

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“EFECTO DE LA ADITIVACIÓN DE  
ÁCIDOS HÚMICOS O HIDROLIZADOS DE  
LODOS EN LAS PROPIEDADES DE FILMS  
DE GELATINA”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**PAULA MARÍA VALENZUELA GARCÍA**

**JULIO, 2017**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



**PROFESOR TUTOR:**

Dr. D. Sergio Collado Alonso (Universidad de Oviedo)  
Dr. D<sup>a</sup>. Paula Oulego Blanco (Universidad de Oviedo)  
Dr. D. Ismael Marcet (Universidad de Oviedo)

**CERTIFICA:**

Que D. **Paula Valenzuela García** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11<sup>a</sup> promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 13 de julio de 2017

D. Sergio Collado A.

D<sup>a</sup>. Paula Oulego B.

D. Ismael Marcet

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy gracias a Dios por la oportunidad que me dio de venir aquí a estudiar el máster y por todo lo que pude vivir en este tiempo. A mi familia, por su apoyo durante todo este tiempo incluso estando fuera de casa.

Agradezco la ayuda de mis tutores, a Ismael por estar tan pendiente durante toda la experimentación y análisis de las pruebas, sus explicaciones, tiempo y ayuda fueron de gran importancia para el desarrollo de este trabajo. A Sergio y a Paula, por su apoyo durante el proceso del trabajo con los lodos, durante el análisis de los datos y sus consejos durante la preparación de esta memoria.

A mis compañeros de clase y del laboratorio, su compañía y apoyo durante este tiempo fueron vitales para tener un buen ambiente de trabajo y lograr tener buenos momentos durante todas las horas invertidas.

# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	3
	A. Films .....	3
	B. Composición .....	4
	1. Proteínas .....	4
	2. Polisacáridos .....	9
	3. Lípidos.....	10
	4. Otros componentes.....	11
	C. Otros aditivos potenciales.....	12
	1. Ácidos húmicos .....	12
	2. Hidrolizado de lodo.....	15
III.	METODOLOGÍA .....	18
	A. Films .....	18
	1. Preparación de hidrolizados de lodo.....	18
	2. Preparación de films.....	18
	3. Capacidad para formar films.....	19
	4. Caracterización.....	19
	B. Hidrolizado .....	23
	1. Lodo inicial .....	23
	2. Método de hidrólisis.....	23
	3. Toma de muestras.....	24
	4. Determinación de tiempo óptimo de tratamiento.....	24
	5. Análisis proximales .....	25
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
	A. Formulación del film control.....	28

B.	Caracterización films de gelatina con ácidos húmicos.....	28
1.	Apariencia .....	28
2.	Propiedades físicas .....	31
3.	Propiedades químicas .....	33
4.	Propiedades estructurales .....	35
C.	Caracterización films aditivados con hidrolizado de lodos.....	42
1.	Apariencia .....	42
2.	Propiedades físicas .....	45
3.	Propiedades químicas .....	46
4.	Propiedades estructurales .....	48
D.	Comparación entre films aditivados con ácidos húmicos o hidrolizado .....	55
E.	Otras pruebas con hidrolizado de lodos .....	56
V.	CONCLUSIONES .....	59
VI.	BIBLIOGRAFÍA .....	61
VII.	ANEXOS .....	66
A.	Glicerol.....	66
B.	Caracterización del proceso de hidrolizado de lodos mediante oxidación húmeda	67
1.	Características físicas.....	67
2.	Productos solubles en hidrolizados.....	71
C.	Método DPPH.....	73

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar los efectos que tienen distintos aditivos en las propiedades de films de gelatina, se realizó una aditivación con ácidos húmicos e hidrolizado de lodos de un film control con un 3% de gelatina y 25% de glicerol. Se ensayaron concentraciones de cada aditivo del 1%, 2% y 3% y se observaron los efectos en las propiedades físicas, químicas, estructurales y apariencia de los films.

Con la aditivación de ácidos húmicos se obtuvieron efectos de mejora en las propiedades físicas, específicamente en solubilidad y en texturometría, en las propiedades químicas y en la apariencia de los films. La fuerza de punción y la elongación en punción mostraron mejores resultados que los films sin aditivos, indicando que los ácidos húmicos mejoran la propiedad de resistencia y extensibilidad al film. Esto mismo se ve con los valores del grosor del film. Se vieron también mejoras en la transmitancia del film y en la barrera de luz UV para los films aditivados con ácidos húmicos, pudiendo actuar como mejor opción de envoltorio para alimentos sensibles a la luz. En cuanto a las propiedades químicas, se obtuvo un incremento en la capacidad antioxidante en los films, proveyéndole la capacidad de secuestrar radicales libres.

En cambio, la aditivación de hidrolizado tuvo efectos menos positivos en las propiedades de los films. El hidrolizado de lodo no modificó el grosor de los films, presentando así una red bastante homogénea, que también se pudo observar en las vistas microscópicas de la morfología de los films. En cuanto a las propiedades químicas, también se observó un aumento en la capacidad antioxidante, pero menos acusado que en el caso de los ácidos húmicos. El efecto en las propiedades mecánicas del film no fue una mejora sino que se vio un efecto contrario, resultando en films más débiles. De la misma manera, la solubilidad de los films fue mayor a los films control y su higroscopicidad también se vio afectada.

En las propiedades estructurales de ambos tipos de film, los efectos que se observaron fueron ligeramente positivos, no difieren en gran manera de los films sin aditivos, la morfología es muy similar al igual que la estabilidad. Conforme aumenta la concentración de aditivo en los films, el tiempo de descomposición del material es menor, pero aun así muestran estabilidad en un rango de temperatura cercano a los films de gelatina sin aditivos.

## ABSTRACT

In order to evaluate the effects that different additives have over gelatin based films' properties, humic acids and hydrolyzed sludge were incorporated to a control film with 3% of gelatin and 25% of glycerol. Different tests were carried out with the additives in different concentrations, 1%, 2%, and 3% and the effects were evaluated in the physical, chemical, and structural properties.

Humic acids addition showed better effects on physical properties, specifically in solubility and mechanical properties, in chemical properties, and in transparency of the films. A significant better effect was showed on the puncture strength and elongation at break, indicating that humic acids improve resistance and extensibility of the film. The same effect occurred with the thickness of the films. Film's transmittance was also improved, as well as the UV light barrier, presenting the possibility to use these films as wrappers for light sensitive foods. In the chemical properties' evaluation, there was an increase on antioxidant capacity in films, providing the film the capacity to scavenge free radicals.

The hydrolyzed sludge, however, showed less positive effects of the films' properties. The hydrolyzed sludge did not affect on the films' thickness, presenting a very smooth and homogeneous matrix, which could also was observed in the microscopy scans (SEM). In the chemical properties' evaluation, there was also an increase on antioxidant capacity in films, but less profound than the humic acids' effect. The effect on mechanical properties was not positive, but on the contrary, it resulted on slightly weak films. On that same subject, film solubility was even lower than the control, it did not improve this specific property, and also hygroscopicity was also affected.

Structural properties were affected on both type of films, slightly positive effects were showed but they did not differ from the control films on a big scale, morphology was really similar as well as the stability. Stability of the films was slightly affected, film decomposition increases as the additive concentration increases as well, but the film still presents stability like the gelatin based film.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organización de las cadenas de gelatina.....	7
Figura 2: esquema de la estructura de films de gelatina. a) espiral amorfa; b) triple hélice y espiral; c) conjunto de triple hélices y espirales. (adaptado de Duconseille, 2015) .....	8
Figura 3: modelo de estructura de ácidos húmicos .....	13
Figura 4: Comportamiento de las moléculas de ácidos húmicos en condiciones alcalinas y el proceso de agregación con la reducción de pH. A) pH alcalino: repulsión de cargas, B) disminución de pH: agregación intramolecular, C) disminución de pH: agregación intermolecular, D) pH ácido: precipitación.....	14
Figura 5: comparación de grosor de films, C: control, 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de ácidos húmicos en el biofilm .....	29
Figura 6: Transmitancia de luz (T, %) a longitud de onda 200-800nm de films con ácidos húmicos .....	30
Figura 7: color de los films con ácidos húmicos. a) control, b) 1% ácidos húmicos, c) 2% ácidos húmicos, d) 3% ácidos húmicos .....	31
Figura 8: Propiedades físicas de los films adicionados con ácidos húmicos .....	32
Figura 9: capacidad antioxidante de ácidos húmicos a distintas concentraciones según análisis ABTS .....	34
Figura 10: Microscopía electrónica de barrido de la sección transversal de: a) film de gelatina (control), b) film con 1% ácidos húmicos, c) film con 2% de ácidos húmicos, d) film con 3% de ácidos húmicos.....	36
Figura 11: espectro FTIR entre 600 y 4000 $\text{cm}^{-1}$ de los biofilms y sus componentes .....	37
Figura 12: Curvas TGA (—) y DTG (—) de film de gelatina y films aditivados con ácidos húmicos: a) film control, b) film con 1% ácidos húmicos, c) film con 2% ácidos húmicos, d) film con 3% ácidos húmicos.....	40
Figura 13: grosor y transparencia de los films adicionados con hidrolizado .....	43
Figura 14: Transmisión de luz (T, %) a longitud de onda 200-80nm de films con hidrolizados .....	44
Figura 15: color de los films con hidrolizado, a) control (gelatina), b) 1% hidrolizado, c) 2% hidrolizado, d) 3% hidrolizado .....	44
Figura 16: Propiedades físicas de films de gelatina con hidrolizado.....	46
Figura 17: capacidad antioxidante de hidrolizado de lodos a distintas concentraciones según análisis ABTS.....	47

