



RevICAp

Revista de Ingeniería y Ciencias Aplicadas



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



FACULTAD DE
**CIENCIAS APLICADAS
A LA INDUSTRIA**

ISSN 2796-9444 / Num. 2. Vol. 1 - 2023

INDICE

Síntesis de poliacrilamida parcialmente hidrolizada modificada con ácido tánico con potencial aplicación en recuperación mejorada de hidrocarburo.....	1
Obtención y caracterización de un sistema de liberación de Sr^{+2} a partir de entrecruzamiento iónico de alginato	9
Efecto de atmósferas modificadas y temperaturas de refrigeración en un producto alimenticio de formulación compleja.....	17
Películas antibacterianas de poli(3-hidroxibutirato) (PHB)	27
Efecto de la incorporación de rellenos minerales sobre las propiedades ópticas de films de polietileno	35
Estudio preliminar de la síntesis de PLA mediante catálisis ácida.....	43
Embalse El Nihuil: Características hidroquímicas, macro y microflora acuática y estado trófico.....	49



Síntesis de poliacrilamida parcialmente hidrolizada modificada con ácido tánico con potencial aplicación en recuperación mejorada de hidrocarburo

Ramses Segundo Meleán^{1,2}, Juan Manuel Milanesio^{2,3}, Miriam Cristina Strumia^{1,2}, Facundo Mattea^{1,2}

1. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Haya de la Torre y Av. Medina Allende, Córdoba, X5000HUA, Argentina.
2. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA), Av. Vélez Sarsfield 1611, Córdoba, X5016GCA, Argentina.
3. Departamento de Química Industrial y Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 299, Córdoba, X5000JJC, Argentina.

*E-mail: ramsesmelean@gmail.com

PALABRAS CLAVES

Ácido tánico
Viscosidad
Poli(acrilamida-co-ácido acrílico)
Reología

RESUMEN

En este estudio, se sintetizó un nuevo copolímero mediante la modificación de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) a través de una reacción de esterificación entre los grupos carboxílicos del copolímero y los grupos alcohol del ácido tánico. El objetivo fue obtener una macromolécula con estructuras ramificadas laterales y estudiar su impacto en la viscosidad de soluciones acuosas para su potencial aplicación en recuperación mejorada de petróleo. Las macromoléculas sintetizadas se caracterizaron por FTIR para confirmar la incorporación covalente del ácido tánico a la estructura del copolímero. Los resultados mostraron que la adición de 0,4; 4,0 y 10,0 % en peso de ácido tánico a la mezcla de reacción inicial produjo polímeros con diferentes niveles de monómero ramificado incorporado. Finalmente, se evaluaron las propiedades reológicas de soluciones acuosas de los copolímeros sintetizados para investigar los efectos de las interacciones intra e intermoleculares que resultaron de la incorporación del comonómero ramificado. Los resultados mostraron que la viscosidad de las soluciones fueron un 440 % mayor que la del poli(acrilamida-co-ácido acrílico) original en agua.

Synthesis of partially hydrolyzed polyacrylamide modified with tannic acid with potential application in enhanced oil recovery

KEYWORDS

Tannic acid
Viscosity
Poly(acrylamide-co-acrylic acid)
Rheology

ABSTRACT

In this study, a novel copolymer was synthesized by modifying poly(acrylamide-co-acrylic acid) via esterification of the carboxylic groups in the copolymer with the alcohol functional groups of tannic acid. The aim was to obtain a copolymer with lateral branched structures and study their impact on the viscosity of aqueous solutions for potential application in enhanced oil recovery. The synthesized macromolecules were characterized by FTIR to confirm the covalent incorporation of tannic acid. The results revealed that adding tannic acid at concentrations of 0.4, 4.0, and 10.0% in the reaction produced polymers with different levels of incorporated branched monomer. Finally, the rheological properties of aqueous solutions of the obtained copolymers were evaluated to investigate the effects of the incorporated intra- and intermolecular interactions. The results demonstrated that the viscosity of the solutions were at least 440% greater compared to the original poly(acrylamide-co-acrylic acid) in water.

1. Introducción

La poli(acrilamida-co-ácido acrílico) también conocida como poli(acrilamida parcialmente hidrolizada) (HPAM), es el copolímero sintético más ampliamente utilizado en la recuperación mejorada de hidrocarburos (EOR, por sus siglas en inglés). Debido a su naturaleza hidrosoluble, a su resistencia al ataque de bacterias, a la disponibilidad de sus monómeros, y a la relativa facilidad con la que puede sintetizarse con un peso molecular promedio en peso (Mw) elevado (entre 2×10^6 y 30×10^6 Da), la HPAM se ha posicionado como el agente viscosificante de mayor uso en pozos petroleros. En solución acuosa, este polímero alcanza viscosidades comparables a las del petróleo presente en el yacimiento, haciendo que el índice de movilidad se aproxime a 1 y contribuyendo a la mejora de la recuperación de petróleo (Druetta et al., 2019).

Existen dos enfoques distintos para ajustar la viscosidad de las soluciones acuosas de polímeros comerciales y adaptarlas a los requisitos del yacimiento. El primer enfoque implica regular el peso molecular promedio en peso de la HPAM, mientras que el segundo enfoque consiste en modificar la estructura molecular de la misma mediante la incorporación de pequeñas cantidades de uno o más comonómeros que le confieran propiedades asociativas, que en consecuencia resulten en un aumento de la viscosidad o que les permitan resistir condiciones específicas del yacimiento, como la temperatura, el pH y la salinidad del agua (Feng et al., 2005; Scott et al., 2020).

Wever et al. (2011), compararon más de 80 modificaciones químicas de la HPAM, centrándose específicamente en comonómeros lineales. Su objetivo consistió en establecer una correlación entre la estructura molecular de los polímeros sintetizados y sus propiedades, poniendo un énfasis particular en la viscosidad de las soluciones acuosas y su relevancia en las aplicaciones de EOR. Durante el estudio, los investigadores analizaron la influencia de diversas variables, tales como el pH, la salinidad y la temperatura, y su impacto en las propiedades fisicoquímicas de los polímeros.

Scott et al. (2020) llevaron a cabo una revisión comparativa de varios comonómeros lineales, entre los que se incluyen el ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS), la N-vinilpirrolidona (NVP) y el N,N-dimetilacrilamida (NNDAM). Estos comonómeros mostraron resistencia frente a la

presencia de sales, la temperatura y el esfuerzo de corte. El ácido tánico (AT) es un compuesto polifenólico ramificado que puede extraerse del roble y de cáscaras de frutas, entre otros (Ge et al., 2019). Es soluble en agua y su estructura se compone de un anillo de glucosa en posición central, seguido de una capa de cinco unidades de ácido gálico unidas mediante enlaces éster (Basak et al., 2021). La Figura 1 muestra un esquema de la estructura molecular del AT. La presencia de grupos hidroxilo y anillos fenólicos en la estructura de la molécula le confiere la capacidad de interactuar con otras macromoléculas a través de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas intramoleculares y apilamiento π - π , lo que resulta en propiedades antimicrobianas, buena estabilidad química y térmica (Bae et al., 2021; Guo et al., 2019).

El AT ha sido utilizado en el desarrollo de membranas. Yan et al. (2020) demostraron la efectividad del AT como modificador de superficie para la creación de membranas mixtas. También se utilizó para la formación de superficies superhidrofílicas, membranas antifouling, y como compatibilizante en la producción de membranas poliméricas y nanomateriales. Además, el AT ha sido empleado en la creación de membranas selectivas para compuestos específicos. En 2021, Basak et al. (2021) presentaron el uso del AT como retardante de llama de origen biológico para diferentes materiales, incluyendo algodón, lana, seda, resina epoxi, poliéster y nylon. Los autores atribuyeron las propiedades retardantes de fuego a los polifenoles aromáticos presentes en el AT. Por su parte, Guo et al. (2019) investigaron diversas aplicaciones del AT, tales como su aplicación en liberación de fármacos, como agente antibacteriano, agente coordinador de metales, antioxidante, adhesivo y entrecruzante en la producción de hidrogeles y recubrimientos de partículas. Liang et al. (2021) utilizaron AT para la encapsulación de nanopartículas de zeína y pectina, y encontraron que el AT fue capaz de encapsular las proteínas, preservando sus propiedades antioxidantes y liberándolas de manera progresiva bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal. Además, se observó que el AT mostró resistencia a la salinidad, la temperatura y la acidez debido a las interacciones fuertes establecidas entre el AT y las nanopartículas de zeína-pectina. El AT también fue utilizado como agente adhesivo en la formación de un hidrogel inteligente con arcilla, tal como lo describen Han & Yang (2021). Los autores demostraron la formación de un hidrogel físico reversible que, en un momento determinado, se transformó en un hidrogel químico

irreversible, perdiendo su capacidad adhesiva (Han & Yang, 2021).

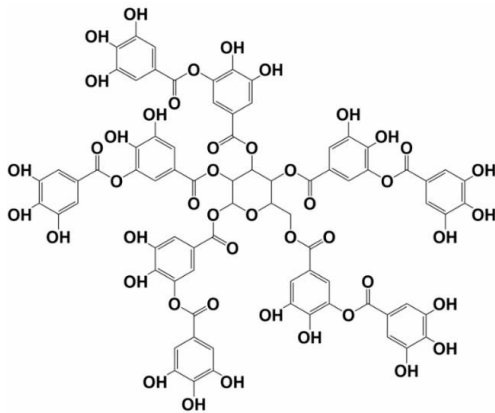


Figura 1. Estructura molecular de ácido tánico (AT)

En otro estudio realizado en 2022, desarrollaron un sensor basado en gelatina injertada con polipirrol, acrilamida y AT. Los resultados mostraron que la adición de AT mejoró las propiedades mecánicas del sensor al aumentar su elasticidad y su rendimiento eléctrico (Qie et al., 2022). A partir de los antecedentes mencionados, se considera que el AT puede, potencialmente, debido a sus interacciones inter- e intracadena, generar propiedades asociativas en la HPAM modificada. Estas propiedades pueden aumentar la viscosidad de las soluciones acuosas de polímeros en comparación con las soluciones acuosas convencionales de HPAM. En este sentido, el objetivo principal de este estudio fue la síntesis y caracterización de HPAM modificada con AT como agente espesante en soluciones acuosas, en vistas de una potencial aplicación en EOR.

2. Materiales y métodos

Materiales

Se utilizaron los siguientes reactivos sin purificación o tratamiento previo: ácido acrílico, con una pureza del 98 % (número CAS 79-10-7); acrilamida, con una pureza del 99 % (número CAS 2094- 98-6) y 1,1'-Azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ABCN) (número CAS 2094-98-6), todos adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO). El AT, con una pureza del 88 % (número CAS 1401-55-4) fue provisto por Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO). El carbonato de potasio (K_2CO_3), con una pureza del 99 % (número CAS 584-08-7), fue adquirido en AnalaR Analytical Reagent (Chadwell Heath, Inglaterra), mientras que el acetato de etilo, con una pureza del 99 % (número CAS 141-78-6) se adquirió en Anedra (Buenos Aires, Argentina). El agua deuterada con una

pureza del 99,9 % (número CAS 7789-20-0) fue provista por Merck MagniSolv®, mientras que el agua Milli-Q se preparó en el laboratorio.

Síntesis y purificación del copolímero poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (HPAM)

La síntesis se realizó por copolimerización conjunta de acrilamida y ácido acrílico (HPAM) mediante una reacción radicalaria no controlada. La mezcla reactiva inicial fue de 74,6% de acrilamida (4,64 g) y un 25,4 % de ácido acrílico (1,58 g) p/p, una composición monomérica típica de polímeros utilizados en EOR (Scott et al., 2020). Se empleó el iniciador térmico ABCN a una concentración molar de 0,05%, y tanto el iniciador como los monómeros se disolvieron en 30 mL de acetato de etilo para la reacción (Juárez Data et al., 2020). Las cantidades relativas de cada monómero fueron seleccionadas conociendo sus relaciones de reactividad en el acetato de etilo: 0,46 y 0,28, respectivamente (Nazaripour et al., 2012). Dado que ambas relaciones de reactividad son inferiores a 1, se favorecen las reacciones de heteropropagación (entre dos monómeros distintos) en lugar de las de homopropagación (entre dos monómeros idénticos), favoreciendo la conformación de un tipo de copolímero alternante (Hamielec et al., 1989). La reacción se llevó a cabo en un recipiente cerrado de acero inoxidable que fue purgado con nitrógeno durante 15 minutos. Posteriormente, el recipiente se colocó en un baño térmico a $90 \pm 1^\circ C$ con agitación a 800 rpm durante 12 horas, siguiendo el procedimiento descrito por Juárez Data et al. (Juárez Data et al., 2020). El copolímero sintetizado se purificó mediante lavado y filtración utilizando 100 mL de acetato de etilo. El lavado se realizó poniendo en contacto el copolímero con el solvente y agitando a 400 rpm durante 30 minutos en cada uno de los tres ciclos. Posteriormente, el copolímero purificado se secó durante 24 horas en un horno de vacío a $45 \pm 1^\circ C$ hasta alcanzar peso constante.

Síntesis y purificación del polímero Ácido tánico - HPAM

El copolímero HPAM injertado con ácido tánico (HPAM-AT) se sintetizó mediante esterificación. Los grupos carboxílicos de las unidades de ácido acrílico en el HPAM reaccionan con los grupos hidroxilo del AT en un medio acuoso utilizando carbonato de potasio como catalizador. Se prepararon tres copolímeros de HPAM-AT con diferentes cantidades de AT (0,4, 4,0 y 10,0% p/p) en relación a la masa de HPAM utilizada. La reacción de esterificación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Chen et al. (2019). Para ello, se preparó una solución acuosa de

HPAM al 4% p/p. A esta solución se le agregó el catalizador (K_2CO_3) en una proporción de 4:1 HPAM:catalizador. La solución se agitó a 600 rpm y a 25 ± 1 °C durante aproximadamente 12 horas hasta obtener una solución translúcida. Simultáneamente, se prepararon tres soluciones de AT. Cada una de estas soluciones se agitó a 800 rpm durante 1 hora y a una temperatura de 25 ± 1 °C. La masa de AT en cada solución correspondía a un 0,4, 4,0 y 10,0% p/p de la masa total de HPAM de la solución madre de polímero. A continuación, la solución de HPAM se colocó en un baño de hielo a 10 ± 1 °C, y la solución de AT se agregó gota a gota. La mezcla resultante se agitó a 600 rpm y se mantuvo a 25 ± 1 °C durante 12 horas para lograr la esterificación completa. Después de completar la reacción de esterificación, el polímero se sometió a un proceso de purificación por diálisis utilizando una membrana de 50 kDa. Con el objetivo de eliminar por completo el AT y el K_2CO_3 remanente, la solución acuosa del polímero se dializó en 6 ciclos, cada uno con una duración de 12 horas. La solución purificada resultante se secó en un horno de vacío a 45 °C durante un período de 72 horas, o hasta que alcance peso constante. Los copolímeros resultantes serán denominados de aquí en adelante como: HPAM-AT 0,4%, HPAM-AT 4,0% y HPAM-AT 10,0% de acuerdo a las concentraciones de la mezcla reactiva inicial de esterificación.

Caracterización de los polímeros

Los polímeros obtenidos se analizaron por espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) para observar la incorporación del AT a la cadena de la HPAM. Además, se estudió el comportamiento reológico de las soluciones acuosas de los copolímeros, determinando su viscosidad aparente a $10\ s^{-1}$.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Los espectros FTIR de los copolímeros fueron obtenidos en un espectrofotómetro Nicolet iN10 (Thermo Fisher Scientific, USA). Los espectros se registraron en el rango de $600-4000\ cm^{-1}$, realizando un promedio de 64 escaneos por muestra. Las muestras se analizaron directamente sobre una placa de oro, sin requerir ningún otro tipo de preparación, y utilizando un detector de mercurio-cadmio-telurio.

Comportamiento reológico

La caracterización reológica de las soluciones de copolímeros se realizó en un reómetro modelo MCR301 de Anton Paar (Alemania), equipado con

una geometría de cono-plato de 50 mm de diámetro (CP-50). Para mantener la temperatura constante en $25,00 \pm 0,01$ °C y prevenir la evaporación de la muestra, se utilizó un peltier (modelo H-PTD200). Se colocaron aproximadamente 580 μL de la solución polimérica en el plato y luego el cono se ubicó en la posición de medición. Antes de realizar las mediciones, se aplicó a la muestra un esfuerzo cortante constante de $10\ s^{-1}$ durante 3 minutos para su preparación, seguido de otros 3 minutos adicionales para alcanzar el equilibrio térmico. Una vez preparada la muestra, se llevaron a cabo tres pruebas reológicas distintas. En primer lugar, se realizó un barrido de esfuerzo cortante que abarcó desde $1\ s^{-1}$ hasta $1000\ s^{-1}$, generando un total de 31 puntos de datos a lo largo de aproximadamente 80 minutos. Finalmente, se llevó a cabo una segunda prueba de rotación que consistió en aplicar tres ciclos alternados de velocidad de corte constante durante 2 minutos: una velocidad de corte baja a $7,34\ s^{-1}$ y una más alta de $1000\ s^{-1}$, comenzando desde el valor más bajo, registrando la viscosidad. Las soluciones poliméricas utilizadas en todos los ensayos reológicos se prepararon disolviendo el polímero en agua Milli-Q con una concentración de 10.000 mg/L, mediante agitación a 400 rpm durante un periodo de 24 horas.

3. Resultados y discusiones

La HPAM sintetizada mediante polimerización radicalaria no controlada tuvo un aspecto de polvo blanco, soluble en agua, y el proceso tuvo un rendimiento gravimétrico de $96 \pm 3\%$ después de su purificación. Para determinar dicho rendimiento, se comparó la masa de los monómeros utilizados con la del producto final obtenido después de su diálisis. El producto de la esterificación de la HPAM con AT fue un polvo de color verde que también se mostró soluble en agua. En la Figura 2 se muestra la reacción de esterificación entre la HPAM y el AT, la cual se basa en una reacción de sustitución nucleofílica en medio básico, donde el catalizador básico (K_2CO_3) desprotona al AT, generando un oxianión que ataca al grupo carbonilo de la HPAM y forma un complejo intermedio. La reorganización de este complejo conduce a la liberación de un anión hidroxilo, que se convierte en agua al recibir un protón del carbonato de potasio. Como producto final de la reacción se obtiene el HPAM-AT, mientras que el agua y el carbonato de potasio son subproductos de reacción. Se obtuvieron rendimientos gravimétricos del $94 \pm 2\%$ para HPAM-AT 0,4%, $93 \pm 4\%$ para HPAM-AT 4,0% y $90 \pm 3\%$ para HPAM-AT 10,0%.

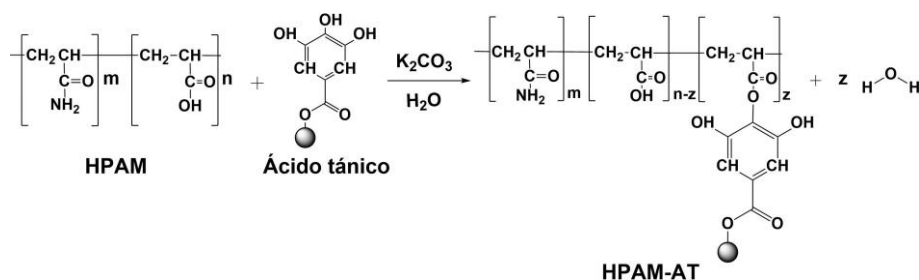


Figura 2. Reacción de modificación de la HPAM con AT.

El análisis FTIR se realizó para evaluar el avance de la reacción de esterificación. En la Figura 3 se muestran las señales características relevantes analizadas en este estudio. La incorporación de AT en la estructura del copolímero pudo verificarse a través de las señales en las siguientes frecuencias: 1715, 1580, 1033 y 800 cm^{-1} . Estas señales corresponden a la formación de ésteres carbonílicos en la reacción de esterificación, los enlaces π aromáticos, las vibraciones de estiramiento del oxígeno-carbonilo en los éteres presentes en la molécula y el movimiento flexión de los enlaces C-H en los aromáticos incorporados, respectivamente. Para evaluar el grado de incorporación de AT en los polímeros, se hizo el cociente entre la señal atribuida a los grupos -OH (3370 cm^{-1}), exclusivos del ácido tánico, con respecto a la señal del carbonilo de la amida (1650 cm^{-1}), exclusiva del monómero de acrilamida. Al no variar la cantidad de acrilamida utilizada en las síntesis, esta última señal actúa como señal de referencia. Es por esto que la relación entre ambos picos aumenta a medida que aumenta la incorporación de AT por esterificación, de acuerdo a lo que se muestra en la Tabla 1, y siguiendo la ecuación 1.

Tabla 1. Intensidad relativa de -OH de los polímeros sintetizados

Copolímero	Intensidad relativa -OH
HPAM	0,64
HPAM-AT 0,4 %	0,93
HPAM-AT 4,0 %	1,03
HPAM-AT 10,0 %	1,24

$$\text{Intensidad relativa de -OH} = \frac{\text{Intensidad de -OH}_{3370}}{\text{Intensidad de -NH}_{1650}} \quad (1)$$

Las demás señales características corresponden a: 3370 cm^{-1} , las vibraciones de los grupos -OH; entre 3370 y 3200 cm^{-1} , las vibraciones de estiramiento del grupo N-H; 2945 cm^{-1} , el estiramiento del grupo

-CH₂; 1650 cm^{-1} , el estiramiento de la amida C=O; y a 1605 cm^{-1} , el estiramiento del ácido carboxílico C=O. No es posible inferir la incorporación del AT analizando ninguna de estas señales por sí solas. Existen antecedentes en la literatura de incorporación de AT a la estructura de diferentes polímeros. Por ejemplo, Mahdavi et al. (2023) describieron la modificación de una membrana de polietersulfona mediante la formación de un hidrogel compuesto por AT y polietilenglicol. En sus espectros FTIR, se observaron las señales características a 1720 cm^{-1} correspondientes al carbonilo del éster, así como los enlaces π aromáticos ubicados entre 1460 y 1610 cm^{-1} . Del mismo modo, Jing et al. (2019) realizaron un injerto de AT en quitosano con el objetivo de conferir capacidad antioxidante al material. En su análisis, detectaron la señal del éster a 1720 cm^{-1} y las vibraciones de los enlaces π aromáticos a 1617 y 1542 cm^{-1} .

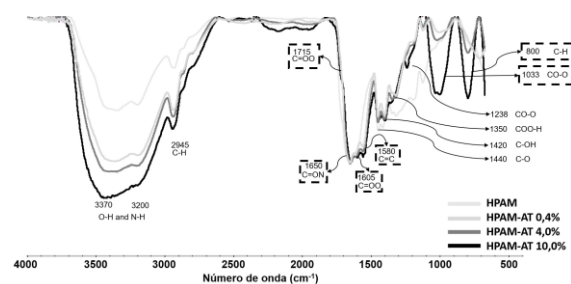


Figura 3. Espectros FTIR de los copolímeros sintetizados.

En relación al análisis reológico de soluciones de los copolímeros, la viscosidad es una propiedad crítica en el contexto de la EOR. En la Figura 4 se muestra la relación entre la viscosidad y la velocidad de corte para la HPAM y los copolímeros HPAM-AT 0,4%, HPAM-AT 4,0% y HPAM-AT 10,0%. El injerto de las cadenas de AT a la cadena principal del polímero resultó en un aumento significativo de la viscosidad. Además, se observó que un mayor grado de

esterificación se traduce en viscosidades más altas a una velocidad de corte determinada.

Por ejemplo, a una velocidad de corte de 10 s^{-1} , que es relevante para las aplicaciones de EOR, la viscosidad de HPAM es de 5,3 cP, mientras que HPAM-AT 0,4%, HPAM-AT 4,0% y HPAM-AT 10.0% presentan viscosidades de 23,3, 26,6 y 33,1 cP, respectivamente, proporcionando un incremento de viscosidad para los polímeros modificados de 440 %, 502 % y 625 % veces más que el HPAM original, respectivamente. Es importante destacar que la viscosidad de las soluciones poliméricas se mantiene relativamente constante para velocidades de corte en el rango de 1 s^{-1} a 100 s^{-1} , lo que sugiere que las interacciones intermoleculares e intramoleculares no se ven interrumpidas por el alineamiento inducido por el movimiento de corte.

Hasta la fecha, no se encontraron en la literatura publicaciones previas de viscosidades de soluciones poliméricas incorporando AT en su estructura. Sin embargo, se han reportado aumentos en la viscosidad de emulsiones preparadas con polímeros sintéticos y proteínas modificadas con AT. Por ejemplo, Wang et al. (2022) observaron un incremento en la viscosidad de emulsiones aceite-agua utilizando una proteína soluble en agua modificada con AT. Los autores atribuyeron este comportamiento a las interacciones covalentes y no covalentes entre los polifenoles de AT y la proteína.

Del mismo modo, Yang et al. (2021) encontraron que aumentar la cantidad de AT en un complejo de partículas de quinina y AT (CP-AT) resultó en una mayor viscosidad de la emulsión debido a la formación de enlaces físicos entre el AT y las partículas de CP. Sin embargo, la viscosidad disminuyó a elevadas velocidades de corte debido a la ruptura de estas interacciones físicas. En ambas investigaciones, se utilizaron complejos de AT con proteínas como agentes espesantes y estabilizadores para mejorar la formación y estabilidad de emulsiones en aplicaciones en alimentos.

Se ha reportado que el AT presenta una variedad de interacciones con los polímeros, incluyendo enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de coordinación (An et al., 2019; Guo et al., 2019; Jafari et al., 2022). De acuerdo a ese antecedente, en este trabajo el AT incorporado a la cadena sería capaz de formar cinco tipos de enlaces de hidrógeno con la HPAM: los hidrógenos de la

amida ($-\text{NH}_2$) con los oxígenos hidroxilo del AT ($-\text{NH}_2 \cdots \text{OH}$), los oxígenos carbonilo del ácido carboxílico ($-\text{COO}$) con los hidrógenos hidroxilo del AT ($\text{O}=\text{CO} \cdots \text{HO}$), los hidrógenos del ácido carboxílico con los oxígenos hidroxilo del AT ($\text{O}=\text{COH} \cdots \text{OH}$), y los oxígenos polifenoles del AT con los hidrógenos de la amida y/o ácido carboxílico del polímero ($\text{AR}-\text{O} \cdots \text{H}_2\text{N}$ y $\text{AR}-\text{O} \cdots \text{HO}$).

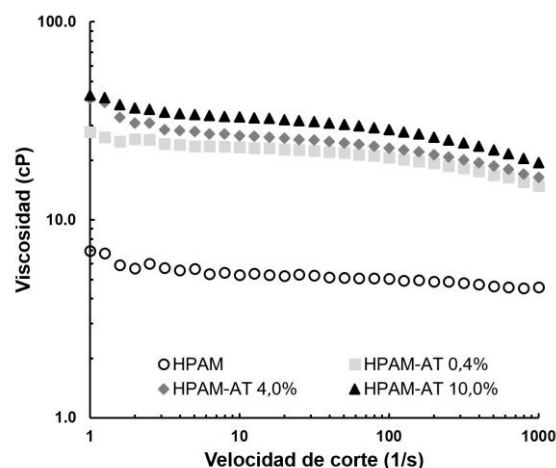


Figura 4. Viscosidad versus tasas de corte de los copolímeros sintetizados.

Además, están las interacciones de acoplamiento π - π de los polifenoles de AT, y las interacciones electrostáticas que ocurren entre los grupos amida protonados en el polímero y los grupos hidroxilo desprotonados en los polifenoles de AT ($\text{AR}-\text{O}^- \cdots +\text{NH}_3$). Estas diversas interacciones podrían desempeñar un papel clave en la formación de una red física entre las cadenas de copolímero, incrementando la viscosidad de las soluciones acuosas y estabilizando dicha red en un amplio rango de velocidades de corte.

La Figura 5 presenta los resultados obtenidos en las pruebas cíclicas de velocidad de corte alternante. Las mismas se realizaron con el propósito de determinar la capacidad de la solución polimérica de recuperar su viscosidad original después de ser sometida a ciclos de esfuerzos de corte repetidos, emulando los esfuerzos a los que son sometidas las soluciones poliméricas durante el bombeo.

La HPAM presentó una reducción del 15 % en su viscosidad a 1000 s^{-1} , con una recuperación aproximada del 97 % de su viscosidad inicial al finalizar la prueba. En contraste, los polímeros

HPAM-AT experimentaron una reducción del 40 % a altas velocidades de corte (1000 s^{-1}), pero lograron recuperar completamente su viscosidad al término de la prueba. Estos resultados resaltan la alta resistencia al esfuerzo de cizalla y evidencian la capacidad regenerativa de las redes físicas asociadas en solución (Lai et al., 2013; Wu, Zhang, Chen, et al., 2022).

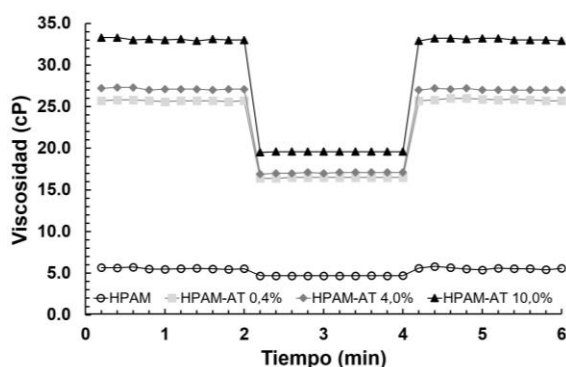


Figura 5. Viscosidad aparente de los polímeros sintetizados luego de tres cambios de velocidad de corte.

4. Conclusiones

En este estudio se presenta un método de síntesis para la producción de poli(acrilamida-co-ácido acrílico) modificada con ácido tánico. El proceso implicó una primera síntesis del copolímero con un contenido de ácido acrílico aproximado del 24 % y de acrilamida del 76 %. En una segunda etapa se realizó la incorporación de diferentes cantidades de ácido tánico mediante una reacción de esterificación entre los grupos de ácido carboxílico del polímero y los grupos hidroxilo terminales del ácido tánico.

La incorporación de la molécula ramificada a la estructura polimérica se confirmó mediante FTIR. Específicamente, se comprobó la presencia de la señal del carbonilo del éster a 1715 cm^{-1} en los espectros de FTIR y el aumento de la relación entre la señal correspondiente a grupos -OH (3370 cm^{-1}) y la correspondiente al carbonilo de la amida (1650 cm^{-1}), demostrando la incorporación del AT a la estructura del polímero.

De acuerdo al análisis reológico de soluciones acuosas de los copolímeros sintetizados, se observó que las viscosidades de los polímeros modificados fueron entre 440 % y 625 % mayores que las de HPAM, y las muestras recuperaron sus valores de

viscosidad después de variaciones bruscas en la velocidad de corte, lo que sugiere la formación de redes físicas estables y resilientes, capaces de recuperar sus propiedades reológicas ante variaciones abruptas o repetidas en el esfuerzo de corte. En comparación con otros agentes químicos utilizados en la modificación de polímeros, el ácido tánico tiene un costo relativamente bajo y es ampliamente disponible, lo que lo convierte en una opción atractiva desde el punto de vista económico.

En general, los resultados reportados sugieren que la modificación de HPAM con ácido tánico puede generar soluciones poliméricas interesantes para su potencial aplicación en la EOR.

5. Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por el Proyecto P-UE 22920180100039CO, CONICET- FYPF PIO13320150100037CO, y FoNCyT PICT-2016-1521. R.S. Meleán agradece a CONICET por financiar su formación doctoral. Agradecemos a la Dra. María Belén Oviedo por su ayuda en la interpretación de las interacciones intra e intermolecular entre el ácido tánico y la HPAM.

6. Referencias

- An, X., Kang, Y., & Li, G. (2019). The interaction between chitosan and tannic acid calculated based on the density functional theory. *Chemical Physics*, 520, 100–107.
- Bae, S. Bin, Kim, E., Chathuranga, K., Lee, J. S., & Park, W. H. (2021). Gelation and the antioxidant and antibacterial properties of silk fibroin/tannic acid/Zn²⁺ mixtures. *Polymer*, 230, 124090.
- Basak, S., Raja, A. S. M., Saxena, S., & Patil, P. G. (2021). Tannin based polyphenolic bio- macromolecules: Creating a new era towards sustainable flame retardancy of polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 189, 109603.
- Chen, H., Li, R., Xie, J., Xu, X., & Chen, S. (2019). Facile methacrylation of cellulose via alkaline aqueous esterification for thiol-ene click functionalization. *Materials Letters*, 245, 18–21.
- Druetta, P., Raffa, P., & Picchioni, F. (2019). Chemical enhanced oil recovery and the role of chemical product design. *Applied Energy*, 252(June), 113480.
- Feng, Y., Billon, L., Grassl, B., Bastiat, G., Borisov, O., & François, J. (2005). Hydrophobically associating polyacrylamides and their partially hydrolyzed derivatives prepared by post- modification. 2. Properties of non-hydrolyzed polymers in pure water and brine. *Polymer*, 46(22), 9283–9295.

- Ge, D., Yuan, H., Xiao, J., & Zhu, N. (2019). Insight into the enhanced sludge dewaterability by tannic acid conditioning and pH regulation. *Science of The Total Environment*, 679, 298–306.
- Guo, J., Suma, T., Richardson, J. J., & Ejima, H. (2019). Modular Assembly of Biomaterials Using Polyphenols as Building Blocks. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(11), 5578–5596.
- Hamielec, A. E., Macgregor, J. F., & Penlidis, A. (1989). Copolymerization. In G. Allen & J. C. Bevington (Eds.), *Comprehensive Polymer Science and Supplements* (pp. 17–31).
- Han, J., & Yang, D. (2021). Tannic acid/clay hydrogel with time-dependent mechanical and adhesive performance enabled by molecular interaction evolution. *Polymer*, 235, 124261.
- Jafari, H., Ghaffari-bohlouli, P., Podstawczyk, D., Nie, L., & Shavandi, A. (2022). Tannic acid post- treatment of enzymatically crosslinked chitosan-alginate hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 295, 119844.
- Jing, Y., Diao, Y., & Yu, X. (2019). Free radical-mediated conjugation of chitosan with tannic acid: Characterization and antioxidant capacity. *Reactive and Functional Polymers*, 135, 16–22.
- Juárez Data, R. M., Mattea, F., Strumia, M. C., & Milanesio, J. M. (2020). Effect of including a hydrophobic comonomer on the rheology of an acrylamide acrylic acid based copolymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(47), 49532.
- Lai, N., Qin, X., Ye, Z., Peng, Q., Zhang, Y., & Ming, Z. (2013). Synthesis and Evaluation of a Water- Soluble Hyperbranched Polymer as Enhanced Oil Recovery Chemical. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–11.
- Liang, X., Cao, K., Li, W., Li, X., McClements, D. J., & Hu, K. (2021). Tannic acid-fortified zein-pectin nanoparticles: Stability, properties, antioxidant activity, and in vitro digestion. *Food Research International*, 145, 110425.
- Mahdavi, H., Hosseini, F., & Ghanbari, R. (2023). Incorporation of MIL-101(Fe)/Tannic acid-PEG to PES-TPU blend membrane to modify a membrane with riveting mechanical stability and separation performance. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 120, 195–208.
- Nazaripour, S., Rafizadeh, M., & Bouhendi, H. (2012). Precipitation copolymerization of acrylamide and acrylic acid: Determination of reactivity ratio by various methods. *E-Polymers*, 12(1).
- Qie, H., Wang, Z., Ren, J., Lü, S., & Liu, M. (2022). A tough shape memory hydrogel strain sensor based on gelatin grafted polypyrrole. *Polymer*, 263, 125524.
- Scott, A. J., Romero-Zerón, L., & Penlidis, A. (2020). Evaluation of Polymeric Materials for Chemical Enhanced Oil Recovery. *Processes*, 8(3), 361.
- Wang, S., Zhou, B., Yang, X., Niu, L., & Li, S. (2022). Tannic acid enhanced the emulsion stability, rheology and interface characteristics of *Clanis Bilineata* Tingtauca Mell protein stabilised oil in water emulsion. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(8), 5228–5238.
- Wever, D. A. Z., Picchioni, F., & Broekhuis, A. A. (2011). Polymers for enhanced oil recovery: A paradigm for structure–property relationship in aqueous solution. *Progress in Polymer Science*, 36(11), 1558–1628.
- Wu, R., Zhang, S., Chen, Y., Chen, H., Wang, M., & Tan, Y. (2022). Salt enduring and shear resistant polymer systems based on dynamically reversible acyl hydrazone bond. *Journal of Molecular Liquids*, 346, 117083.
- Yan, W., Shi, M., Dong, C., Liu, L., & Gao, C. (2020). Applications of tannic acid in membrane technologies: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102267.
- Yang, F., Yang, J., Qiu, S., Xu, W., & Wang, Y. (2021). Tannic acid enhanced the physical and oxidative stability of chitin particles stabilized oil in water emulsion. *Food Chemistry*, 346, 128762.



Obtención y caracterización de un sistema de liberación de Sr⁺² a partir de entrecruzamiento iónico de alginato

María Luz Torrez^{1,2}, Juan Manuel Fernandez², Tamara Oberti¹

1. Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata (UNLP –CONICET), Diag. 113. y 64 (1900), La Plata, Argentina.
2. Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 115 (1900), Argentina.

*E-mail: toberti@inifta.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Alginato de sodio
Liberación Sr⁺²
Biomaterial

RESUMEN

El hueso es un órgano con funciones críticas para la fisiología humana, ya que no solo se encarga de la protección y soporte de otros tejidos, sino que también interviene en la homeostasis mineral, regula el pH sanguíneo y aloja a múltiples células progenitoras. El tejido óseo posee la capacidad única de poder repararse a sí mismo sin dejar cicatrices, no obstante, bajo algunas situaciones, tales como: grandes fracturas óseas, enfermedades como tumores o situaciones metabólicas, esta capacidad se ve limitada por lo que se requiere la anteversión médica para el tratamiento del daño óseo. Los procedimientos para este tipo de lesiones tienen un impacto clínico y económico enorme. Por ello, en el presente trabajo se aborda dicha problemática mediante la ingeniería de tejido óseo la cual utiliza distintos materiales que puedan servir de relleno del daño óseo para guiar su reparación. Un posible material podría ser a base de alginato ya que posee propiedades acordes para la aplicación buscada: buena biocompatible, baja toxicidad y económicamente accesible, aunque presenta buena solubilidad en agua. A partir de la incorporación de iones Ca⁺² y Sr⁺² a soluciones de alginato de sodio se logró un material entrecruzado, con mayor estabilidad en medios acuosos, como sistema de liberación de Sr⁺². La importancia de este catión se debe a que se ha demostrado su efecto anabólico sobre el hueso. Se analizó la concentración de los iones empleados como entrecruzados y los tiempos de gelación sobre la liberación de estroncio. Dichos sistemas fueron caracterizados por ensayos de hinchamiento y degradación encontrándose que el porcentaje del ion liberado depende del tiempo de gelación de las muestras, ya que al cabo de 6 días se cuantificó en el medio un 28,5 %, 24,8 % y 17,1 % de Sr⁺² para 1, 12 y 24 h de gelación, respectivamente.

Obtaining and characterizing a Sr⁺² release system from alginate ionic crosslinking

KEYWORDS

Sodium alginate
Sr⁺² release
biomaterials

ABSTRACT

Bone is an organ with critical functions for human physiology. Bone tissue has the unique ability to repair itself without scarring, however, under some situations, such as: bone fractures or diseases, this ability is limited and requires expensive clinical interventions for the treatment of bone damage. Thus, in the present work, this problem is addressed through bone tissue engineering, which uses different materials to serve as fillers for bone damage to guide its repair. A possible material could be an alginate base since it has good properties: biocompatible, low toxicity and economically accessible, although it is soluble in water. From the incorporation of Ca⁺² and Sr⁺² ions to sodium alginate solutions, a cross-linked material will be obtained, with greater stability in aqueous media, as a Sr⁺² release system. The concentration of the ions used as crosslinking and the gelation times on the strontium release were analyzed. These systems were characterized by swelling and degradation tests, finding that the percentage of the ion released depends on the gelation time of the samples, since after 6 days 28,5 %, 24,8 % and 17,1 % were quantified in the medium for 1, 12 and 24 h of gelation, respectively.

1. Introducción

El alginato de sodio es un polisacárido natural aniónico, no ramificado presente en algas pardas o bacterias, ampliamente investigado para su uso en una gran cantidad de aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, relativo bajo costo y capacidad de gelación cuando se lo entrecruza con cationes divalentes, particularidad que lo hace único al compararlo con otros polianiones. Esta propiedad se encuentra directamente relacionada con su composición (Tan et al., 2020; Torres et al., 2019) y la afinidad por los cationes divalentes está dada de manera exclusiva por los bloques poliguluronato (poliG) que componen la estructura del polímero natural. Se conoce que la selectividad por los metales aumenta marcadamente con el incremento en el contenido de bloques de α -L-guluronato (G) en el polisacárido, mientras que los bloques de polimanuronato (poliM) y los bloques de residuos alternados MG prácticamente no muestran selectividad, aunque sí se ha demostrado que los iones Ca^{+2} pueden unirse de manera inespecífica al poliM (Mørch et al., 2006). A su vez, la afinidad del alginato por estos metales aumenta en el orden $\text{Mg}^{+2} \ll \text{Ca}^{+2} < \text{Sr}^{+2} < \text{Ba}^{+2}$.

El ranelato de estroncio (RaSr) es una sal orgánica que ha sido utilizada como medicamento antiosteoporótico empleada principalmente en el tratamiento de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas debido a la actividad del Sr^{+2} como droga anabólica y anticatabólica ósea, es decir presenta un mecanismo de acción dual, ya que inhibe la actividad osteoclástica disminuyendo la resorción ósea y estimula la actividad osteoclástica, incrementando la formación de hueso. El Sr^{+2} , por analogía con el Ca^{+2} , puede actuar uniéndose al receptor sensor de Ca^{+2} (CaRS) y de esta manera mediar tanto un aumento en la apoptosis de osteoclastos como en la replicación de preosteoblastos y osteoblastos (Lino et al., 2016; Lino et al., 2018). También, se ha demostrado un efecto directo de Sr^{+2} (tanto en su forma RaSr como SrCl_2) en la enzima fosfatasa alcalina (FAL), proveniente de extractos de células de la línea establecida UMR106, encontrándose además un aumento de afinidad de la enzima por su sustrato de manera dependiente de la concentración de Sr^{+2} (Fernández et al., 2014). Sin embargo, su uso se ha asociado a eventos cardiovasculares al ser administrado vía oral (EMA, 2014; Molinuevo et al., 2017), por ello, resulta interesante desarrollar un sistema de liberación de Sr^{+2} que actué localmente en el sitio óseo a reparar con el fin de evitar los efectos secundarios mencionados.

Por su parte, los hidrogeles de alginato pueden ser utilizados para la liberación controlada, específicamente localizada, de fármacos encapsulados en el polímero; lo que es usualmente deseable para permitir concentraciones locales favorables y sostenidas en el tiempo con una exposición mínima a otros tejidos (Langer, 1998; Langer, 2000).

En el presente trabajo se desarrollan hidrogeles de alginato entrecruzados iónicamente con Sr^{+2} como principio activo para su evaluación como sistema de liberación de drogas con acción local.

2. Materiales y métodos

Reactivos

Cloruro de calcio (CaCl_2 93%, Cicarelli), Cloruro de estroncio (SrCl_2 99.9%, Sigma), Cultivo celular: medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM. En polvo, alto en glucosa, con L-glutamina y rojo de fenol. Sin HEPES, piruvato de sodio ni bicarbonato de sodio), Gibco®, Thermo Fisher Scientific. (Buenos Aires, Arg.). Material de cultivo celular, Nunc (CABA, Arg.). Alginato de sodio comercial (Sigma Aldrich, CAS Number 9005-38-3)

Obtención de hidrogeles

Los hidrogeles fueron obtenidos a partir de una solución al 2 % p/v de alginato de sodio en agua destilada a la que se incorporaron soluciones de CaCl_2 y/o SrCl_2 . Brevemente, la solución de polímero fue esterilizada por autoclave a 121 °C y 1 atm de presión durante 15 minutos y las soluciones de sales preparadas en agua bidestilada se esterilizaron por filtración con un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0,22 μm (Corning®). Luego, la solución de alginato se transfirió a una placa de cultivo de 24 pocillos colocando 1 ml de la solución por pocillo. El entrecruzamiento se llevó a cabo con el agregado de 500 μL de una solución de CaCl_2 25 mM, junto con distintas concentraciones de SrCl_2 (0,05; 0,10; 0,25 ó 0,50 mM). Además, se sintetizó un hidrogel sólo con iones Ca^{+2} para ser utilizada como condición control. A su vez, cada una de estas variables fue sometida a 1, 12 y 24 h de gelación; dejando las placas en agitación constante durante el tiempo correspondiente en un agitador elíptico (Fábrica de aparatos científicos S.A.).

Una vez finalizado el periodo de entrecruzamiento, los hidrogeles fueron congelados a -4 °C durante la noche para su posterior secado por liofilización a -40 °C; en un liofilizador Scientz 10N provisto por Hiotek, China.

Liberación de Sr⁺²

Para el análisis del perfil de liberación de Sr⁺² por parte de los hidrogeles se colocó 1 mL de DMEM en cada pocillo y se los mantuvo en una estufa de cultivo (Incubator HF 151 UV Heal Force®) a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % CO₂. Se recolectó el medio a 1, 2, 3 y 6 días y se monitoreó la cantidad del ion presente en el sobrenadante usando un espectrofotómetro de absorción atómica (AA-7000, Shimadzu). Para relacionar la absorbancia con la cantidad de ion presente se realizó una curva de calibración con estándar de Sr⁺² de concentraciones entre 0,5 y 2 ppm en DMEM. El mecanismo de difusión de Sr⁺² hacia el exterior del hidrogel se estimó utilizando los datos experimentales, empleando el modelo Ritger-Peppas (Ritger y Peppas, 1987) a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{M_t}{M_f} = k t^n \quad (1)$$

Donde k es una constante del sistema que depende de las características estructurales del polímero y su interacción con el disolvente y soluto (Sr⁺²). Por su parte, n es un exponente difusional que describe el mecanismo de transporte de agua en la membrana, es decir que otorga información sobre el mecanismo físico que controla la liberación del soluto. Por otro lado, M_t y M_f corresponden a la masa de droga acumulada al tiempo t y en el tiempo final del ensayo, respectivamente. Mediante los datos experimentales (hasta 60 % de la liberación respecto del máximo) se puede realizar un gráfico de $\log (M_t / M_f)$ frente a $\log t$, en el cual el valor n se ve representado en la pendiente y k se obtiene a partir de la intersección de la recta con el eje Y.

Estudio de hinchamiento y degradación

Se estudió la capacidad máxima de hinchamiento en los hidrogeles obtenidos. Para ello, los materiales obtenidos fueron congelados a -4 °C y luego secados hasta peso constante en liofilizador (peso seco, w_0) y posteriormente fueron inmersos en agua destilada a 37 °C. A intervalos regulares de tiempo, las membranas fueron retiradas y pesadas nuevamente, esta vez en estado húmedo (peso húmedo, w_s). El contenido de agua absorbida por el hidrogel se calculó como la diferencia entre w_s y w_0 , mientras que el porcentaje de hinchamiento (swelling, Sw) se definió como:

$$\% S_w = \frac{(w_s - w_0)}{w_0} \times 100 \quad (2)$$

Además, se analizó la degradación de los hidrogeles luego del estudio de hinchamiento. Para ello, luego de cada período de tiempo evaluado, se retiraron las muestras del agua destilada y se congelaron a -4 °C durante la noche para su posterior liofilización hasta peso constante (peso final seco, w_d). De esta manera, se comparó el peso inicial seco (w_0) de las muestras con el peso final seco luego del proceso de hinchamiento (w_d), empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{(w_0 - w_d)}{w_0} \times 100 \quad (3)$$

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de al menos dos experimentos separados realizados por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey con el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ para todos los análisis estadísticos.

3. Resultados y Discusión

Obtención de hidrogeles

En este trabajo se pretendió desarrollar un hidrogel para ser utilizado en ingeniería de tejido óseo, como sistema de liberación de Sr⁺² como droga osteoinductora. Estudios previos (Fernández et al., 2013) demostraron que concentraciones de RaSr cercanas a 0,1 mM resultan óptimas para el incremento de la función y actividad osteoblástica. Además, se ha reportado que los niveles séricos de Sr⁺² en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis en tratamientos a largo plazo con RaSr se encuentran entre los 0,1 - 0,2 mM (Marie, 2008). Es por ello por lo que se seleccionaron concentraciones de Sr⁺² que pudiera, luego de su liberación, alcanzar una concentración de 0,1 mM. Sin embargo, luego de realizar algunos ensayos preliminares, se observó que los hidrogeles no poseían una estabilidad adecuada para su aplicación como soporte en el sitio de lesión. Por lo tanto, para aumentar la estabilidad del material sin incrementar la concentración de Sr⁺², la cual podría llegar a tener efectos tóxicos, se procedió a realizar entrecruzamientos con el agregado de Ca⁺² a distintos tiempos de gelación.

En la siguiente imagen (Figura 1) se muestran las membranas obtenidas con concentraciones de Sr⁺² de 0,05; 0,10; 0,25 y 0,50 mM a 1, 12 y 24 h de gelación. En todos los casos los hidrogeles se

aditivaron con una solución de ion Ca^{+2} 25 mM con el objetivo de favorecer el entrecruzamiento iónico de manera estable en caso de que las

concentraciones de Sr^{+2} no fueran suficientes para lograrlo. También se preparó una membrana sin Sr^{+2} como condición control.

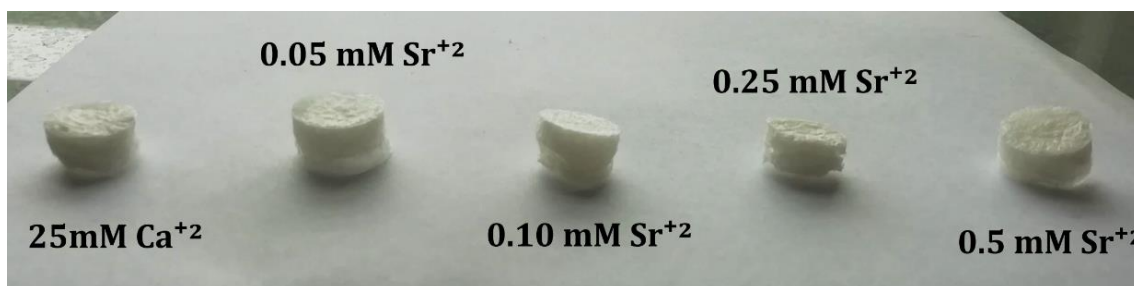


Figura 1. Hidrogeles en estado seco, luego de 24h de gelación.

Liberación de Sr^{+2}

La cinética de liberación del ion Sr^{+2} a partir de los hidrogeles obtenidos se evaluó luego de 1, 2, 3 y 6 días; se estudiaron los perfiles de liberación y se evaluó el mecanismo de transporte del catión involucrado en este proceso, desde la matriz polimérica. En la Figura 2 se exhibe el perfil de liberación de los materiales luego de 24 h de gelación. En ella, se puede observar que, con el transcurso del tiempo, la liberación del catión

aumenta de manera constante y de forma dependiente con la concentración de Sr^{+2} utilizada para preparar el hidrogel, de tal manera que el porcentaje del ion que difundió al medio luego de 6 días de cultivo fue de 10,7%, 12,3%, 13,6% y 17,1% para las concentraciones 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM y 0,5 mM respectivamente. En el caso de los hidrogeles con 1 y 12 h de gelación se observó un comportamiento similar, es decir, la liberación de Sr^{+2} aumenta con la concentración de estroncio utilizada en el hidrogel.

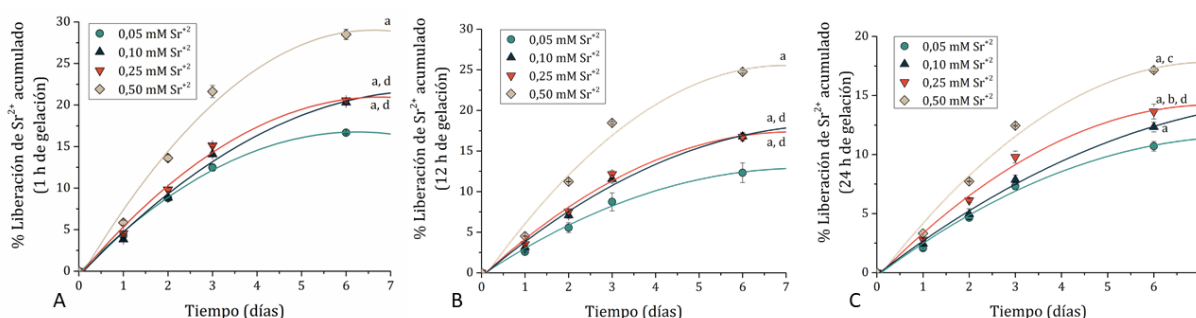


Figura 2. Liberación de Sr^{+2} a 1, 2, 3 y 6 días en hidrogeles con A) 1h de gelación B) 12 h de gelación C) 24 h de gelación.
a: $p < 0,001$ vs 0,05 mM Sr^{+2} , b: $p < 0,01$ vs 0,10 mM Sr^{+2} , c: $p < 0,5$ vs 0,25 mM Sr^{+2} , d: $p < 0,001$ vs 0,50 mM Sr^{+2} .

A su vez, en la Figura 3 se muestran los porcentajes de liberación de Sr^{+2} luego de 6 días de cultivo para todos los hidrogeles con 1, 12 y 24 h de gelación. Cuando se evalúa la difusión del ion en hidrogeles con la misma carga inicial, puede observarse claramente que el tiempo de gelación tiene una influencia directa en la liberación, siendo esta inversamente proporcional al tiempo de gelación. Tal es el caso de los hidrogeles con 0,5 mM de Sr^{+2} , en los cuales puede apreciarse que el porcentaje de liberación fue de 28,5 %, 24,8 % y 17,1 % para 1, 12 y 24 h de gelación, respectivamente. Este mismo comportamiento fue observado para los hidrogeles restantes.

El método de gelación utilizado consiste en un proceso de intercambio iónico entre el Na^+ del alginato de sodio soluble en agua y los iones Sr^{+2} de la sal de SrCl_2 para obtener el gel en transición. Se ha demostrado que la gelación puede encontrarse distribuida de manera heterogénea en el alginato, ya que la mayor concentración de cationes divalentes se concentra en la superficie y disminuye de manera gradual hacia el centro del gel (Draget, 2009; Skjåk-Bræk et al., 1989). Estos autores indicaron que la difusión de iones crea una zona clara de gelificación que se mueve desde la superficie al centro del gel. El grado de homogeneidad en los hidrogeles de alginato puede ser controlado utilizando distintos parámetros, que involucran la concentración de iones, la cantidad de tiempo en la que el alginato se

encuentra en presencia de estos y el peso molecular del polímero. Esto indicaría, por lo tanto, que un mayor tiempo de gelación da lugar a una mayor difusión de los cationes hacia el centro de los hidrogeles, estimulado a su vez por la agitación, permitiendo la formación de interacciones iónicas más estables y que, por lo tanto, limitan la liberación de iones como el Sr^{+2} .

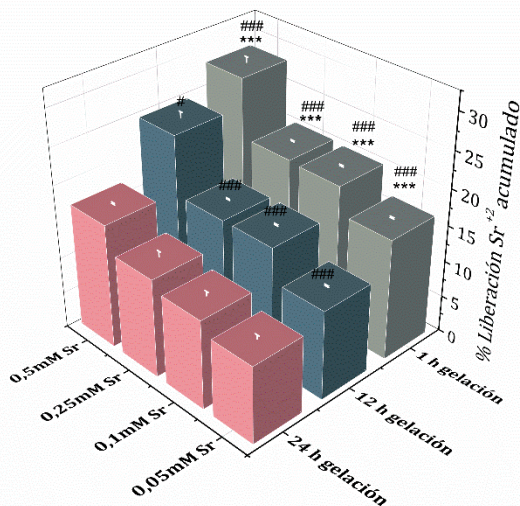


Figura 3. Liberación de Sr^{+2} luego de 6 días de cultivo para hidrogeles de 0,05, 0,1, 0,25 y 0,5 mM formados luego de 1, 12 y 24 h de gelación. #: $p < 0,5$ vs 12 h gelación, ***: $p < 0,001$ vs. 12 h gelación, ###: $p < 0,001$ vs 24 h gelación.

Además, a partir de las curvas de liberación (Figura 1) para cada condición de concentración de Sr^{+2} y tiempo de gelación utilizados, se procedió al análisis de los mecanismos de transporte asociados al proceso de liberación del principio activo desde el polímero. Para ello se utilizó el modelo de Ritger-Peppas, el cual proporciona información a partir del valor del exponente n de la ecuación matemática correspondiente (Ecuación 1); los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Exponente difusional n para hidrogeles preparados con diferentes concentraciones de Sr^{+2} , luego de 1, 12 y 24 h de gelación.

Concentración Sr^{+2} (mM)	n 1 h gelación	n 12 h gelación	n 24 h gelación
0,05	1,03	1,11	1,17
0,1	1,20	1,01	1,16
0,25	1,11	1,14	1,10
0,5	1,22	1,21	1,31

Todos los valores calculados arrojaron un valor de $n > 1$ lo que indica una forma extrema de transporte conocida en la bibliografía como Super Caso II.

Este proceso de difusión de basa en que durante su desarrollo ocurre un proceso de plastificación como consecuencia de una disminución de las fuerzas atractivas entre las cadenas del polímero, que acelera la absorción de solvente sobre el final del proceso de penetración, y resulta en un aumento en la movilidad de las cadenas poliméricas (Ritger y Peppas, 1987; Llabot et al., 2004).

Estudio de hinchamiento y degradación

Durante el estudio de la cinética de hinchamiento en agua a 37 °C, todos los hidrogeles sintetizados a 1, 12 y 24 h de gelación mostraron un rápido incremento durante los primeros 5 minutos para luego alcanzar el equilibrio a los 120 minutos (2 h).

En la Figura 4 puede apreciarse que en todas las membranas el porcentaje máximo de hinchamiento superó el 4000%, logrando alcanzar valores de 10000% para algunos casos. En la Figura 4.A se encuentran representados los perfiles de hinchamiento para los cinco hidrogeles a 1 h de gelación. Aquellos correspondientes a 0,05 mM y 0,10 mM Sr^{+2} presentaron un porcentaje de hinchamiento muy superior a las matrices con mayor concentración del metal. Es posible que la presencia de un mayor número de átomos de Sr^{+2} favorezca la fuerza de las interacciones iónicas en la red de alginato, lo que implicaría la formación de redes más rígidas y, por lo tanto, con una menor tasa de hinchamiento.

Un efecto similar se observa en la figura 4.B, en hidrogeles con 12 h de gelación, en donde además se puede apreciar que la membrana que posee solo iones Ca^{+2} tiene un porcentaje de hinchamiento aún menor que los materiales con ambos cationes. Sin embargo, esta tendencia no se observa en hidrogeles con 24 h de gelación (Figura 4.C), indicando que posiblemente exista en este ensayo un factor adicional con influencia sobre la tasa de hinchamiento, además de la afinidad de los cationes.

Con el fin de visualizar el efecto del tiempo de gelación en la estabilidad de los hidrogeles, se presenta, en la Tabla 3, el porcentaje final de hinchamiento de estos luego de 24 h. En el presente trabajo se planteó la posibilidad de gelificar el alginato a tres tiempos distintos, bajo la hipótesis de

que cuanto mayor fuera el contacto de los iones con las cadenas del polímero, mejor sería la difusión de estos a lo largo de la matriz, por lo que se lograría obtener un hidrogel homogéneo con interacciones electrostáticas más estables que disminuirían la tasa de hinchamiento. Sin embargo, puede observarse

que solo los hidrogeles 0,05 y 0,10 mM Sr^{+2} cumplieron con esta predicción. Por el contrario, en 0,25 y 0,50 mM Sr^{+2} se encontró el efecto inverso, mientras que en el control sólo con Ca^{+2} se observaron fluctuaciones en el hinchamiento sin una tendencia clara.

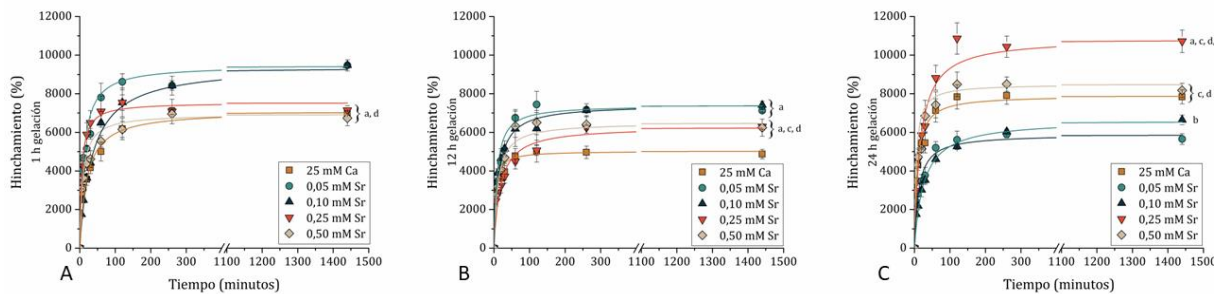


Figura 4. Hinchamiento de hidrogeles a 1, 12 y 24 h. a: $p < 0,001$ vs 25 mM Ca^{+2} ; b: $p < 0,5$ vs 0,05 mM Sr^{+2} , c: $p < 0,001$ vs 0,05 mM Sr^{+2} , d: $p < 0,01$ vs 0,10 mM Sr^{+2} , f: $p < 0,001$ vs 0,50 Mm Sr^{+2} .

Tabla 3 Porcentaje de hinchamiento para hidrogeles luego de 24 h. a: $p < 0,05$ vs misma concentración a 12 h gelación ([12 h]), b: $p < 0,001$ vs [12 h]. c: $p < 0,01$ vs misma concentración a 24 h gelación ([24 h]), d: $p < 0,001$ vs [24 h].

Concentración	1 h gelación	12 h gelación	24 h gelación
25 mM Ca^{+2}	6976 ± 84 ^{b, c}	4347 ± 240 ^d	7837 ± 363
0,05 mM Sr^{+2}	9473 ± 288 ^{b, d}	7123 ± 65 ^d	5655 ± 273
0,10 mM Sr^{+2}	9169 ± 126 ^{b, d}	7411 ± 201 ^d	6644 ± 252
0,25 mM Sr^{+2}	7144 ± 238 ^{a, d}	6297 ± 142 ^d	10718 ± 581
0,50 mM Sr^{+2}	6740 ± 400 ^c	6244 ± 443 ^d	8174 ± 360

Al finalizar este estudio, se evaluó el porcentaje de degradación de los hidrogeles encontrando que, luego de 24 h en agua, la degradación fue de alrededor de 30% o más para todos los casos (Tabla 4). Estos resultados indican una gran pérdida de masa en un lapso muy acotado, obteniéndose con el paso del tiempo, hidrogeles muy frágiles con inestabilidad entre las cadenas poliméricas, lo cual genera una gran dificultad a la hora realizar una lectura correcta sobre el mecanismo de difusión del solvente en los hidrogeles.

