde bioplastics. Considering the mechanical properties, the addition of aldehydes improved flexural

stiffness, especially in the systems with formaldehyde, although with no significant differences with respect to the additive concentration (1 and 3%). By contrast, the analysis of the tensile behaviour led to more rigid and less deformable bioplastics for both the glyoxal and glutaraldehyde systems. On the other hand, there was a direct relationship between the degree of crosslinking and the functional properties. The addition of aldehydes to the initial formulation caused a decrease in the water absorption capacity, although without influencing the soluble matter loss of the resulting bioplastics, which mainly corresponds to the amount of glycerol used as plasticizer in processing. On balance, the use of aldehydes as crosslinking agents gave the bioplastics greater rigidity against mechanical stress, losing deformation capacity, as well as a lower water absorption capacity, which is a useful property for applications in which the humidity in the product should not be modified.

- Considering the addition of genipin, a colour change was observed in the bioplastics towards a dark blue hue. In addition, a higher crosslinked degree was found by increasing the concentration of genipin in the initial formulation. Furthermore, there was a reinforcement of the bioplastics obtaining systems with elastic moduli one order of magnitude greater. Besides, the water hydrophobicity of the systems also increased with the content of genipin.
- Finally, the addition of transglutaminase, although this crosslinking agent provided a lower degree of crosslinking than other agents studied, increased the rigidity of the systems (and thus lowering their deformability) and decreased their water uptake capacity (emphasized with the higher concentration). Furthermore, it did not modify the physical appearance of the bioplastic. As a consequence, it has been

Conclusiones

shown that transglutaminase could be a clear substitute for aldehyde-based crosslinking agents due to its lower toxicity problems.

Life Cycle

The analysis of the fabrication processes of the different systems reveals that, although the thermal treatment is the one that generates the greater changes in bioplastics, it is the process with the most energy consumption and CO₂ emissions. On the other hand, the chemical treatment with genipin has proven to be the most expensive for the price of genipin, a fact that can be remedied by using naturally extracted genipin.

Regarding the study of the biodegradability of the systems, it is shown that, in general, the use of a crosslinking method (whether physical, chemical or enzymatic) increased the degradation time of the systems. This increase may be due to different possible factors: (i) the higher mechanical resistance of the bioplastics observed in the mechanical tests, (ii) the antibacterial activity of these systems that killed the bacteria before they could break down the bioplastics, or (iii) the elongation of the biopolymeric chain that makes it more difficult for bacteria to digest them.

As a personal conclusion, it is clear that a change is necessary. Bioplastics are considered eco-friendly products in terms of sustainability and environmental risk assessment. Therefore, the development of bioplastics can help make this change possible in the medium term, although more research is still needed in aspects such as large-scale production, costs, durability or controlled degradation. In sum, for this change to be possible, bioplastics must be competitive with conventional plastics in terms of production costs, compatibility with

existing industrial technology or consumer conviction. In other words, the change towards a more sustainable society requires the support and collaboration between industry, academia, authorities, consumers, that is, the population in general.

Referencias

- Abraham, A., Park, H., Choi, O., & Sang, B.-I. (2021). Anaerobic co-digestion of bioplastics as a sustainable mode of waste management with improved energy production – A review. *Bioresource Technology*, 322, 124537.
- Acquah, C., Zhang, Y., Dubé, M. A., & Udenigwe, C. C. (2020a). Formation and characterization of protein-based films from yellow pea (*Pisum sativum*) protein isolate and concentrate for edible applications. *Current Research in Food Science*, 2, 61–69.
- Acquah, C., Zhang, Y., Dubé, M. A., & Udenigwe, C. C. (2020b). Formation and characterization of protein-based films from yellow pea (*Pisum sativum*) protein isolate and concentrate for edible applications. *Current Research in Food Science*, 2, 61–69.
- Adamy, M., & Verbeek, C. J. R. (2013). Injection-Molding Performance and Mechanical Properties of Blood Meal-Based Thermoplastics. *Advances in Polymer Technology*, 32(3), 1–9.
- Adebisi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128(4), 902–908.
- Aguilar, J. M., Bengoechea, C., Pérez, E., & Guerrero, A. (2020). Effect of different polyols as plasticizers in soy based bioplastics. *Industrial Crops and Products*, 153, 112522.
- Ahsan, H. (2018). Amino acid arginine and adducts: autoimmune activity. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 39(6), 577–594.
- Alonso-González, M., Felix, M., & Romero, A. (2021). Development of malt sprout-based bioplastics via injection-moulding. *Industrial Crops and Products*, 162, 113267.
- Álvarez-Castillo, E., Bengoechea, C., & Guerrero, A. (2020). Effect of pH on the properties of porcine plasma-based superabsorbent materials. *Polymer Testing*, 85, 106453.