Figura 18: Microscopía electrónica de barrido de la sección transversal de: a) film de gelatina (control), b) film con 1% hidrolizado, c) film con 2% de hidrolizado, d) film con 3% de hidrolizado .....	49
Figura 19: a) espectro FTIR entre 600 y 4000cm <sup>-1</sup> de biofilms aditivados con hidrolizado de lodos y sus componentes — glicerol, — gelatina, — hidrolizado, — control, —1% hidrolizado, — 2% hidrolizado, —3% hidrolizado. b) detalle del espectro FTIR entre 600 y 4000 cm <sup>-1</sup> del hidrolizado del lodo .....	50
Figura 20: Curvas TGA (—) y DTG (—) del film de gelatina y los films aditivados con hidrolizado: a) film control, b) film con 1% hidrolizado, c) film con 2% hidrolizado, d) film con 3% hidrolizado .....	53
Figura 21: films de gelatina al 3% con distintas concentraciones de glicerol. a) 40% glicerol, b) 35% glicerol, c) 30% glicerol, d) 25% glicerol .....	66
Figura 22: pH de los lodos a lo largo del tratamiento .....	67
Figura 23: desarrollo del color durante el tratamiento hidrotérmico .....	68
Figura 24: color en el sobrenadante del hidrolizado de lodos a 140°C por 120min .....	68
Figura 25: evolución de la DQOt durante el tratamiento hidrotérmico .....	69
Figura 26: DQO soluble durante el tratamiento hidrotérmico.....	69
Figura 27: evolución de sólidos totales y sólidos volátiles durante el tratamiento hidrotérmico.....	70
Figura 28: volumen ocupado por el lodo en cada muestra tomada (inicial y en tiempos creciente de izquierda a derecha) tras 30 minutos en reposo .....	71
Figura 29: concentración de proteínas y ácidos húmicos durante el tratamiento hidrotérmico.....	72
Figura 30: prueba DPPH para films con ácidos húmicos .....	73
Figura 31: prueba DPPH para films con hidrolizado de lodo .....	74

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: condiciones iniciales del lodo utilizado .....	23
Tabla 2: condiciones durante el tratamiento oxidativo húmedo .....	24
Tabla 3: Grosor y transparencia de films con ácidos húmicos.....	29
Tabla 4: Humedad, solubilidad del film, fuerza de punción (PS), deformación en punción (PD) de films con ácidos húmicos .....	31
Tabla 5: Actividad antioxidante: ABTS, quelación ion férrico de films con ácidos húmicos .....	33
Tabla 6: Datos termogravimétricos de los diferentes films .....	40
Tabla 7: Grosor y transparencia de los films con hidrolizado .....	42
Tabla 8: Humedad, solubilidad del film, fuerza de punción (PS), deformación en punción (PD) y transparencia de los films con hidrolizado.....	45
Tabla 9: Actividad antioxidante: ABTS, quelación ion férrico de films con hidrolizados ....	46
Tabla 10: Propiedades termogravimétricas de los films de gelatina aditivados con hidrolizado de lodo.....	53
Tabla 11: Efecto de aditivos en films de gelatina .....	55
Tabla 12: composición de disoluciones de biopolímeros obtenidos a partir del lodo .....	56
Tabla 13: capacidad de formación de films de lodos con distintos tratamientos.....	57

# I. INTRODUCCIÓN

Los productos alimentarios están expuestos a deshidratación, deterioro, cambios en su apariencia, color, sabor y valor nutricional durante los procesos de manejo, almacenamiento y transporte. Por ello, es importante encontrar embalajes que provean una barrera a gases, luz, vapor de agua y más, y protejan a los ingredientes susceptibles a la oxidación. En los últimos años y con el interés de aumentar la vida de anaquel de los alimentos y mantener su calidad, se han buscado nuevas opciones de embalaje que permitan además la incorporación de agentes funcionales como antioxidantes, antimicrobianos, sustancias químicas, compuestos fitoquímicos, enzimas, péptidos o microorganismos vivos que prevengan, por ejemplo, el crecimiento microbiano o la oxidación de lípidos.

Los envases tradicionales basados en polímeros han demostrado su ligereza, versatilidad y economía de costes, aunque la industria del embalaje apuesta cada vez más por materiales más sofisticados y a la vez más sostenibles, elaborados a partir de fuentes renovables, para reducir el impacto ambiental.

En años recientes, ha aumentado el interés por alimentos de alta calidad, los gobiernos han exigido la reducción de residuos de empaque y ha habido demanda en marketing para nuevos productos. Estos tres factores han hecho que se busque bioempaques económicos, fáciles de fabricar y biodegradables. Otros factores importantes que influyen en la viabilidad comercial de un biofilm son el perfil nutritivo, la composición, la vida útil y el color, entre otros. Por todas estas razones, la industria de los alimentos necesita buscar y mejorar los sistemas de empaques y desarrollar materiales que provean propiedades funcionales para mantener la calidad de los productos.

Los biofilms no sólo reducen la permeabilidad e intercambio de moléculas con el ambiente, sino que además son un excelente vehículo para la incorporación de agentes antimicrobianos naturales que garantizan la seguridad alimenticia sin contribuir a la contaminación ambiental. Por ejemplo, las propiedades antioxidantes en los biofilms permiten mejorar la conservación de los alimentos. El uso de compuestos no tóxicos con propiedades antioxidantes mejora la calidad y prolongan la vida del producto, además de

evitar la formación de compuestos de degradación en el material de envasado que pueden llegar a producir olores y sabores indeseables en el alimento. El propósito de esta actividad antioxidante es que retarde o inhiba los procesos de deterioro por radicales libres y oxidación, que pueden presentarse en los componentes de los alimentos.

Los ácidos húmicos contienen grupos funcionales que proveen mejoras en propiedades de plantas, formación de complejos con metales pesados, actividad antiviral y antiinflamatoria. La presencia de fenoles, ácidos carboxílicos y quinonas aportan actividad antioxidante, antimutagénica/desmutagénica y fungicida/bactericida, propiedades muy interesantes a la hora de formular un biofilm (Ferrara, 2006). Es por este motivo que la aditivación de ácidos húmicos fue una propuesta para generar films de gelatina con mejores propiedades.

Con este mismo propósito, se decidió tomar también en cuenta los lodos obtenidos de la industria alimentaria como potencial aditivo para biofilms. Debido a su variada composición de sólidos, los lodos pueden generar disoluciones con gran carga de biopolímeros como proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos, que podrían ser utilizados como agentes constitutivos de films. Por su composición de ácidos húmicos, la actividad antioxidante que pueden presentar los lodos podría constituir un uso secundario de estos residuos.

Este tipo de films podría aplicarse en una diversidad de sistemas alimentarios con altos contenidos de lípidos (como oleaginosas; productos deshidratados como la leche en polvo, formulados donde se han incorporado lípidos omegas como ingrediente, cereales para desayuno, galletas, barras energéticas o cualquier alimento rico en aceites poliinsaturados), que pueden ser susceptibles de oxidación y modificar las propiedades funcionales, así como derivar en la pérdida del valor nutricional o generar compuestos tóxicos, además de olor o color desagradables.

## II. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

Actualmente la mayor parte de films, empaques y envoltorios están hechos de materiales plásticos, debido a su fácil procesamiento, durabilidad y bajos costos. Sin embargo la acumulación de éstos debido a su alta resistencia a la degradación han hecho que estudios recientes se esfuercen en desarrollar empaques biodegradables que sean compatibles con el medio.

### A. Films

Los biofilms y recubrimientos comestibles representan una alternativa de empaque sin costos ambientales y sin efectos adversos sobre la salud. Un biofilm es una matriz continua elaborada con sustancias poliméricas que funciona como barrera, la cual puede además almacenar ciertos compuestos deseados (Xu, 2009).

Los biofilms han presentado un gran potencial en la última década por su gran versatilidad de uso en industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, medicina y biotecnología en general. Los films han permitido generar distintas opciones de alternativa en almacenamiento, vehículo y en muchas industrias debido a sus propiedades funcionales. Polisacáridos y proteínas derivados de diferentes fuentes, son los materiales constitutivos de los biofilms más estudiados por las características que le proporcionan, y la adición de componentes lipídicos.

Algunas de las funciones más importante de los biofilms son proveer una barrera a los gases y vapor de agua, proteger ingredientes susceptibles de oxidación, incorporar agentes funcionales como antimicrobianos, antioxidantes, probióticos y mejorar las propiedades mecánicas de manejo.

El uso de biofilms en aplicaciones alimentarias y en especial en productos altamente perecederos, como los pertenecientes a la cadena hortofrutícola permiten conservar los parámetros de calidad de diferentes factores como aceptabilidad comercial, pérdida de peso, firmeza, color de la superficie del alimento, y calidad nutritiva (Viña *et al.*, 2007).