Bajpai y Sharma (2004) estudiaron el comportamiento de perlas de alginato entrecruzadas con Ca^{+2} . Ellos observaron que, después de lograr un máximo de hinchamiento en buffer fosfato salino (PBS, del inglés phosphate-buffered saline) estas comenzaban a perder peso hasta que finalmente se disolvían por completo. El mecanismo propuesto por los autores para explicar este comportamiento consiste, inicialmente, en el intercambio entre los iones Na^{+} de la solución externa y los iones Ca^{+2} unidos de manera

inespecífica a los grupos COO^{-} de las secuencias de polimanuronato. Como resultado, la repulsión electrostática entre los grupos carboxilo provoca la relajación de las cadenas, lo que favorece el hinchamiento del gel. Luego, avanzando en el proceso, los iones Ca^{+2} unidos a los grupos COO^{-} de las unidades de poliguluronato (que forman la estructura de “caja de huevo”) también comienzan a intercambiar iones Na^{+} con el medio, provocando la desintegración de las perlas.

En el presente trabajo se ha observado un comportamiento similar a pesar de no utilizar buffer fosfato como medio para el estudio que, incluso, coincide con el mecanismo difusivo del ion Sr^{+2} hallado al evaluar su liberación. Esto corrobora que el agua destilada no se encuentra completamente libre de iones, ya que además se ha demostrado que la ausencia de Na^{+} tanto en agua desionizada como en buffers (por ejemplo, Tris-HCl) evita casi por completo el hinchamiento de los materiales entrecruzados (Bajpai y Sharma, 2004; Mørch et al., 2006).

Zhou y colaboradores (Zhou et al., 2018) sintetizaron redes poliméricas de poli(acrilamida semi-interpenetradas con alginato, el cual fue entrecruzado iónicamente con soluciones al 0,1 M de los iones Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} y Ca^{+2} . Estos hidrogeles fueron sometidos a un ensayo de hinchamiento con PBS durante 100 h, en el cual todos los materiales mostraron porcentajes significativamente menores con respecto a un hidrogel control sin entrecruzamiento iónico. A su vez, el orden creciente de hinchamiento observado fue $\text{Sr}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Zn}^{+2} \approx \text{Ca}^{+2}$, demostrando que este fenómeno está fuertemente ligado a la naturaleza del metal utilizado. Por otro lado, Bajpai & Sharma (2004) observaron que el hinchamiento en PBS de las perlas de alginato se reducía de manera inversamente proporcional a la concentración de la solución de CaCl_2 utilizada para su entrecruzamiento. Mørch et al. (2006) fabricó perlas de los iones Ca^{+2} , Ba^{+2} y Sr^{+2} que gelificaron durante 10 minutos; utilizando alginatos con distinta composición de manurónico (M) y gularónico (G): uno con alto contenido de M (FM= 0,60) y otro con alto contenido de G (FG=0,66); observando que el radio de las perlas en solución salina se ve sumamente disminuido cuando el alginato rico en G es entrecruzado con Ba^{+2} y Sr^{+2} debido a la gran afinidad que tiene la subunidad de gularónico por estos iones. A su vez, al aumentar a 24 h el tiempo de gelación de los materiales, se obtuvieron geles aún más compactos.

Todo lo mencionado anteriormente indica que el hinchamiento de los hidrogeles de alginato está directamente relacionado al tipo y concentración del ion utilizado, la relación M/G del polímero y el tiempo de gelación. Esto concuerda con la hipótesis propuesta en este trabajo, que plantea que para hidrogeles de igual composición se obtienen materiales más estables y con hinchamientos menores cuanto mayor es el período de tiempo utilizado para la gelación. Varios autores concordaron en este sentido, independientemente del tipo de polímero o ion en particular utilizado en sus respectivos trabajos, lo que lleva a pensar que el método de síntesis para la formación de estos hidrogeles es determinante.

Por otro lado, la degradabilidad de un biomaterial es un factor principal en la regeneración de tejidos y la liberación de drogas. En este sentido, materiales con alta tasa de degradabilidad, como es en el caso del presente trabajo, presentan aplicación solo en casos puntuales donde se requiera un suministro de la

droga por un período muy acotado de tiempo. Además, este tipo de materiales también puede ser utilizado como parte de sistemas más complejos en los que cumpla la función de liberar Sr^{+2} dentro, por ejemplo, de un scaffold realizado de otro material polimérico más resistente.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se logró obtener una familia de hidrogeles de alginato con una gran capacidad de hinchamiento que, además, pueden actuar como sistema de liberación de droga. Estos materiales podrían utilizarse en aplicaciones que requieran una liberación de drogas catiónicas bivalente en un periodo corto de administración en sitios localizados a tratar.

5. Agradecimientos

Se agradece a CONICET, UNLP y CIC PBA por la financiación para la concreción del presente trabajo.

6. Referencias

- Bajpai, S. K.; y Sharma, S. (2004). Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers* 59(2), 129-140.
- Draget, K. I. (2009). Alginates. In *Handbook of hydrocolloids* (pp. 807-828). Woodhead Publishing.
- European Medicines Agency. PRAC recommends suspending use of Protelos/Osseor (strontium ranelate).
- Fernández, J. M.; Molinuevo, M. S.; Sedlinsky, C.; Schurman, L.; Cortizo, A. M.; McCarthy, A. D. (2013). Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *European journal of pharmacology* 706 (1-3), 41-47
- Fernández, J. M.; Molinuevo, M. S.; McCarthy, A. D.; Cortizo, A. M. (2014). Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn^{2+} and Mg^{2+} . *Biometals* 27(3), 601-607.
- Hurtel-Lemaire, A. S.; Mentaverri, R.; Caudrillier, A.; Cournaire, F.; Wattel, A.; Kamel, S.; Brazier, M. (2009). The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis new insights into the associated signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 284(1), 575-584.
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature-London* 392, 5-10.

- Langer, R. (2000). Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research* 33(2), 94-101.
- Lino, A.; Fernández, J.M.; Molinuevo, S.; Cortizo, A.M.; McCarthy, A. (2016). Efectos in vivo del Ranelato de Estroncio sobre células progenitoras de médula ósea de ratas diabéticas. *Actualizaciones en Osteología* 12(2), 78-86.
- Lino, A.; McCarthy, A.; Fernández, J.M. (2018). Evaluation of strontium-containing PCL-PDIPF scaffolds for bone tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Annals of Biomedical Engineering* 47(3), 902-912.
- Llabot, J. M.; Manzo, R. H.; Allemandi, D. A. (2004). Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International journal of pharmaceutics* 276(1-2), 59-66.
- Marie, P. J. (2008). Effective doses for strontium ranelate. *Osteoporosis international* 19(12), 1813-1813.
- Molinuevo, M. S.; Fernández, J. M.; Cortizo, A. M.; McCarthy, A. D.; Schurman, L.; Sedlinsky, C. (2017). Advanced glycation end products and strontium ranelate promote osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells in vitro: Preventive role of vitamin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 450, 94-104.
- Mørch, Y. A.; Donati, I.; Strand, B. L.; & Skjåk-Bræk, G. (2006). Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules* 7(5), 1471-1480.
- Ritger, P. L.; Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release* 5(1), 37-42.
- Skjåk-Bræk, G.; Grasdalen, H.; Smidsrød, O. (1989). Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydrate polymers* 10(1), 31-54.
- Tan, L.L.; Sampathkumar, K.; Wong, J.H.; Loo, S.H. (2020). Divalent cations are antagonistic to survivability of freeze-dried probiotics encapsulated in cross-linked alginate. *Food and Bioproducts Processing* 124, 369-377.
- Torres, M.L.; Fernandez, J.M.; Dellatorre, F.G.; Cortizo, A.M.; Oberti, T.G. (2019). Purification of Alginate Improves its Biocompatibility and Eliminates Cytotoxicity in Matrix for Bone Tissue Engineering. *Algal Research* (40), 101499.
- Zhou, Q.; Kang, H.; Bielec, M.; Wu, X.; Cheng, Q.; Wei, W.; Dai, H. (2018). Influence of different divalent ions cross-linking sodium alginate-polyacrylamide hydrogels on antibacterial properties and wound healing. *Carbohydrate polymers* 197, 292-304.



Efecto de atmósferas modificadas y temperaturas de refrigeración en un producto alimenticio de formulación compleja

Maria Ciappini^{1,2}, Ana Ferroggiaro², Mabel Santoro³

1. Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Rosario Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos. Zeballos 1341 (2000) Rosario, Santa Fe, Argentina
2. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano - Facultad de Química. Avda. Pellegrini 1332 (2000) Rosario, Santa Fe, Argentina.
3. Universidad Nacional de Rosario - Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura. Avda. Pellegrini 250 (2000) Rosario, Santa Fe, Argentina.

*E-mail: mcciappini@frro.utn.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Atmósfera modificada
Platos listos para consumir
Preservación

RESUMEN

Las atmósferas modificadas prolongan la vida útil comercial de diversos productos alimenticios, causando menos alteraciones en los atributos sensoriales del alimento respecto a los productos congelados y envasados al vacío. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la composición de atmósferas modificadas y la temperatura de almacenamiento sobre un producto alimenticio "arroz con filete de pollo y vegetales", propuesto para su comercialización por una empresa alimentaria de la región. El plato mencionado se envasó en bandejas de polipropileno, con film de tapa laminado en porciones de 300 g. Las muestras se conservaron a 4 °C y 12 °C, en atmósfera de aire, y en atmósferas con 20 % y 30 % de CO₂ en N₂. En los días 0, 7, 14 y 21 se realizaron recuentos microbiológicos, análisis fisicoquímicos y sensoriales. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de color (amarillo principalmente), recuento de hongos y levaduras y enterobacterias para las diferentes condiciones de almacenamiento. Entre las condiciones ensayadas, los mejores resultados se encontraron a 4 °C y atmósfera controlada con 30 % de CO₂ y 70 % de N₂.

Effect of modified atmospheres and refrigeration temperatures on a complex formulation food product

KEYWORDS

Modified atmosphere
Ready meals to eat
Preservation

ABSTRACT

Modified atmospheres extend the commercial shelf life of various food products, causing fewer alterations in the sensory attributes of the food, with respect to frozen and vacuum-packed products. The objective of this work was to evaluate the effect of the composition of modified atmospheres and storage temperatures of a product named "Rice with chicken filet and vegetables", proposed for commercialization by a food company in the region. The mentioned dish was packed in polypropylene trays, with laminated lid film, in 300 g portions. Samples were stored at 4°C and 12°C, in air atmosphere and atmosphere with 20% and 30% CO₂ in N₂. On days 0, 7, 14 and 21, microbiological counts, physicochemical and sensory analyzes were performed. Statistically significant differences were found on color parameters (yellow principally), count of fungi and yeasts and enterobacteria, for the different test conditions. Among the conditions tested in this study, the most appropriate to preserve this dish corresponded to 4 °C and a controlled atmosphere with 30% CO₂ and 70% of N₂.

1. Introducción

El mercado de los alimentos listos para consumir o listos para calentar y consumir ha venido desarrollándose en las últimas dos décadas, para consolidarse como una categoría de productos alimenticios. Esta consolidación se ha dado de forma diferenciada en los distintos países y regiones, dependiendo del grado de desarrollo, nivel de ingresos, costumbres e idiosincrasias propias. Estos factores han condicionado el tamaño alcanzado por ese mercado, pero su existencia y expansión son innegables a nivel mundial (Derek, 2020).

Dentro de los productos listos para consumir, se pueden diferenciar los Platos principales (Main Dishes), las Comidas listas (Ready Meals) y los Kits de comidas para preparar (Meal Kits) (Verhoeven, 2022). Las comidas listas han experimentado en 2019 un crecimiento en los lanzamientos y productos disponibles del 3 % a nivel mundial y del 12,2 % en Argentina. Las Comidas listas se encuentran comprendidas en el Código Alimentario Argentino (CAA), Capítulo III, Artículo 156 tris, apartado III: Comidas preparadas con tratamiento térmico que reciban un proceso de manipulación post tratamiento térmico tal como cortado, mezclado, feteado, envasado, entre otros.

Dentro de las tecnologías de conservación empleadas en las categorías de productos mencionados, se destacan la congelación y ultracongelación, el envasado en atmósfera modificada combinada con refrigeración y los termoprocesados termoestables, en envases laminados de cartón, aluminio y polietileno, aptos para procesos térmicos a presión en autoclaves. Cada tecnología utilizada para la conservación implica ventajas y desventajas dependiendo de la característica analizada, de los objetivos perseguidos y del mercado al que van dirigidos los productos finales. Dentro de este análisis, se puede considerar a la congelación como la tecnología más ventajosa desde el punto de vista de los lapsos de vida útil alcanzables, pero es la atmósfera modificada con refrigeración, el método que mejor conserva el aspecto visual y el que permite una regeneración o calentamiento más sencillo, parejo y efectivo, con los medios habituales que posee el consumidor.

Numerosos estudios sobre la vida útil de productos alimenticios envasados en atmósferas modificadas se han abordado desde la perspectiva del monoproducción. Se dispone de una gran cantidad de antecedentes sobre frutas frescas y vegetales mínimamente procesados (Viña, 2004; Cocco, 2015), de peces y carnes crudas de variado origen (Guerra Araujo, 2014; Deng et al., 2020); pero se encuentran pocos antecedentes sobre la evolución de productos que en su formulación involucran más de un componente. Estudios recientes (Matera et al., 2020) han abordado esta temática, pero sin agotarla y comprendiendo que la variedad de formulaciones de comidas preparadas listas para calentar y consumir, también entraña un elemento cultural que es variable entre regiones y entre poblaciones.

La empresa Grupo K&B SRL, de la localidad de Funes, Departamento Rosario, presta servicios de alimentación a hospitales y sanatorios, cumpliendo con los estándares de calidad e inocuidad alimentaria que este sector requiere. El servicio consiste en la elaboración de dietas y menús según la necesidad de cada paciente, bajo la supervisión de un equipo de nutricionistas. Con ese fin, elabora principalmente productos congelados, pero desea incursionar en otras metodologías de conservación. Por otra parte, desarrolló un producto que contiene componentes vegetales, un cereal como el arroz y una proteína animal ampliamente difundida en las comidas listas para consumir, como es el pollo. Para la conservación de este producto, se propuso la combinación de refrigeración y atmósferas controladas, trabajando sobre la hipótesis de que la variación en la composición de los gases de las mezclas utilizadas para componer la atmósfera en el envasado de productos listos para calentar y consumir, así como las temperaturas a las que son expuestos los productos durante su almacenamiento, inciden en las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales del alimento y condicionan su conservación. Las legislaciones de Argentina y Mercosur (CAA), así como la de la Unión Europea (Reglamentos CE N° 178/2002 y 2073/2005) y de Estados Unidos (CFR), indican la vida útil declarable para algunos productos como carnes procesadas, vegetales mínimamente procesados, chacinados y otros, pero dejan al criterio y a la determinación del elaborador, la investigación de la vida útil real, en muchos productos alimenticios. Las normas aplicables a las fábricas productoras de alimentos, como ISO 22000 (2019) y British Retail Consortium (BRC, 2018), especifican la necesidad de incluir la determinación de la vida útil en el proceso de diseño y desarrollo de los productos, en una forma de protocolos documentados, con procedimientos que reflejen las condiciones reales durante el almacenamiento y la manipulación, en base a criterios microbiológicos, químicos y sensoriales que sean relevantes.

Considerando los antecedentes mencionados y el interés del Grupo K&B, el objetivo de este trabajo se basó en estudiar los efectos de la temperatura y la composición de la atmósfera modificada sobre la conservación de un alimento denominado "arroz con pollo y vegetales" que permitan determinar las mejores condiciones de almacenamiento que aseguren la máxima vida útil del producto.

2. Materiales y métodos

Para la elaboración de 100 g de arroz con filete de pollo y vegetales, se incluyeron los siguientes ingredientes: 30 g de filete de pollo, 18 g de arroz blanco parboilizado, 18 g de agua, 13 g de tomate perita, 8 g de cebolla, 4,5 g de vino blanco, 3 g de zanahoria, 3 g de arvejas verdes, 2 g de aceite de girasol, 0,1 g de perejil, 0,2 g de ajo en polvo, 0,15 g de sal fina y 0,05 g de laurel. Se utilizaron vegetales y pollo frescos.

La preparación del plato se realizó en las instalaciones de la empresa Grupo K&B SRL (Funes, Santa Fe, Argentina), utilizando un sartén volcable de 45 L (Ingeniería Gastronómica, Argentina). Para el enfriamiento de la preparación, se empleó un túnel de abatimiento (Colombo Ingeniería, Argentina), que posee seis carros de veinte bandejas cada uno y opera a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El plato terminado se envasó mediante una fraccionadora automática de tornillo, en bandejas de polipropileno (Cotnyl PMB103, negro), de $164 \times 119 \times 60\text{ mm}$ y 425 micrones de espesor. La permeabilidad al O_2 del material es de $50\text{ cm}^3/\text{m}^2.\text{día}.\text{bar}$ a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el cierre, se utilizó film laminado de poliéster con cloruro de polivinilideno (Saran), de 13,5 micrones de espesor, con film Cast de polipropileno de 25 micrones de espesor (Flexigraf). La permeabilidad al oxígeno de esta película a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ es menor a $10\text{ cm}^3/\text{m}^2.\text{día}.\text{bar}$. Se utilizó una selladora de bandejas con vacío e inyección de gases (TURBOVAC, Cerveny, Argentina). El producto se conservó a $4,0 \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una cámara de refrigeración con evaporadores de freón y a $12,0 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una heladera con control de temperatura Proporcional-Integral-Derivativo (PID) tipo Arduino.

Para la generación de la atmósfera modificada (ATM), se utilizaron dos mezclas: INDURAL 2.0 (501804), conteniendo 30% de dióxido de carbono (CO_2) y 70% de nitrógeno (N_2) e INDURAL 4.0 (499230), con 20% de CO_2 y 80% de N_2 (INDURA-Air Products, Argentina).

Se elaboraron 35 kg de producto por cada una de las condiciones de atmósfera modificada a ensayar (aire, 20% CO_2 + 80% N_2 , 30% CO_2 + 70% N_2). Se envasó en porciones individuales de 300 g. La mitad de las bandejas se conservó a $4,0 \pm 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la otra, a $12,0 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el producto recién elaborado y cada 7 días, por espacio de tres semanas, se utilizaron tres de las bandejas conservadas a cada temperatura para realizar los ensayos microbiológicos, otras dos bandejas para los ensayos fisicoquímicos y se suministró una bandeja individual, conservada a cada temperatura, a cada uno de los siete evaluadores sensoriales que participaron del ensayo.

Sobre cada producto recién elaborado, se realizaron las siguientes determinaciones (AOAC, 2019): humedad, proteínas, grasas totales, grasas saturadas y grasas trans, fibra alimentaria, cenizas, sodio y actividad acuosa. El contenido de hidratos de carbono y el valor energético se obtuvieron por

cálculo. Se informa el promedio y la desviación estándar de estos resultados.

Siguiendo los criterios indicados en el CAA. Capítulo III, Artículo 156 tris, apartado III, se realizaron los siguientes análisis microbiológicos: Recuento de Enterobacterias (UFC/g) (ISO 21528-2, 2018); Recuento de *E. coli* (NMP/g) (BAM-FDA, 2011); Recuento de *Estafilococos* coagulasa positiva (NMP/g) (ISO 6888-3, 2003); *Salmonella* spp. (ISO 6579-1, 2017); *Listeria monocytogenes* (UFC/g) (BAM-FDA, 2011); Recuento de *Clostridium perfringens* (UFC/g) (ISO 7937, 2004); Recuento de presuntos *Bacillus cereus* (UFC/g) (ISO 7932, 2004). Adicionalmente se practicaron las siguientes determinaciones microbiológicas, no obligatorias según CAA pero relacionadas con la vida útil: Recuento de Bacterias Ácido Lácticas o Lactobacilos, en placa Agar MRS (ISO 9232, 1999); Recuento de Hongos y Levaduras (ISO 6611, 2004); Recuento de Mesófilos Aerobios Totales (BAM-FDA, 2011). Se informó el valor más elevado entre los tres resultados obtenidos para cada condición. Para los controles fisicoquímicos, se llevó a cabo un análisis de textura en el producto completo, midiendo la resistencia a la compresión, utilizando un Texturómetro AVIC TEX-I (Argentina), con probetas de 1 cm^2 , a velocidad de 1 mm/seg . Se muestrearon dos bandejas del producto por cada ensayo, realizando mediciones por duplicado en cinco puntos diferentes de cada bandeja. También se determinó el pH mediante pHómetro Testo 205 (Reino Unido) y se midió la composición de los gases en el espacio de cabeza de la bandeja (O_2 y CO_2), con un medidor digital WITT Oxybaby 6.0 (Alemania). Se informan los valores promedio de tres determinaciones y su desviación estándar.

Las determinaciones mencionadas se complementaron con un análisis sensorial de perfil completo, que incluye gustos, aroma, color y textura. Se evaluaron siete atributos sensoriales, expresando su intensidad en una escala del 1 a 5, participando un panel seleccionado y entrenado. Se procedió a la selección de evaluadores siguiendo la Norma ISO 8586 (2012) a partir de un grupo reclutado de veintiocho personas, que respondieron a una convocatoria difundida en la empresa. Se utilizaron ocho pruebas de selección: reconocimiento de gustos básicos, reconocimiento de olores, la prueba de Ishihara (1973) para establecer la ceguera al color, una prueba de ordenamiento para el gusto ácido y el gusto amargo, una prueba de descripción de textura y, finalmente, una prueba secuencial de triángulos. Se seleccionaron los siete evaluadores con mejor desempeño en las pruebas mencionadas.

El entrenamiento de los evaluadores sensoriales incluyó quince sesiones, en un período de ocho semanas. Se suministraron los siguientes patrones y escalas de referencia para los atributos a medir: solución acuosa de cloruro de sodio (salado), solución acuosa de cafeína (amargo), solución acuosa de ácido cítrico (ácido); pollo y arroz con diferentes tiempos de cocción, asociados a un grado de ternura en una escala del 1 (poco tierno) al 5 (muy tierno) y una mezcla de las especias utilizadas con diferentes grados de dilución en cloruro de sodio, para el aroma a especias. También se suministró a los integrantes del panel una escala correspondiente a la intensidad del atributo que se denominó, por consenso, color amarillo. Para ello, se prepararon mezclas de arroz y pollo con diferentes cantidades de condimentos, indicando los puntos 1, 3 y 5 de la escala a utilizar. Los evaluadores trabajaron en forma individual, en cabinas apropiadas para tal fin, recibiendo una bandeja de producto por cada condición a analizar. Los resultados generados por el panel se informan como promedios de los valores generados por los siete evaluadores. Utilizando Info Stat Statistical Software (Di Rienzo et al., 2008) se aplicó el test de Shapiro-Wilks modificado, para contrastar la normalidad de los datos, con un nivel de confianza del 95%. Luego se realizó el Análisis de la Varianza (ANOVA) y, cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos o entre semanas de almacenamiento, se realizó el test de Diferencia Mínima Significativa de Fisher (LSD). Las diferencias significativas se indicaron mediante letras diferentes. Las variables más importantes se correlacionaron mediante un análisis de regresión múltiple, utilizando el software mencionado.

3. Resultados y Discusión

La composición nutricional del producto se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición nutricional de 100 g arroz con filete de pollo y vegetales.

Parámetro	Unidad	Valor
Humedad	g	69,05 ± 1,22
Hidratos de Carbono	g	18,26 ± 0,95
Proteínas	g	6,58 ± 0,42
Grasas Totales	g	4,48 ± 0,18
Grasas Saturadas	g	1,17 ± 0,10
Grasa Trans	g	0,0
Cenizas	g	1,62 ± 0,07
Fibra alimentaria	g	0,4 ± 0,1
Sodio	mg	100 ± 8
Valor energético	kJ	585,7 ± 21,5

En virtud de los nutrientes que contiene y considerando los valores de la ley de Promoción de la Alimentación Saludable en Argentina (2021), no es necesario incluir octógonos negros de advertencia nutricional en el rotulado frontal, en esta primera etapa de aplicación de la ley. En efecto, el alimento no contiene azúcares añadidos, cafeína o edulcorantes; el contenido de sodio es menor a 600 mg/100 g; el porcentaje de calorías aportado por las grasas saturadas es inferior a 12 y el de calorías totales también se encuentra por debajo de los valores indicados.

En la Tabla 2 se informan los valores correspondientes a los parámetros fisicoquímicos evaluados en las muestras de los distintos tratamientos, a lo largo de las semanas de ensayo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el pH, cuando se comparan los distintos tratamientos. En cambio, existen diferencias para un mismo tratamiento. El pH aumentó en las semanas uno y dos, para luego disminuir en la semana tres. Este comportamiento puede explicarse por la dilución parcial del dióxido de carbono en la fracción líquida del producto, sobre todo en los casos donde el porcentaje del dióxido de carbono aumentó por la producción microbiana de ese gas. Estos resultados difieren de los informados por Wongwicharn et al. (2009), al ensayar un plato de pollo y arroz, conservado a 4 °C en atmósfera modificada (20 % CO₂ + 80 % N₂; 40 % CO₂ + 60 % N₂ y 60% CO₂ + 40 % N₂). En ese trabajo, no detectaron diferencias significativas en la evolución del pH., aunque si en las variaciones de la textura y el color.

Al determinar la Textura, medida como la resistencia a la compresión sobre una muestra del producto alimenticio (Tabla 2), no se encontraron diferencias significativas en función de los tratamientos. En cambio, se observaron diferencias significativas en cada tratamiento, desde el tiempo inicial hasta la semana tres. Se observó un aumento de la resistencia a la compresión a través del tiempo, circunstancia que puede explicarse por la retrogradación del almidón presente en el arroz, con la consecuente relocalización de las moléculas de agua dentro del mismo (Banchathanakij y Supphantharika, 2009; Jung, 2017).

En los tratamientos con atmósferas modificadas, la presencia de oxígeno en el momento inicial estuvo relacionada con el aire no eliminado en el envasado y/o con el que pudo quedar retenido en la trama heterogénea del producto. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de dióxido de carbono. Las variaciones observadas,

especialmente en aquellas muestras conservadas con aire o a temperatura de 12 °C, se relacionaron con los gases producidos por el metabolismo de los microorganismos presentes, aumentando el porcentaje de dióxido de carbono en esas muestras.

La actividad acuosa (a_w) resultó igual a $0,96 \pm 0,02$. Esta es determinante en las reacciones químicas y bioquímicas que deterioran el alimento y, especialmente, en el crecimiento de los microorganismos. Para este valor inicial de a_w ,

prácticamente no se encuentra restringida la actividad microbiana y podría desarrollarse, potencialmente, *Clostridium perfringens*, *Bacillus*, *Escherichia* y algunas levaduras. Sin embargo, y respondiendo a las buenas prácticas de manufactura puestas en práctica en la elaboración del plato, los recuentos de *Escherichia coli*, *Estafilococos coagulasa positiva*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* indicaron ausencia en todas las muestras.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos ensayados en el arroz con filete de pollo y vegetales, en función de los tratamientos aplicados y durante la conservación

Atmósfera	T [°C]	Parámetro	Semanas de almacenamiento			
			0	1	2	3
Aire	4	pH	5,5 ± 0,5 ^c	5,8 ± 0,3 ^b	5,9 ± 0,6 ^a	sd
		Textura	970 ± 197 ^b	869 ± 202 ^b	1398 ± 618 ^a	sd
		% CO ₂	1,2 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,4 ^b	1,7 ± 0,4 ^b	sd
		% O ₂	17,8 ± 0,5	16,9 ± 0,3	16,5 ± 0,2	sd
Aire	12	pH	5,5 ± 0,5 ^c	5,8 ± 0,2 ^b	6,2 ± 0,1 ^a	sd
		Textura	973 ± 197 ^b	840 ± 251 ^b	2075 ± 950 ^c	sd
		% CO ₂	1,2 ± 0,3 ^b	2,5 ± 1,1 ^a	sd	sd
		% O ₂	17,8 ± 0,5	16,0 ± 5,2	sd	sd
ATM 20 % CO ₂ 80 % N ₂	4	pH	5,4 ± 0,4 ^c	5,7 ± 0,1 ^b	6,2 ± 0,3 ^a	5,5 ± 0,7 ^{bc}
		Textura	980 ± 227 ^b	723 ± 437 ^b	1368 ± 613 ^a	1308 ± 230 ^a
		% CO ₂	20,6 ± 0,6 ^a	18,6 ± 2,1 ^b	18,0 ± 1,7 ^b	sd
		% O ₂	1,1 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,46 ^{bc}	2,0 ± 0,6 ^c	1,5 ± 0,9 ^b
ATM 20 % CO ₂ 80 % N ₂	12	pH	5,4 ± 0,4 ^c	5,7 ± 0,3 ^b	6,1 ± 0,6 ^a	5,5 ± 0,8 ^{bc}
		Textura	970 ± 227 ^b	906 ± 157 ^b	1497 ± 641 ^{ab}	1615 ± 819 ^a
		% CO ₂	20,6 ± 0,6 ^a	18,3 ± 2,1 ^a	28,6 ± 19,8 ^b	sd
		% O ₂	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,9	1,0 ± 1,5	0,9 ± 1,1
ATM 30 % CO ₂ 70 % N ₂	4	pH	5,4 ± 0,5 ^c	5,9 ± 0,3 ^b	5,9 ± 0,6 ^a	5,5 ± 0,7 ^{bc}
		Textura	974 ± 197 ^b	873 ± 224 ^b	1262 ± 997 ^a	1337 ± 501 ^a
		% CO ₂	31,2 ± 0,6 ^b	24,6 ± 2,3 ^a	25,3 ± 1,2 ^a	24,6 ± 1,2 ^a
		% O ₂	1,4 ± 0,7 ^a	2,8 ± 2,5 ^c	2,3 ± 1,0 ^{bc}	1,8 ± 1,0 ^{ab}
ATM 30 % CO ₂ 70 % N ₂	12	pH	5,4 ± 0,5 ^c	5,8 ± 0,2 ^b	6,1 ± 0,6 ^a	5,6 ± 0,7 ^{bc}
		Textura	970 ± 197 ^b	1190 ± 274 ^b	1426 ± 568 ^a	1432 ± 329 ^a
		% CO ₂	31,2 ± 0,6 ^a	26,5 ± 0,7 ^b	25,5 ± 13,9 ^b	30,7 ± 13,2 ^a
		% O ₂	1,4 ± 0,7 ^a	2,5 ± 1,1 ^c	1,4 ± 0,8 ^a	0,8 ± 0,8 ^b

Textura = corresponde a la medición instrumental de la resistencia a la compresión, expresada en g/cm².

sd = sin datos por encontrarse el producto no apto para consumo por presencia de hongos y/o con producción de gas.

Letras supraíndices diferentes indican diferencias significativas (p=0,05) para un mismo tratamiento.