- Álvarez-Castillo, E., Del Toro, A., Aguilar, J. M., Guerrero, A., & Bengoechea, C. (2018). Optimization of a thermal process for the production of superabsorbent materials based on a soy protein isolate. *Industrial Crops and Products*, 125(1), 573–581.
- Álvarez-Castillo, E., Pelagio, M. J., Bengoechea, C., & Guerrero, A. (2021). Plasma based superabsorbent materials modulated through chemical cross-linking. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 105017.
- Amaya-Farfan, J., & Rodríguez-Amaya, D. B. (2021). The Maillard reactions. In *Chemical Changes During Processing and Storage of Foods* (pp. 215–263). Elsevier.
- AOAC, I. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International.
- ASTM D570-98: Standard Test Method for Water Absorption Of Plastics*. (2005). ASTM international.
- Atiweh, G., Mikhael, A., Parrish, C. C., Banoub, J., & Le, T.-A. T. (2021). Environmental impact of bioplastic use: A review. *Heliyon*, 7(9), e07918.
- Awadhiya, A., Kumar, D., & Verma, V. (2016). Crosslinking of agarose bioplastic using citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 151, 60–67.
- Azeredo, H. M. C., Kontou-Vrettou, C., Moates, G. K., Wellner, N., Cross, K., Pereira, P. H. F., & Waldron, K. W. (2015). Wheat straw hemicellulose films as affected by citric acid. *Food Hydrocolloids*, 50, 1–6.
- Azeredo, H. M. C., & Waldron, K. W. (2016). Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 109–122.
- Barbi, S., Macavei, L. I., Caligiani, A., Maistrello, L., & Montorsi, M. (2021). From Food Processing Leftovers to Bioplastic: A Design of Experiments Approach in a Circular Economy Perspective. *Waste and Biomass Valorization*, 12(9), 5121–5130. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01376-3>
- Bátori, V., Åkesson, D., Zamani, A., Taherzadeh, M. J., & Sárvári Horváth, I.

Referencias

- (2018). Anaerobic degradation of bioplastics: A review. *Waste Management*, 80, 406–413.
- Belay, M., Tyeb, S., Rathore, K., Kumar, M., & Verma, V. (2020). Synergistic effect of bacterial cellulose reinforcement and succinic acid crosslinking on the properties of agar. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 3115–3122.
- Beltrán Rico, M., & Marcilla Gomis, A. (2012). *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades*. Publicaciones de la Universidad de Alicante.
- Biesecker, G., Ieuan Harris, J., Thierry, J. C., Walker, J. E., & Wonacott, A. J. (1977). Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature*, 266(5600), 328–333.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N., & Rubini, K. (2002). Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, 23(24), 4827–4832.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414–431.
- Camacho-Otero, J., Boks, C., & Pettersen, I. (2018). Consumption in the Circular Economy: A Literature Review. *Sustainability*, 10(8), 2758.
- Carvajal-Piñero, J. M., Ramos, M., Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., & Romero, A. (2019). Development of Pea Protein Bioplastics by a Thermomoulding Process: Effect of the Mixing Stage. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(5), 968–978.
- Chakraborty, I., N, P., Govindaraju, I., Managuli, V., Banik, S., Kishore Mahato, K., & Mazumder, N. (2022). Preparation and characterization of citric acid crosslinked starch based bioplastic. *Materials Today: Proceedings*, 55, 26–30.
- Cheung, D. T., Tong, D., Perelman, N., Ertl, D., & Nimni, M. E. (1990). Mechanism of Crosslinking of Proteins by Glutaraldehyde IV: In Vitro and In Vivo Stability of a Crosslinked Collagen Matrix. *Connective Tissue*