Los biopolímeros pueden ser categorizados según su constituyente principal en la formulación: polisacáridos, lípidos, proteínas y poliésteres. La formación de films involucra asociaciones intermoleculares e intramoleculares o reticulación entre cadenas poliméricas para formar matrices tridimensionales semirígidas que atrapan e inmovilizan al disolvente (Margquié, 1995). La reticulación es un proceso de formación de redes tridimensionales al unir cadenas poliméricas mediante enlaces covalentes o no covalentes. Los procesos de reticulación son muy importantes en films a base de polisacáridos y proteínas y para recubrimientos que se aplican a superficies de alimentos, mejorando su resistencia al agua, así como también a sus propiedades mecánicas y de barrera. Los componentes utilizados para reticulación en contacto con alimentos deben presentar una baja toxicidad. (Azeredo, 2016)

El grado de cohesión del film depende de la estructura biopolimérica, del procedimiento de preparación, de parámetros físicos (temperatura, presión, tipo de disolvente y dilución, técnica de evaporación de disolvente, técnica de aplicación) y de la presencia de plastificantes y aditivos de reticulación. A este respecto, las proteínas ofrecen un potencial alto para formar numerosos enlaces. (Margquié, 1995)

## B. Composición

### 1. Proteínas

Las propiedades inherentes de las proteínas hacen que sean excelentes polímeros para producir films. Las más utilizadas para formar films son gluten de trigo, aislado de proteína de suero, caseinato y proteína de soya. (Rezvani, 2013).

Se obtienen mejores rendimientos si se escogen proteínas de baja solubilidad (como zeína de maíz, gluten de trigo y proteínas miofibrilares animales) usando reticulación o añadiendo compuestos lipídicos. (Margquié, 1995)

Los films de proteínas tienen propiedades mecánicas y ópticas adecuadas, forman buenas barreras frente a aromas, gases y lípidos, y también pueden adherirse a superficies de frutas o vegetales, pero son sensibles a la humedad y presentan pobres barreras frente al vapor de agua. (Rezvani, 2013)

Asimismo, los films a base de proteínas pueden funcionar como excelentes vehículos para incorporar una gran variedad de aditivos como nutrientes, antioxidantes, antimicrobiales, antifúngicos y sabores. (Guadipati, 2013)

Las proteínas también pueden ser utilizadas para coberturas de frutas y vegetales frescos. Los bioplásticos hechos de gelatina son resistentes, transparentes y fácil de manejo. Según estudios realizados, la adición de gelatina al gluten de trigo o celulosa-acetato-ftalato han mejorado las propiedades mecánicas de los films. (Matta, 2012)

Los films a base de proteína son estabilizados a través de interacciones electroestáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, puentes covalentes y puentes disulfuro. (Rezvani, 2013)

Normalmente, el grupo hidroxilo de las macromoléculas (proteínas y polisacáridos), se une al agua a través de puentes de hidrógeno, resultando en la plastificación de matrices poliméricas alterando sus propiedades mecánicas y de barrera. Tanto la naturaleza química de las macromoléculas como las características estructurales/morfológicas de la matriz polimérica, las características del permeante, la naturaleza química de los aditivos y el grado de reticulación, afectan a las características de barrera. Las matrices formadas por cadenas simples y lineares se asocian más estrechamente y conllevan a films con baja permeabilidad, mientras que las cadenas poliméricas formadas por grupos laterales pesados conducen a matrices menos compactas y a una alta permeabilidad al vapor de agua. (Carvalho, 2003)

La introducción de enlaces cruzados dentro o entre cadenas gelatinosas mediante vía enzimática o modificación química, puede ser una alternativa para obtener una matriz polimérica con mejor estructura y un polímero ordenado formando una matriz podría resultar en mejores propiedades funcionales del film. (Carvalho, 2003)

Los enlaces químicos responsables de la integridad de los films proteicos involucran enlaces de hidrógeno, iónico, hidrofóbicos y covalentes. No obstante, las proteínas, por sí solas forman films con baja flexibilidad, de tal forma que el film es tan frágil que no puede soportar el estrés mecánico como material de empaque. Por consiguiente, plastificantes

como glicerol son añadidos para mejorar la flexibilidad de los films de proteínas al debilitar los enlaces de hidrógeno. Los plastificantes disminuyen las atracciones intermoleculares entre cadenas de polímeros adyacentes y aumentan la flexibilidad de los films. No obstante, una de las desventajas de usar plastificantes es que aumentan la penetración de la humedad a través de los films proteicos. Las propiedades de esos films pueden mejorarse utilizando agentes de reticulación con químicos o reacciones enzimáticas. La adición de un agente de reticulación como formaldehído a un film de zeína puede reducir su permeabilidad de agua y mejorar su fuerza de tensión. (Ho, 2004)

#### a. Gelatina

La gelatina es un material proteináceo soluble en agua, de origen animal que se obtiene por hidrólisis parcial del colágeno. Este biopolímero consiste de proteínas (82.92%), sales minerales y agua. Las fuentes más abundantes de producción de gelatina son piel de cerdo (46%), pieles de bovino (29.4%), huesos de reses y cerdo (23.1%) y pescado (<1.5%) (Fakhouri, 2013).

La gelatina se obtiene por desnaturalización térmica o degradación fisicoquímica del colágeno, vía hidrólisis ácida o básica utilizando un catalizador. Dependiendo de la materia prima utilizada (fuente y edad del animal), el colágeno no tiene exactamente la misma estructura, composición y propiedades y la gelatina tampoco. Tanto así, que se han encontrado 28 tipos diferentes de colágeno, proveyendo un gran diversidad de gelatinas, con propiedades físicas y composición química muy variada. (Fakhouri, 2013)

Durante el proceso de formación de gelatina, las proteínas son extraídas de la piel y huesos por baños ácidos o alcalinos y pretratamientos térmicos. Se utiliza un proceso térmico para separar proteínas del resto de materias primas. Dependiendo del proceso de manufactura, el extracto es desionizado, esterilizado y secado. El producto seco obtenido es la gelatina. Existen dos tipos de gelatina, A y B, producidos de pretratamientos ácido y alcalino respectivamente. (Fakhouri, 2013)

La gelatina es biodegradable y biocompatible, presenta propiedades hemostáticas y no es inmunogénica. La gelatina puede disolverse en agua y formar disoluciones de baja viscosidad a temperatura por encima de 35°C, pero pasa a una disolución-gel cuando

enfriá, formando geles. La gelificación involucra la transición conformacional de una parte de las cadenas de gelatina de un estado en espiral aleatorio a estructuras con forma de triple hélice del colágeno. (Coimbra, 2014)

### 1) Estructura de la gelatina

El colágeno está compuesto por tres cadenas  $\alpha$  que forman una estructura de triple hélice pero durante el proceso de formación de la gelatina, el colágeno es desnaturalizado y pierde su estructura original. Las fibras de colágeno que forman hélices pierden su estructura durante el calentamiento y recuperan parcialmente su estructura durante el enfriamiento. El agua queda atrapada entre las cadenas y la gelatina forma un gel. La estructura de la gelatina es diferente a la del colágeno porque sus hélices están parcialmente reformadas. (Duconseille, 2015)

La gelatina presenta la propiedad de formar geles termorreversibles después de calentar, disolver y enfriar, ya que forma redes tridimensionales con zonas intermoleculares microcristalinas (Fakhouri, 2013). El mecanismo detrás de la formación de geles de gelatina involucra combinaciones iónicas entre grupos amino y carboxilo de sus aminoácidos, con el apoyo de los enlaces de hidrógeno. (Matta, 2012)

La estructura de la gelatina cambia durante la gelificación. Según el estado del gel, las cadenas tienen distintos arreglos de sitio y diferentes interacciones. Estas dos características dependen de la concentración de gelatina, temperatura y la energía necesaria para formar una estructura secundaria. (Figura 1)

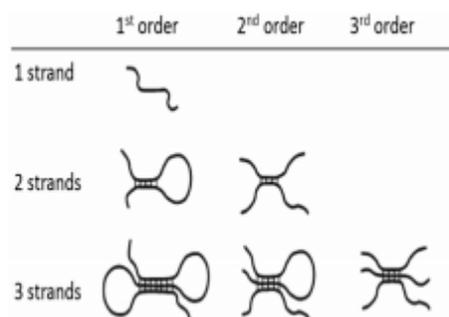


Figura 1: Organización de las cadenas de gelatina

Se generan tres órdenes de reacción diferentes; el primer orden es donde sólo hay una  $\alpha$ -cadena en la estructura. El segundo orden es utilizado para presentar reacciones con dos  $\alpha$ -cadenas diferentes y el tercer orden incluye tres  $\alpha$ -cadenas diferentes. Las estructuras formadas son reversibles y estables sólo si tienen la longitud mínima, indicando que estas hélices son estabilizadas por enlaces débiles. Por ejemplo, si una hélice es muy corta, fácilmente se derrite. (Duconseille, 2015)

Según Coppola, Djabourov & Ferrand (2012), el film de gelatina puede tener tres estados de estructuras diferentes: el estado amorfo corresponde a la estructura de espiral con cadenas primarias, el estado semi-cristalizado está compuesto de una estructura de triple hélice y un espiral, y el estado cristalizado corresponde al empaquetamiento de triple hélices y estructura de espiral. (Figura 2)