Microorganismos anaerobios estrictos esporulados, como el caso del *Clostridium botulinum* no se investigaron debido a la presencia residual de oxígeno en los envases, provenientes de la tecnología de envasado, la conservación a baja temperatura y la actividad acuosa menor a 0,97, según los criterios del Advisory Committee for the Microbiological Safety of Foods (ACMSF),

recopilados por Jones (2008), que indican los factores de riesgo y los lineamientos de exclusión o no de la probabilidad de ocurrencia del desarrollo de toxina botulínica en este tipo de productos. Los resultados obtenidos de recuentos para lactobacilos, enterobacterias, aerobios mesófilos, hongos y levaduras se muestran en la Tabla 3. Para la presencia de microorganismos aerobios mesófilos,

se encontraron diferencias significativas ($p=0,05$) entre las muestras conservadas con aire y aquellas conservadas con atmósferas modificadas, evidenciando la influencia inhibitoria de la presencia de dióxido de carbono en el desarrollo de los microorganismos aerobios. Asimismo, se observaron

valores más bajos de aerobios mesófilos cuando las muestras se conservaron a 4 °C respecto de las muestras conservadas a 12 °C, para todos los tratamientos, evidenciando también la influencia de la temperatura en el crecimiento de estos microorganismos.

Tabla 3. Parámetros microbiológicos ensayados en el arroz con filete de pollo y vegetales, en función de los tratamientos aplicados y durante la conservación.

Envase	T [°C]	Recuento [UFC/g]	Semanas de almacenamiento			
			0	1	2	3
Aire	4	Aerobios Mesófilos	2455 ^a	2912 ^a	16705 ^b	sd
		Hongos y Levaduras	5 ^a	0 ^a	900 ^b	sd
		Enterobacterias	0 ^a	0 ^a	5000 ^b	sd
		Lactobacilos	0 ^a	0 ^a	650 ^b	sd
Aire	12	Aerobios Mesófilos	2405 ^a	10950 ^b	270750 ^c	sd
		Hongos y Levaduras	5 ^a	1075 ^b	210 ^c	sd
		Enterobacterias	0 ^a	3800 ^b	7500 ^c	sd
		Lactobacilos	0	0	20	sd
ATM 20 % CO ₂ 80 % N ₂	4	Aerobios Mesófilos	2450 ^b	2925 ^{bd}	1650 ^c	3627 ^d
		Hongos y Levaduras	5 ^a	20 ^c	0 ^a	53 ^b
		Enterobacterias	0 ^a	250 ^c	2500 ^b	750 ^c
		Lactobacilos	0	0	0	58
ATM 20 % CO ₂ 80 % N ₂	12	Aerobios Mesófilos	2435 ^b	3085 ^b	5820 ^b	34675 ^c
		Hongos y Levaduras	5 ^b	105 ^b	950 ^c	1375 ^c
		Enterobacterias	0 ^b	1055 ^c	3050 ^{ca}	5750 ^a
		Lactobacilos	0 ^a	0 ^a	110 ^a	1600 ^b
ATM 30 % CO ₂ 70 % N ₂	4	Aerobios Mesófilos	2455 ^a	2995 ^a	1262 ^b	3500 ^c
		Hongos y Levaduras	5	0	0	0
		Enterobacterias	0	0	0	0
		Lactobacilos	0	0	0	0
ATM 30 % CO ₂ 70 % N ₂	12	Aerobios Mesófilos	2355 ^b	4100 ^b	4525 ^b	26800 ^c
		Hongos y Levaduras	5	10	0	0
		Enterobacterias	0 ^a	80 ^b	290 ^d	0 ^c
		Lactobacilos	0 ^a	0 ^a	0 ^a	375 ^b

sd: sin datos por encontrarse el producto no apto para consumo por presencia de hongos y/o con presencia de gas.
Letras supra-índices diferentes indican diferencias significativas ($p=0,05$) para un mismo tratamiento

También el desarrollo de hongos y levaduras aparece sensiblemente influenciado por la presencia de dióxido de carbono y por la temperatura de conservación, siendo el primero de los parámetros mencionados más importante en la inhibición de su crecimiento. Las condiciones de 30 % de dióxido de carbono y 4°C aparecen como las más adecuadas para la conservación del producto, con respecto a este parámetro microbiológico que, por otro lado, es de gran importancia, ya que si aparecieran signos visibles de la presencia de hongos, el producto resultaría claramente rechazado por el consumidor. Los resultados difieren de los informados por Vongsawasdi et al. (2008), quienes observaron que los recuentos totales en placa fueron similares para la muestra envasada en aire y aquellas conservada en atmósfera modificada con CO₂ entre 20 y 60 % a 4 °C, durante 15 días, pero fueron menores con la

concentración de CO₂ después de 20 días. En el recuento de enterobacterias, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($p = 0,01$), particularmente entre los ensayos de aire respecto de aquellos con atmósferas modificadas y entre las distintas temperaturas de conservación. El recuento de estos microorganismos es fundamental ya que pueden estar asociados a la presencia de patógenos fecales y la legislación argentina no admite valores superiores a 10³ UFC/g. Esto limitaría la posibilidad de comercialización del producto y los días de vida útil a declarar en algunos de los tratamientos realizados. Desde este punto de vista, el plato envasado en ATM con 30 % de dióxido de carbono se puede comercializar hasta las tres semanas ensayadas, a 4° y a 12 °C, mientras que el producto envasado en aire o en ATM con 20 % de

dióxido de carbono cumple el requisito legal por espacio de una semana, sólo cuando se conserva a 4 °C. Finalmente, los lactobacilos aparecieron entre la segunda y la tercera semana.

Los tratamientos de conservación ensayados también modificaron las características sensoriales del arroz con filete de pollo y verduras, como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros sensoriales del arroz con filete de pollo y vegetales en función de los tratamientos aplicados y durante su conservación

Envase	T [°C]	Parámetro	Semanas de almacenamiento			
			0	1	2	3
Aire	4	Salado	3,3 ± 0,6 ^a	3,3 ± 0,6 ^a	2,4 ± 1,7 ^b	sd
		Ácido	1,3 ± 1,2 ^a	1,5 ± 1,1 ^{ab}	1,7 ± 1,7 ^b	sd
		Aroma a especias	3,3 ± 0,6 ^a	3,3 ± 0,7 ^a	2,7 ± 1,9 ^b	sd
		Amargo	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,2 ± 1,2	sd
		Terneza del arroz	3,0 ± 0,8 ^a	3,6 ± 0,6 ^a	2,5 ± 1,8 ^b	sd
		Terneza del pollo	3,1 ± 0,6 ^b	3,5 ± 0,5 ^b	2,5 ± 1,8 ^a	sd
		Color amarillo	3,0 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,5 ^a	1,8 ± 1,3 ^b	sd
Aire	12	Salado	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,5	sd	sd
		Ácido	1,3 ± 1,2 ^a	1,7 ± 1,1 ^b	sd	sd
		Aroma a especias	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,8	sd	sd
		Amargo	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	sd	sd
		Terneza del arroz	3,1 ± 0,8 ^a	3,5 ± 0,6 ^b	sd	sd
		Terneza del pollo	3,1 ± 0,6	3,4 ± 0,5	sd	sd
		Color amarillo	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,4	sd	sd
ATM 20 % CO ₂ 80 % N ₂	4	Salado	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,6
		Ácido	1,3 ± 1,2 ^a	1,2 ± 1,3 ^a	1,8 ± 1,1 ^b	1,6 ± 1,3 ^b
		Aroma a especias	3,3 ± 0,6 ^a	3,5 ± 0,6 ^{ab}	3,5 ± 0,7 ^{ab}	3,7 ± 0,7 ^b
		Amargo	1,1 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	1,4 ± 0,6 ^{ab}	1,6 ± 0,8 ^b
		Terneza del arroz	3,0 ± 0,8 ^a	3,3 ± 0,8 ^a	3,4 ± 0,9 ^a	3,5 ± 1,1 ^b
		Terneza del pollo	3,1 ± 0,6 ^a	3,4 ± 0,5 ^b	3,5 ± 0,5 ^b	3,1 ± 0,9 ^a
		Color amarillo	3,0 ± 0,3 ^a	3,0 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,6 ^b
ATM 20 % CO ₂ 80 % N ₂	12	Salado	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,6	3,1 ± 0,6
		Ácido	1,3 ± 1,2 ^a	1,5 ± 1,4 ^a	1,6 ± 1,1 ^a	2,7 ± 1,1 ^b
		Aroma a especias	3,3 ± 0,6	3,6 ± 0,5	3,4 ± 0,5	3,6 ± 0,8
		Amargo	1,1 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,5 ^b	1,4 ± 0,6 ^b	1,7 ± 0,9 ^b
		Terneza del arroz	3,0 ± 0,8 ^a	3,4 ± 0,7 ^b	3,4 ± 0,9 ^b	3,6 ± 1,3 ^b
		Terneza del pollo	3,1 ± 0,6	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,2 ± 0,9
		Color amarillo	3,0 ± 0,3 ^a	3,0 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,3 ^{ab}	2,4 ± 0,6 ^b
ATM 30 % CO ₂ 70 % N ₂	4	Salado	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5
		Ácido	1,3 ± 1,2 ^a	1,2 ± 1,2 ^a	1,3 ± 1,3 ^a	1,7 ± 1,2 ^b
		Aroma a especias	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,6	3,5 ± 0,7
		Amargo	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,6
		Terneza del arroz	3,0 ± 0,8 ^a	3,6 ± 0,6 ^b	3,6 ± 0,6 ^b	3,5 ± 1,1 ^b
		Terneza del pollo	3,1 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,3 ± 0,7
		Color amarillo	3,0 ± 0,3	3,1 ± 0,5	2,8 ± 0,2	2,7 ± 0,5
ATM 30 % CO ₂ 70 % N ₂	12	Salado	3,3 ± 0,6 ^a	3,3 ± 0,5 ^a	3,2 ± 0,6 ^a	2,1 ± 1,0 ^b
		Ácido	1,3 ± 1,2	1,3 ± 1,2	1,2 ± 1,3	1,1 ± 0,9
		Aroma a especias	3,3 ± 0,6 ^a	3,4 ± 0,5 ^a	3,4 ± 0,6 ^a	1,7 ± 0,4 ^b
		Amargo	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,6
		Terneza del arroz	3,0 ± 0,8 ^a	3,5 ± 0,6 ^b	3,6 ± 0,7 ^b	2,1 ± 1,0 ^c
		Terneza del pollo	3,1 ± 0,6	3,3 ± 0,6	3,4 ± 0,6	3,2 ± 1,1
		Color amarillo	3,0 ± 0,3 ^a	3,1 ± 0,6 ^a	2,8 ± 0,2 ^a	1,8 ± 1,1 ^b

sd: sin datos por estar el producto no apto para consumo por presencia de hongos y/o con producción de gas. Letras diferentes indican diferencias significativas (p=0,05) por tiempo de conservación. Los valores se determinaron en escalas del 1 al 5 de intensidad.

Por ejemplo, para los gustos ácido y salado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (p = 0,04;

p = 0,01, respectivamente) y entre las semanas de almacenamiento del alimento (p=0,05; p=0,01, respectivamente). Las diferencias en estas

percepciones aparecieron a partir de la segunda semana, particularmente en las muestras conservadas con aire y con ATM del 20 % de CO₂. Este efecto aparece más vinculado a la composición de la atmósfera que a las temperaturas de conservación y es más acentuado en el gusto ácido, que registró aumentos a través del tiempo.

En la percepción del gusto amargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($p = 0,01$) y entre semanas ($p = 0,02$). La mayor diferencia se encontró entre los tratamientos con aire y los de atmósferas modificadas, dado que se percibió un gusto amargo más intenso en las muestras conservadas con aire. En las muestras conservadas con atmósferas modificadas y a distintas temperaturas, aparecieron cambios en el gusto amargo en la tercera semana, cuando el producto llegó en condiciones microbiológicas para ser probado, notándose un incremento en este gusto al final de la vida útil controlada. Es probable que esté condicionado por el incremento del gusto ácido.

A diferencia del fenómeno de retrogradación del almidón, detectado a través de la medición instrumental de la resistencia a la compresión, se reportó un aumento en la percepción de la terneza del arroz con el transcurso de las semanas, hasta la semana tres para las muestras envasadas en ambas ATM y hasta la semana dos para las muestras conservadas en aire; luego, se aprecia una disminución. La percepción sensorial de la retrogradación del almidón parece retrasarse respecto a la medición instrumental.

Los resultados para la terneza del pollo evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en los análisis aplicados ($p=0,01$). Se percibió un aumento en este atributo para todos los tratamientos, coincidente con el ablandamiento de la carne con el paso del tiempo.

Por su parte, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,01$) entre tratamientos y entre semanas para el aroma a especias, que se manifestaron a partir de la segunda semana. El aumento en la percepción de los aromas a especias podría estar influenciado por los cambios en los gustos ácido y salado.

Se percibió también una disminución significativa del color amarillo ($p = 0,01$), atributo característico del producto, a partir de la segunda semana de almacenamiento, que continuó disminuyendo en la tercera semana. Estos resultados son coincidentes con los informados por Wongwicharn et al. (2009), quienes observaron que las propiedades sensoriales se conservaban mejor bajo atmósferas modificadas.

Análisis de regresión múltiple

En función de la participación de las distintas variables estudiadas en la evolución del arroz con filete de pollo y vegetales a lo largo de su vida útil, se seleccionaron aquellas de mayor incidencia y se realizó el análisis de regresión múltiple sobre ellas (Tabla 5). El objeto de este análisis fue establecer correlaciones matemáticas válidas, que permitan predecir la duración del producto bajo condiciones de almacenamiento reales

Tabla 5. Análisis de Regresión Múltiple para enterobacterias (E), hongos y levaduras (HyL) y color amarillo (A) en arroz con filete de pollo y vegetales.

Ecuación de ajuste	Coefficiente de correlación	R ²
$E = 1198,72 + 1531,2 * t - 147,03 * CO_2 + 131,85 * T$	0,66	0,44
$HyL = 177,447 + 508,414 * t - 45,065 * CO_2 + 45,988 * T$	0,63	0,40
$A = 2,954 - 0,593 * t + 0,038 * CO_2 - 0,04 * T$	0,75	0,46

t = tiempo en semanas o fracción de ellas; CO₂ = porcentaje de dióxido de carbono inicial en el envase; T = temperatura en grados centígrados

Las variables independientes identificadas fueron: temperatura de almacenamiento, contenido inicial de dióxido de carbono en la atmósfera del envase y tiempo (semanas). Las variables dependientes, de mayor importancia en la limitación de la vida útil del producto en estudio fueron: recuento de

enterobacterias (E), por razones legales; recuento de hongos y levaduras (HyL), por el rechazo que causa su presencia en el consumidor, y el color amarillo (A), como indicador de aceptabilidad para el consumidor al momento de la compra. El modelo es válido dentro de las condiciones estudiadas, con valores de dióxido

de carbono entre 0 y 30 %, temperaturas entre 4 y 12 °C y tiempo de cero a veintiún días. Para todos los casos, cuando el modelo arroja resultados negativos, se debe considerar que el recuento es cero.

Los coeficientes positivos encontrados para el tiempo y para la temperatura indican que estas variables promueven el crecimiento de colonias de enterobacterias, de hongos y de levaduras, mientras que el efecto provocado por la presencia de dióxido de carbono actúa en sentido contrario. Concentraciones de tan solo el 0,5% de oxígeno residual en productos envasados en dióxido de carbono y N₂ o al vacío son suficientes para permitir el crecimiento de especies de hongos y levaduras no deseadas (Schirmer, 2020). Estudios previos han demostrado que las concentraciones elevadas de CO₂ son generalmente mucho más eficientes para controlar el crecimiento de hongos, que el agotamiento del O₂ (Taniweaki, 2009).

En cambio, la influencia de las variables estudiadas sobre la variación del color amarillo en el arroz con filete de pollo y verduras, es opuesta y el color amarillo disminuye con los aumentos de temperatura, pero aumenta con incrementos en el porcentaje de dióxido de carbono presente.

4. Conclusiones

El envasado en atmósferas modificadas combinado con refrigeración prolonga la vida útil del arroz con filete de pollo y vegetales y es un método de conservación adecuado, debido a su efectividad en la conservación de los atributos de calidad, en coincidencia con lo que ocurre con otros productos alimenticios (Solomos, 2017; Yousuf et al., 2018; Kvapil, 2019).

Al analizar los resultados expuestos, se observó que la temperatura de almacenamiento fue el factor que mayor incidencia mostró en el desarrollo de los microorganismos estudiados. La concentración inicial de dióxido de carbono o la disminución de la concentración de oxígeno, también determinó la inhibición o lentificación de la actividad microbiana, sin eliminarla completamente, en menor grado.

La respuesta de la medición sensorial de la terneza y de la medición instrumental de la resistencia a la compresión mostró un retraso en la percepción sensorial de este fenómeno. Se encontraron

variaciones perceptibles en los gustos salado, amargo y ácido, en el aroma a especias y en el color amarillo en todas las condiciones de envasado y de conservación, a partir de la primera semana de almacenamiento. El color amarillo y el gusto ácido fueron los parámetros que mayores variaciones registraron.

En virtud de las condiciones y parámetros aquí estudiados, se puede concluir que es posible alcanzar una vida útil comercial de al menos tres semanas para el producto alimenticio en estudio (arroz con filete de pollo y vegetales), cuando se envasa en una atmósfera modificada de 30 % de CO₂ y 70 % N₂ a 4 °C.

5. Referencias

- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. (2019). 21th ed., George Latimer. Rockville, MD, USA.
- BAM – FDA (2011). Bacteriological Analytical Manual. U.S Food and Drug Administration.
- Banchathanakij, R.; Suphantharika, M. (2009). Effect of different β -glucans on the gelatinisation and retrogradation of rice starch. *Food Chemistry*, 114(1), 5-14.
- BRC. British Retail Consortium (2018). Norma Mundial de Seguridad Alimentaria. BRC Global Standards Ed. 8 II.
- CAA. Código Alimentario Argentino (2022) Ministerio de Agroindustria. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas. Marco Regulatorio.
- CFR. Code of Federal Regulations. Title 21 - Food and Drugs.
- Cocco, M. (2015). Estudio del efecto de las distintas etapas del procesamiento mínimo de frutos cítricos sobre su calidad interna global. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Deng, S.; Li, M.; Wang, H.; Xu, X. y Zhou, G. (2020). Enhancement of the edible quality and shelf life of soft boiled chicken using MAP. *Food Science and Nutrition*, 8, 1596-1602.
- Derek, M. (2020). Changes in Gastronomy and Urban Space. Introduction to Part II. In: Kowalczyk, A., Derek, M. (eds) *Gastronomy and Urban Space. The Urban Book Series*. Springer, Cham.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. (2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Guerra Araujo N. (2014). Qualidade de file de Tilápia embalado com atmosfera modificada. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Paraíba, Piracicaba, Brasil.
- ISO 9232 (1999). Medio para el aislamiento y enumeración de lactobacilos según Man, Rogosa y Sharpe. International Organization for Standardization.
- ISO 6888-3 (2003). Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus*

- aureus y otras especies). Parte 3: Detección y técnica NMP para números bajos. International Organization for Standardization.
- ISO 7932 (2004). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Técnica de recuento de colonias a 30°C. Modificación 1: Inclusión de ensayos opcionales. (ISO 7932:2004/Amd 1:2020, Versión corregida 2020-08). International Organization for Standardization.
- ISO 7937 (2004). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica del recuento de colonias. International Organization for Standardization.
- ISO 8586 (2012). Sensory analysis. General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. International Organization for Standardization.
- ISO 6579-1 (2017). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp. International Organization for Standardization.
- ISO 21528-2 (2018). Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Enterobacteriaceae. Parte 2: Técnica para el recuento de colonias. (ISO 21528-2:2017, Versión corregida 2018-06-01). International Organization for Standardization.
- Ishihara, S. (1973) Test for colour blindness. Kanehara Shuppan, Tokio, Japan.
- Jones, G. (2008) Risks of psychrotrophic *Clostridium Botulinum* in MAP and vacuum packed chilled foods. *New Food*.
- Jung, K.; Lee, H.; Lee, S.H.; Kim, J.C. (2017). Retrogradation of heat-gelatinized rice grain in sealed packaging: investigation of moisture relocation. *Food Science and Technology*, 37(1), 97-102.
- Kvapil, M.F. (2019). Deshidratación osmótica y envasado en atmósferas modificadas de anco (*Cucurbita moschata*) mínimamente procesado. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía y Agroindustria. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina.
- Ley 27.642. Promoción de la Alimentación saludable. Boletín Oficial del 12/11/2021.
- Matera, A.; Altieri, G.; Ricciardi, A.; Zotta, T.; Condelli, N.; Galgano, F.; Genovese, F.; Di Renzo, G. (2020). Microbiological Stability and Overall Quality of Ready-to-Heat Meals Based on Traditional Recipes of the Basilicata Region Foods, 9, 406.
- Norma ISO 22000 (2019). Traducción Oficial- ISO 2018- Licenciado por IRAM FILIAL LITORAL. 19 de marzo de 2019.
- Reglamento (CE) Nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria y se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. 28 de enero de 2002.
- Reglamento (CE) Nº 2073/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 15 de noviembre de 2005.
- Schirmer, B.C.T.; Sørheim, O.; Skaar, I.; Kure, C.F. (2020). The Influence of Concentrations of Carbon Dioxide and Residual Oxygen on the Growth of Meat Spoilage Moulds. *Journal of Food Science and Nutrition*, 6: 064.
- Solomos, T. (2017). Aspects of the Biology and Physics Underlying Modified Atmosphere Packaging. En Yildif, F. y Wiley, R.C. (Eds.) *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables* (17-51).
- Taniweaki, M.H.; Hocking, A.D.; Pit, J.I.; Fleet, G.H. (2009). Growth and mycotoxin production by spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 132: 100-108.
- Verhoeven, L. (2022). Meal-kits; a trade-off between literature on healthy food and convenience food? Master Thesis of Marketing, Radboud University, Nijmegen, Países Bajos.
- Viña, S. (2004). Efecto del almacenamiento sobre la calidad del apio trozado. Aspectos químicos de los mecanismos de defensa. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Vongsawasdi, P.; Wongwicharn, A.; Khunajakr, N.; Dejsu, N. (2008). Shelf-life extension of fried battered chicken by modified atmosphere packaging. *As. J. Food Ag-Ind.*, 1(04), 197-204
- Wongwicharn, A.; Phoolphund, S.; Vongsawasdi, P.; Bomrungnok, W. (2009). Shelf-life extension of roasted red chicken meat coloured with red mould rice by modified atmosphere packaging. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 4, 183-193.
- Yousuf, B.; Qadria, O.S.; Srivastava, A.K. (2018). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT – Food Science and Technology*, 89, 198–209.



Películas antibacterianas de poli(3-hidroxi butirato) (PHB)

Mayte Milenka Quispe¹, María Emilia Villanueva², Guillermo Javier Copello³,
Olivia Valeria López^{1,4}, Marcelo Armando Villar^{1,5}

1. Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga Km 7, Bahía Blanca 8000, Argentina.
2. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de Luján, Luján 6700, Argentina.
3. Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco, IQIMEFA (UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires 1113, Argentina.
4. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, Bahía Blanca 8000, Argentina
5. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, Bahía Blanca 8000, Argentina.

*E-mail: olivialopez@plapiqui.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Poli(3-hidroxi butirato)
Sulfato de cobre
Películas
Capacidad antibacteriana

RESUMEN

En este trabajo se obtuvieron películas por mezclado en fundido y termocompresión a partir de poli(3-hidroxi butirato) (PHB) con Irganox 1010 (0,3 %, p/p_{PHB}) como antioxidante, tributirato de glicerol (20 %, p/p_{PHB}) como plastificante y sulfato de cobre (II) pentahidratado (0,5 - 7,5 %, p/p_{PHB}) como antimicrobiano. La incorporación del antimicrobiano incrementó la rugosidad de la superficie de las películas. Los materiales que contenían sulfato de Cu (II) presentaron menor ductilidad y resistencia mecánica debido al tamaño micrométrico de los cristales. La incorporación de 0,5 % del antimicrobiano permitió incrementar la WVP debido al elevado grado de hidratación de la sal; sin embargo, concentraciones mayores (2,5 - 7,5 %) redujeron esta propiedad por el incremento de la tortuosidad. Si bien los materiales presentaron capacidad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (Gram +) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -), se apreciaron diferencias atribuidas a la pared celular de estas bacterias. Así, se demostró que es posible obtener películas antibacterianas de PHB a partir de la incorporación de una sal de cobre que podrían utilizarse para envases de alimentos, cosméticos o farmacéuticos como así también para dispositivos biomédicos.

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) films with antibacterial properties

KEYWORDS

Poly(3-hydroxybutyrate)
Copper sulfate
Films
Antibacterial capacity

ABSTRACT

In this work, films of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) with Irganox 1010 (0.3%, w/p_{PHB}) as antioxidant, glycerol tributyrates (20%, w/p_{PHB}) as plasticizer, and copper (II) sulfate pentahydrate (1 - 7.5%, w/p_{PHB}) as antimicrobial were obtained by melt mixing and thermocompression. The incorporation of the antimicrobial increased the roughness of films surface. The materials containing Cu (II) sulfate presented lower ductility and mechanical resistance due to the crystals micrometric size. The incorporation of 0.5 % of the antimicrobial increased the WVP due to the high degree of hydration of the salt; however, higher concentrations (2.5 - 7.5 %) reduced this property due to an increased tortuosity. Although the materials presented antibacterial capacity against *Staphylococcus aureus* (Gram +) and *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -), differences attributed to cell wall of the bacteria were observed. Thus, it was revealed that it is possible to obtain antibacterial PHB films, from the incorporation of a copper salt, that could be used for food, cosmetic or pharmaceutical packaging as well as for biomedical devices.

1. Introducción

La inadecuada disposición final de los materiales de uso masivo derivados del petróleo tales como

envases de alimentos, bebidas, cosméticos y fármacos, como así también dispositivos biomédicos e insumos agropecuarios provoca un gran impacto ambiental. Esto se atribuye principalmente a la

generación y acumulación de materiales no biodegradables, como por ejemplo los denominados microplásticos que se encuentran contaminando hábitats acuáticos, terrestres y aeroterrestres (Castañeta et al., 2020). Una alternativa para minimizar el impacto ambiental que genera el uso y la mala disposición de los materiales de origen petroquímico, son los biomateriales de origen renovable y biodegradables (Miteluț et al., 2019; Arancibia et al., 2014). Sin embargo, pese a ser sustentables, estos materiales aún no se utilizan de forma masiva debido principalmente a su elevado costo, deficientes propiedades mecánicas como la fragilidad y difícil procesamiento, en comparación con los materiales derivados del petróleo (Montes et al., 2016).

Actualmente, el desarrollo de materiales que no sólo se obtengan de recursos renovables y sean biodegradables sino también que posean capacidad antibacteriana, resulta de gran interés para la comunidad científica y el sector industrial. El poli(3-hidroxibutirato) (PHB) es uno de los biopolímeros más estudiados y además posee propiedades mecánicas similares a algunos polímeros sintéticos. Sin embargo, a diferencia de otros biopolímeros como el quitosano, no posee actividad antibacteriana. En 2008, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos reconoció al cobre como el primer metal antimicrobiano. Se ha demostrado en ensayos in vitro que sobre superficies sólidas de cobre se puede eliminar el 99,9 % de los microorganismos (Prado et al. 2012). La actividad antibacteriana del cobre se atribuye principalmente a la liberación de iones Cu^{2+} que afectan la integridad de la membrana/pared bacteriana. Posteriormente, generan estrés oxidativo intracelular y modifican el ADN, resultando

finalmente en la muerte de los microorganismos (Grass et al., 2011; Vincent et al., 2018). Por ello, una manera de potenciar el uso del PHB es otorgarle propiedades antibacterianas a partir de la adición de sales de cobre.

El objetivo de este trabajo fue obtener películas flexibles a partir de PHB con capacidad antibacteriana. Se evaluó el efecto de la incorporación de tributirato de glicerol como plastificante y sulfato de cobre (II) pentahidratado como agente antibacteriano sobre la microestructura y las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al vapor de agua de las películas de PHB. Además, se realizaron estudios para evaluar la capacidad antibacteriana de los materiales desarrollados testeando bacterias Gram positivas y Gram negativas.

2. Materiales y métodos

Materiales

El poli(3-hidroxibutirato) (PHB) se adquirió de Biomer® (Alemania). Los aditivos utilizados fueron tributirato de glicerol (TBG, 98,5 % de pureza, Sigma Aldrich, Suiza) como plastificante, Irganox® 1010 (I, 98,0 % de pureza, Sigma Aldrich, Suiza) como antioxidante y sulfato de cobre (II) pentahidratado (Cu, 98,0 % pureza, Biopack, Argentina) como agente antibacteriano.

Obtención de las películas

Se prepararon diferentes formulaciones de PHB, I, TBG y Cu, según se muestra en la Tabla 1. Cabe destacar que, las concentraciones de los diferentes aditivos se encuentran expresadas en porcentaje en base PHB (% p/p_{PHB}).

Tabla 1. Formulaciones de películas a base de PHB, Irganox 1010 (I), tributirato de glicerol (TBG) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu).

Formulación	Irganox 1010 (I) (%, p/p _{PHB})	Tributirato de glicerol (TBG) (%, p/p _{PHB})	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu) (%, p/p _{PHB})
PHB-I-0Cu	0,3	-	-
PHB-I-0,5Cu	0,3	-	0,5
PHB-I-2,5Cu	0,3	-	2,5
PHB-I-5Cu	0,3	-	5,0
PHB-I-7,5Cu	0,3	-	7,5
PHB-I-0Cu _{TBG}	0,3	20	-
PHB-I-0,5Cu _{TBG}	0,3	20	0,5
PHB-I-2,5Cu _{TBG}	0,3	20	2,5
PHB-I-5Cu _{TBG}	0,3	20	5,0
PHB-I-7,5Cu _{TBG}	0,3	20	7,5

Las muestras se procesaron por mezclado en fundido empleando una mezcladora Brabender Plastograph (Alemania) a 180 °C y 60 rpm, durante 15 min. Las muestras procesadas se trituraron y se utilizaron para la obtención de las películas por termocompresión empleando una prensa hidráulica (5 kg cm⁻², 195 °C y 15 min). El espesor se midió utilizando un calibre digital electrónico MAX-CAL (Fowler & NSK, Japón), tomando 5 mediciones en posiciones al azar para cada una de las muestras y promediando los valores obtenidos.

Caracterización de las películas

Para el estudio de la microestructura, las películas se crio-fracturaron empleando N₂ líquido, se montaron sobre tacos de aluminio y se metalizaron usando una metalizadora de plasma de Argón. La morfología de las secciones transversales se estudió mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), utilizando un microscopio LEO EVE 40 XVP con un detector de electrones secundario. Además, utilizando un Sistema de Microanálisis de Rayos X por Energía Dispersiva (EDS) Oxford X-Max 50, acoplado al microscopio, se realizó un microanálisis para obtener información sobre la composición química elemental de una pequeña área de las muestras estudiadas.

Las microfotografías de las superficies de las películas se obtuvieron mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), utilizando un microscopio láser focal Carl Zeiss (Alemania). Se fijó una muestra de 2 × 2 mm sobre una cinta adhesiva de doble faz y se escanearon diferentes áreas (10 × 10 μm² a 500 × 500 μm²) para determinar la rugosidad superficial media (Ra).