- Research*, 25(1), 27–34.
- Chow, C.-F., So, W.-M. W., Cheung, T.-Y., & Yeung, S.-K. D. (2017). Plastic Waste Problem and Education for Plastic Waste Management. In *Emerging Practices in Scholarship of Learning and Teaching in a Digital Era* (pp. 125–140). Springer Singapore.
- Coles, S. (2014). Bioplastics from Lipids. *Bio-Based Plastics: Materials and Applications*, 117–135.
- Cox, M., & Nelson, D. (2000). Lehninger Principles of Biochemistry. In *Wh Freeman* (Vol. 5).
- Cui, L., Yuan, J., Wang, P., Sun, H., Fan, X., & Wang, Q. (2017). Facilitation of α -polylysine in TGase-mediated crosslinking modification for gluten and its effect on properties of gluten films. *Journal of Cereal Science*, 73, 108–115.
- D.Gomez-Martinez, A.G. Barneto, I. Martinez, P., & Partal. (2011). Modelling of pyrolysis and combustion of gluten–glycerol-based bioplastics. *Bioresource Technology*, 102(10), 6246–6253.
- Dahl, W. J., Foster, L. M., & Tyler, R. T. (2012). Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S3–S10.
- Davidenko, N., Bax, D. V, Schuster, C. F., Farndale, R. W., Hamaia, S. W., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2016). Optimisation of UV irradiation as a binding site conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27, 14–31.
- Domenek, S., Morel, M. H., Redl, A., & Guilbert, S. (2003). Thermosetting of wheat protein based bioplastics: Modeling of mechanism and material properties. *Macromolecular Symposia*, 197(1), 181–192.
- Etheridge, R. D., Pesti, G. M., & Foster, E. H. (1998). A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology*,

Referencias

- 73(1–2), 21–28.
- European Bioplastics. (2020). *Bioplastics: Facts and figures*. European Bioplastics.
- Feeney, R. E., Blankenhorn, G., & Dixon, H. B. F. (1975). Carbonyl-Amine Reactions in Protein Chemistry. In *Advances in Protein Chemistry* (pp. 135–203). Elsevier.
- Félix, M., Martín Alfonso, J.E., Romero, A., & Guerrero, A. (2014). Development of albumen / soy biobased plastic materials processed by injection molding. *Journal of Food Engineering*, 125, 7–16.
- Felix, M., Perez-Puyana, V., Romero, A., & Guerrero, A. (2017). Production and Characterization of Bioplastics Obtained by Injection Moulding of Various Protein Systems. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(1), 91–100.
- Felix, M., Romero, A., Rustad, T., & Guerrero, A. (2017). Physicochemical, microstructure and bioactive characterization of gels made from crayfish protein. *Food Hydrocolloids*, 63, 429–436.
- Fernández-d'Arlas, B. (2019). Tough and Functional Cross-linked Bioplastics from Sheep Wool Keratin. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
- Fernández-Dacosta, C., Posada, J. A., Kleerebezem, R., Cuellar, M. C., & Ramirez, A. (2015). Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. *Bioresource Technology*, 185, 368–377.
- Fernández-Espada, L., Bengoechea, C., Cordobés, F., & Guerrero, A. (2016). Protein/glycerol blends and injection-molded bioplastic matrices: Soybean versus egg albumen. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(6), 42980.
- Fernández Dacosta, C. (2018). *Alternative sources to fossil carbon: Ex-ante assessment of novel technologies using waste as a resource*. www.ridderprint.nl
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *Food loss and waste database*. <http://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw->