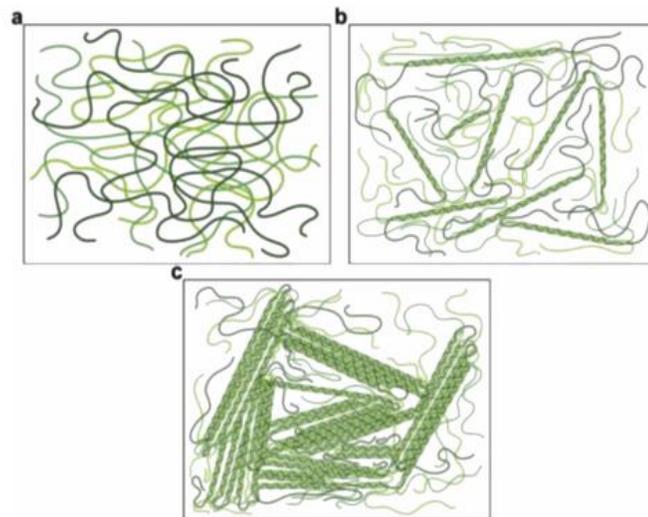


Figura 2: esquema de la estructura de films de gelatina. a) espiral amorfa; b) triple hélice y espiral; c) conjunto de triple hélices y espirales. (adaptado de Duconseille, 2015)

Estos tres estados dependen de la velocidad de secado de los films de gelatina. El estado amorfo se obtiene cuando los films de gelatina se secan rápidamente, mientras que el estado cristalizado corresponde a una velocidad de secado lenta. El grosor de los films

afecta a la velocidad de secado y tiene un impacto en la disposición espacial de las moléculas. (Duconseille, 2015)

La estructura de la gelatina cambia con la humedad, temperatura, concentración y contenido de varias sustancias en la gelatina. La nucleación de cadenas de gelatina es muy sensible a la concentración de la gelatina durante el paso de enfriamiento. La estructura también se ve influenciada por la distribución del peso molecular de las cadenas de gelatina. Su estructura es tan compleja porque está influenciada por muchos factores (Duconseille, 2015)

Las ventajas de la gelatina para formar films son sus buenas propiedades mecánicas, bajo costo de producción a gran escala, eficientes propiedades de barrera hacia lípidos, capacidad formadora de films, biodegradabilidad y fácil eliminación. Sus mayores impedimentos son su alta capacidad de adsorción de agua que resulta en hinchazón del film, que se disuelve durante el contacto con material acuoso, y las pobres propiedades de barrera frente a la humedad. (Mihaly, 2005)

Los films formados sólo con gelatina pueden ser susceptibles a romperse por la alta densidad de energía cohesiva de las proteínas o si el sistema de formación del gel se deshidrata. Es por eso que se utilizan plastificantes para mejorar la flexibilidad, extensibilidad y dispensabilidad de los films. Uno de los plastificantes más utilizados en films de gelatina es el glicerol; éste reduce las interacciones inter-cadena y así modula propiedades funcionales macroscópicas de los films para aplicación específica. Estudios previos de los efectos del glicerol en los films de la gelatina han demostrado que las propiedades funcionales (propiedades mecánicas, propiedades de barrera) de los films dependen del contenido de glicerol. (Liu, 2017)

## 2. Polisacáridos

Los polisacáridos más utilizados para formar films son almidón, carrageninas, pectinas, alginatos, carboximetilcelulosa y quitosano. (Rezvani, 2013)

Los films de almidón proveen una mínima barrera a la humedad, debido a las propiedades hidrofílicas de sus polímeros. Los films de polisacáridos tienen buenas

propiedades mecánicas y ópticas, pero al igual que las proteínas éstos presentan pobres barreras al vapor de agua. Por ello, generalmente se formulan los films con varios biopolímeros; por ejemplo, un componente lipídico en el film funciona como una buena barrera de permeabilidad de vapor de agua, mientras que los polisacáridos y las proteínas funcionan como barreras de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ) efectivas. (Al-Hassan, 2012)

La combinación de proteínas y polisacáridos crean compuestos con propiedades altamente mejoradas, ya que los dos componentes proveen ventajas y compensan las desventajas de cada uno. Las funciones de espesamiento y gelificación de polisacáridos en la fase líquida proveen excelentes características adicionales a la solución de mezcla del film y mejoran su estabilidad. (Hongyang, 2014) Además, los dos componentes tienen efectos sinérgicos, que dotan al compuesto con características funcionales superiores.

Varios estudios han investigado el uso de sorbitol y glicerol como plastificantes en la formación de films a base de almidón o gelatina. Vanin *et al.* (2005) concluyeron que el glicerol es compatible con la gelatina y presenta los mayores efectos plastificantes en las propiedades mecánicas en la producción de films flexibles y fáciles de manejar sin separación de fases. (Al-Hassan, 2012)

### 3. Lípidos

Los lípidos, en los films, ofrecen altas propiedades de barrera de agua; no obstante, forman films frágiles causando condiciones anaeróbicas a temperaturas de almacenamiento altas y no se adhieren a superficies hidrofílicas. (Colla, 2006) Por ello, los lípidos usualmente son añadidos a films o a disoluciones para formar films en pequeña proporción. Así, los ácidos grasos y alcoholes, glicéridos acetilados, ceras, lacas y aceites se han utilizado como aditivos en la formulación para reducir la pérdida de humedad, mejorar el control de desecación o para prevenir la pérdida de sabor; éstos se han previsto como coberturas que actúan como barrera o como films comestibles. (Basiak, 2016)

Los films de proteínas-lípidos (o polisacáridos-lípidos) pueden ser formados por dos métodos. Uno de ellos es la preparación de una emulsión de complejo proteína-lípido por un tratamiento físico (por ejemplo homogenización) y luego la creación del film mediante recubrimiento y secado. Otro método es la formación de un film laminado (el lípido como

una capa distintiva entre o por encima del film biopolimérico). Generalmente, los films de bicapas o multicapas muestran mejores propiedades mecánicas y de resistencia en comparación con los films de una capa formados por emulsión (el lípido disperso uniformemente a través de toda la estructura del film). No obstante, la tecnología para crear films bicapa o multicapa es más compleja y lleva más tiempo. Los diferentes disolventes utilizados y el tratamiento de alta temperatura del proceso de producción aumentan el coste mientras disminuyen la seguridad de esos films comparados con los films formados por emulsión. Además, existe una mayor tensión superficial entre las diferentes capas, resultando en su separación. Únicamente un solo paso es necesario para formar un film de recubrimiento por emulsión y las propiedades emulsificantes de las proteínas aisladas ayudan a formar un film con mejores cualidades a menor costo. (Hongyang, 2014)

En los films emulsionados, el tamaño de partícula del lípido tiene una gran influencia en la permeabilidad del vapor de agua. La eficiencia de la barrera aumenta con el descenso del tamaño del glóbulo lipídico y con la distribución homogénea de sustancias hidrofóbicas. Por consiguiente, la velocidad de mezcla durante el proceso de emulsión puede considerarse como un factor importante para obtener films homogéneos y tiene una gran influencia en su funcionamiento. (Colla, 2006)

El uso de mezclas naturales de proteínas, polisacáridos y lípidos, obtenidos de fuentes agrícolas, aprovecha cada componente en el sistema original y demuestra ser una oportunidad nueva para materiales de films comestibles. (Colla, 2006)

#### 4. Otros componentes

Las propiedades funcionales, organolépticas, nutricionales y mecánicas de los films pueden ser modificadas también por adición de otros materiales en mínimas cantidades. Por ejemplo, la adición de plastificantes y surfactantes. Los surfactantes reducen la tensión superficial de la solución y mejoran la humectabilidad y adhesión del film, controlan la permeabilidad del vapor de agua. (Rezyani, 2013)

Las proteínas están involucradas en varios tipos de reacciones de reticulación, ya que sus grupos amino son fuertemente nucleófilos. Existen varios agentes de reticulación para proteínas y polisacáridos, que difieren en mecanismos, especificaciones y efectos. Los más

utilizados para films de proteínas son los aldehídos. Los efectos reportados de films de proteínas con aldehídos incluyen la mejora a resistencia al agua (para films de caseinato), que ha sido atribuido a espacio molecular reducido disponible para que las moléculas de agua penetren la matriz, propiedades de barrera mejoradas y cambios positivos en las propiedades de tensión. (Azeredo, 2016)

El valor de pH del medio ha sido demostrado como un factor clave para la reticulación con aldehídos, ya que determina el grado de protonación de los grupos amino. Farris, Song y Huang (2010) investigaron los grupos funcionales involucrados en la formación de redes con gelatina y glutaraldehído. Al aumentar el pH, los grupos amino son desprotonados, así que más grupos aminos libres están disponibles para la reacción. Si disminuye el pH, la cantidad de grupos amino protonados aumenta, reduciendo así la posibilidad de formar redes. (Azeredo, 2016)

### C. Otros aditivos potenciales

#### 1. Ácidos húmicos

Los ácidos húmicos son macromoléculas que comprenden las sustancias húmicas (HS), que son la materia orgánica distribuida en el suelo terrestre, agua natural y sedimentos resultantes del decaimiento de los residuos naturales y vegetales. Los ácidos húmicos (HA) son fracciones de las sustancias húmicas que son solubles en medios alcalinos, parcialmente solubles e insolubles en medios ácidos. Este parámetro de clasificación varía con la composición, pH y fuerza iónica de los ácidos húmicos. Debido a su carácter anfifílico, los ácidos húmicos forman estructuras con forma de micelas, llamadas pseudomicelas neutras en condiciones ácidas. (Gomes, 2016)

##### a. Características y propiedades

Los ácidos húmicos contienen diferentes grupos funcionales cuyas cantidades dependen del origen, clima, edad y condiciones ambientales de extracción/producción de HAs. Las diferentes funciones se atribuyen principalmente a los grupos funcionales fenólicos y carboxílicos. Estos compuestos proveen una mejora de crecimiento y nutrición en plantas, formación de complejos con metales pesados, actividad antiviral y

antiinflamatoria. Según estudios recientes hechos por Ferrara (2006) y Khil'ko (2011), la presencia de fenoles, ácidos carboxílicos y quinonas aportan actividad antioxidante, antimutagénica/desmutagénica y fungicida/bactericida, propiedades muy interesantes a la hora de formular un biofilm.