El estudio de las propiedades mecánicas se llevó a cabo a partir de ensayos de tracción en un equipo Instron Tensile Testing Instrument modelo 3369 (UK), utilizando una velocidad de 5 mm/min y una celda de carga de 1 kN. A partir de las curvas de tensión en función de la deformación, se calcularon la resistencia máxima a la tracción (σ_m), el módulo de Young (E) y el alargamiento a la rotura (ε_B), de acuerdo con la norma ASTM D882-9. Se ensayaron al menos 10 especímenes de cada una de las formulaciones estudiadas.

La permeabilidad al vapor de agua (WVP, siglas en inglés) se determinó empleando un permeador Permatran W3/33 (Mocon Inc., USA), de acuerdo al método estándar ASTM F-1249. Las medidas se

llevaron a cabo a 25 °C, empleando un área de exposición de 5 cm². Los ensayos se realizaron por duplicado.

La estabilidad térmica se evaluó mediante análisis termogravimétrico (TGA) utilizando una balanza termogravimétrica TA Instrument Discovery Series (USA). Las muestras (~10 mg) se calentaron de 25 a 350 °C a 10 °C min⁻¹, en atmósfera de nitrógeno (20 mL min⁻¹). Se registraron las curvas de porcentaje de masa en función de la temperatura y se obtuvieron la temperatura de onset (T_{d onset}) y la temperatura máxima de descomposición (T_{d máx}) a partir de la curva de la primera derivada (DTGA), de acuerdo con la metodología propuesta por Seoane et al. (2018).

Se realizaron ensayos de difusión en agar LB para evaluar la actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) y *Staphylococcus aureus* (Gram +). Las colonias de las bacterias obtenidas de un cultivo de 12 h se suspendieron en caldo LB y la concentración se ajustó a 10⁵ UFC mL⁻¹. Luego, se extendieron 200 μL de esta suspensión en placas de agar LB. Las muestras de películas (discos de 0,5 cm de diámetro) se desinfectaron con 1 mL de etanol al 70 % y se utilizaron para el ensayo de eficacia antibacteriana después de lavar tres veces con agua esterilizada. A continuación, las muestras se dejaron reposar sobre el medio inoculado y después de la incubación a 37 °C durante 24 h, se midió el halo de inhibición.

3. Resultados y Discusión

Microestructura

Las películas estudiadas presentaron secciones transversales homogéneas, observándose en las muestras que contenían sulfato de cobre la presencia de los cristales de la sal embebidos en la matriz polimérica. A modo de ejemplo, en la Figura 1 se muestran las microfotografías SEM y el espectro EDS de la sección transversal de la película PHB-I-0,5Cu_{TBG}. En las imágenes SEM (Figuras 1A y 1B) se observan los cristales de la sal de cobre que presentaron tamaños que oscilaron entre 25 y 50 μm.

La coloración rojiza de los cristales es un indicativo de que los mismos están conformados por una cantidad significativa de cobre (Figura 1A). De acuerdo con esta observación, el análisis elemental de los cristales por EDS mostró picos asociados al

cobre elemental (Cu), además de pequeñas trazas de oxígeno (O) que sugiere una oxidación parcial del

cobre y la presencia de azufre (S) asociado a iones sulfato (Figura 1C).

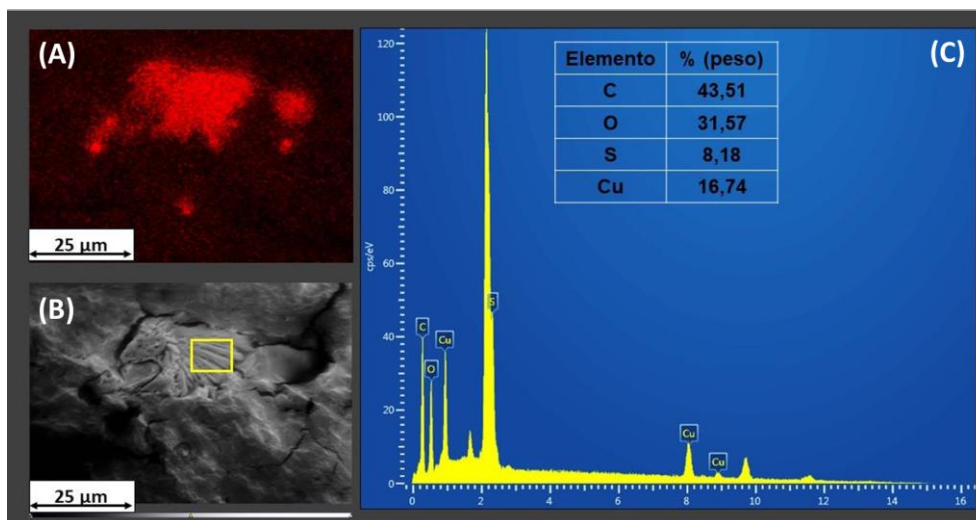


Figura 1. (A) y (B) Micrografías SEM de películas de PHB-I-0,5CuTBG. (C) Espectro EDS de la sección recuadrada en amarillo en la imagen (B).

La rugosidad es una propiedad importante de las películas poliméricas, especialmente para ciertas aplicaciones donde la adherencia de los materiales es relevante. La Figuras 2A y 2B corresponden a micrografías AFM en 3D de películas de PHB plastificadas con TBG, sin y con sulfato de cobre al 2,5 %. La rugosidad de las películas de PHB-I-0CuTBG resultó ser 45 ± 8 nm, un valor significativamente menor al informado por Chan et al. (2011) para películas a base de PHB. La incorporación de sulfato

de cobre generó un aumento notable en la rugosidad de las películas, siendo 105 ± 14 nm para las películas de PHB-I-2,5CuTBG. Este incremento podría atribuirse a la presencia de microcristales de sal en la superficie de las películas. De acuerdo con esta observación, un estudio similar demostró que la incorporación de cargas minerales aumentó notablemente la rugosidad media de los materiales basados en PHB (Toloue et al., 2019).

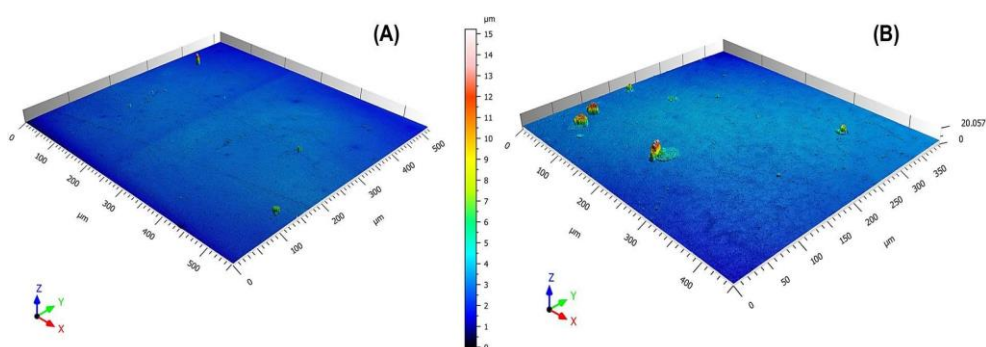


Figura 2. Imágenes AFM en 3D de películas de: (A) PHB-I-0Cu y (B) PHB-I-2,5CuTBG.

Degradación térmica

En Tabla 2 se muestran las temperaturas de onset (T_{donset}) y de máxima degradación térmica ($T_{dmáx}$) de todas las formulaciones estudiadas. En general, se observa que la presencia del plastificante (TBG) y la

incorporación de la sal de cobre provocaron una leve disminución de la temperatura de onset y de máxima degradación térmica. En el caso de la adición del TBG, la presencia de los grupos ésteres del plastificante podrían promover reacciones de

degradación del PHB y reducir la $T_{d_{onset}}$ y la $T_{d_{máx}}$ (Seoane et al., 2018). En general, cuando se incorporan compuestos inorgánicos a matrices poliméricas se evidencia una mejora de la estabilidad térmica de los materiales compuestos. El hecho de que la presencia de la sal de cobre no tuviera ese efecto sobre la estabilidad térmica de las formulaciones estudiadas podría atribuirse a una baja compatibilidad entre la matriz polimérica y las partículas minerales.

Tabla 2. Temperaturas de onset ($T_{d_{onset}}$) y de máxima degradación térmica ($T_{d_{máx}}$) de películas de PHB con TBG y sulfato de cobre (II) pentahidratado.

Formulación	$T_{d_{onset}}$ (°C)	$T_{d_{máx}}$ (°C)
PHB-I-0Cu	271,5	290,0
PHB-I-0,5Cu	270,2	284,9
PHB-I-2,5Cu	274,6	287,6
PHB-I-5Cu	270,3	286,0
PHB-I-7,5Cu	272,7	287,7
PHB-I-0Cu _{TBG}	275,1	286,9
PHB-I-0,5Cu _{TBG}	266,0	284,7
PHB-I-2,5Cu _{TBG}	267,8	283,8
PHB-I-5Cu _{TBG}	269,3	283,3
PHB-I-7,5Cu _{TBG}	267,2	283,9

En el caso de la adición del TBG, la presencia de los grupos ésteres del plastificante podrían promover reacciones de degradación del PHB y reducir la $T_{d_{onset}}$ y la $T_{d_{máx}}$ (Seoane et al., 2018). En general, cuando se incorporan compuestos inorgánicos a matrices poliméricas se evidencia una mejora de la estabilidad térmica de los materiales compuestos. El hecho de que la presencia de la sal de cobre no tuviera ese efecto sobre la estabilidad térmica de las formulaciones estudiadas podría atribuirse a una baja compatibilidad entre la matriz polimérica y las partículas minerales.

Propiedades mecánicas

La incorporación de partículas minerales a matrices biopoliméricas suele ser una estrategia para superar ciertas limitaciones como la baja rigidez y resistencia mecánica. Sin embargo, los efectos sobre las propiedades finales de los materiales compuestos dependen de varios factores tales como el tamaño de las partículas, la concentración del relleno y la adhesión interfacial entre partículas y matriz (Ren et al., 2009). La Figura 3 muestra el efecto de la adición de las diferentes concentraciones de sulfato de cobre estudiadas sobre las propiedades mecánicas de las películas de PHB sin plastificar y plastificadas

con TBG. Un aumento en la concentración de la sal de cobre condujo a una disminución de la elongación a la rotura y de la resistencia mecánica de las películas (Figura 3A y 3B). Estos cambios podrían deberse principalmente a las dimensiones micrométricas de las partículas añadidas (entre 25 y 50 μm , aproximadamente). La máxima resistencia a la tracción aumenta cuando disminuye el área superficial de las partículas, como en el caso de la incorporación de nanopartículas que proporcionan una distribución eficiente de la tensión en la matriz polimérica (Fu et al., 2008; Mittal, 2009). Los resultados obtenidos sugieren que, para mejorar las propiedades mecánicas de las películas de PHB mediante la adición de sulfato de cobre (II), sería necesario realizar una reducción del tamaño de las partículas antes del procesamiento térmico. Por lo que, una molienda de la sal y un posterior tamizado para obtener un material de menor tamaño podría ser una posible solución.

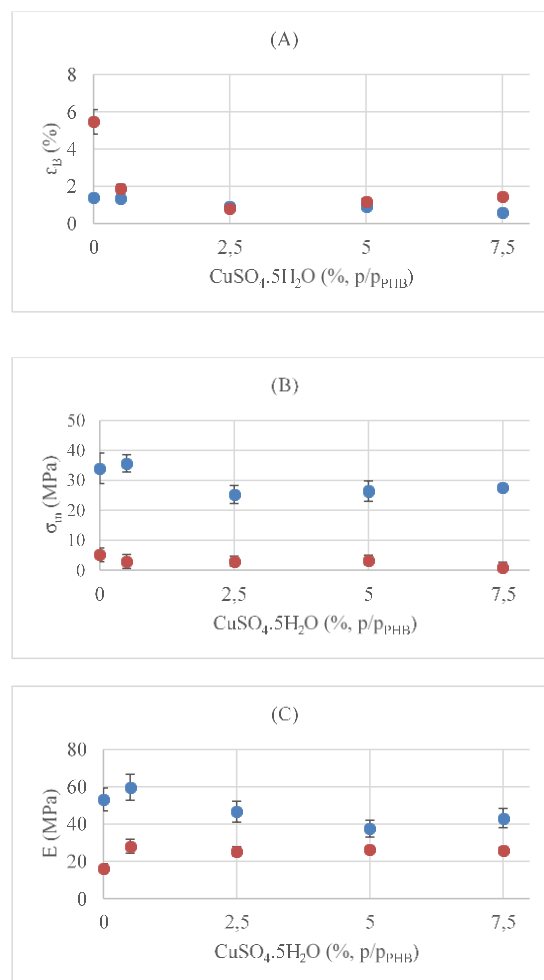


Figura 3. Propiedades mecánicas de películas de PHB con diferentes concentraciones de sulfato de cobre (II): (A) Deformación a la rotura (ϵ_B), (B) resistencia mecánica (σ_m) y (C) módulo de Young (E). Símbolos: (●) sin TBG, (●) con TBG.

La Figura 3C muestra que no hubo cambios importantes en los valores del módulo de Young con la adición de partículas de sulfato de cobre (II) hasta un 7,5 %. Tanto para las películas plastificadas con TBG como las que no tenían TBG, en el rango de concentraciones de sal de cobre estudiado, solo se observó una ligera disminución a elevadas concentraciones de sal. De acuerdo a Fu et al. (2008), la concentración de las partículas tiene baja influencia sobre la rigidez del material, como así también sobre la adhesión interfacial de los rellenos minerales/matriz polimérica, cuando se utilizan partículas de tamaño micrométrico de forma irregular como es el caso de los cristales de la sal de cobre empleados en este trabajo.

Permeabilidad al vapor de agua

Las propiedades de barrera de las películas de PHB dependen de la presencia de aditivos, de los compuestos empleados y de su concentración. En la Figura 4 se muestra el efecto del plastificante y de las diferentes concentraciones estudiadas de la sal de cobre sobre la permeabilidad al vapor de agua de las películas de PHB. Las películas sin plastificante (PHB-I-OCu) presentaron los valores más bajos de WVP, la incorporación de 20 % de este aditivo permitió incrementar notablemente esta propiedad de barrera

(PHB-I-OCu_{TBG}). Esto podría atribuirse al incremento del volumen libre que favorecería la difusión de las moléculas de vapor de agua y a la miscibilidad del TBG en la matriz de PHB (Seoane et al., 2018). Por otra parte, según Requena et al. (2016) la presencia de regiones plastificadas más polares facilita la solubilidad del permeante, incrementando la WVP. La adición de la menor concentración de sulfato de cobre (II) ensayada (0,5 %) incrementó la WVP lo que podría deberse a que esta sal se encuentra hidratada, favoreciendo el aumento de esta propiedad de barrera. Sin embargo, la incorporación de las concentraciones más elevadas de la sal de cobre (2,5 - 7,5 %) redujo notablemente la WVP, debido seguramente al incremento de la tortuosidad inducido por la presencia de dominios (fase cristalina) impermeables dentro de la matriz (Follain et al., 2013). Además, Requena et al. (2016) mencionan que la disminución de la WVP podría atribuirse a la reorganización de los componentes de la matriz, como una cristalización secundaria o una posible separación de fases.

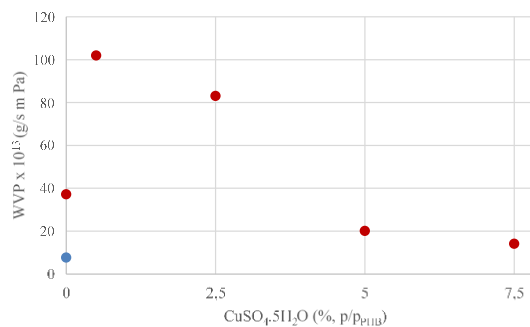


Figura 4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de PHB con diferentes concentraciones de sulfato de cobre (II). Símbolos: (●) sin TBG, (●) con TBG.

Capacidad antibacteriana

En la Figura 5 se muestra el halo de inhibición de las películas de PHB para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. La capacidad de las películas para inhibir el desarrollo microbiano está asociada con la difusión y liberación de la sustancia activa desde la matriz al medio. Por lo tanto, las cadenas de polímero deben moverse cooperativamente y así permitir el transporte del agente antimicrobiano. Todas las muestras que contenían sulfato de cobre (II) tuvieron capacidad para inhibir el desarrollo de *S. aureus* (Figura 5A), independientemente de la presencia del plastificante. Como era de esperar, cuanto mayor sea la concentración del agente antimicrobiano mayor será el halo de inhibición. En las películas de PHB plastificadas, el halo de inhibición bacteriana frente a *S. aureus* fue superior al correspondiente a las no plastificadas, comparando muestras con la misma concentración de sulfato de cobre (II). Esto se puede atribuir a que la reducción de las fuerzas intermoleculares por parte del plastificante, que mejora la movilidad de las cadenas poliméricas, disminuye el grado de cristalización y aumenta el coeficiente de difusión (Ishizawa y Nakamatsu, 2002; Quispe et al., 2021). En cuanto al efecto de las películas de PHB cargadas con sulfato de cobre (II) sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*, la concentración mínima de sal que inhibe el desarrollo bacteriano fue de 5 % para las películas no plastificadas (Figura 5B). En el caso de las películas de PHB plastificadas, esta concentración mínima fue de 2,5 %, remarcando nuevamente el efecto del plastificante sobre la difusión del agente antimicrobiano. Existe una clara diferencia en el efecto del sulfato de cobre (II) sobre la inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Cuando comparamos los diámetros de los halos de inhibición bacteriana para ambos tipos de bacterias a la misma

concentración de sal, el halo de *S. aureus* (Gram +, Figura 5A) fue mayor que el correspondiente a *P. aeruginosa* (Gram -, Figura 5B).

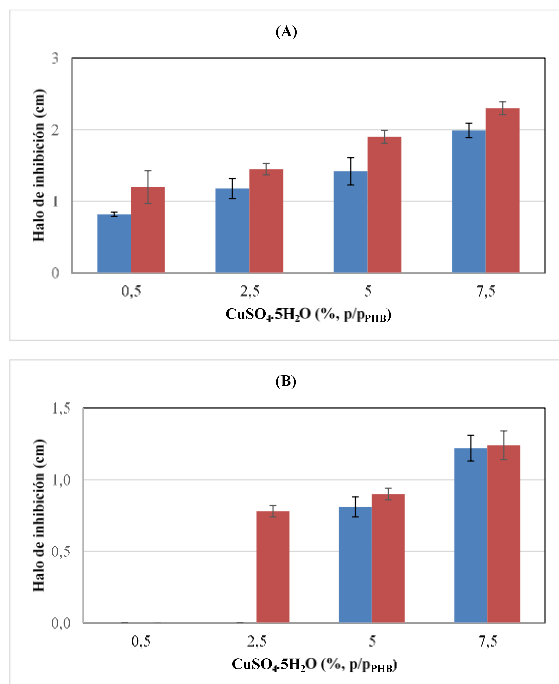


Figura 5. Halo de inhibición bacteriana de películas de PHB con diferentes concentraciones de sulfato de cobre (II) pentahidratado frente a: (A) *S. aureus* (gram +) y (B) *P. aeruginosa* (gram -). Símbolos: (■) sin TBG, (■) con TBG.

Las diferencias están asociadas principalmente a la estructura de la pared celular de ambas bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano y no tienen una membrana lipídica externa. Por otro lado, las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglicano, intercalada entre una membrana lipídica externa y la membrana plasmática, lo que da como resultado una estructura de bicapa lipídica. Esta estructura actúa como un tamiz molecular que permite la difusión de moléculas relativamente pequeñas, generando cierta protección contra varios agentes antibacterianos (Tafur et al., 2008).

4. Conclusiones

Se demostró que es factible obtener películas de PHB con capacidad antibacteriana a partir de la incorporación de sulfato de cobre (II). Si bien los materiales fueron capaces de inhibir el desarrollo de bacterias Gram positivas como el *S. aureus* y de

bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*, se evidenciaron mejores resultados para el control de desarrollo de bacterias Gram positivas debido a diferencias en la pared celular de ambos tipos microorganismos. A pesar de que la incorporación de la sal de cobre permite otorgar capacidad antibacteriana a las películas de PHB, se obtuvo una disminución en la ductilidad y resistencia de las mismas debido al tamaño micrométrico de los cristales empleados. Para minimizar este efecto, sería conveniente reducir el tamaño de las partículas antes de incorporarlas a la matriz polimérica. Por otro lado, la presencia del agente antibacteriano incrementó la WVP cuando se agregaron bajas concentraciones, pero al incorporar concentraciones más elevadas, los valores de WVP disminuyeron por el incremento de la tortuosidad del pasaje de las moléculas de vapor de agua a través de la matriz. Las películas de PHB con propiedades antibacterianas podrían aplicarse en diversos campos como envasado de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos como así también para dispositivos biomédicos.

5. Agradecimientos

Agradecemos a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Sur (UNS) por su apoyo financiero.

6. Aclaración

Se deja constancia que parte de los resultados publicados en este trabajo han sido publicados previamente en el artículo "Films of Poly(Hydroxybutyrate) (PHB) and Copper with Antibacterial Activity" *Polymers* 2023, 15(13), 2907.

7. Referencias

- Arancibia, M. y otros tres autores, (2014). Control antifúngico en plátano (*Musa acuminata*) mediante películas activas, Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 9, 141-145.
- Castañeta, G. y otros tres autores, (2020). Microplásticos: un contaminante que crece en todas las esferas ambientales, sus características y posibles riesgos para la salud pública por exposición. *Revista Boliviana de Química* 37(3), 142-157.

- Chan, R. y otros cinco autores, (2011). Manipulation of Polyhydroxybutyrate Properties through Blending with Ethyl-Cellulose for a Composite Biomaterial. *International Journal of Polymer Science* 651549, 1-8.
- Follain, N y otros cinco autores, (2013). Water transport properties of bio-nanocomposites reinforced by *Luffa cylindrica* cellulose nanocrystals. *Journal of Membrane Science* 427, 218-229.
- Fu, S.Y y otros tres autores, (2008). Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion, and particle loading on mechanical properties of particulate-polymer composites. *Composites Part B: Engineering* 39(6), 933-961.
- Grass, G. y otros dos autores, (2011). Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1541-1547.
- Ishizawa, C.; Nakamatsu, J. (2002). Matrices Poliméricas para Liberación Controlada de Sustancias Activas. *Revista de Química* 16(1-2), 13-23.
- Miteluț, A.C. y otros cuatro autores, (2019). Soil ecotoxicity assessment after biodegradation of some polymeric materials. *Scientific Papers. Series A. Agronomy* 61, 538-543.
- Mittal, V. (2009). Polymer Layered Silicate Nanocomposites: A Review. *Materials* 2(3), 992-1057.
- Montes, M.L.I. y otros tres autores, (2016). Mezclas poli(3-hidroxibutirato)/ácido poliláctico: efecto del agregado de un plastificante natural. *Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales 16 SAM CONAMET*.
- Prado, J.V. y otros dos autores, (2012). Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Revista Médica Chilena* 140, 1325-1332.
- Quispe, M.M. y otros cuatro autores, (2021). Glycerol-based additives of poly(3-hydroxybutyrate) films. *Polymer Testing* 93, 107005.
- Ren, J. y otros tres autores, (2009). Preparation, characterization and properties of binary and ternary blends with thermoplastic starch, poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Carbohydrate Polymers* 77(3), 576-582.
- Requena, R. y otros tres autores, (2016). Effect of plasticizers on thermal and physical properties of compression-moulded poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxy-valerate)] films. *Polymer Testing* 56, 45-53.
- Seoane, I.T. y otros dos autores, (2018). Effect of two different plasticizers on the properties of poly(3-hydroxybutyrate) binary and ternary blends. *Journal of Applied Polymer Science* 135(12), 1-12.
- Tafur, J.D. y otros dos autores, (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infections* 12, 227-232.
- Toloue, E.B. y otros tres autores, (2019). Potential of an electrospun composite scaffold of poly(3-hydroxybutyrate)-chitosan/alumina nanowires in bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* 99, 1075-1091.
- Vincent, M. y otros tres autores, (2018). Contact killing and antimicrobial properties of copper. *Journal of Applied Microbiology* 124(5), 1032-1046.



Efecto de la incorporación de rellenos minerales sobre las propiedades ópticas de films de polietileno

Héctor Alejandro Anzorena^{1,2}, Cecilia Inés Paulo³, Andrés Eduardo Ciolino^{4,5}, María Gabriela Passaretti⁵, Marcelo Armando Villar^{4,5}, Olivia Valeria López^{4,6}, Mario Daniel Ninago^{1,2}

1. Instituto de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (ICAI-CONICET). Bernardo de Irigoyen 375, 5600, San Rafael -Argentina.
2. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria. Bernardo de Irigoyen 375, 5600, San Rafael -Argentina.
3. Centro de Investigaciones en Física e Ingeniería del Centro, CIFICEN (UNCPBA-CONICET), Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Av. del Valle 5737, (7400) Olavarría, Buenos Aires, Argentina.
4. Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET), Camino La Carrindanga Km 7, Bahía Blanca 8000, Argentina.
5. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, Bahía Blanca 8000, Argentina.
6. Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Av. Alem 1253, Bahía Blanca 8000, Argentina.

*E-mail: mninago@fcai.uncu.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Films de polietileno
Rellenos minerales
Propiedades ópticas

RESUMEN

En este trabajo se obtuvieron films de polietileno de alta densidad reforzados con partículas minerales mediante la técnica de mezclado en fundido y posterior termo-compresión. Como rellenos minerales se emplearon arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC). AI es un silicato de la familia de las micas, mientras que el MC es un aluminosilicato activado obtenido por calcinación del caolín. Se realizó la caracterización estructural de partículas de AI y MC mediante Difracción Laser (DL), Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Espectroscopía Infrarroja (FTIR) y Difracción de Rayos X (XRD). Por DL se observó una distribución de partículas bimodal para AI y unimodal para MC. Se prepararon compuestos con dos concentraciones de relleno (1 y 5 % p/p de MC y AI) en una matriz de polietileno de alta densidad (HDPE). Los materiales obtenidos resultaron homogéneos, translúcidos y fáciles de manipular. Comparados con los valores obtenidos para la matriz de HDPE, la presencia de AI y MC en las películas obtenidas incrementó tanto la capacidad de barrera a la radiación como la opacidad sin comprometer significativamente su transparencia.

Effect of mineral fillers incorporation on optical properties of polyethylene films

KEYWORDS

Polyethylene films
Mineral fillers
Optical properties

ABSTRACT

In this work, high-density polyethylene films reinforced with mineral particles were obtained by using melt-mixing and thermo-compression. Illitic clay (IC) and metakaolin (MK) were used as mineral fillers. (IC) is a silicate of the mica family, whereas MK is an activated aluminosilicate obtained by the calcination of kaolin. A structural characterization of AI and MK particles were performed by Laser Diffraction (LD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transformed Infrared (FTIR) and X-Ray Diffraction (XRD). LD test showed a unimodal particle distribution for MK and bimodal particle distribution for AI. Both fillers were incorporated to a high density polyethylene (HDPE) matrix at two concentrations (1 and 5 % w/w). Obtained composites resulted homogeneous, translucent, and easy to handle. The presence if IC and MK particles acted as physical barrier against both UV and visible radiation, by increasing UV barrier capacity and opacity without compromising their transparency.

1. Introducción

El interés industrial en compuestos de matriz polimérica con cargas minerales ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido a la versatilidad de usos y aplicaciones que presentan este tipo de materiales (Dubois, 2002; Gopakumar, 2002). Actualmente, los materiales más utilizados como carga en los compuestos poliméricos y de mayor interés comercial son los rellenos de tipo mineral. Además, las películas o films de polietileno (PE) son los materiales más comúnmente empleados como mantos protectores de suelos (mulching agrícola). Por otra parte, la obtención de minerales es una de las actividades mineras con mayor desarrollo en la zona centro de la provincia de Buenos Aires, donde cerca de 13 M tn de material es triturado, empleando a más de 2.500 personas (Minería Metalífera y Rocas de Aplicación, 2016). Por lo tanto, el potencial geológico argentino ofrece reservas minerales de bajo costo que pueden ser claves para el desarrollo de nuevos materiales.

El metacaolín (MC) es un aluminosilicato activado y ampliamente utilizado en la formulación de cementos, que se obtiene por calcinación térmica de caolín. Este proceso, produce una transformación de su estructura cristalina, que ayuda a mejorar las propiedades mecánicas y la durabilidad final del hormigón (Sujavanich, 2017; da Silva Andrade, 2018). La arcilla illítica (AI) es un silicato de la familia de las micas, formado por una capa octaédrica de aluminio intercalada entre dos capas de sílice (Zhang, 2016). Se usa comúnmente en la industria cosmética como un aditivo en máscaras faciales, champú y jabones así como también en la formulación de materiales compuestos (Jurgelanea, 2017).

Por otra parte, el poli(etileno), PE, es uno de los polímeros “commodities” más empleado en la fabricación de envases y productos. Su amplia versatilidad proviene de su buena resistencia química, inocuidad, baja permeabilidad al vapor de agua, excelente capacidad como aislante eléctrico y ligereza de peso. Dependiendo de las condiciones de polimerización, se pueden obtener PEs con diferente grado y tipo de ramificaciones, lo que da lugar a materiales de diferente densidad y cristalinidad (Horst, 2012).

Aunque el PE y sus diferentes variedades han sido extensamente estudiadas, la búsqueda de nuevos

usos y aplicaciones es permanente. En las últimas décadas se han empleado distintos métodos de modificación para obtener nanocompuestos de polietileno/montmorillonita y polietileno/bentonita mediante mezclado con materiales inorgánicos (Horst, 2012; Ninago, 2017). Sin embargo, el empleo de AI y de MC como relleno mineral en la formulación de nanocompuestos de PE, es una alternativa escasamente estudiada.

El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar materiales compuestos a base de polietileno de alta densidad (HDPE) y partículas minerales de MC y AI. Además, se analizó la influencia de la carga sobre la estructura y las propiedades ópticas de la matriz del HDPE estudiado.

2. Materiales y métodos

Se empleó un polietileno comercial de alta densidad (HDPE, NG7000, Dow-Polipur S.A.) con un índice de fluidez de 11 a 190 °C/21,6 Kg ASTM D1238 y dos tipos de partículas minerales: arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC) provenientes de la ciudad de Olavarría (Buenos Aires, Argentina).

La morfología de las partículas se estudió mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), empleando un microscopio electrónico JEOL JSM-35 CF, con detector de electrones secundarios a 10 kV. Las muestras fueron previamente dispersadas, empleando un flujo de aire, sobre una cinta adhesiva conductora de aluminio (3M®), y recubiertas con una capa de oro mediante sputtering. Además, se complementó la caracterización por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en un espectrómetro Nicolet 520 FT-IR en el rango 400-4000 cm⁻¹.

La identificación de la estructura cristalina de las partículas fue estudiada por Difracción de Rayos X (XRD). Los difractogramas se obtuvieron usando un difractómetro Philips PW1710, provisto de un tubo y ánodo de cobre, operando a 45 KV, 30 mA y 2θ variando desde 5 hasta 40°.

La distribución de tamaño de partículas se determinó a través de ensayos de Difracción Laser (LD), empleando un equipo Horiba Partica LA-950. Para la preparación de los compuestos se procesaron en fundido mezclas de HPDE con AI y MC (0, 1 y 5 % p/p) empleando una mezcladora Atlas Laboratory a 160 °C y 40 rpm durante 15 min. Los materiales

obtenidos se denominaron HDPE-#AI y HDPE-#MC, donde el símbolo # representa la cantidad de partículas de relleno incorporadas (0, 1 y 5 % p/p). Las películas se obtuvieron mediante termo-compresión en una prensa hidráulica a 160 °C y 180 kg cm⁻² durante 6 minutos. Se registraron 10 medidas del espesor de cada película en localizaciones aleatorias mediante el empleo de un medidor digital de espesores (CM-882), y se calculó su valor promedio.