data/es/

- Gan, C.-Y., Cheng, L.-H., & Easa, A. M. (2009). Assessment of Cross-Linking in Combined Cross-Linked Soy Protein Isolate Gels by Microbial Transglutaminase and Maillard Reaction. *Journal of Food Science*, *74*(2), C141–C146.
- Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I., & Mohammadi, R. (2017). Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 687–707.
- Gennadios, A. (2002). Protein Based Films and Coatings. In *CRC, New York*.
- Gerrard, J. ., Brown, P. ., & Fayle, S. . (2002). Maillard crosslinking of food proteins I: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with ribonuclease. *Food Chemistry*, *79*(3), 343–349.
- Gerrard, J. A., & Brown, P. K. (2002). Protein cross-linking in food: mechanisms, consequences, applications. *International Congress Series*, *1245*, 211–215.
- Gomes, S. R., Rodrigues, G., Martins, G. G., Henriques, C. M. R., & Silva, J. C. (2013). In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, *33*(3), 1219–1227.
- Gonzalez-Gutierrez, J., Partal, P., Garcia-Morales, M., & Gallegos, C. (2010). Development of highly-transparent protein/starch-based bioplastics. *Bioresource Technology*, *101*(6), 2007–2013.
- González-Gutiérrez, J., Partal, P., García-Morales, M., & Gallegos, C. (2011). Effect of processing on the viscoelastic, tensile and optical properties of albumen/starch-based bioplastics. *Carbohydrate Polymers*, *84*(1), 308–315.
- Gorczyca, G., Tylingo, R., Szweda, P., Augustin, E., Sadowska, M., & Milewski, S. (2014). Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydrate Polymers*, *102*(1), 901–911.

Referencias

- Gorissen, S. H. M., Crombag, J. J. R., Senden, J. M. G., Waterval, W. A. H., Bierau, J., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. C. (2018). Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*, *50*(12), 1685–1695.
- Gruber, P., Becker, W.-M., & Hofmann, T. (2005). Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of rAra h 2, a Recombinant Major Allergen from Peanut (*Arachis hypogaea*), Its Major Epitopes, and Peanut Agglutinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 2289–2296.
- Guo, H., Liang, D., Sun, Z., Chen, F., Wang, X., Li, J., Zhu, L., Bian, J., Wei, Y., Huang, L., Chen, Y., Peng, D., Li, X., Lu, S., Liu, J., & Shirazi, Z. (2022). Measuring and evaluating SDG indicators with Big Earth Data. *Science Bulletin*. In Press.
- Hassan, M. M., & Fowler, I. J. (2022). Thermal, mechanical, and rheological properties of micro-fibrillated cellulose-reinforced starch foams crosslinked with polysiloxane-based cross-linking agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, *205*, 55–65.
- Haynes, J. G., Czymbek, K. J., Carlson, C. A., Veereshlingam, H., Dickstein, R., & Sherrier, D. J. (2004). Rapid analysis of legume root nodule development using confocal microscopy. *New Phytologist*, *163*(3), 661–668.
- Hernandez-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation--a review. *Journal of Food Science*, *73*(2), R30-9.
- Hřebíček, J., Jensen, S., & Steenmans, C. (2016). Decision support tools of european environment agency. *Environmental Modelling and Software for Supporting a Sustainable Future, Proceedings - 8th International Congress on Environmental Modelling and Software, IEMs 2016*, *4*(July), 871.
- ISO 20200:2004. *Plastics — Determination of the degree of disintegration of plastic materials under simulated composting conditions in a laboratory-*

- scale test*. (2004).
- ISO 527-2:2012. *Plastics—Determination of tensile properties-Part 2: Test Conditions for Moulding and Extrusion Plastics* (p. pp 527–532). (2012).
- Jackcina Stobel Christy, E., Rajeswari, A., Gopi, S., & Pius, A. (2020). Chitin and chitosan-based aerogels. In *Handbook of Chitin and Chitosan* (pp. 285–334). Elsevier.
- Jansens, K. J. A., Telen, L., Bruyninckx, K., Vo Hong, N., Gebremeskel, A. F., Brijs, K., Verpoest, I., Smet, M., Delcour, J. A., & Goderis, B. (2017). Concepts and experimental protocols towards a molecular level understanding of the mechanical properties of glassy, cross-linked proteins: Application to wheat gluten bioplastics. *European Polymer Journal*, 88, 231–245.
- Jia, F., Wang, J. J., Huang, Y., Zhao, J., Hou, Y., & Hu, S.-Q. (2021). Development and characterization of gliadin-based bioplastic films enforced by cinnamaldehyde. *Journal of Cereal Science*, 99, 103208.
- Jiménez-Rosado, M., Bouroudian, E., Perez-Puyana, V., Guerrero, A., & Romero, A. (2020). Evaluation of different strengthening methods in the mechanical and functional properties of soy protein-based bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 262, 121517.
- Jiménez-Rosado, M., Perez-Puyana, V., Cordobés, F., Romero, A., & Guerrero, A. (2018). Development of soy protein-based matrices containing zinc as micronutrient for horticulture. *Industrial Crops and Products*, 121, 345–351.
- Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A., & Romero, A. (2020). Use of heat treatment for the development of protein-based bioplastics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100341.
- Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Perez-Puyana, V., Guerrero, A., & Romero, A. (2021). Comparison between pea and soy protein-based bioplastics obtained by injection molding. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(20), 50412.
- Kahoush, M., Behary, N., Guan, J., Cayla, A., Mutel, B., & Nierstrasz, V.