Los ácidos húmicos están compuestos principalmente de grupos fenólicos, ácidos carboxílicos, enólicos, quinonas y grupos éter, pero pueden también contener azúcares y péptidos. Sin embargo, los fenoles y ácidos carboxílicos son prevalentes. La extensa estructura de la molécula de ácidos húmicos está compuesta por porciones hidrofílicas, que consisten de grupos OH y por porciones hidrofóbicas que consisten de cadenas alifáticas y anillos aromáticos.

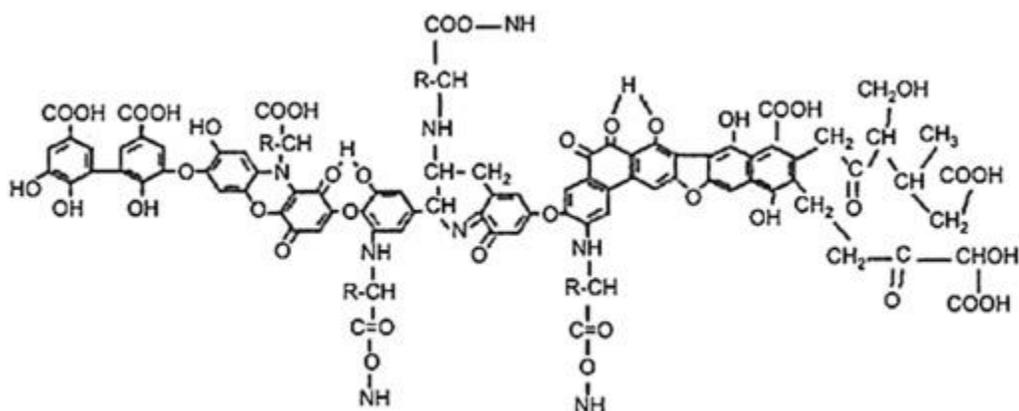


Figura 3: modelo de estructura de ácidos húmicos

Los grupos fenólicos y carboxílicos son responsables del bajo carácter ácido de los ácidos húmicos. Las quinonas son grupos aceptores de electrones y son responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Son reducidas a semiquinonas, que son estabilizadas por los anillos aromáticos y luego reducidas a hidroquinonas que son aún más estables. Según los estudios de Aeschbacher *et al.* (2012), los grupos fenólicos en los ácidos húmicos retardan la transformación oxidativa de quinonas, aumentando su permanencia en ambientes oxidativos.

Las principales propiedades de los ácidos húmicos (solubilidad, dependencia del pH, interacción con grupos hidrofóbicos y quelación metálica) están relacionadas con su estructura, su anfifilicidad y sus diferentes grupos funcionales. Son considerados solubles

en condiciones neutras y alcalinas. Esta propiedad varía con la composición química de las sustancias en el ambiente y su origen. (Gomes, 2016)

Los ácidos húmicos son generalmente considerados solubles en condiciones neutras a alcalinas. Esta propiedad varía según el origen de los compuestos y su composición química. En medios alcalinos, los grupos fenólicos y carboxílicos son desprotonados y la repulsión de estos grupos con carga negativa provoca que las moléculas tomen una configuración estirada. Al disminuir el pH, los grupos funcionales se protonan y los efectos de repulsión se minimizan, causando que la molécula adopte una estructura más compacta. En esta etapa, las porciones hidrofóbicas están en el interior de la estructura y las porciones hidrofílicas están en contacto con el medio acuoso. Esta forma de micela provee a la molécula de características detergentes y permite que forme agregados en un nivel intramolecular, intermolecular y precipitación (Figura 4). (Gomes, 2016)

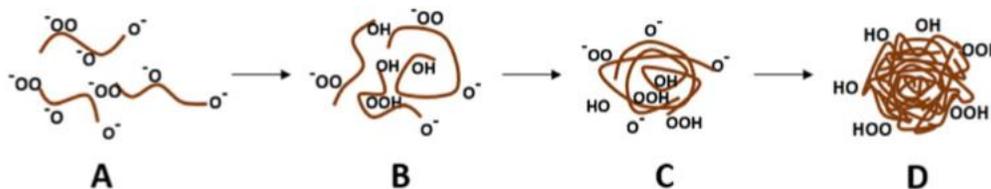


Figura 4: Comportamiento de las moléculas de ácidos húmicos en condiciones alcalinas y el proceso de agregación con la reducción de pH. A) pH alcalino: repulsión de cargas, B) disminución de pH: agregación intramolecular, C) disminución de pH: agregación intermolecular, D) pH ácido: precipitación.

Prado *et al.* (2011), notó que el pH está relacionado con la solubilidad y la estabilidad de suspensiones acuosas de ácidos húmicos. Una doble capa eléctrica se forma alrededor de las partículas cargadas, protegiéndolas y permitiendo que el sistema esté sin carga. A un pH neutro, la solubilización de los ácidos húmicos es parcial. Estos pueden encontrarse disueltos en agua en la naturaleza pero no todas las soluciones sólidas aisladas pueden disolverse. En estudios realizados, se observó que las disoluciones de ácidos húmicos en agua pueden tener fracciones insolubles y solubles. Pueden existir en agua como moléculas disueltas y en forma dissociada, por ser polielectrolitos débiles. Estos corresponden a la fracción soluble de los ácidos húmicos, mientras que la fracción insoluble interacciona con el ambiente y actúa como un intercambiador de iones. La disolución de las moléculas de ácidos húmicos en agua es compleja por ser una mezcla de componentes, donde sólo algunos de ellos son solubles en agua.

## b. Interés en films

Los grupos fenólicos en ácidos húmicos actúan como agentes donadores de electrones, eliminando radicales libres y previniendo el inicio de reacciones de oxidación en cadena. Son capaces de quelar metales, particularmente hierro y cobre, inhibiendo la formación de radicales libre de metales de transición, controlando la peroxidación lipídica y la fragmentación de ADN. Estas propiedades antioxidantes también son útiles en cosmética y aplicaciones farmacéuticas. (Gomes, 2016)

Khil'ko *et al.* (2011), han evaluado la capacidad antioxidante de los ácidos húmicos de lignito a través de su comportamiento para inhibir el proceso de oxidación en cadena de radicales de cumeno y etilenbenzeno iniciado por azobisisobutironitrilo (AIBN) y dimetil sulfóxido (DMSO). Se observó que la velocidad de absorción de oxígeno disminuyó significativamente en presencia de ácidos húmicos y, a concentraciones altas (10g/L), el proceso de oxidación era completamente interrumpido. Los autores sugieren el uso de derivados de ácidos húmicos como antioxidantes naturales para preservar alimentos. Estos derivados antioxidantes se obtienen mediante técnicas de escisión reductiva y con costos más efectivos que otros antioxidantes alimenticios.

Se han realizado estudios para aumentar la solubilidad en agua del  $\beta$ -caroteno por medio de complejos de  $\beta$ -caroteno y ácidos húmicos, como lo describe Martini *et al.* (2010) en su estudio. Estos  $\beta$ -carotenoides tienen actividades biológicas importantes, incluyendo propiedades antioxidantes y como precursores de vitamina A, pero su hidrofobicidad restringe su uso para los campos farmacéutico, cosmético y alimenticio. Estos autores demostraron que la solubilidad en agua del  $\beta$ -caroteno aumenta grandemente al hacer complejos con ácidos húmicos y que su estabilidad hacia la irradiación mejora aproximadamente un 60%.

## 2. Hidrolizado de lodo

Tanto las poblaciones humanas como las industrias utilizan una gran cantidad de agua, que resulta contaminada. Dentro del sector industrial, la industria alimentaria es el sector que más agua utiliza, y contamina, y uno de los que más residuos genera. Los lodos

producidos son considerados uno de los problemas de mayor interés por sus altos volúmenes y difícil deshidratación. Una de las formas para reducir el volumen de lodos y mejorar su manejo es la tecnología hidrotérmica, que aprovecha las características del agua a altas temperaturas y presiones para solubilizar y degradar compuestos orgánicos e inorgánicos en lodos. (Neyens *et al.*, 2004). Las tecnologías hidrotérmicas en tratamiento de lodos pueden ser categorizadas en dos grupos, oxidativas (oxidación húmeda) y no oxidativas (hidrólisis térmica).