La distribución de partículas en la matriz de HDPE se estudió mediante SEM, evaluándose además la homogeneidad y apariencia de los materiales obtenidos. Se empleó un microscopio electrónico JEOL JSM-35 CF, con detector de electrones secundarios. Las películas fueron crio-fracturadas y recubiertas con una fina capa de oro mediante la técnica de sputtering.

Se registraron los parámetros de cromaticidad de las películas (L^* , a^* , y b^*) de acuerdo a la escala CieLab empleando un colorímetro Hunterlab UltraScan XE, realizando las mediciones en al menos diez posiciones aleatorias. Los parámetros de color varían desde $L^*=0$ (negro) a $L^*=100$ (blanco), $-a^*$ (verde) a $+a^*$ (rojo), y $-b^*$ (azul) a $+b^*$ (amarillo). A partir de los datos de cromaticidad se calcularon el ángulo de Hue (H^*) y Croma (C^*) usando las ecuaciones (1) y (2):

$$H^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

El valor del ángulo de Hue (H^*) se define como el ángulo formado con el eje a^* , asignando para 0° color rojo/magenta, 90° para amarillo, 180° para verde y 270° para azul o púrpura, ángulos comprendidos entre los valores mencionados darán colores intermedios.

El parámetro Croma (C^*) representa la longitud de la hipotenusa formada entre el origen (0,0) y el punto (a^* , b^*), siendo una medida directa de la intensidad o grado de saturación del color.

La capacidad de barrera a la radiación UV, la opacidad y la transparencia de las películas fue estudiada por Espectroscopia UV-Vis. Se registraron los espectros de transmisión de las películas en el rango UV-Vis, haciendo uso de un

espectrofotómetro DR6000 (Hach, EEUU). Para esto se cortaron probetas rectangulares de 10 mm de ancho por 30 mm de largo, y se analizaron en una celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico, registrando el espectro desde los 200 nm hasta los 800nm.

A partir de estos espectros se cuantificó la capacidad de barrera a la radiación mediante el cálculo de los factores: barrera al UV, opacidad, índice τ_{PAR} y transparencia. De dichos factores los últimos tres corresponden al rango de la radiación del espectro visible (400 a 700nm), mientras que para el cálculo de barrera UV, se trabajó en el rango ultravioleta, el cual comprende de 300 a 380nm.

Los valores de índice PAR y barrera UV se calcularon de acuerdo a la norma ISO 9050:2012(E), haciendo uso de las ecuaciones (3 y 4, respectivamente) reportadas en trabajos previos del grupo (Passaretti et al. 2022):

$$\tau_{PAR} = \frac{\sum_{400}^{700} S_{\lambda} \cdot \Delta_{\lambda} \cdot \tau(\lambda)}{\sum_{400}^{700} S_{\lambda} \cdot \Delta_{\lambda}} \quad (3)$$

$$\tau_{UV} = \frac{\sum_{300}^{380} S_{\lambda} \cdot \Delta_{\lambda} \cdot \tau(\lambda)}{\sum_{300}^{380} S_{\lambda} \cdot \Delta_{\lambda}} \quad (4)$$

Donde S_{λ} es la distribución espectral relativa de la radiación en el intervalo objetivo, $\tau(\lambda)$ es el espectro de transmitancia de la película analizada, y, Δ_{λ} son los intervalos de longitud de onda definidos por la norma para la integración.

La opacidad de las películas se calculó a partir del área bajo la curva registrada entre 400 y 700 nm, de acuerdo al método reportado por Piermaría et al. (2011), mientras que la transparencia se evaluó a 600 nm, teniendo en cuenta el espesor de las películas. Las muestras se analizaron por triplicado.

3. Resultados y Discusión

En la figura 1 se observan las micrografías SEM correspondientes a las partículas de AI (a) y MC (b). En las mismas se puede observar que la AI presenta una estructura formada por agregados pseudoesféricos con cavidades, mientras que el MC presentó una estructura de tipo laminar con agregados de menor tamaño.

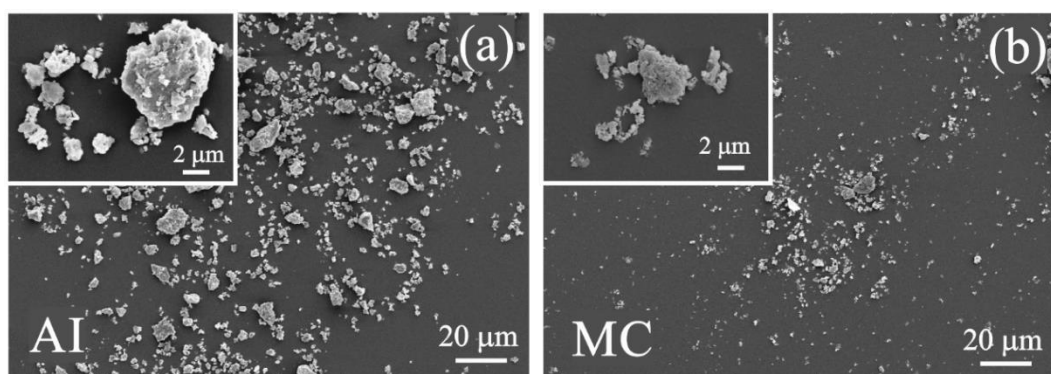


Figura 1. Micrográficas SEM de arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC).

Los espectros FTIR (figura 2) obtenidos para los rellenos muestran las señales características de estas arcillas. Para AI (línea roja) se observan una señal a 3440 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de los enlaces O-H del agua y de los grupos silanol (Si-OH). A 1000 cm^{-1} se evidencia una amplia banda relacionada con el estiramiento de los enlaces Si-O; y los doblamientos de los enlaces O-Si-O se evidencian por la presencia de picos a 530 y 470 cm^{-1} (Ozdes, et al. 2011).

Respecto al MC, se identificaron las bandas típicas del mineral a 3420 cm^{-1} (deformación -OH), 1612 cm^{-1} (vibración del enlace del agua absorbida en la superficie o atrapada en las cavidades), 1097 cm^{-1} (vibración de los enlaces Si-OSi y Si-O-Al) y 685 cm^{-1} (vibración simétrica del enlace Si-O) (Belmokhtar, 2017, Sore et al., 2016, Ozer y Soyer-Uzun., 2015).

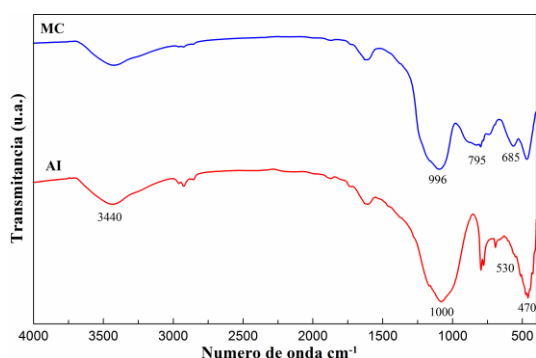


Figura 2. Espectros FTIR de partículas de arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC).

La distribución de tamaño de las partículas mediante difracción laser se observa en la Figura 3: Para MC, las partículas presentaron una única población de

con un tamaño promedio de $\sim 1,0\text{ }\mu\text{m}$. Como puede observarse, los valores obtenidos por DL resultaron menores a los observados por SEM. Esto podría estar relacionado con la mejor dispersión de las partículas durante el ensayo en flujo de aire en el equipo de difracción. Por otra parte, la AI mostró una distribución bimodal con tamaños promedio de $4\text{ }\mu\text{m}$ y $8,7\text{ }\mu\text{m}$. Cabe destacar que, en esta muestra, la proporción de partículas de menor tamaño representó más del 50 % del total.

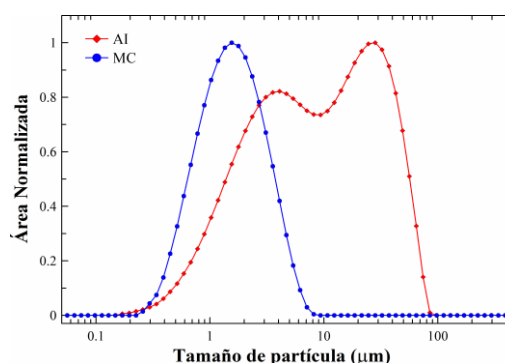


Figura 3. Distribución de tamaño determinada por DL de arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC).

Para complementar la caracterización estructural de las partículas minerales estudiadas se llevó a cabo un estudio cristalográfico mediante XRD. La Figura 4 presenta los difractogramas correspondientes a AI y MC. En el caso de AI, se pueden apreciar picos característicos ubicados en ángulos $2\theta = 19,7^\circ$ y $34,9^\circ$ que pueden atribuirse a las reflexiones características de la esmectita e illita, respectivamente (Wang, 2017).

Por otra parte, MC presentó señales de difracción en el rango 2θ entre $18,0^\circ$ y $38,0^\circ$, que es característico

de fases amorfas que se encuentran presentes en metacaolines (Kenne Diffo, 2015). Además, a partir del espectro se detectaron impurezas de mica, cuarzo y caolinita.

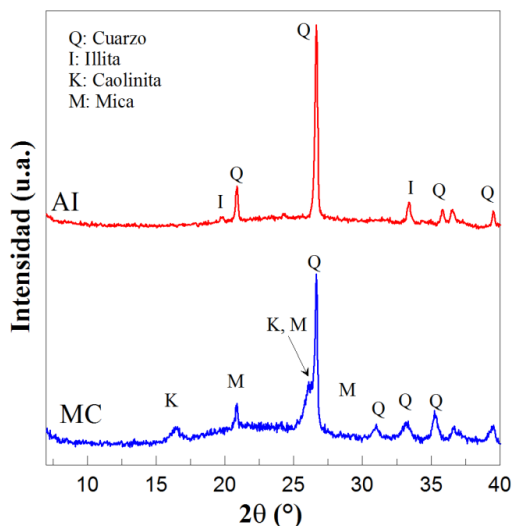


Figura 4. Difractogramas XRD de la arcilla illítica (AI) y del metacaolín (MC).

No sólo el tipo de relleno y porcentaje incorporado definen las propiedades de los materiales reforzados; también es de suma importancia evaluar la dispersión de los rellenos y la adhesión en la interface relleno-matriz. Las películas de los compuestos a base de HDPE con AI y MC resultaron homogéneas, translúcidas, flexibles y de color amarillo-rojizo y gris-azulado, respectivamente.

En la Figura 5 se presentan las micrografías SEM de la superficie de fractura de las películas obtenidas. En ambos compuestos se observó una buena distribución de las partículas en la matriz. En este aspecto, Suhaida et al. (2011) reportaron que la forma irregular de las partículas provee un área superficial suficiente que permite que el relleno se disperse bien y se fije de manera adecuada a la matriz. En los compuestos HDPE-5AI, si bien se evidenció una buena dispersión de las partículas, se detectó la presencia de micro-aglomerados de AI (Figura 5a). La formación de aglomerados podría relacionarse con el carácter hidrofílico de las partículas minerales en contraste con la naturaleza hidrofóbica de la matriz sintética. La ocurrencia de estos aglomerados conduce al desprendimiento de las láminas que conforman la AI, formándose así pequeños poros e intersticios que conducen a una baja interacción entre la matriz y el relleno mineral

(Figura 5b). En este contexto, una débil interacción en la interfase resulta en materiales con menor capacidad de barrera debido a que se crean caminos preferenciales entre el relleno y la matriz, como también un menor esfuerzo de tensión provocado por la pobre capacidad de transferirse las tensiones en la interfase. (Fendler et al., 2007; Kaczmarek et al., 2019).

Por otra parte, los compuestos con 5 % p/p de MC presentaron una superficie de fractura con mayores irregularidades (Figura 5c) y la ausencia de aglomerados. Además, se observó una mejor adhesión entre la interfase partículas-HDPE, (Figura 5d). Esta interfase continua es típica de partículas que se encuentran bien adheridas a una matriz polimérica, donde las fuerzas de adhesión son mayores a las fuerzas de fractura (Castillo, 2013).

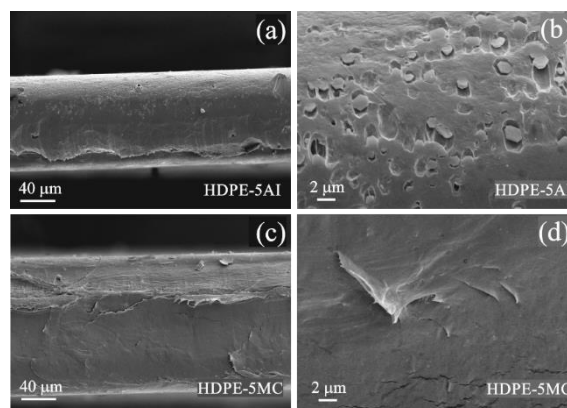


Figura 5. Micrografías SEM de compuestos con 5% de arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC).

El efecto de la incorporación de partículas minerales sobre las propiedades ópticas de las películas de HDPE se muestra en la Figura 6. Los valores de luminosidad de la matriz de HDPE se vieron ligeramente reducidos en un 10 y 5 %, para las muestras con 5 % p/p de AI y MC, respectivamente (Figura 6a).

Con respecto a los parámetros de cromaticidad, el efecto más notorio se evidenció en los valores de *b*. En este sentido, las muestras con 1 y 5 % p/p de AI presentaron incrementos en los valores de *b* en 5 y 15 veces, respectivamente. Por su parte, las muestras con 1 y 5 % de MC mostraron un incremento de 2,5 y 5 veces respecto a los valores obtenidos para la matriz de HDPE (Figura 6b). Así, la incorporación de las partículas favoreció el

desarrollo de materiales con una tonalidad hacia la gama del amarillo-rojizo para los compuestos con AI y gris-azulado en los compuestos con MC, siendo

este resultado coherente con la apariencia final de las películas obtenidas por termocompresión.

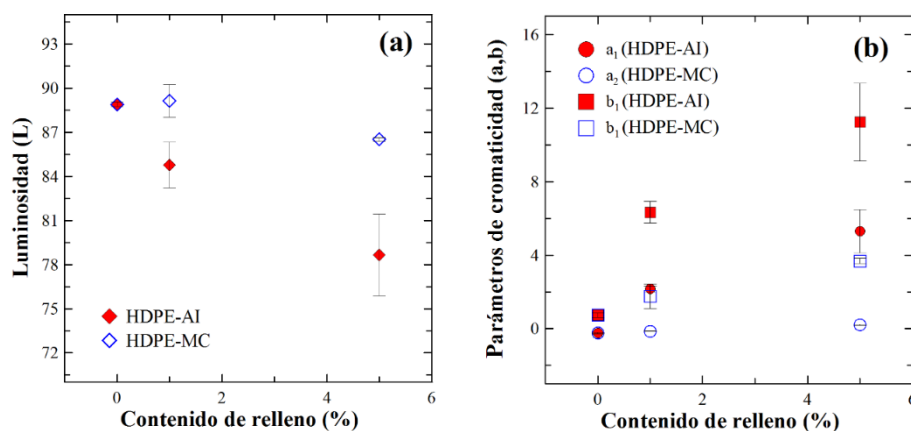


Figura 6. Parámetros de color de películas de polietileno de alta densidad (HDPE) y compuestos de HDPE con 1 y 5 % p/p de arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC): (a) Luminosidad, L . (b) Parámetros de cromaticidad, a y b ,

Los índices de color (H^*) e intensidad del color (C^*) se observan en la Tabla 1, en la que se evidencian los cambios producidos por el agregado de los rellenos. Al agregar MC se produce una leve reducción de la luminosidad (cae aproximadamente en un 10%) y la coloración se torna hacia la zona de los amarillos, que se observa por el ángulo de $86,70^\circ$ con una intensidad de color de 3,66. Para el agregado de AI, la luminosidad se reduce hasta en un 20% y la coloración se desplaza más hacia la zona de los rojos, marcada por el ángulo de $64,83^\circ$ con una intensidad de 12,43. El cambio en la intensidad de color (comparado con la película base, con una intensidad de 0,77) resultó mucho más elevado para AI que denotó con una coloración rojiza en las películas.

Tabla 1. Color (H^*) e intensidad de color (C^*) de las películas de HDPE, HDPE-#AI y HDPE-#MC.

Muestra	H^*	C^*
HDPE	$-72,73 \pm 1,16$	$0,77 \pm 0,11$
HDPE-1AI	$71,12 \pm 1,31$	$6,69 \pm 0,59$
HDPE-5AI	$64,83 \pm 0,88$	$12,43 \pm 2,41$
HDPE-1MC	$-87,29 \pm 2,13$	$2,08 \pm 0,33$
HDPE-5MC	$86,70 \pm 0,34$	$3,66 \pm 0,15$

La incorporación de relleno a las películas de HDPE tiene el fin de inducir nuevas propiedades o mejorar las ya existentes en estos materiales, como lo es la capacidad de barrera a la radiación. La espectroscopia de absorción UV-Visible es el método más efectivo para medir la modificación en la capacidad de bloqueo en este rango, ya que el paso

de luz a través de un medio dado modifica la distribución espectral de la radiación pasante (Passaretti et al., 2022). En este sentido, todos los materiales estudiados presentaron dicho pico localizado en esa región, confirmando así su capacidad de absorción de radiación UV (Figura 7). Así, la opacidad y la absorción a la radiación UV se incrementó en los compuestos de manera creciente con la concentración de partículas. Para un 5 % p/p de AI y MC, se observó un incremento en la absorción de 1,4 veces respecto del valor obtenido para la matriz de HDPE. Este efecto puede atribuirse a que la presencia de las partículas obstaculiza el pasaje de la radiación visible y UV a través de la matriz de HDPE. Resultados similares se han reportado en la literatura para compuestos poliméricos reforzados con partículas minerales (Mbey, 2012; Ninago, 2017). Por otra parte, la determinación de la opacidad en materiales compuestos que pueden ser usados como envases o mantos protectores de suelos puede considerarse como un parámetro relevante debido a que esta propiedad influye en la aceptabilidad del producto envasado por parte del consumidor, o en el desempeño final que presenta cuando es aplicado en sobre terrenos a cultivar.

En la Figura 7 se muestran los valores de opacidad para los compuestos procesados con 1 y 5 % p/p de relleno, respecto de los valores obtenidos para la matriz de HDPE. Las películas del material compuesto HDPE-5AI presentaron un incremento en la opacidad de un 38 %, comparado con el valor

obtenido en la matriz de HDPE (Figura 7a); mientras que para el material compuesto HDPE-5MC el

aumento en la opacidad fue de tan sólo 18 % (Figura 7b).

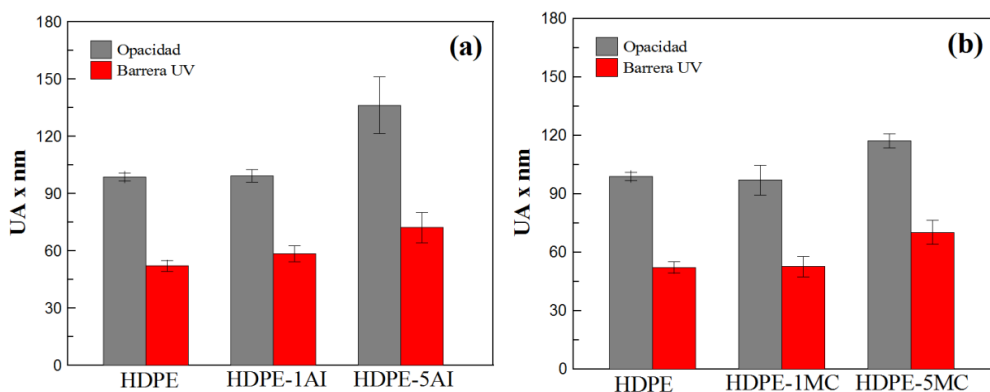


Figura 7. Capacidad de barrera a la radiación UV y opacidad de películas de polietileno de alta densidad (HDPE) y compuestos de HDPE con 1 y 5 % p/p de arcilla illítica (AI) y metacaolín (MC)

Por otra parte, la incorporación de 5 % p/p de AI dio como resultado una disminución de la transparencia debido a un aumento en la absorción a 600 nm. Sin embargo, para los otros materiales estudiados no se observaron cambios significativos (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades de barrera a la radiación de las distintas películas.

Muestra	τ_{PAR} [%]	Transparencia
HDPE	55,0 ± 8,0	1,63 ± 0,04
HDPE-1AI	50,0 ± 7,0	1,65 ± 0,07
HDPE-5AI	42,0 ± 13,0	2,41 ± 0,07
HDPE-1MC	52,0 ± 4,0	1,37 ± 0,16
HDPE-5MC	51,0 ± 0,12	1,76 ± 0,17

Además, el índice τ_{PAR} calculado muestra que el agregado de rellenos reduce el paso de la radiación en el rango visible (indicado por un menor valor). En comparación con MC, las películas con AI mostraron menores valores τ_{PAR} , lo cual indica que este relleno presenta mayor capacidad para reducir el paso de radiación.

Estos cambios en las propiedades ópticas podrían atribuirse a varios factores: el tamaño del relleno, su disposición espacial, como así también a la distribución y dispersión del mismo dentro de la matriz (Kampeerappun, 2007). De esta manera, partículas más grandes que la longitud de onda de la luz visible podrían obstruir el paso de la misma, otorgándole a las películas a base de polietileno de alta densidad, una funcionalidad adicional.

4. Conclusiones

En este trabajo se demostró la factibilidad de procesar HDPE en presencia de diferentes cargas minerales con AI y MC. Las películas obtenidas por termo-compresión resultaron translúcidas y fáciles de manipular. La incorporación de partículas minerales condujo a un mayor desarrollo de color hacia la tonalidad amarillo-rojizo para los compuestos con AI y gris-azulado para los compuestos con MC. La eficiencia del procesamiento térmico se reflejó en la homogeneidad de las superficies de fractura y en la buena distribución de ambas cargas en la matriz de HDPE.

A partir de los resultados obtenidos se evidenció que la incorporación de partículas de AI y MC incrementa la capacidad de absorción de la radiación UV, otorgándole a las películas de HDPE una funcionalidad adicional, convirtiéndolas en materiales aptos para ser empleados en envases de productos que puedan ser susceptibles a la rancidez oxidativa catalizada por luz UV.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad Nacional de Cuyo (SIIP 06/L006-T1), a la Universidad Nacional del Sur (PGI 24/ZQ18) y al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (PICT-2020-SERIEA02022) por el apoyo financiero que hizo posible la realización de este trabajo.

6. Referencias

- Passaretti, M. G., Ninago, M. D., Villar, M. A., & López, O. V. (2022). Thermoplastic Starch and Mica Clay Composites as Biodegradable Mulching Films. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(10), 4394-4405.
- Ozdes, D., Duran, C., & Senturk, H. B. (2011). Adsorptive removal of Cd (II) and Pb (II) ions from aqueous solutions by using Turkish illitic clay. *Journal of Environmental Management*, 92(12), 3082-3090.
- Sore, S. O., Messan, A., Prud'homme, E., Escadeillas, G., & Tsobnang, F. (2016). Synthesis and characterization of geopolymer binders based on local materials from Burkina Faso–Metakaolin and rice husk ash. *Construction and Building Materials*, 124, 301-311.
- Ozer, I., & Soyer-Uzun, S. (2015). Relations between the structural characteristics and compressive strength in metakaolin based geopolymers with different molar Si/Al ratios. *Ceramics International*, 41(8), 10192-10198.
- Fendler, A., Villanueva, M. P., Gimenez, E., & Lagarón, J. M. (2007). Characterization of the barrier properties of composites of HDPE and purified cellulose fibers. *Cellulose*, 14, 427-438.
- Kaczmarek, H., Królikowski, B., Chylińska, M., Klimiec, E., & Bajer, D. (2019). Piezoelectric films based on polyethylene modified by aluminosilicate filler. *Polymers*, 11(8), 1345.
- Belmokhtar N; Ammari M; Brigui J; Ben allal L. (2017). Comparison of the microstructure and the compressive strength of two geopolymers derived from Metakaolin and an industrial sludge. *Construction and Building Materials*. 146, 621–629.
- Castillo LA; Barbosa SE; Capiati NJ. (2013). Surface-Modified Talc Particles by Acetoxy Groups Grafting: Effects on Mechanical Properties of Polypropylene/Talc Composites. *Polymer Engineering and Science*. 53, 89-95.
- da Silva Andrade D; da Silva Rêgo JH; Morais PC; Frías Rojas M. (2018) Chemical and mechanical characterization of ternary cement pastes containing metakaolin and nanosilica. *Construction and Building Materials*, 159, 18–26.
- Dubois AMP; Garces TSJ; Jerome R. Polyethylenelayered silicate nanocomposites prepared by polymerization-filling technique: synthesis and mechanical properties. *Polymer*, 43, 2123-2132
- Gopakumar TG; Lee JA; Kontopoulou M; Parent JS. (2002). Influence of clay exfoliation on the physical properties of montmorillonite/polyethylene composites. *Polymer*, 43 (20), 5483–5491.
- Horst MF; Quinzani LM; Failla MD. (2012) Rheological and barrier properties of nanocomposites of HDPE and exfoliated montmorillonite. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*. 27 (1), 106-125.
- Jurgelanea I; Sevjakova V; Dzene L. (2017) Influence on illitic clay addition on the stability of sunflower oil in water emulsion. *Colloids and Surfaces A*. 529, 178-184.
- Kampeerapappun PP; Aht-Ong D; Pentrakoon D; Srikulkit K. (2007). Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. *Carbohydrate Polymers*, 67, 155-163.
- Kenne Dikko BB; Elimbi A; Cyr M; Dika Manga J; Tchakoute Kouamoé M. (2015). Effect of the rate of calcination of kaolin on the properties of metakaolin-based geopolymers. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 3, 130-138.
- Mbey JA; Hoppe S; Thomas F. (2012). Cassava starch–kaolin composite film. Effect of clay content and clay modification on film properties. *Carbohydrate Polymers*, 88 (1). 213-222.
- Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas. Presidencia de la Nación. Minería Metálica y Rocas de Aplicación. Informes de cadenas de valor. AÑO 1 - N° 2. Mayo 2016
- Ninago MD; López OV; Passaretti MG; Horst MF; Lassalle VL; Carbajal Ramos I; Di Santo R; Ciolino AE; Villar MA. (2017). Mild microwave-assisted synthesis of aluminum-pillared bentonites Thermal behavior and potential applications. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 129 (3), 1517- 1531.
- Piermaría J; Bosch A; Pinotti A; Yantorno O; García MA.; Abraham A. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25 (5), 1261- 1269.
- Suhaida SI; Ismail H; Palaniandy S. (2011). Study of the effect of different shapes of ultrafine silica as fillers in natural rubber compounds. *Polymer Testing*, 30 (2), 251-259.
- Sujavanich S; Suwanvitaya P; Chaysuwan D; Heness G. (2017) Synergistic effect of metakaolin and fly ash on properties of concrete. *Construction and Building Materials*. 155, 830-837.
- Wang W; Tian G; Zong L; Zhou Y; Kang Y; Wang Q; Wang A. (2017) From illite / smectite clay to mesoporous silicate adsorbent for efficient removal of chlortetracycline from water. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 31-43.
- Zhang S; Sheng JJ; Qiu Z. (2016) Water adsorption on kaolinite and illite after polyamine adsorption. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 142, 13-20.



Estudio preliminar de la síntesis de PLA mediante catálisis ácida

Janet de los Angeles Chinellato Díaz^{1,2}, Cesar G. Gomez^{1,2}, Ramses S. Meleán^{2,3}, Facundo Mattea^{1,2}, Marcelo Ricardo Romero^{1,2}

1. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Orgánica, Av. Haya de la Torre y Av. Medina Allende (X5000HUA), Córdoba, Argentina.
2. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA-CONICET), Edificio de Ciencias II. Haya de la Torre y Medina Allende, (X5016GCA), Córdoba, Argentina.
3. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Departamento de Química Industrial y Aplicada, Av. Vélez Sarsfield 299 (X5000JJC), Córdoba, Argentina.

*E-mail: marceloricardoromero@gmail.com

PALABRAS CLAVES

Poliácido láctico (PLA)
Esterificación de Fischer
Caracterización química
Reología

RESUMEN

El poliácido láctico (PLA), es un poliéster sintético de gran valor comercial debido a su origen renovable y a sus propiedades biocompatibles, biodegradables, biorreabsorbibles y mecánicas. En consecuencia, existe gran interés en el desarrollo de rutas sintéticas alternativas para la obtención de PLA que permitan la sustitución de la reacción catalizada convencionalmente con octanoato de estaño; debido a que este catalizador es citotóxico y queda ocluido en la red macromolecular luego de la polimerización. Por lo tanto, se buscan alternativas sintéticas más amigables con el medio ambiente. Por este motivo, se diseñó una vía de síntesis en dos etapas catalizadas sucesivamente con un ácido y un metal biocompatibles. En este trabajo se realizó la optimización de la primera etapa, la cual consistió en una esterificación de Fischer de ácido láctico utilizando ácido sulfúrico como catalizador. Para determinar las mejores condiciones de reacción, se realizó un barrido de concentración de catalizador ácido en el rango de 0 a 3% v/v. De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontraron condiciones óptimas de concentración de catalizador responsables de generar la mayor cantidad de producto de condensación y simultáneamente el tiempo de reacción más corto y la mayor viscosidad. Además, se verificó la composición de los productos de síntesis mediante RMN-¹H y FT-IR, encontrando señales específicas que permitieron identificar entre los productos la formación de moléculas de oligómeros de PLA.

Preliminary studies of PLA synthesis by acid catalysis

KEYWORDS

Poly(lactic acid) PLA
Fischer esterification
Chemical characterization
Reology

ABSTRACT

Poly(lactic acid) (PLA) is a synthetic polyester of great commercial value due to its renewable origin, biocompatible, biodegradable, bioresorbable, and mechanical properties. Consequently, there is a great interest in the development of alternative synthetic routes for obtaining PLA that allow for the substitution of the conventional tin octanoate-catalyzed method. Due to the cytotoxicity of this catalyst and its occlusion in the network after polymerization, more environmentally friendly synthetic alternatives are being sought. For this reason, a two-step synthesis route catalyzed successively with sulfuric acid and biocompatible metals was designed. In this work, the optimization of the first step was performed, which consists in a Fischer esterification of lactic acid using acid as catalyst. To determine the best conditions, a catalyst concentration was carried out in the range of 0 to 3% v/v. According to the obtained results, optimal catalyst concentration conditions were found that generate the highest amount of condensation product while simultaneously achieving the shortest reaction time and the highest viscosity. Furthermore, the composition of the synthesis products was verified using ¹H-NMR and FT-IR, identifying specific signals of PLA oligomer molecules among the products.

1. Introducción

El poliácido láctico (PLA) es un poliéster alifático muy versátil que posee propiedades biodegradables, biocompatibles y biorreabsorbibles con aplicaciones en áreas como la ciencia médica, dispositivos de ingeniería, envasado de alimentos, entre otros (Singhvi y col., 2019; Hazal y Yildirim, 2019; Malek y col., 2021). Si bien es un polímero sintético, sus precursores provienen de fuentes renovables, tal como ácido láctico, generado habitualmente mediante procesos de fermentación de azúcares y carbohidratos (Yun y col., 2003).