Referencias

- (2021). Genipin-mediated immobilization of glucose oxidase enzyme on carbon felt for use as heterogeneous catalyst in sustainable wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 0–2.
- Kalia, V., Raizada, N., & Sonakya, V. (2000). Bioplastics. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 59, 433–445.
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742–2750.
- Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, 24(3), 237–249.
- Kwak, H. W., Lee, H., Park, S., Lee, M. E., & Jin, H.-J. (2020). Chemical and physical reinforcement of hydrophilic gelatin film with di-aldehyde nanocellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 332–342.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126–147.
- Lárez Velásquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances En Química*, 1(2), 15–21.
- Lee, K., Jeon, Y., Kim, D., Kwon, G., Kim, U.-J., Hong, C., Choung, J. W., & You, J. (2021). Double-crosslinked cellulose nanofiber based bioplastic films for practical applications. *Carbohydrate Polymers*, 260, 117817.
- Leterme, P., Monmart, T., & Baudart, E. (1990). Amino acid composition of pea (*Pisum sativum*) proteins and protein profile of pea flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(1), 107–110.
- Liang, H. N., & Tang, C. H. (2013). PH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 309–319.

- Lindroth, P., & Mopper, K. (1979). *High Performance Liquid Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with o-Phthaldialdehyde*. 51(11), 1667–1674.
- Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C., & Bing, D. J. (2020). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593–2605.
- Makita, R., Akasaka, T., Tamagawa, S., Yoshida, Y., Miyata, S., Miyaji, H., & Sugaya, T. (2018). Preparation of micro/nanopatterned gelatins crosslinked with genipin for biocompatible dental implants. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1735–1754.
- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206–210.
- Martínez, I., Partal, P., García-Morales, M., Guerrero, A., & Gallegos, C. (2013). Development of protein-based bioplastics with antimicrobial activity by thermo-mechanical processing. *Journal of Food Engineering*, 117(2), 247–254.
- McKee, T., & McKee, J. R. (2020). *Bioquímica: las bases moleculares de la vida*. McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- McKee, T., McKee, J. R., & de Buitrago, J. M. G. (2003). *Bioquímica: la base molecular de la vida*. McGraw-Hill, Interamericana.
- Menges, G., Michaeli, W., Schmachtenberg, E., & Haberstroh, E. (2002). *Werkstoffkunde Kunststoffe*. 5. Auflage.
- Metz, B., Kersten, G. F. A., Hoogerhout, P., Brugghe, H. F., Timmermans, H. A. M., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A., & Jiskoot, W. (2004). Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6235–6243.