La oxidación húmeda es considerada como una tecnología hidrotermal efectiva para el tratamiento de lodos de depuradora y de efluente con altas concentraciones de materia orgánica de carácter biorefractorio. Durante este tratamiento, los compuestos orgánicos e inorgánicos oxidables son degradados en fase líquida a altas temperaturas (150-320°C) y presiones (20-150 bar) con el uso de aire u oxígeno. (Bertanza *et al.*, 2016). Esta técnica mejora las características de estabilidad y filtrabilidad de los lodos, reduciendo también su carga orgánica. (Genç *et al.*, 2002).

#### a. Características y propiedades

Los lodos biológicos están compuestos principalmente de agregados microbianos, que están compuestos de células incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Las EPS son los componentes principales de lodos activos, lodos granulares y biofilms (Bezawada *et al.*, 2013). Los lodos son la acumulación de microorganismos y las EPS son mezclas de polímeros de alto peso molecular excretados por los microorganismos, producidos por la lisis de las células y materia orgánica adsorbida de aguas residuales. Los lodos son floculados por EPS que están compuestos principalmente por proteínas, lípidos, ácidos húmicos, ácidos nucleicos y polisacáridos (Sun, 2016). De hecho, la cantidad de EPS y su composición juegan un papel determinantes en las interacciones célula-célula y célula-superficie. Estas características determinan ampliamente las propiedades principales de los lodos, como la adhesión celular, agregación flocular y cohesión, retención de agua, sorción de compuestos orgánicos y iones inorgánicos (Ni *et al.*, 2009).

Los tratamientos hidrotérmicos permiten la rotura de la estructura de floculación por medio de la solubilización y degradación de EPS y lisis celular. Los tratamientos involucran

la liberación de altas cantidades de sustancias poliméricas al medio, cuya composición, concentración y tamaño molecular varían con el tiempo de reacción, especialmente bajo una atmósfera oxidante (Mishra *et al.*, 1995).

b. Interés en films

Debido a su variada composición de sólidos, los lodos pueden generar disoluciones con gran carga de biopolímeros como proteínas y carbohidratos, que podrían ser utilizados como agentes constitutivos de films. Además, la adición de hidrolizados a los films podría mejorar la capacidad antioxidante final.

### III. METODOLOGÍA

#### A. Films

##### 1. Preparación de hidrolizados de lodo

Se realizaron distintas pruebas con los lodos tratados con tres diferentes procesos: una extracción de EPS de lodos frescos, sobrenadante del hidrolizado de lodos y liofilizado del hidrolizado. Los lodos tratados se centrifugaron 20 minutos a 10000 rpm en una centrifugadora Kubota 6500, se separó el sobrenadante y éste se colocó en botellas de plástico en la nevera a 4°C. Para liofilizar los lodos, luego de obtener el sobrenadante, se colocaron 100mL del sobrenadante en Erlenmeyer de 500 mL y se llevaron a congelar a -30°C por 16 horas. Las muestras congeladas se metieron a un proceso de liofilización en un Liofilizador Telstar Cryodos (con bomba de vacío RZ6) durante 48 horas. Se pesó el contenido de muestra liofilizada y se almacenó en el congelador hasta su uso para la preparación de los films. Para la extracción de EPS, los lodos se sometieron a un tratamiento térmico a 60°C durante 1 hora y luego se centrifugaron 20 minutos a 10000 rpm en la centrifugadora.

##### 2. Preparación de films

Las disoluciones formadoras de films se prepararon disolviendo 3g de gelatina en 100 ml de agua destilada. Las disoluciones se calentaron a 65°C durante 13 min bajo una velocidad de agitación de 300 rpm hasta obtener una disolución completa y homogénea. Las disoluciones se dejaron enfriar hasta 40°C. Luego se agregó el plastificante en base al contenido de proteína, en este caso, glicerol al 25% (sobre la cantidad de proteína). A continuación, se agregó la cantidad de aditivo (ácidos húmicos o hidrolizado de lodo) en diferente concentración (1%, 2%, 3% sobre la cantidad de proteína). Para los films con ácidos húmicos, se agregó además NaOH 0.1N a las disoluciones hasta llegar a un pH 10, debido a su baja solubilidad en agua y su alta solubilidad en medios básicos. Las disoluciones se calentaron a 30°C a una velocidad de agitación de 600 rpm hasta obtener una disolución completa. Se colocó un volumen de disolución formadora de film (20mL) en placas Petri. Las placas Petri se deshidrataron en un horno a 47°C por 18-20 horas. Al

sacarlas del horno, se colocaron en un desecador con sílica gel por 72 horas para mantener controladas la temperatura y humedad antes de su caracterización.

### 3. Capacidad para formar films

La capacidad de formar films se determinó para seleccionar el porcentaje de aditivo y la forma de agregarlo en la solución para formar films. Los films se prepararon según lo descrito anteriormente. La capacidad de la formulación para formar films se evaluó según la capacidad que la disolución muestra para cubrir uniformemente la superficie de la placa Petri después de secar, que se pudiera despegar fácilmente de la placa y fuera manejable, no pegajosa ni quebradiza. Según esta premisa cualitativa, la capacidad de formar films se clasificó como: (-) sin capacidad, (+) capacidad moderada y (++) buena capacidad.

### 4. Caracterización

#### a. Grosor

El grosor de los films se midió utilizando un micrómetro (Mitutoyo SR44) con un rango de 0-25mm. y una exactitud de 0.001mm. El grosor medio de los films se determinó por el promedio de 4 mediciones realizadas en 9 diferentes puntos.

#### b. Absorción de luz y transparencia

Las propiedades de barrera de luz y la transparencia de los films se calcularon por triplicado utilizando un espectrofotómetro SPEKOL 1500 (Analytikjena) a longitudes de onda entre 200 a 800nm. Se cortaron los films en piezas rectangulares y se colocaron directamente en la cubeta del espectrofotómetro, usando una cubeta vacía como referencia. La transparencia de los films se calculó con la ecuación  $T = -\log\left(\frac{T_{600}}{x}\right)$ , donde  $T_{600}$  es la transmisión de luz a 600nm y  $x$  es el grosor del film (mm). Según esta ecuación, los valores altos de  $T$  indican un menor grado de transparencia.

c. Propiedades mecánicas

Se midieron dos propiedades mecánicas de los films, la fuerza de punción (PS) y la deformación en punción (PD) mediante un texturómetro (TA-TX plus, Stable Micro Systems, Texture Analyser). Las muestras del film se cortaron en tiras de 2cm de ancho y 4cm de largo mediante una navaja de corte. Se midieron 18 muestras de cada tipo de film. La fuerza de punción se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$PS = \frac{Fm}{Th}$$

Donde Fm es la fuerza máxima de compresión, expresada en Newtons y Th es el grosor del film expresado en mm. La deformación en punción se determinó mediante la fórmula:

$$PD = \frac{\sqrt{D^2 + R^2} - R}{R}$$

Donde D es la distancia recorrida después de hacer fuerza en el film hasta su rotura y R es el radio del orificio en la placa, ambos expresados en mm.

d. Contenido de agua

El contenido de agua se midió por determinación de la pérdida de peso del film después de secar a 105°C por 24h. Se expresa como gramos de agua por gramos de materia seca. Todas las muestras se midieron por triplicado.

e. Solubilidad del agua

Los films se cortaron en trozos de 4x3cm y se secaron a 105°C por 24h. Después de secar, se pesaron. Los films se colocaron individualmente en vasos de precipitado con 50 mL de agua destilada, siendo tapados y almacenados a 25°C por 24 horas. Luego de esto, se sacaron y secaron a 105°C por 24 horas para determinar su peso final en materia seca. La solubilidad en agua se determinó por triplicado. La pérdida de materia soluble total fue calculada con el peso seco inicial y final de los films.  $\frac{W_f - W_o}{W_f} * 100$

## f. Capacidad antioxidante

### 1) Método DPPH

La capacidad de eliminación de radicales DPPH se determinó por el método propuesto por Li, *et al.* (2014), con ligeras modificaciones. La disolución muestra contenía 0.6 mL de solución DPPH 1.0mM, 0.6 mL de disolución formadora de film a diferentes concentraciones (1-0.5%) y 4 mL de etanol. La solución control contenía 0.6 mL de agua destilada, 4.0 mL de etanol y 0.6 mL de solución DPPH 1.0mM. En todos los casos, las mezclas fueron homogenizadas en vortex y luego incubadas por 30 min a oscuras a temperatura ambiente. Luego de esto, se midió la absorbancia a 517nm.