Cabe destacar que el PLA posee propiedades mecánicas adecuadas para la impresión 3D lo cual posiciona a este material como una alternativa viable para la construcción de prótesis (Liu y col., 2016; Wu y col., 2019). Además, el PLA puede ser reabsorbido por los sistemas bioquímicos de las células del cuerpo humano, lo cual convierte a este biopolímero en un recurso prometedor para sus aplicaciones en la ingeniería de tejidos, ya que evita la necesidad de cirugías adicionales en pacientes con implantes o dispositivos de regeneración celular (Gasparotto y col., 2022).

Las vías de síntesis más empleadas para la obtención de PLA son la polimerización por condensación directa del ácido láctico y la polimerización por apertura de anillo de lactida. A nivel comercial, se realiza habitualmente la síntesis de apertura de anillo de lactida en presencia del catalizador organometálico octanoato de estaño (Henton y col., 2005). Sin embargo, aunque este procedimiento tiene un alto rendimiento, el PLA obtenido presenta Sn ocluido entre las cadenas macromoleculares, para el cual se ha demostrado citotoxicidad y capacidad de inhibir el crecimiento celular de forma moderada a severa, según el contenido de metal presente en el material (Tanzi y col., 1994).

Por consiguiente, en la búsqueda de nuevos métodos sintéticos que permitan obtener PLA de baja o nula citotoxicidad; en este trabajo se propone una vía de síntesis en dos etapas catalizadas sucesivamente con un ácido y metales biocompatibles.

En los estudios preliminares presentados en este trabajo se analiza la primera etapa propuesta de polimerización del PLA, que consiste en la reacción de esterificación de Fischer del ácido láctico. Este

proceso de esterificación tiene lugar porque el ácido láctico es un hidroxiaácido, el cual puede sufrir una esterificación directa entre los grupos carboxilo e hidroxilo de su estructura, en presencia de un catalizador ácido (Figura 1)

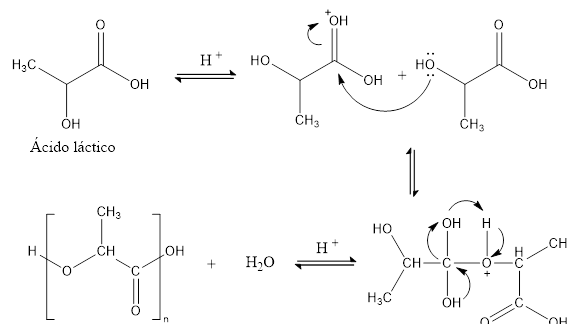


Figura 1. Reacción de esterificación Fischer del ácido láctico.

La reacción de esterificación inicia cuando el oxígeno del grupo carbonilo es protonado por H^+ proveniente del medio de reacción. Después, el carbono de este grupo recibe un ataque nucleofílico de un hidroxilo de otra molécula de ácido láctico, resultando en la formación de una estructura tetraédrica. A continuación, se elimina una molécula de agua y un protón, lo que da lugar a la formación de un enlace éster. Este proceso se repite cíclicamente originando cadenas de PLA.

Las reacciones de poliesterificación se caracterizan por tener una constante de equilibrio muy pequeña entre 1 y 10 (Odián, G., 2004). Por lo tanto, para favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de PLA, se perturba el equilibrio de acuerdo al principio de Le Chatelier mediante la remoción de agua del sistema de reacción (Maharana, y col., 2009).

En este trabajo se presenta la optimización de la reacción de síntesis de PLA en base al estudio de la cinética de deshidratación y a la concentración de catalizador ácido. Posteriormente, los productos obtenidos fueron purificados y caracterizados mediante estudios reológicos y espectroscópicos.

2. Materiales y métodos

Materiales.

Para la síntesis de PLA se utilizó ácido L-láctico 85% ($C_3H_6O_3$) (Pura Química, Argentina), tolueno grado H.P.L.C. (Sintorgan, Argentina), ácido sulfúrico

(H₂SO₄) 98% (Anedra, Argentina) y carbonato de sodio anhidro (Na₂CO₃) 99,7% (Anedra, Argentina). Para las técnicas de caracterización se emplearon bromuro de potasio (KBr) 99% (Aldrich, Alemania) y cloroformo deuterado (CDCl₃) 99,8 % D (Sigma-Aldrich, Alemania).

Síntesis y purificación.

Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno, utilizando como reactor un balón de vidrio de tres bocas de 100 mL sobre una manta de calentamiento y agitación magnética. En este recipiente se colocaron 30 mL de ácido L-láctico, 30 mL de tolueno y posteriormente se adicionó como catalizador ácido sulfúrico, en diferentes concentraciones: 3,00; 1,00; 0,30; 0,10; 0,03; 0,00% v/v. El reactor se conectó a un refrigerante para constituir un sistema de reflujo (~110 °C), intercalando entre ambos un dispositivo Dean Stark. Mediante este último se separó el agua condensada para cada sistema de reacción y se registró el volumen producido en función del tiempo, con

intervalos de recolección de 5 min. Se consideró como punto final de cada reacción cuando cesó la generación de agua. Todos los productos de síntesis se neutralizaron con Na₂CO₃ en exceso. Posteriormente, el tolueno se extrajo utilizando un rotavapor a 90°C y 100 mm Hg durante 30 min. Todas las síntesis se realizaron por duplicado.

3. Resultados y Discusión

Síntesis de PLA.

La síntesis de PLA se llevó a cabo mediante la reacción de esterificación de Fischer en diferentes concentraciones de ácido sulfúrico en el rango de 0 a 3% v/v. La reacción entre los grupos carboxilo e hidroxilo del monómero genera agua como producto de la condensación, pero como la constante de equilibrio de estos sistemas es pequeña se debió eliminar esta molécula del medio de reacción para favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de los oligómeros de PLA, de acuerdo al principio de Le Chatelier.

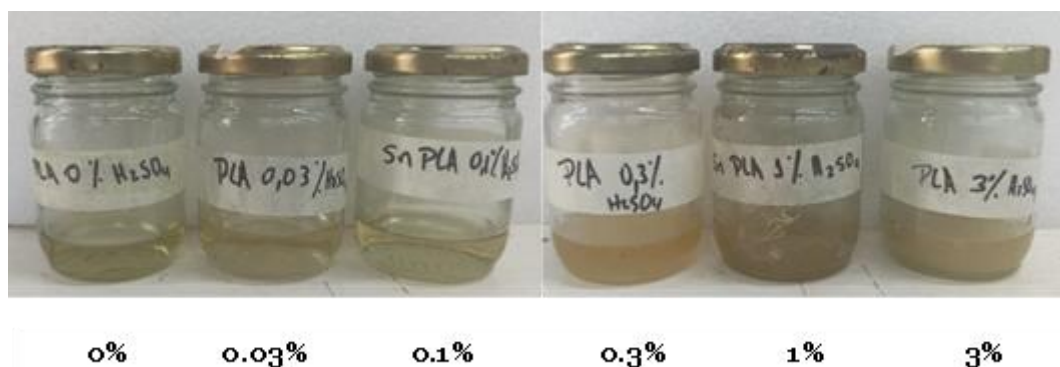


Figura 1. Productos de síntesis a distintas concentraciones ácidas de 0,0 % a 3,0 % v/v.

En la Figura 2 se observan fotografías de los productos obtenidos al ensayar las diferentes concentraciones de catalizador. Las muestras presentan aspecto de soluciones más viscosas que los reactivos iniciales y su color cambia de transparente a amarillo pálido. Además, se puede observar que a partir de la concentración de 0,3 % de ácido, se tiene un cambio notable en la apariencia, mostrando un punto de inflexión en el comportamiento de las muestras.

En la Figura 3 se representa la cinética de deshidratación del ácido láctico en función de la concentración de catalizador. El eje izquierdo representa el tiempo en el que cesa la generación de

agua del sistema de reacción (plateau). Mientras que el eje derecho indica la cantidad máxima de agua generada en cada síntesis en función de la concentración de catalizador. Por su parte, en el gráfico inserto en la figura, se detalla la cinética de la producción de agua para los distintos sistemas ensayados. Como se puede observar, la generación de agua no es proporcional a la concentración de ácido, sino que presenta una curva creciente que pasa por un máximo en 1,0 %, para luego volver a decrecer al alcanzar el 3,0 %. En cuanto al tiempo de reacción, se observa que con 1,0 % de catalizador se obtiene el tiempo más corto, mientras que con 0,1 % el tiempo más prolongado.

Tomando en consideración los resultados de esta cinética de deshidratación, la reacción catalizada con 1,0 % de ácido, muestra el mejor comportamiento.

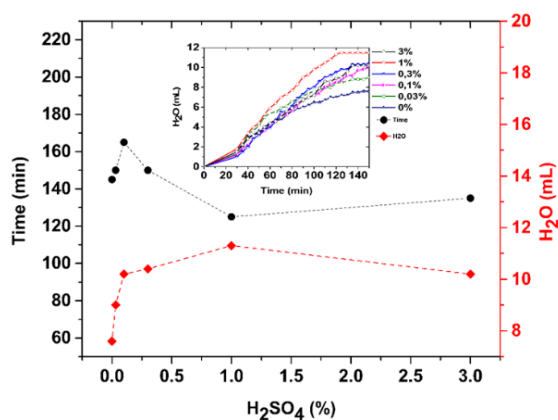


Figura 3. Volumen de agua y tiempo de reacción versus concentración de ácido sulfúrico. El gráfico inserto muestra la cinética de deshidratación.

Caracterización reológica.

Posteriormente, las muestras fueron estudiadas mediante ensayos reológicos de corte rotacional, los cuales se resumen en la Figura 4. Mientras que la línea vertical de puntos se ha trazado con fines comparativos a un valor arbitrario de velocidad de corte.

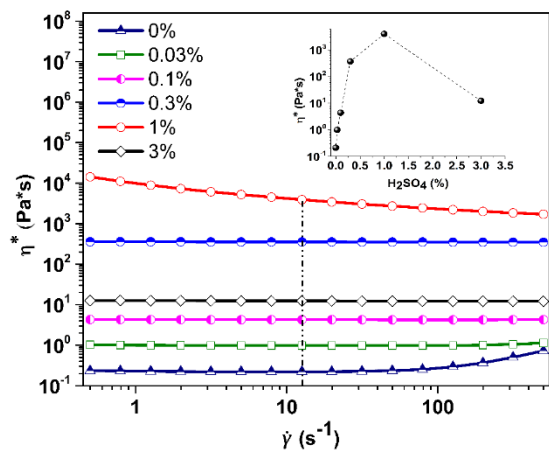


Figura 4. Viscosidad versus frecuencia de corte rotacional para PLA obtenido con diferentes concentraciones de catalizador. *Gráfico Inserto:* viscosidad compleja en función de la concentración de ácido sulfúrico.

El gráfico inserto representa la viscosidad correspondiente a la línea vertical de puntos, en la cual se observa el comportamiento viscoelástico en función de la concentración de catalizador. En general, las muestras presentan la viscosidad de un fluido newtoniano ideal en un amplio rango de

velocidades de corte. Aunque se observan ligeras variaciones en las muestras que exhiben mayor y menor viscosidad.

En particular, la muestra correspondiente al 1,0 % presenta una transición hacia fluido pseudoplástico. En el gráfico inserto se observa de manera simplificada la respuesta reológica de las diferentes muestras, y destaca claramente que la muestra obtenida con 1,0 % de catalizador presenta una viscosidad 10 veces o más que los valores obtenidos para el resto de las reacciones ensayadas. Esto podría estar asociado a que presumiblemente el producto obtenido posee un mayor peso molecular.

Caracterización espectroscópica.

Con el objetivo de identificar los grupos funcionales presentes y corroborar la formación del éster, los productos fueron analizados por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR, Figura 5a).

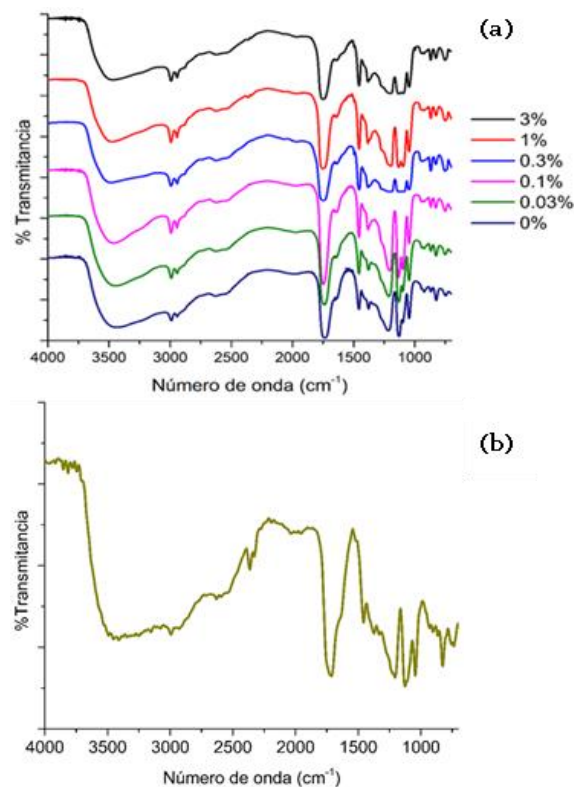


Figura 5. (a) FT-IR de los productos de síntesis a distintas concentraciones de catalizador (b) FT-IR del ácido láctico.

Los resultados arrojaron para todas las muestras una banda ancha entre los 3500 cm^{-1} y 3550 cm^{-1} que se ha asignado al estiramiento de los -OH del ácido carboxílico.

A 2990 cm^{-1} se observa la banda del grupo metilo presente en los polímeros y a 2986 cm^{-1} la señal del ácido láctico, mientras que a 2943 cm^{-1} se observa la señal de metileno. Seguidamente, se observan las bandas de estiramiento de C=O (carbonilo) de éster entre 1735 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} que están ligeramente desplazadas a la izquierda respecto al carbonilo del ácido que absorbe a 1715 cm^{-1} (Figura 5b). Luego, a 1210 cm^{-1} se observan los estiramientos de C-O del ácido y a 1045 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} los estiramientos C-O del éster.

Los espectros analizados permiten concluir que los productos obtenidos presentan señales características que sugieren la formación del polímero PLA.

Adicionalmente, se llevaron a cabo estudios espectroscópicos de RMN^{-1}H para los productos de síntesis a distintas concentraciones de catalizador

(Figura 6). Las señales principales que se pueden asignar a los protones de PLA entre los productos de reacción, se identifican entre $\delta = 1,62 - 1,68\text{ ppm}$ y corresponden a la señal del metilo de la cadena repetitiva, representada con la letra (a), y entre $\delta = 1,52 - 1,58$ al metilo terminal de cadena, representado con la letra (d). Es importante destacar que, cuando se maximiza el cociente entre la señal del metilo de la cadena repetitiva y el metilo de la cadena terminal aumenta la longitud de cadena.

En la Figura 6 se observa que existe una mayor elongación de cadenas a concentraciones de ácido iguales a 0,3 %. También, es posible observar las señales del hidrógeno del carbono de la cadena repetitiva, representado con la letra (b), entre $\delta = 5,18 - 5,33\text{ ppm}$ y las señales del hidrógeno del extremo de cadena, representado por la letra (c), entre $\delta = 4,39 - 4,49\text{ ppm}$.

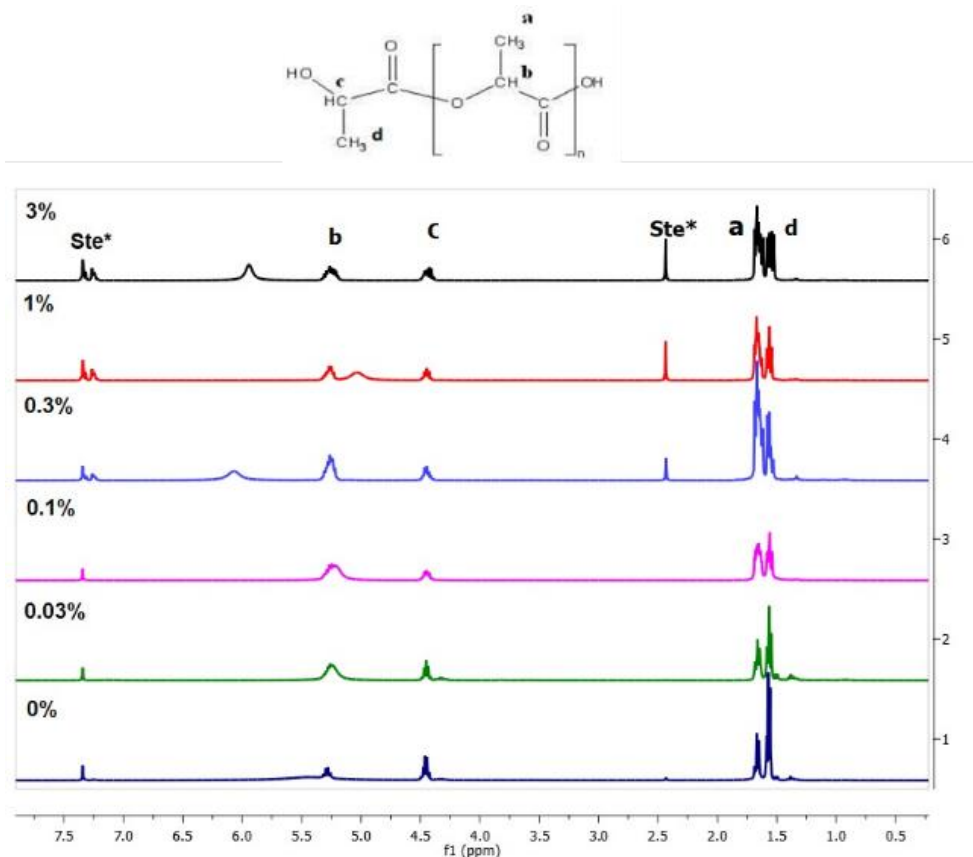


Figura 6. RMN^{-1}H de los productos de síntesis a distintas concentraciones de catalizador.

También, es posible observar las señales del hidrógeno del carbono de la cadena repetitiva, representado con la letra (b), entre $\delta = 5,18 - 5,33\text{ ppm}$ y las señales del hidrógeno del

extremo de cadena, representado por la letra (c), entre $\delta = 4,39 - 4,49\text{ ppm}$.

Además, se esperaría que las señales (a) y (d) fueran dobletes, ya que son metilos influenciados por un solo átomo de hidrógeno del enlace C-H y de igual forma, que las señales (c) y (b) fuesen cuadrupletes, ya que el hidrógeno del enlace C-H se ve influenciado por los tres hidrógenos de los metilos. Sin embargo, se observan señales bastante variadas, con muchos picos, lo cual indicaría la presencia de oligómeros de diferentes tamaños de cadena.

Por otra parte, entre $\delta = 7,26 - 7,34$ ppm y $\delta = 2,44$ ppm se observan señales correspondientes a tolueno residual, lo cual indica la presencia de material remanente del proceso de purificación.

En general, a través de estos resultados se puede corroborar la formación del polímero en sus primeras etapas de condensación, ya que las señales se manifiestan en las posiciones del espectro esperadas.

4. Conclusiones

En este trabajo se presentan los resultados preliminares correspondientes a la primera etapa de síntesis catalítica secuencial para obtener PLA. Mediante estudios espectroscópicos se evidenció la formación de oligómeros de PLA como producto de la esterificación de Fischer catalizada con H_2SO_4 , evidenciándose señales de desplazamientos químicos que podrían ser asignadas a hidrógenos característicos de la estructura de PLA y absorciones de grupos funcionales esperables para este tipo de polímero. Además, se encontraron evidencias que indican la presencia de cadenas de mayor tamaño cuando se utilizaron concentraciones de ácido superiores a 0,3 %.

Adicionalmente, junto al estudio de cinética de deshidratación del ácido láctico se pudo determinar que 1,0 % de catalizador ácido fue la concentración más adecuada, tomando como criterios: tiempo de reacción, volumen de producto de condensación y viscosidad. Por tanto, este trabajo permitió reducir el problema a un intervalo estrecho de concentración óptima de 0,3 a 1,0 % de catalizador para poder avanzar en la próxima etapa de síntesis de PLA utilizando metales biocompatibles, con el fin de incrementar el peso molecular de los productos y consecuentemente las propiedades mecánicas del biopolímero.

5. Agradecimientos

Janet Chinellato agradece a CONICET la beca de doctorado recibida. También se agradece a SECYT-UNC, a PRIMAR TP: 32520170100384CB y al proyecto PICT 2021-GRFT1-00728 por el aporte de fondos para el desarrollo de esta investigación.

6. Referencias

- Gasparotto, M.; Bellet, P.; Scapin, G.; Busetto, R.; Rampazzo, C.; Vitiello, L.; Indravadan, D.; Filippini, F. (2022). 3D Printed Graphene-PLA Scaffolds Promote Cell Alignment and Differentiation, *International Journal of Molecular Sciences* 23, 1736.
- Hazal, E.; Yildirim, H. (2019). Surface Modification of 3D Printed PLA Objects by Fused Deposition Modeling: A Review, *colloids and interfaces* 3 (43), 1-25.
- Henton, D. E.; Gruber, P.; Lunt, J.; Randall, J. (2005). Polylactic Acid Technology, Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites 16, 527-577.
- Liu, A.; Xue, G.H.; Sun, M.; Shao, H.F.; Ma, C.Y.; Gao, Q.; Gou, Z.R.; Yan, S.G.; Liu, Y.M.; He, Y. (2016). 3D Printing Surgical Implants at the clinic: A Experimental Study on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction, *Scientific Reports* 21704 (6), 1-13.
- Maharana, T.; Mohanty, B.; Negi, Y.S. (2009). Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability, *Progress in Polymer Science* 34 (1), 99-124.
- Malek, N.S.A.; Faizuman, M.; Khusaimi, Z.; Bonnia, N. N.; Rusop, M.; Asli, N.A. (2021). Preparation and Characterization of Biodegradable Polylactic Acid (PLA) Film for Food Packaging Application: A Review, *Journal of Physics: Conference Series*, (1892), 1-7.
- Odian, George (2004). Principles of polymerization. 4° ed. New Jersey. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Singhvi, M.S.; Zinjarde, S.S.; Gokhale, D.V. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications, *Journal of Applied Microbiology* 6 (127), 1612-1626.
- Tanzi, M. C, Verderio, P., Lampugnani, M. G., Resnati, M., Dejana, E., Sturani, E. (1994). Cytotoxicity of some catalysts commonly used in the synthesis of copolymers for biomedical use, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5, 393-396.
- Wu, D.; Spanou, A.; Diez, A.; Persson, C. (2020). 3D-printed PLA/HA composite structures as synthetic trabecular bone: A feasibility study using fused deposition modeling, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 103, 1-10.
- Yun, J.S.; Wee, Y.J.; Ryu, H.W. (2003). Production of optically pure l(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1, *Enzyme and Microbial Technology* 33 (4), 416-423.



Embalse El Nihuil: Características hidroquímicas, macro y microflora acuática y estado trófico

María Esther Balanza¹, María Eugenia Santibáñez¹, Antonio Sebastián Sánchez¹, Mónica Beatriz Barrera¹, Alicia Lucía Ordóñez¹, Alicia María Sánchez¹

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria – Universidad Nacional de Cuyo. Bernardo de Irigoyen N° 375- (5600) San Rafael, Mendoza- Argentina.

*E-mail: mbarrera@fcai.uncu.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Embalse El Nihuil
Estado trófico
Calidad hidroquímica
Calidad del agua

RESUMEN

Se analizan tanto la calidad físico química del agua como la productividad planctónica primaria y la presencia de macrófitas para evaluar el estado trófico del embalse en toda la extensión del mismo y en diferentes épocas del año. Para ello, mediante muestreos trimestrales se ha medido la conductividad eléctrica, sólidos totales, aniones y cationes, entre otros, así como el contenido de clorofila a, fósforo, nitrógeno y transparencia Secchi, todos según lo establecido por los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. También se ha realizado el análisis cuali y cuantitativo del fitoplancton, incluyendo cálculos de biodiversidad y la estimación de la superficie ocupada por macrófitas, así como las especies tanto sumergidas como aéreas presentes. Los resultados indican aguas sulfatadas cálcicas con un valor medio de sólidos totales alrededor de 1 g/l, con muy baja productividad fitoplanctónica en la que predominan las diatomeas y una relación TN:TP < 9, resultando el nitrógeno limitante del desarrollo algal. Los índices de estado trófico (TSI) muestran un lago de aguas oligotróficas en toda su extensión, aún cuando el gran desarrollo de macrófitas requiera de medidas adecuadas para su control y mejor aprovechamiento del lago para diversos fines.

El Nihuil Reservoir: Hydrochemical characteristics, aquatic macro and microflora and trophic state

KEYWORDS

El Nihuil Reservoir
Trophic State
Hydrochemical Quality
Water Quality

ABSTRACT

Both the physical chemical quality of the water and the primary plankton productivity and the presence of macrophytes are analyzed to assess the trophic status of the reservoir throughout its length and at different times of the year. To do this, electrical conductivity, total solids, anions and cations, among others, have been measured through quarterly sampling, as well as the content of chlorophyll a, phosphorus, nitrogen and Secchi transparency, all as established by the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Qualitative and quantitative analysis of phytoplankton has also been carried out, including biodiversity calculations and the estimation of the surface area occupied by macrophytes, as well as present submerged and aerial species. The results indicate calcium sulphated waters, with an average value of total solids around 1 g/l, with very low phytoplankton productivity in which diatoms predominate and a TN:TP ratio < 9, resulting in nitrogen limiting algal development. The trophic state indices (TSI) show a lake with oligotrophic waters in all its extension, even when the great development of macrophytes requires adequate measures for their control and better use of the lake for various purposes.

1. Introducción

El embalse El Nihuil fue inaugurado en 1947 con una capacidad de 384 hm³ y una superficie de 9600 ha en

su cota máxima, lo que da al lago características de somero en buena parte de su extensión desde la construcción de la presa, con 4 m de profundidad media, que permitió rápidamente el desarrollo de

vegetación acuática sumergida arraigada en el fondo en amplias zonas del mismo, denominada lamas en toda la región, aún cuando esté constituida por macrófitas vasculares y no por algas. Fue construido con propósitos de generación hidroeléctrica y de regulación del caudal para riego de áreas cultivadas del oasis sur de la provincia de Mendoza. En la actualidad su capacidad total se ha reducido a menos del 60 % de la original (224 hm³ en 2016) y la operativa a sólo 155 hm³ y aún cuando la superficie ocupada resulta también variable, todavía presenta buena parte de la extensión cubierta por menos de 2 m de agua la mayor parte del año.

Este río, como todos los de la provincia, es de régimen nival y su erogación depende de la precipitación de nieve en la cordillera durante la época invernal, la cual viene disminuyendo en los últimos años mientras la demanda se mantiene, provocando una situación de emergencia hídrica o cercana a ella en toda la zona y la disminución de la cota y superficie del embalse como se observa en las imágenes satelitales de la Figura 1. En las mismas se advierte que tanto en la década de los '90 como desde 2011 a la fecha, con escasas excepciones, la superficie, y por lo tanto la cota, del lago se mantuvieron muy reducidas, lo que provocó que las macrófitas sumergidas se encuentren hoy a nivel de superficie del agua y la formación de islas de diverso tamaño con juncales, vegetación emergente aérea, que dificultan la navegación y el uso recreativo, a la vez que disminuyen fuertemente la capacidad operativa del embalse. Tal situación hace pensar que su estado trófico se encuentre muy deteriorado a pesar de que el río Atuel no recibe contaminación de origen antrópico significativa aguas arriba del embalse.

El término eutrofización, del griego “bien nutrido”, comenzó a utilizarse a mediados del siglo pasado para designar el enriquecimiento excesivo en nutrientes de un ecosistema acuático y su uso más extendido se refiere específicamente al aporte más o menos masivo de nutrientes inorgánicos que contienen nitrógeno y fósforo en un ecosistema acuático con la entrada de agua restringida, como por ejemplo en un lago. Debido a ello se produce una proliferación descontrolada de algas fitoplanctónicas, inicialmente diatomeas y algas verdes para terminar favoreciendo el desarrollo de cianofíceas – cianobacterias o algas verde azules – que finalmente consumen hasta agotar el N y P disponibles y este último elemento actúa como limitante de la producción primaria (Moreno-Franco et al., 2010). Las cianobacterias generalmente forman una capa en superficie, que baja mucho la

transparencia medida con el disco de Secchi e impide el paso de la luz solar y la fotosíntesis por debajo de ellas, por lo que la producción primaria no puede existir a mayores profundidades.

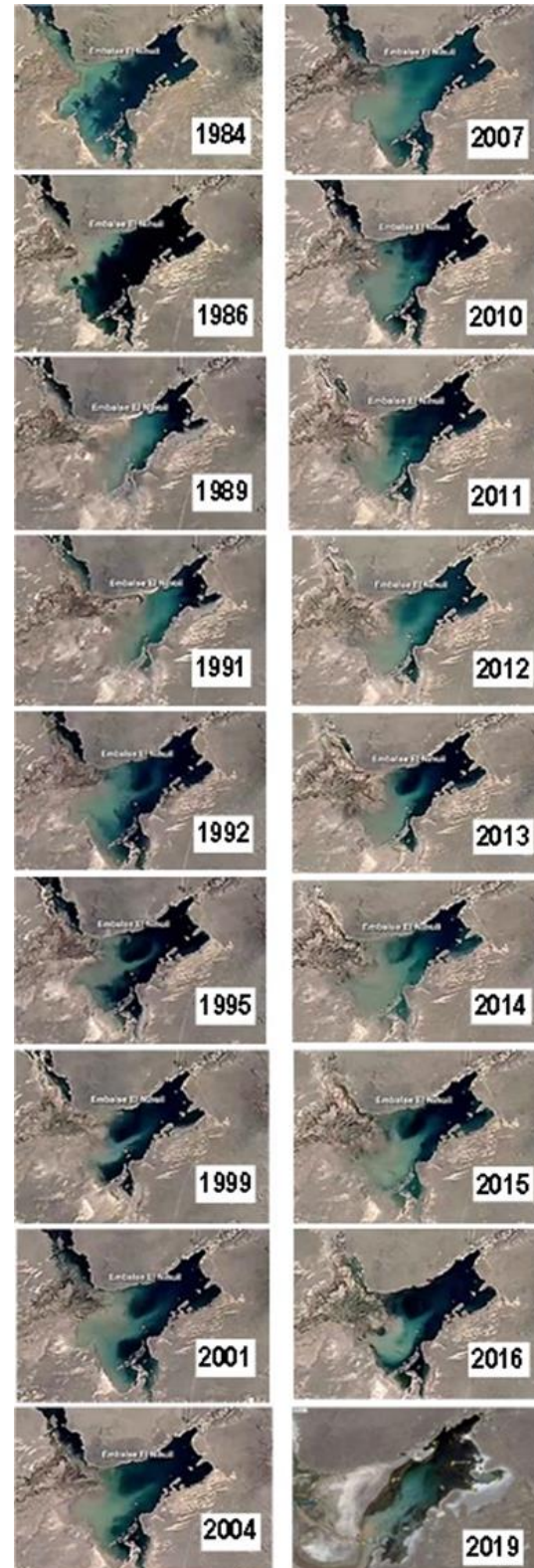


Figura 1. Evolución de imágenes satelitales del Embalse El Nihuil mostradas por Google Earth

Aunque desde mediados del siglo XX la eutrofización solía evaluarse en forma muy subjetiva por la apariencia del ecosistema y varios otros factores, en 1977 Carlson propuso diversos índices de estado trófico (TSI / IET) para la evaluación objetiva de la misma con base en el contenido de clorofila a (Chl a / Clor a) y la turbiedad del agua medida por la transparencia al disco de Secchi (SD / DS), como parámetros para estimar la producción primaria o biomasa algal y de fósforo (TP / PT) como parámetro útil para evaluar el contenido de nutrientes del agua.