Referencias

- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–802.
- Mirpoor, S. F., Giosafatto, C. V. L., Di Girolamo, R., Famiglietti, M., & Porta, R. (2022). Hemp (*Cannabis sativa*) seed oilcake as a promising by-product for developing protein-based films: Effect of transglutaminase-induced crosslinking. *Food Packaging and Shelf Life*, 31, 100779.
- Mohammed, Z. H., Hill, S. E., & Mitchell, J. R. (2000a). Covalent crosslinking in heated protein systems. *Journal of Food Science*, 65(2), 221–226.
- Mohammed, Z. H., Hill, S. E., & Mitchell, J. R. (2000b). Covalent crosslinking in heated protein systems. *Journal of Food Science*, 65(2), 221–226.
- Montha, S., Suwandittakul, P., Poonsrisawat, A., Oungeun, P., & Kongkaew, C. (2016). Maillard Reaction in Natural Rubber Latex: Characterization and Physical Properties of Solid Natural Rubber. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2016, 1–6.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 86(3), 325–332.
- Nagasawa, N., Tago, T., Kudo, H., & Taguchi, M. (2017). Radiation-induced crosslinking of polyamide11 in the presence of triallylisocyanurate. *Polymer Degradation and Stability*, 136, 98–102.
- Nanda, S., Patra, B. R., Patel, R., Bakos, J., & Dalai, A. K. (2022). Innovations in applications and prospects of bioplastics and biopolymers: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20(1), 379–395.
- Nezhad-Mokhtari, P., Ghorbani, M., Roshangar, L., & Soleimani Rad, J. (2019). Chemical gelling of hydrogels-based biological macromolecules for tissue engineering: Photo- and enzymatic-crosslinking methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 760–772.
- Nishida, M., Ichihara, H., Watanabe, H., Fukuda, N., & Ito, H. (2015). Improvement of dynamic tensile properties of Poly(lactic

- acid)/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) polymer alloys using a crosslinking agent and observation of fracture surfaces. *International Journal of Impact Engineering*, 79, 117–125.
- Novák, K. (2011). Determination of symbiotic nodule occupancy in the model *Vicia tetrasperma* using a fluorescence scanner. *Annals of Botany*, 107(4), 709–715.
- OECD. (2019). *Global Material Resources Outlook to 2060*. OECD.
- Oh, M., Ma, Q., Simsek, S., Bajwa, D., & Jiang, L. (2019). Comparative study of zein- and gluten-based wood adhesives containing cellulose nanofibers and crosslinking agent for improved bond strength. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 92, 44–57.
- Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baharvand, H., & Daemi, H. (2018). Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 678–688.
- Osen, R., Toelstede, S., Wild, F., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2014). High moisture extrusion cooking of pea protein isolates: Raw material characteristics, extruder responses, and texture properties. *Journal of Food Engineering*, 127, 67–74.
- Pavoni, J. M. F., dos Santos, N. Z., May, I. C., Pollo, L. D., & Tessaro, I. C. (2021). Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films. *Polymer Bulletin*, 78(2), 981–1000.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Guerrero, A., Martínez, I., & Romero, A. (2022). Antimicrobial potential of protein-based bioplastics. In S. Kalia & S. Sharma (Eds.), *Protein-Based Biopolymers From Source to Biomedical Applications* (1st ed.). Elsevier.
- Perez-Puyana, V., Romero, A., & Guerrero, A. (2016). Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(A), 1462–1468.
- Perez, V., Felix, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2016). Characterization of

Referencias

- pea protein-based bioplastics processed by injection moulding. *Food and Bioproducts Processing*, 97, 100–108.
- Perotto, G., Simonutti, R., Ceseracciu, L., Mauri, M., Besghini, D., & Athanassiou, A. (2020). Water-induced plasticization in vegetable-based bioplastic films: A structural and thermo-mechanical study. *Polymer*, 200, 122598.
- Ray, M., Pal, K., Anis, A., & Banthia, A. K. (2010). Development and characterization of chitosan-based polymeric hydrogel membranes. *Designed Monomers and Polymers*, 13(3), 193–206.
- Reeb, J., & Rost, B. (2019). Secondary Structure Prediction. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 488–496.
- Ricci, L., Umiltà, E., Righetti, M. C., Messina, T., Zurlini, C., Montanari, A., Bronco, S., & Bertoldo, M. (2018). On the thermal behavior of protein isolated from different legumes investigated by DSC and TGA. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(14), 5368–5377.
- Riley, D. J., Bavastrello, V., Covani, U., Barone, A., & Nicolini, C. (2005). An in-vitro study of the sterilization of titanium dental implants using low intensity UV-radiation. *Dental Materials*, 21(8), 756–760.
- Riyajan, S.-A., Chaiponban, S., & Tanbumrung, K. (2009). Investigation of the preparation and physical properties of a novel semi-interpenetrating polymer network based on epoxised NR and PVA using maleic acid as the crosslinking agent. *Chemical Engineering Journal*, 153(1–3), 199–205.
- Ryberg, M. W., Hauschild, M. Z., Wang, F., Averous-Monnery, S., & Laurent, A. (2019). Global environmental losses of plastics across their value chains. *Resources, Conservation and Recycling*, 151, 104459.
- Sessa, D. J., Cheng, H. N., Kim, S., Selling, G. W., & Biswas, A. (2013). Zein-based polymers formed by modifications with isocyanates. *Industrial Crops and Products*, 43, 106–113.
- Shand, P. J., Ya, H., Pietrasik, Z., & Wanasundara, P. K. J. P. D. (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein

- isolate gels. *Food Chemistry*, 102(4), 1119–1130.
- Shlush, E., & Davidovich-Pinhas, M. (2022). Bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 125, 66–80.
- Silva, C. J. S. M., Sousa, F., Gübitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2004). Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 51–56.
- Sonker, A. K., Belay, M., Rathore, K., Jahan, K., Verma, S., Ramanathan, G., & Verma, V. (2018). Crosslinking of agar by diisocyanates. *Carbohydrate Polymers*, 202, 454–460.
- Suhag, A., Biswas, K., Singh, S., & Kulshreshtha, A. (2022). Crosslinking effect on polyvinyl alcohol resin for barrier properties of barrier biaxial orientation films. *Progress in Organic Coatings*, 163, 106662.
- Taherian, A. R., Mondor, M., Labranche, J., Drolet, H., Ippersiel, D., & Lamarche, F. (2011). Comparative study of functional properties of commercial and membrane processed yellow pea protein isolates. *Food Research International*, 44(8), 2505–2514.
- Tan, W. F., Koopal, L. K., Weng, L. P., van Riemsdijk, W. H., & Norde, W. (2008). Humic acid protein complexation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(8), 2090–2099.
- Tiedge, H. (1991). The Use of UV Light as a Cross-Linking Agent for Cells and Tissue Sections in In Situ Hybridization. *DNA and Cell Biology*, 10(2), 143–147.
- Tömösközi, S., Lásztity, R., Haraszi, R., & Baticz, O. (2001). Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung/Food*, 45(6), 399.
- Touyama, R., Inoue, K., Takeda, Y., Yatsuzuka, Ikumoto, T., Moritome, N., Shingu, T., Yokoi, T., & Inouye, H. (1994). Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. II .On the Formation Mechanisms of Brownish-Red Intermediates Leading to the Blue Pigment Formation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42, 1571–1578.
- Tummala, P., Liu, W., Drzal, L. T., Mohanty, A. K., & Misra, M. (2006).

Referencias

- Influence of Plasticizers on Thermal and Mechanical Properties and Morphology of Soy-Based Bioplastics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(22), 7491–7496.
- Türker-Kaya, S., & Huck, C. (2017). A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis. *Molecules*, 22(1), 168.
- Van Roijen, E. C., & Miller, S. A. (2022). A review of bioplastics at end-of-life: Linking experimental biodegradation studies and life cycle impact assessments. *Resources, Conservation and Recycling*, 181(January), 106236.
- Vidal, B. de C., & Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 42(3), 283–289.
- Wang, S., Sue, H.-J., & Jane, J. (1996). Effects of Polyhydric Alcohols on the Mechanical Properties of Soy Protein Plastics. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 33(5), 557–569.
- Whitehead, F. A., Young, S. A., & Kasapis, S. (2020). Swelling behaviour and glass transition in genipin-crosslinked chitosan systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3075–3083.
- Wong, S. S., & Jameson, D. M. (2011). *Chemistry of Protein and Nucleic Acid Cross-Linking and Conjugation*. CRC Press.
- Xie, Y., Pan, Y., & Cai, P. (2022). Hydroxyl crosslinking reinforced bagasse cellulose/polyvinyl alcohol composite films as biodegradable packaging. *Industrial Crops and Products*, 176, 114381.
- Yang, J., Ching, Y. C., Chuah, C. H., Nguyen, D. H., & Liou, N.-S. (2021). Synthesis and characterization of starch/fiber-based bioplastic composites modified by citric acid-epoxidized palm oil oligomer with reactive blending. *Industrial Crops and Products*, 170, 113797.
- Yu, A. C., Lian, H., Kong, X., Lopez Hernandez, H., Qin, J., & Appel, E. A. (2021). Physical networks from entropy-driven non-covalent interactions. *Nature Communications*, 12(1), 746.
- Zárate-Ramírez, L. S., Martínez, I., Romero, A., Partal, P., & Guerrero, A.