### 2) Método ABTS

La capacidad de eliminación de radicales ABTS (2,2'-azinobis(-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) se calculó de acuerdo al método descrito por Blanco-Pascual *et al.*, (2014). Se preparó una disolución stock de ABTS<sup>+</sup> compuesta de una solución acuosa de 7mM ABTS<sup>+</sup> y 2.45mM de persulfato de potasio. Esta solución stock fue almacenada a oscuras a temperatura ambiente por 16 horas antes de utilizarla. Se diluyó con agua destilada hasta alcanzar una absorbancia de 0.7±0.04 a 734nm. Las disoluciones formadoras de films se diluyeron a varias concentraciones (0.06-0.45mg/mL) y se tomaron alícuotas de 200µL que se mezclaron con 4.80mL de solución ABTS<sup>+</sup> y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente, la absorbancia de las muestras fue medida a 734nm. El porcentaje de capacidad de eliminación (SC%) para cada concentración y la concentración necesaria para disminuir la absorbancia al 50% del valor inicial (IC50) se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$SC\% = \left(1 - \frac{Abs\ muestra}{Abs\ control}\right) * 100$$

### 3) Método de quelación del ion férrico

La habilidad de quelación del ion férrico de los films fue medida de acuerdo al método descrito por Decker *et al.* (2004), con algunas modificaciones. Se mezclaron 5 mL de la disolución formadora de films que se utilizó a diferentes concentraciones (0.06-0.15%) con

0.1mL de 2mM FeCl<sub>2</sub> y 0.2mL de 5mM de solución ferrozina. Después de incubar a temperatura ambiente por 10 min, se leyó la absorbancia de las muestra a 562nm. El complejo Fe<sup>2+</sup>/ferrozina tiene una alta absorbancia a esta longitud de onda, por lo que una alta habilidad quelante corresponde con una baja absorbancia. Se utilizó una disolución control con 5 mL de agua destilada, 0.1mL FeCl<sub>2</sub> y 0.2mL de ferrozina. La habilidad de quelación en porcentaje se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$SC\% = \left(1 - \frac{Abs\ muestra}{Abs\ control}\right) * 100$$

g. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los análisis se realizaron mediante un microscopio de barrido de electrones modelo JSM-6610LV, JEOL operando a 20 kV. Las muestras de film se mantuvieron en un desecador en disolución saturada de sales durante 7 días y luego se sacaron y se liofilizaron para obtener trozos adecuados para el análisis de la sección transversal. Se utilizó un cabo cilíndrico de aluminio, donde se colocó el film con un adhesivo de cobre de doble cara, para observar la morfología de la sección transversal. Después de esto, los films fueron recubiertos con oro en un VG Microtech model SC7620 por recubrimiento por pulverización catódica por 180s a 4mA. Los films se enfocaron a 15,000x, y la magnificación fue hasta 2000 a 10µm. SEM se utilizó para caracterizar secciones transversales de los films.

h. Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier - FTIR

El espectro infrarrojo del film se midió entre 4000 y 600 cm<sup>-1</sup> a 2cm<sup>-1</sup> de resolución, utilizando un Espectrómetro Infrarrojo Perkin-Elmer Spectrum 400, acoplado a un microscopio con sistema de formación de imágenes (Varian 620-IR y Varian 670-IR) con tres sistemas de detección: uno en el espectrómetro y dos en el microscopio (FPA, para formación de imágenes y MCT para medidas puntuales).

### i. Análisis Termo-gravimétrico (TGA)

TGA se realizó en un TGA-SDTA851 (Mettler Toledo) desde temperatura ambiente hasta 700°C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo una atmósfera de nitrógeno a 20 mL/min.

## B. Hidrolizado

### 1. Lodo inicial

El lodo utilizado es un lodo secundario espesado por flotación proveniente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Baiña, Asturias. Se almacenó el lodo a 4°C para mantener sus propiedades hasta antes de tratarlo por oxidación húmeda. La Tabla 1 muestra las características del lodo antes del proceso del tratamiento:

Tabla 1: condiciones iniciales del lodo utilizado

Ph	DQO total (mg O <sub>2</sub> /L)	DQO soluble (mg O <sub>2</sub> /L)	Sólidos				Proteínas solubles (mg/L)	ácidos húmicos solubles (mg/L)	Carbohidratos solubles (mg/L)
			ST (g/L)	SV (g/L)	SF (g/L)	IVF (ml/g)			
6.64 ± 0.03	28350 ± 9x10 <sup>-3</sup>	811.111 ± 0.004	29.60 ± 0.01	24.70 ± 0.01	4.90 ± 0.01	40.49 ± 0.01	592.26 ± 0.08	107.95 ± 0.01	78.37 ± 0.01

### 2. Método de hidrólisis

Se llevó a cabo un tratamiento de oxidación de los lodos con alta temperatura y presión para hidrolizar el lodo con oxígeno puro. Para ello, se utilizó un reactor PARR 4520 de un litro de capacidad, equipado con un agitador de turbina de seis palas. El procedimiento se llevó a cabo con el paso del gas a través de un humidificador, para saturar el gas, por lo que se utilizó un tanque de acero de dos litros con agua, lleno hasta un 70% de capacidad. Se trabajó con una presión de 40bar, temperatura de 140°C y un caudal de oxígeno de 2000 mL/min. Para mantener la temperatura y el flujo del gas se utilizó un controlador PID. Se hizo uso de una válvula para regular la presión, que se sitúa al final de la línea de gas.

Se introdujeron 700mL de lodos en el reactor y se establecieron las condiciones de operación descritas. La temperatura del reactor y del humidificador se ajustó inicialmente a 100°C para evitar un calentamiento repentino del lodo. Pasados 30 minutos, en los que se alcanzó esa temperatura, se aumentó la temperatura a 140°C, para trabajar con la temperatura de reacción deseada. Se comprobó y graduó la presión en la válvula para que durante todo el proceso se trabajara a 40bar.

### 3. Toma de muestras

A través de todo el experimento se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar la evolución de la composición del hidrolizado a lo largo del tratamiento oxidativo. En total se tomaron 6 muestras a diferentes tiempos.

Tabla 2: condiciones durante el tratamiento oxidativo húmedo

<b>tiempo (min)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>presión (bar)</b>	<b>pH</b>
20	86.2	27.9	6.65
40	149.9	40	5.51
60	135.3	40	5.68
80	137.8	40	5.36
100	144.2	40	5.15
120	142.3	40	4.93

Se llevaron a cabo análisis de sólidos, DQO total e índice volumétrico en cada toma de muestras, luego éstas se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm en una centrifugadora Kubota 6500. Se separó el sobrenadante y éste se utilizó para el resto de análisis realizados.

### 4. Determinación de tiempo óptimo de tratamiento

A pesar de que hay gran cantidad de biomoléculas de interés en un lodo, sólo hay tres tipos en concentraciones susceptibles de generar suficiente interés como para separarlas y determinarlas: proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos. Debido a la necesidad de altas concentraciones de sólidos para formar films, se seleccionó como óptimo el tiempo en el que la concentración de proteínas solubles fuera máxima.

## 5. Análisis proximales

### a. Medida de pH

Se midió el pH de las muestras tomadas de los lodos utilizando un pH metro Crison Basic 20+.

### b. Análisis del color

Se midió la absorbancia en un rango de longitudes de onda de 190 - 1100 nm. Esto permite determinar el color de las muestras y sus cambios durante el proceso. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro (PG Instruments Ltd., T80 UV/VIS). En este estudio se mide el Coeficiente de Absorción Espectral (CAE) a tres longitudes de onda diferentes: 436 nm, 525 nm y 620 nm; el color de las muestras se expresa a través del Número de Color (NC), con la siguiente ecuación:

$$NC = \frac{CAE_{436}^2 + CAE_{525}^2 + CAE_{620}^2}{CAE_{436} + CAE_{525} + CAE_{620}}$$

### c. Medida de la carga orgánica

Se midió empleando el método de la Demanda Química de Oxígeno (DQO). Este método se basa en la oxidación de las moléculas orgánicas presentes en la muestra mediante un compuesto oxidante fuerte, midiendo la cantidad de oxígeno requerida para ello en función del dicromato potásico consumido. La reacción tiene lugar a 150 °C en un digestor durante 2 horas. El valor de la DQO se expresa como concentración de oxígeno en mg/l o partes por millón (ppm), que será mayor cuanto mayor sea la carga orgánica. Dicha concentración se determina por espectrofotometría a 600 nm, donde la muestra adquiere una tonalidad verde según aumenta el valor de la DQO, siendo amarillo anaranjado a concentraciones bajas.

Se realizaron dos tipos de medidas de la DQO:

- DQO total (DQOt). Se mide la DQO de la muestra completa.
- DQO soluble (DQOs). Se mide la DQO del sobrenadante de la muestra centrifugada.

#### d. Medida de sólidos

Este parámetro indica la cantidad de sólidos de los mismos, y por tanto la carga contaminante. Se realizaron 4 tipos de medidas:

- Índice volumétrico de fangos (IVF). Indica el volumen en ml que ocupa un gramo de lodo. Para realizar esta medida, se tomaron 12 ml de lodo en un tubo aforado, y se midió el volumen de lodo sedimentado tras 30 minutos. El IVF se define como este volumen dividido entre los gramos de sólidos totales en la muestra.
- Sólidos totales (ST). Representa los gramos de sólidos por unidad de volumen de muestra. Se obtiene por pesada de un volumen de muestra secada en estufa a 105°C hasta peso constante.
- Sólidos fijos (SF). Son los sólidos remanentes tras la calcinación a 550°C de los sólidos totales. Se atribuyen a compuestos inorgánicos.
- Sólidos volátiles (SV). Corresponden a la fracción volátil de los sólidos del lodo. Son principalmente compuestos orgánicos que pasan a estado gas rápidamente. Su análisis se realizó calcinando la muestra en una mufla a 550°C. El valor se obtiene de la diferencia de peso entre los sólidos totales y los sólidos fijos, puesto que se habrán desprendido de la muestra en forma de CO<sub>2</sub>.