En su trabajo original (Carlson, 1977) indica que la turbiedad medida debe estar producida por la masa algal y no por cualquier otro material particulado, ya sea orgánico o inorgánico y calcula el TSI en base al PT en forma complementaria a los otros dos, como una herramienta más de control ya que obtiene buena correlación entre los contenidos de fósforo y clorofila. Dado que el contenido de fósforo total – y por lo tanto su TSI – tiende a permanecer más o menos constante, con escasa variación en el tiempo, a diferencia de la clorofila y la turbiedad con fuertes variaciones estacionales, concluye que el fósforo total resulta un buen indicador de ambientes eutróficos siempre y cuando sea el nutriente limitante en la producción de biomasa algal.

En síntesis, estos Índices de Estado Trófico propuestos por Carlson (1977), permiten la clasificación pertinente del cuerpo de agua según los valores que tomen en una escala de 0 a 100, habiéndolos el autor distribuido en cuatro categorías: oligo, meso, eutrófico e hipertrófico. La OCDE paralelamente, había establecido valores límite para los valores analíticos de estos tres mismos parámetros a fin de incorporarlos a su propia clasificación (Balanza et al., 2018) con cinco categorías en lugar de cuatro, incluyendo la de ultraoligotrófico. Actualmente este organismo recomienda la aplicación de los Índices de Estado Trófico (TSI) de Carlson, pero asignando las categorías tróficas según los criterios que se muestran en la Tabla 1, los cuales modifican los valores inicialmente propuestos por Carlson, especialmente en el límite entre oligo y mesotrófico (López-Martínez y Madroñero-Palacios, 2015) y establecen cinco categorías para la clasificación.

Posteriormente, posiblemente para tratar de superar dificultades cuando los índices presentan valores diferentes entre sí, Carlson propuso su TSI en base al contenido de nitrógeno total (TN / NT), también como indicador del contenido de nutrientes en el medio cuando este elemento es el que actuaría

como limitante en ambientes no contaminados o cuando la relación TN / TP < 9, en lugar del fósforo.

Tabla 1. Criterios de la OCDE para aplicación de los Índices de Estado Trófico

Valor del índice (TSI)	Categoría Trófica
< 30	Ultraoligotrófico
30 - 44	Oligotrófico
44 - 54	Mesotrófico
54 - 74	Eutrófico
> 74	Hipereutrófico

En la actualidad, diversos autores proponen la utilización de los valores medios obtenidos por todos los TSI / IET de Carlson para la tipificación trófica de los cuerpos de agua (Othaz Brida, 2020) o de algunos de ellos, como en el caso de los Índices de Calidad del Agua utilizados por la Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro - Secretaría de Gestión Ambiental (2011), que promedia los valores de los IETs calculados según los contenidos de fósforo y de clorofila a del agua.

Aunque el uso de los IETs se ha generalizado actualmente para la clasificación trófica, a los fines e disponer de mayor cantidad de elementos para la evaluación global de los ecosistemas resulta de gran valor comparar los resultados obtenidos a través de los índices con los estudios cuali – cuantitativos del fitoplancton en las zonas estudiadas y de la biodiversidad del mismo.

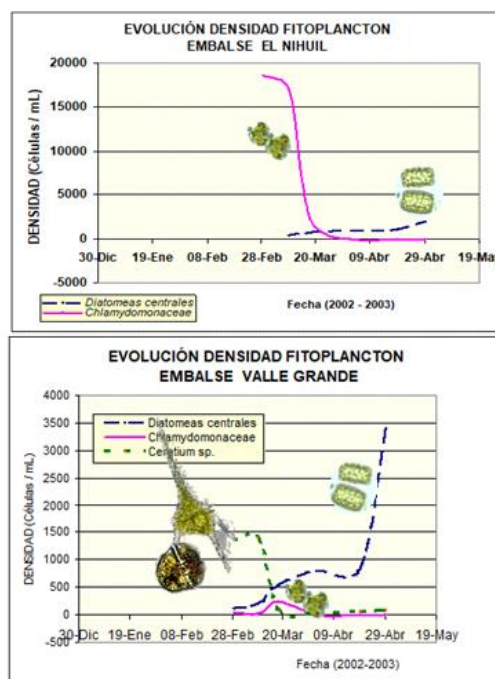


Figura 2. Evolución temporal del fitoplancton durante la floración algal de 2002-2003 en los embalses del Nihuil y Valle Grande- Fuente: Balanza y Ordoñez, 2003

En diciembre de 2002 el embalse en estudio presentó, por única vez, una floración algal de color verde brillante en buena parte de la superficie de zonas de aguas profundas debida al desarrollo de una cloroficea unicelular flagelada identificada como *Chlamydomonas sp.*, la cual se prolongó hasta finales de febrero del año siguiente (Balanza y Ordóñez, 2002), aunque no pudo determinarse fehacientemente el o los factores desencadenantes de la misma y no volvió a presentarse en años posteriores. En los momentos de mayor intensidad de la floración pudieron encontrarse recuentos de hasta 20000 cel.ml⁻¹. Cualquiera fuere la causa, en los embalses aguas abajo no pudieron encontrarse densidades significativas de este organismo, aunque en el embalse Valle Grande también se produjeron floraciones, pero de color amarronado, a causa del desarrollo de dinoflagelados, predominando *Ceratium hirundinella* y, en menor cantidad, *Peridinium sp.* En la figura 2 se muestran las densidades de los diferentes géneros en ambos embalses.

2. Materiales y métodos

Puntos y fechas de muestreo: A fin de analizar variación espacial y estacional de los parámetros medidos en toda la superficie del embalse, se establecieron cinco puntos de muestreo: uno en la presa, en la parte más profunda – más de 25 m –, dos en la zona de profundidad media – 8 a 10 m, uno en cada margen del lago – y otros dos en zonas más cercanas a la cola del embalse, con 3,5 m o menos de profundidad de agua. Todos los puntos se georeferenciaron durante el primer muestreo de forma de repetirlos en los muestreos posteriores. Sólo el punto más cercano a la cola sufrió algunas modificaciones de ubicación, dependiendo de la cota del embalse al momento del muestreo. Aunque se tomaron muestras también de profundidad para verificar la existencia o no de variabilidad en la calidad del agua, la mayoría fueron obtenidas de la superficie, hasta 0,5 m de profundidad, según lo especificado en los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (APHA, AWWA.WPCF, 1992), registrando in situ, en todos los puntos, los valores de temperaturas, tanto ambiente como del agua, pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica.

Las determinaciones analíticas de los parámetros físicos, químicos y biológicos fueron realizadas según los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (APHA, AWWA.WPCF, 1992) ya mencionados, siendo algunos de ellos:

Fósforo Total: Método del ácido ascórbico 4500-P E. La concentración de P total se registró como mg P_T/L

Clorofila a: Método espectrofotométrico 10200 H. La concentración se registró como mg Clorofila a /m³

Nitrógeno total: se determinó por método rápido HACH espectrofotométrico colorimétrico, previa oxidación a nitrato.

Claridad del agua: En cada sitio se determinó la profundidad de extinción de la luz mediante el uso de disco Secchi, en metros, con aproximación a 0,1 m

Otros parámetros: los valores de pH, Conductividad Eléctrica (CE), Oxígeno Disuelto (OD) y Temperatura (°C) se determinaron mediante el uso de Sonda Multiparamétrica Sper Cientific 850081,

Índices de estado trófico (IET) de Carlson: Fueron calculados de acuerdo a las siguientes fórmulas: (Carlson, 1977)

Para Clorofila a:

$$IET_{Clor a} = 9,81 * \ln [Clor a (mg/m^3)] + 30,6 \quad (1)$$

Para Fósforo Total:

$$IET_{PT} = 14,42 * \ln [P_T (mg/m^3)] + 4,5 \quad (2)$$

Para Claridad por Disco Secchi:

$$IET_{DS} = 60 - 14,41 * \ln [DS (m)] \quad (3)$$

Para Nitrógeno Total:

$$IET_{NT} = 14,43 * \ln [N_T (mg/L)] + 54,5 \quad (4)$$

Ensayos cuali – cuantitativos de fitoplancton: Para los ensayos cualitativos se recolectaron muestras con redes de arrastre tanto vertical como horizontal. Las muestras concentradas se examinaron con microscopio óptico en cámara de Sedgwick – Rafter para identificación de los géneros presentes. Para los ensayos cuantitativos se recolectaron muestras de 250 ml de agua superficial en botellas de plástico y se estabilizaron con solución de Lugol, utilizando, de igual manera, la cámara de Sedgwick – Rafter para el conteo.

Biodiversidad de especies fitoplanctónicas: Se utilizaron los índices de Shannon Weaver y de Margalef para medir la biodiversidad específica del fitoplancton. El primero está dado por la ecuación 5:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i \quad (5)$$

Siendo

H' : Índice de diversidad específica de Shannon Weaver (generalmente $0,5 < H' < 5$ y $H' < 2$ para baja diversidad y $H' > 3$ para alta diversidad)

S : número de especies

p_i : abundancia relativa de la especie i , calculada como n_i/N

n_i : número de individuos de la especie i

N : número total de individuos de todas las especies

En tanto el índice de Margalef se calcula mediante la fórmula de la ecuación 6:

$$I = \frac{(s - 1)}{\ln N} \quad (6)$$

Siendo

I : diversidad específica según Margalef ($0 < I < 5$)

s : número de especies

N : número total de individuos de todas las especies

3. Resultados y Discusión

Evolución de los parámetros físico químicos medidos en los diferentes puntos de muestreo: Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de la mayoría de los parámetros en los diferentes puntos de muestreo (Balanza et al, 2018) y sí aparecen dichas diferencias en relación con la temporalidad, especialmente coincidentes con las épocas de máximos y mínimos caudales del río que alimenta el embalse, los resultados se muestran en la Tabla 2 en forma de valores medios y desviaciones estándar, con sus correspondientes coeficientes de variación porcentual (CV), así como máximos y mínimos de cada parámetro.

Los valores incluidos en la tabla 2 muestran un contenido salino más bien elevado para aguas dulces, aunque típico de todos los ríos de la provincia que tienen su origen por en la cordillera y su cauce transcurre luego por cientos de kilómetros en zonas muy áridas

Tabla 2. Valores de los parámetros físico químicos del agua del embalse en las diferentes épocas del año

Parámetro	Valor medio ± DE y (CV %)	Máximo	Mínimo
Conductividad, $\mu S/cm$	1345 ± 202 (15 %)	1616	1023
Residuo Seco (SDT), en mg/L	1002 ± 147 (15 %)	1220	748
Temperatura del agua superficial, en °C	15,2 ± 5,5 (36 %)	22	6
Oxígeno disuelto, en % de saturación	99,8 ± 0,35 (0,4 %)	101	98
pH	7,8 ± 0,3 (3,9 %)	8,6	7,5
Sulfatos, en mg SO_4^{2-}/L	429 ± 72 (17 %)	530	326
Cloruros, en mg Cl^{-1}/L	146 ± 24 (17 %)	176	96
Bicarbonatos, en mg HCO_3^{-1}/L	100 ± 21 (21 %)	141	74
Calcio, en mg Ca^{+2}/L	182 ± 24 (13 %)	200	122
Sodio, en mg Na^{+1}/L	93 ± 18 (19 %)	120	63
Nitrógeno total, en mg N/L	0,12 ± 0,04 (31 %)	0,2	0,1
Fósforo total, en $\mu g P/L$	23 ± 11 (48 %)	50	9
Clorofila a, en μg Clorofila a /L	0,38 ± 0,25 (66 %)	0,8	0,1
Transparencia DS en aguas profundas *, en m	6,99 ± 1,25 (18 %)	10	5,8
Transparencia DS en cola del embalse **, en m	1,28 ± 0,95 (18 %)	2,7	0,6
Relación N / P	5,6 ± 2,5 (45 %)	11	2,5

(*) Considerados sólo los valores inferiores a la profundidad en el punto de muestreo. (**) Todos los valores fueron inferiores a la profundidad total en el punto de muestreo.

Debido a la composición de los suelos, predominan ampliamente los sulfatos sobre otros aniones como cloruros y bicarbonatos, con valores que, en la mayor parte del año, incluso superan los recomendados como límite máximo en aguas para consumo - 400 ppm - tanto por el Código Alimentario Argentino (CAA) como por el E.P.A.S., ente regulador de la calidad del agua para consumo en la Provincia de Mendoza. Si bien el azufre como elemento no se relaciona con deterioro trófico dado que no se reconoce influencia en el desarrollo de la microflora, sí se utiliza junto con el nitrógeno y el fósforo en la preparación de fertilizantes para cultivos (Robredo et al, 2000; Santos-Coello y Ríos-Mesa, 2016), por lo cual debería investigarse su posible relación con el desarrollo de macrófitas del embalse, no habiéndose encontrado referencias bibliográficas al respecto. El contenido de sulfatos del agua resulta casi el triple de lo recomendado por Robredo (2000) para cultivos en hidroponía, aunque tanto el nitrógeno como el fósforo del agua del río presentan valores muy bajos por lo que deberían resultar limitantes.

Dado el pH del agua, que muestra muy poca variabilidad, la especie carbonatada predominante, responsable de la alcalinidad, es el carbonato ácido, siendo no significativas las cantidades de carbonatos y ácido carbónico en cualquier época del año.

En relación con los cationes presentes, predominan los alcalino térreos y fundamentalmente el calcio, acompañado de menores cantidades de magnesio. Si bien esto le confiere una dureza superior a la recomendada por el CAA para aguas de consumo y uso industrial, no suele superar los límites del EPAS para este parámetro. Estos valores altos de dureza, si bien pueden causar incrustaciones importantes tanto en el uso industrial como domiciliario, representan, sin embargo, más bien una ventaja en el uso agrícola, dado que tienden a disminuir los riesgos potenciales de salinización – alcalinización de suelos en aguas de salinidad más bien alta como la de este río.

La temperatura del agua superficial, como es de esperar, muestra una alta variabilidad estacional en concordancia con los cambios de temperatura ambiental y resulta de importancia, no sólo para el desarrollo de las diversas especies planctónicas sino también por la cantidad de oxígeno disuelto (OD) que puede ser retenido en el agua. Por ello, el OD se reporta como porcentaje de saturación del agua a la temperatura de la misma. Todos los valores obtenidos al respecto fueron muy altos, y aunque no se muestran en la tabla, dichos valores se mantienen en todas las profundidades, incluidas las muestras

cercanas al fondo, aún en las partes más profundas. Si bien en la superficie el OD proviene, fundamentalmente, de la atmósfera en contacto, en partes más profundas es también aportado por la fotosíntesis de las macrófitas del fondo, a las cuales alcanza a llegar la luz solar debido a la importante transparencia al disco de Secchi (DS) – casi siete metros en promedio – que posee el agua en toda la superficie del embalse, con excepción de la cola del mismo. Este nivel de transparencia DS indica un agua con escasa cantidad de material en suspensión y para el cálculo de los valores medios no se han tenido en cuenta los puntos de muestreo en los cuales la altura de la columna de agua fuera inferior a la lectura de la transparencia, para evitar resultados erróneos o confusos y teniendo en cuenta que los valores de los demás parámetros no muestran diferencias significativas entre puntos de muestreo. Sí se observa, en la zona de cola del embalse donde se recibe el aporte del agua del río con una importante carga de material inorgánico particulado en suspensión, una transparencia muy disminuida, que no permite visualizar el fondo del cuerpo de agua en ninguna época del año, a pesar de la escasa profundidad.

En relación al contenido de nitrógeno total (NT), incluyendo los nitratos, casi inexistentes en la zona, y el nitrógeno proveniente de materia orgánica y sus productos de degradación, presenta valores muy bajos, proveyendo relaciones entre el nitrógeno y el fósforo (PT) inferiores a 9, valor considerado como necesario para que este último elemento actúe como limitante en el desarrollo de las microalgas (López y Madroñero, 2015) Dada esta situación, pasa a ser esta pequeña cantidad de NT la que limita el desarrollo del fitoplancton.

Al contrario de lo que ocurre con el nitrógeno, el contenido de fósforo, medido como fósforo total (PT) se mantiene, en todos los puntos de muestreo, en valores que, si bien pudieren parecer pequeños por sus valores absolutos, salvo en unas pocas muestras, estarían cercanos a los que presentan lagos clasificados como mesotróficos. Sin embargo, estos valores son casi coincidentes con el del fósforo reactivo soluble (PRS) del agua y se detectan en iguales cantidades en el agua del río antes de entrar al embalse, no proviniendo de contaminación de origen antrópico sino de aportes del mismo terreno. Su validez en este caso para la determinación del estado trófico, dada su relación con el NT, ya fue discutida en el párrafo anterior.

Índices de Carlson de Estado Trófico (TSI): en la tabla 3 se muestran los valores medios, DE y CV de los TSI

de Carlson calculados separadamente para las zonas de aguas de 7 m o más de profundidad y la cola del

embalse, en las diferentes épocas del año, con base en las ecuaciones 1 a 4.

Tabla 3. Valores de los TSI de Carlson en diferentes zonas del embalse El Nihuil. Letras diferentes en los superíndices en cada fila indican diferencias estadísticamente significativas.

Parámetro	Profundidad >DS (Valor medio ± DE y (CV %))	Cola del embalse (Valor medio ± DE y (CV %))
TSI Clor <i>a</i>	19,1 ± 8,0 (42 %) ^a	20,8 ± 5,8 (28 %) ^a
TSI PT	47,4 ± 7,4 (16 %) ^a	50,7 ± 6,2 (12 %) ^a
TSI DS	32,8 ± 3,3 (10 %) ^a	59,1 ± 8,1 (14 %) ^b
TSI NT	23,0 ± 3,9 (17 %) ^a	24,5 ± 5,1 (21 %) ^a

Como puede observarse en dicha tabla no aparecen diferencias significativas en los valores que toma cada uno de los índices en las zonas de aguas más profundas y la zona de cola del embalse, excepto para el IET calculado con base en la turbiedad o transparencia al DS, el cual toma valores muy elevados en esta última zona debido, como ya se dijo, no a la proliferación de especies fitoplanctónicas, sino a la presencia de material inorgánico de arrastre del río, que aún no alcanza a sedimentar, por lo que ese índice debe descartarse en la valoración del estado trófico para ese punto del lago.

zona de aguas más profundas, cuyos valores y rangos pueden observarse más fácilmente en los gráficos de la figura 3, en la que aparecen muy separados los valores de los IETs del PT y el DS. Sin embargo, no ocurre lo mismo entre los valores medios de los índices con base en la Clorofila *a* y el N, que se encuentran bastante cercanos entre sí, aunque aparezcan como significativamente diferentes. Ello se debe a que los valores del IET N presentan un sesgo estandarizado > 2, lo cual viola el supuesto de que los datos provengan de una distribución normal e invalida el uso del análisis de la varianza para este índice, recomendándose utilizar en su lugar la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas en lugar de las medias. Al utilizar tanto esta prueba como la prueba de las medianas de Mood, para evaluar la hipótesis de que las medianas de ambos grupos de datos son iguales, se obtiene un valor-P mayor a 0,05, por lo que se concluye que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de los IET de Clor *a* y N en las zonas de aguas más profundas del embalse. El análisis de la varianza para los valores de los IET en la zona de cola del embalse sí resulta válido y la prueba de rangos múltiples muestra dos grupos de valores de los índices bien diferenciados estadísticamente para el 95% de nivel de confianza, por un lado el formado por los IETs de Clor *a* y N, sin diferencias entre ellos, y por otro, los IET de P y DS, también sin diferencias entre ellos.

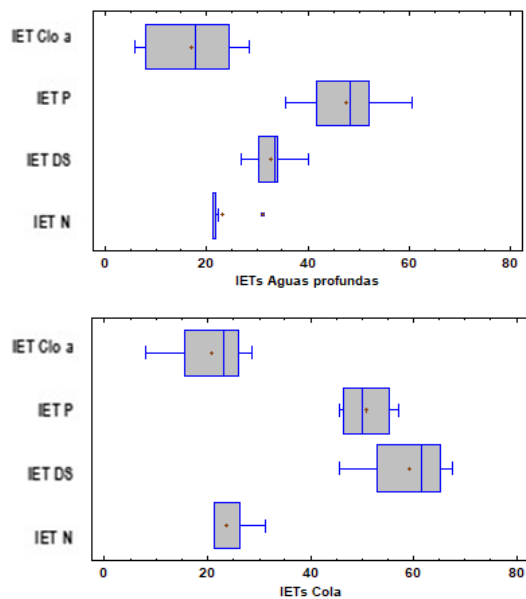


Figura 3. Comparación de los valores de los diferentes IET para las zonas de aguas más profundas (arriba) y la cola (abajo) del embalse El Nihuil

Con relación a la comparación de los valores proporcionados por cada uno de los índices para una misma zona de muestreo, el análisis de la varianza y prueba de rangos múltiples muestra diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95% entre todos los índices para la

Dadas estas diferencias halladas entre los valores de los diferentes IETs y a los fines de poder asignar correctamente una categoría trófica al embalse en su situación actual, se analiza también en los próximos apartados la composición cuali cuantitativa del fitoplancton y la diversidad del mismo.

Microflora: En los análisis tanto cuali como cuantitativos del fitoplancton solo pudo llegarse a la identificación de géneros y no de especies, por lo que los índices de diversidad calculados pueden mostrar

valores inferiores a los reales. Los géneros encontrados en cualquier punto del embalse en los

diversos muestreos y la abundancia relativa de la clase a la que pertenecen se listan en la tabla 4.

Tabla 4. Listado de géneros de microalgas hallados en el embalse El Nihuil y abundancia relativa de las clases.

Clase / Género	Abundancia relativa	Clase / Género	Abundancia relativa
Cyanophyceae		Chlorophyceae	
<i>Coccolithus sp.</i>	1 % a 7 %	<i>Ankistrodesmus sp.</i>	5 % a 12 %
<i>Gomphosphaeria sp.</i>		<i>Chlamydomonas sp.</i>	
<i>Microcoleus sp.</i>		<i>Dictyosphaerium sp.</i>	
<i>Oocystis sp.</i>	<i>Coelastrum sp.</i>		
Bacillariophyceae	56 % a 61 %	<i>Micrasterias sp.</i>	
<i>Asterionella sp.</i>		<i>Monoraphidium sp.</i>	
<i>Cyclotella sp.</i>		<i>Oedogonium sp.</i>	
<i>Cymbella sp.</i>		<i>Scenedesmus sp.</i>	
<i>Diatoma sp.</i>		<i>Zygnema sp.</i>	
<i>Fragilaria sp.</i>		Euglenophyceae	
<i>Navicula sp.</i>		<i>Euglena sp.</i>	0 % a 2 %
<i>Stephanodiscus sp.</i>		<i>Trachelomonas sp.</i>	
<i>Melosira sp.</i>		Cryptophyceae	
<i>Stauroneis sp.</i>		<i>Cryptomonas sp.</i>	6 % a 25 %
<i>Synedra sp.</i>	<i>Rhodomonas sp.</i>		
<i>Tabellaria sp.</i>	Chrysophyceae		14 % a 25 %
Dynophyceae		<i>Chrysococcus sp.</i>	
<i>Ceratium sp.</i>		<i>Chrysocromulina sp.</i>	
<i>Gymnodinium sp.</i>	6 % a 10 %	<i>Chromulina sp.</i>	
<i>Peridinium sp.</i>		<i>Dynobryon sp.</i>	

La gran mayoría de los géneros hallados corresponden a organismos propios de aguas limpias y la composición, en cantidad de géneros representados por clase, se muestra en la figura 4, con mayor diversidad en las bacilariofíceas, o diatomeas, y las clorofíceas o algas verdes. Sin embargo, en la abundancia relativa, expresada como cantidad de individuos de cada género sobre el total de individuos, aparece un claro predominio de las bacilariofíceas, constituyendo entre el 56 al 61 % de la población, con predominancia de las diatomeas centrales y, entre ellas, las del género *Cyclotella sp.*, posiblemente debido a la sensibilidad de algunas especies de este género al contenido de fósforo del agua (Kelly y Whitton, 1995).

El número total de células planctónicas hallado en los diferentes puntos de muestreo y épocas del año varió entre los 15000 y 70000 cel/L, valores considerados propios de lagos oligotróficos (Gobierno de Chile, 2016). Coincidentemente, cabe también destacar que la presencia de cianofíceas o algas verde azules, siempre presentes en cuerpos de agua eutroficados, fue muy baja en todos los muestreos. Así mismo, aún cuando *Chlamydomonas* y *Ceratium*, géneros que anteriormente produjeron

floraciones, siguen estando presentes, los recuentos se mantienen actualmente muy bajos.

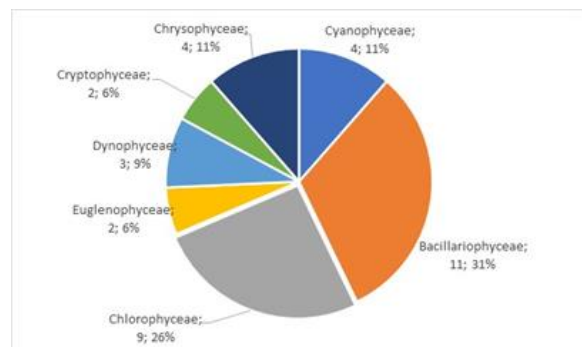


Figura 4. Composición, en cantidad de géneros de fitoplancton por clase, hallados en el embalse El Nihuil

Los índices de Shannon Weaver y de Margalef, calculados según las ecuaciones 5 y 6, sobre géneros en lugar de especies, por lo que puede esperarse valores inferiores a los reales, tomaron valores de 2,15 a 2,2 para el primero y de 2,0 a 2,2 para el segundo, indicando buena diversidad, propia también de lagos poco eutroficados.

Macroflora: A diferencia de la baja productividad a nivel de microflora, la presencia muy visible de

macrófitas en una gran extensión de la superficie del lago, hace que se lo perciba como muy eutroficado. La macroflora consiste en su totalidad de plantas vasculares acuáticas arraigadas en el fondo, incluso en las zonas de mayor profundidad. En general se trata de vegetación sumergida en la que predominan especies como el pino de agua, *Myriophyllum aquaticum*, con tallos de hasta 6 m, así como *Potamogeton* sp. y *Chara* aff. *gracilis*, por lo que en zonas someras los tallos suben hasta ras de la superficie, impidiendo la navegación, además de otras especies de vegetación emergente que en zonas aguas más someras aún, forma verdaderas islas en las que predomina la presencia de juncos y totoras de los géneros *Schoenoplectus*, *Juncus* y *Typha*. Si bien el desarrollo de esta vegetación no depende del enriquecimiento en nutrientes del agua del lago, debido a su enraizamiento en suelo, sí entorpece las actividades acuáticas y reduce la capacidad de embalse, llegando a ocupar hasta un 80 % de la superficie.

4. Conclusiones

El agua del embalse El Nihuil presenta las características físico químicas propias del río que lo alimenta, con escasa amortiguación de las variaciones estacionales y con un contenido de sales más bien elevado, en las que predominan los sulfatos y el calcio como iones salinos. Dada la ausencia de contaminación significativa de origen antrópico en el río Atuel aguas arriba del embalse, el aporte de nitrógeno es muy bajo y resulta el factor limitante en el desarrollo de fitoplancton, el cual se mantiene en valores compatibles con un cuerpo de agua muy poco eutroficado y muestra buena diversidad, en concordancia con la clasificación de lago oligotrófico que proveen los IETs basados en el contenido de clorofila a y el nitrógeno e incluso la transparencia al disco de Secchi en la zona de aguas más profundas, con escasa materia inorgánica en suspensión. Por esta razón, el elevado IET basado en el contenido de fósforo total, no debería ser tenido en cuenta para la clasificación trófica del embalse, dado que no puede influir en la proliferación de microalgas, limitada por el bajo contenido de nitrógeno.

En lo que respecta al gran desarrollo de macrófitas, aún cuando no sea provocado en forma directa por la calidad del agua en lo que se refiere a cantidad de nutrientes, dadas las dificultades que provoca para navegación y capacidad de embalse, sí deberían tomarse medidas para su control, aunque estas

deben ser, necesariamente, de naturaleza diferente de las que se requerirían para mejorar la calidad trófica del agua.

5. Agradecimientos

El presente trabajo ha contado con el financiamiento otorgado a los proyectos Tipo I por la Secretaría de Investigación, Internacionales y Posgrado (SIIP) de la Universidad Nacional de Cuyo. Proyecto: Evolución témporo - espacial de las variables hidroquímicas y flora acuática en el embalse El Nihuil - 2° etapa. El costo de obtención de las muestras en los diferentes puntos del interior del embalse en todas las campañas fue asumido por los propios investigadores participantes del proyecto.

6. Referencias

- Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro - Secretaría de Gestión Ambiental. (2011) Índices de calidad del agua y síntesis de la situación ambiental de la cuenca. [https://www.aic.gov.ar/sitio/archivos/201702/Fica/indices de calidad del agua.pdf](https://www.aic.gov.ar/sitio/archivos/201702/Fica/indices%20de%20calidad%20del%20agua.pdf)
- Balanza, M.E. y Ordóñez, A.L.. (2003). Estudios preliminares sobre floraciones algales en embalses del sur de Mendoza. IV Jornadas Ambientales Ambiental 2003 PRODEA San Juan. Argentina.
- Balanza, M.E. y otros cinco autores. (2018). Análisis aguas profundas del embalse El Nihuil. Congreso Latinoamericano de Ciencias Aplicadas. 173.-179 Vol. 5. ISBN 978-987-46333-1-6. San Rafael. Argentina. <https://fcai.uncuyo.edu.ar/memorias>
- Carlson, R.E. (1977) A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanograf.*, 22: 361-369
- Gobierno de Chile, Ministerio de Obras Públicas (2016) Análisis de fitoplancton en muestras de agua. Informe final. Realizado por Centro EULA Universidad de Concepción. ID – 1019 – 8 – LE16. Santiago. Chile. Recuperado de <https://snia.mop.gob.cl/sad/CQA5736>
- Kelly, M.G. y Whitton, B.A. (1995) The Trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. *Journal of Applied Phycology*. 7: 433 - 444
- López-Martínez, M. L, Madroñero Palacios, S.M. (2015) Estado trófico de un lago tropical de alta montaña: caso laguna de La Cocha. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina Volumen 25-2* Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/cein>
- Moreno-Franco, D.P, Quintero-Manzano, J, López. Cuevas, A. (2010) Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia, *ContactoS* 78, 25–33 Recuperado de <http://www2.izt.uam.mx/anterior/eutrofia2>

- Othaz Brida, M.A. 2020. Dinámica del fósforo en cinco embalses en cadena en la cuenca del río Limay, Norpatagonia argentina. Tesis de maestría. Universidad Nacional del Comahue, Argentina.
- Robredo, P.; Quiroga, M. y Echazú, R. (2000) Análisis comparativo de soluciones nutritivas en cultivos hidropónicos en invernadero. INENCO. Universidad Nacional de Salta. Argentina. Recuperado de <https://www.mendoza-conicet.gob.ar/trabajos>
- Santos Coello, B. y Ríos Mesa, D. (2016) Cálculo de soluciones nutritivas en suelo y sin suelo. Servicio de Agricultura y Desarrollo Rural. Cabildo Insular de Tenerife. España. ISBN: 978-84-15012-87-0. <https://www.agrocabildo.org./Publicaciones/otros>