- (2011). Wheat gluten-based materials plasticised with glycerol and water by thermoplastic mixing and thermomoulding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(4), 625–633.
- Zárate-Ramírez, L. S., Romero, A., Martínez, I., Bengoechea, C., Partal, P., & Guerrero, A. (2014a). Effect of aldehydes on thermomechanical properties of gluten-based bioplastics. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 20–29.
- Zárate-Ramírez, L. S., Romero, A., Martínez, I., Bengoechea, C., Partal, P., & Guerrero, A. (2014b). Effect of aldehydes on thermomechanical properties of gluten-based bioplastics. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 20–29.
- Zárate-Ramírez, L. S., Romero, A., Martínez, I., Bengoechea, C., Partal, P., & Guerrero, A. (2014c). Effect of aldehydes on thermomechanical properties of gluten-based bioplastics. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 20–29.
- Zhang, X., Tang, K., & Zheng, X. (2016). Electrospinning and crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery. *Journal of Bionic Engineering*, 13(1), 143–149.
- Zhang, Y., Zhou, S., Fang, X., Zhou, X., Wang, J., Bai, F., & Peng, S. (2019). Renewable and flexible UV-blocking film from poly(butylene succinate) and lignin. *European Polymer Journal*, 116, 265–274.
- Zhao, C., Zhu, J., Zhang, C., Wang, W., Qu, W., Wang, W., Li, W., & Wu, H. (2022). Preparation of mechanically strong and active composite films based on fish myofibrillar proteins: The dual effects of oxidized polyphenol crosslinking and layered double hydroxide reinforcement. *Food Hydrocolloids*, 129, 107616.

Índice de abreviaturas

ACV	Análisis de ciclo de vida
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales
CEAP	Plan de Acción de Economía Circular
cm	centímetros
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
FTIR	Espectroscopía infrarroja
h	horas
ISO	Organización Internacional de Normalización
IT	Índice de transparencia
M	molar
mg	miligramos
MPa	Megapascal
min	minutos
mL	mililitros
ODS (SDG)	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PLA	Ácido poliláctico
PHA	Polihidroxialcanoato
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SME	Energía Mecánica Específica
TGA	Análisis termogravimétrico
UE	Unión Europea

Publicaciones

- Perez-Puyana, Víctor Manuel; Félix Ángel, Manuel; Romero García, Alberto; Guerrero Conejo, Antonio (2016). Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding, *Food and bioproducts processing*, 97, 100-108.
- Perez-Puyana, Víctor Manuel; Jiménez Rosado, Mercedes; Guerrero Conejo, Antonio; Martínez García, Inmaculada; Romero García, Alberto (2022). Antimicrobial potential of protein-based bioplastics (Chapter 10). In: Protein-Based Biopolymers From Source to Biomedical Applications. Elsevier Science. ISBN: 9780323905459
- Perez-Puyana, Víctor Manuel; Cuartero García, Pablo; Jiménez Rosado, Mercedes; Martínez García, Inmaculada; Romero García, Alberto (2022). Physical crosslinking of pea protein-based bioplastics: Effect of heat and UV treatments, *Food Packaging and Shelf Life*, 32, 100836.
- Perez-Puyana, Víctor Manuel; Escribano Maestre, Daniel; Jiménez Rosado, Mercedes; Romero García, Alberto; Martínez García, Inmaculada (2022). Influence of the aliphatic chain length on the crosslinking properties of aldehydes on sustainable bioplastics obtained from pea protein, *Journal of polymers and the environment*, DOI: 10.1007/s10924-022-02571-6.
- Perez-Puyana, Víctor Manuel; Cortés Triviño, Esperanza; Jiménez Rosado, Mercedes; Romero García, Alberto; Martínez García, Inmaculada (2022). Pea protein-based bioplastics crosslinked with genipin: Analysis of the crosslinking evolution, *International Journal of Biological Macromolecules*, SUBMITTED.