#### e. Determinación de concentración de proteínas y ácidos húmicos

Ambos compuestos se determinaron de forma conjunta mediante el método de Lowry, (1951), debido a las interferencias en la medida que causan entre ellos (Frølund *et al.*, 1995). Se midió la absorbancia de las muestras de proteínas (absorbancia total) y ácidos húmicos (absorbancia ciega) en un espectrofotómetro a 580 nm, aplicando dos ecuaciones para obtener los valores de absorbancia de cada molécula, ya sin interferencias. Las rectas de calibrado correspondientes se realizaron con albúmina sérica bovina (BSA) y ácidos húmicos, con concentración 0.5g/L, como patrones para cada caso.

#### f. Determinación de concentración de carbohidratos

Se realizó siguiendo el método del fenol – ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956), utilizando D-glucosa monohidratada como patrón. Se realizó una dilución de la muestra (1-50) y de ésta se tomó 1mL, se agregó 0.5mL de fenol y 2.5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se agitaron las

muestras y seguidamente se dejaron reposar en oscuras durante 30 minutos. La absorbancia de las muestras se midió a 492 nm.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Formulación del film control

Se utilizará un film de gelatina con glicerol como control para comparar el efecto de las distintas aditivaciones de ácidos húmicos o hidrolizados de lodo en las propiedades del material. Se hace necesario el empleo de glicerol como plastificante para mejorar la flexibilidad, extensibilidad y dispensabilidad de los films. Los films solamente de gelatina son frágiles y susceptibles a romperse debido a la alta densidad de energía cohesiva de las proteínas. Por lo tanto, las propiedades funcionales de los films dependen del contenido de glicerol (Liu, 2017). Es por ello que inicialmente se experimentó formar los films de gelatina con distintas concentraciones de glicerol para determinar la cantidad adecuada, y en ausencia de aditivos. De esa forma se obtiene un film control optimizado en cuanto a la proporción gelatina / glicerol. Esta proporción será también utilizada en la formulación de todos los biofilms con los porcentajes de aditivo correspondiente.

Según las pruebas realizadas, a bajas concentraciones de glicerol, los films son quebradizos y frágiles, mientras que, films con concentraciones de glicerol más altas tienden a ser pegajosos y brillantes. Por tanto, tras ensayar concentraciones de glicerol entre entre 25 y 40%, se determinó que la concentración óptima de glicerol en la solución para formar los films fue de 25% sobre la cantidad de proteína, lo que permitió obtener films elásticos pero no pegajosos ni quebradizos, como se puede ver en Anexo A.

### B. Caracterización films de gelatina con ácidos húmicos

Se realizaron films con adición de ácidos húmicos en distinta concentración (1%, 2%, 3%). Estos films se caracterizaron para evaluar sus propiedades y el efecto que tienen los ácidos húmicos sobre el film de gelatina, siendo comparados con el film control sin aditivar.

#### 1. Apariencia

La apariencia de los films se muestra en la Tabla 3. Los valores de grosor de los films con ácidos húmicos son ligeramente menores que el film de gelatina pero en general

presentan un grosor similar, independientemente de la concentración de ácido húmico empleado. Esto parece indicar que la presencia de ácidos húmicos en los films no tiene un efecto significativo en el grosor, presentando una estructura densa y compacta. Esta alta compactibilidad puede ser el resultado de un buen entrecruce entre los ácidos húmicos y la gelatina.

Tabla 3: Grosor y transparencia de films con ácidos húmicos

Film	C	A1	A2	A3
Grosor ( $\mu\text{m}$ )	$82 \pm 16$	$71 \pm 7$	$74 \pm 13$	$77 \pm 11$
Transparencia	$0.44 \pm 0.07$	$2.5 \pm 0.1$	$3.3 \pm 0.3$	$5.4 \pm 0.3$

\*C: control, 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de ácidos húmicos en el biofilm

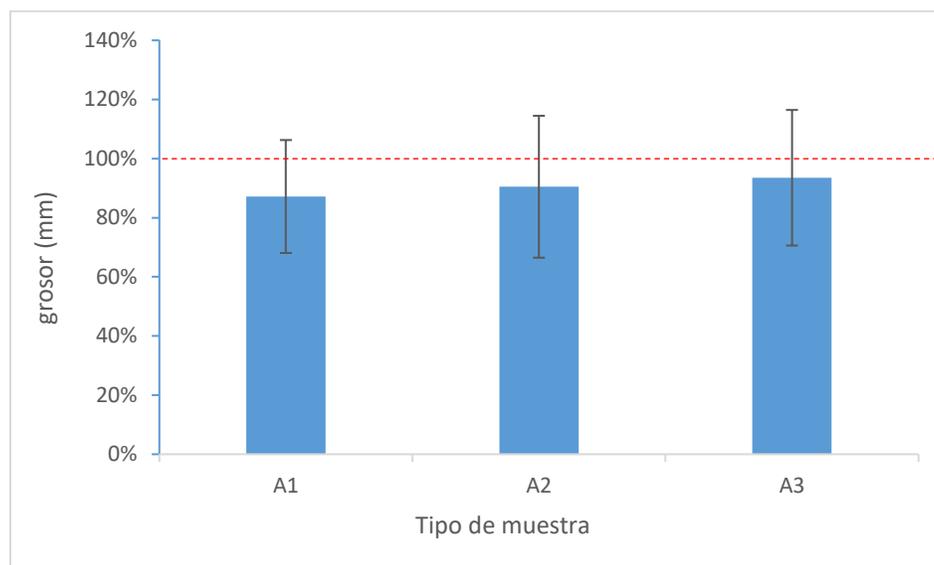


Figura 5: comparación de grosor de films. Control (---), 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de ácidos húmicos en el biofilm

Por otro lado, en la Figura 6 se observa la trasmittancia de luz a diferentes longitudes de onda de los diferentes films. La capacidad de absorción de luz UV es importante para determinar la aplicación potencial del film en empaques de alimentos. La habilidad de estos materiales de absorber luz UV es clave para extender la vida útil de alimentos con grasas, que son susceptibles a la degradación oxidativa catalizada por la radiación UV.

En general, los films con ácidos húmicos presentaron una baja transmisión de luz en el rango UV (200-280 nm) (Figura 6), proveyendo así una eficiente barrera contra ese tipo de

radiación. Con respecto al rango visible, casi no se mostró transmitancia de luz por debajo de los 450 nm. A excepción del control y como cabía esperar, el film con 1% de ácidos húmicos fue el más transparente (Tabla 3), aunque los films con 2 y 3% presentaron bajos valores de transparencia también. Los valores de transparencia son muy similares a los films sintéticos comerciales, polipropileno orientado (OPP) y polietileno de baja densidad (LDPE) (Shiku *et al.*, 2004), indicando que los films son lo suficientemente claros para utilizarse como empaques para ver a través de ellos.

La transmitancia si aumentó en el rango 600-800 nm, confirmando la presencia de pigmentos color rojo-marrón. Las longitudes de onda cercanas a 600nm pueden ser de un tono rojizo y las cercanas a 700 nm de tono marrón (Bricaud *et al.*, 1995). En este intervalo, el film con 3% de ácidos húmicos continuó presentando la menor transmitancia, hasta un 12% de luz, frente al 28% del control. Estos resultados indican que la aditivación con los ácidos húmicos en los films de gelatina pueden aumentar la habilidad de éstos para proteger productos que son sensibles a la luz.

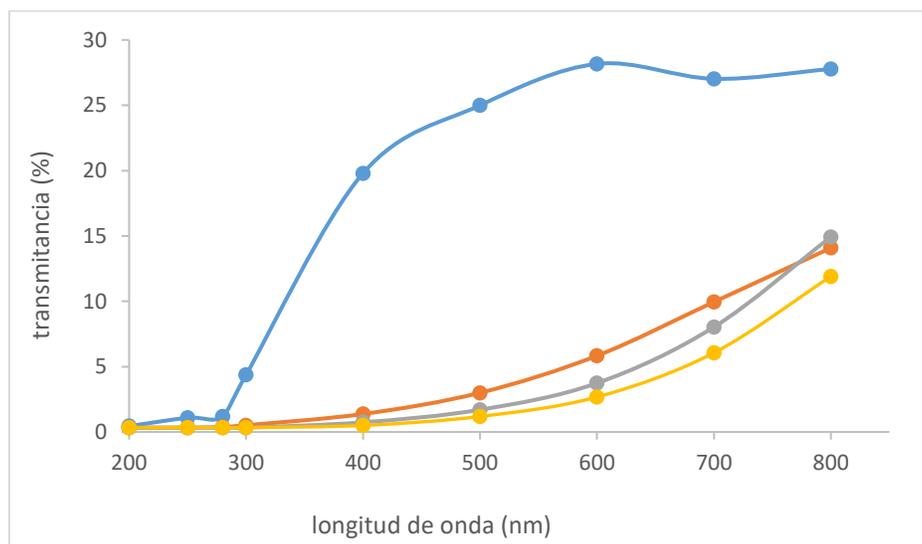


Figura 6: Transmitancia de luz (T, %) a longitud de onda 200-800nm de films con ácidos húmicos

—●— control —●— 1% ácidos húmicos —●— 2% ácidos húmicos —●— 3% ácidos húmicos

En cuanto al color, se hizo una comparación óptica entre los distintos films con ácidos húmicos y el film control de gelatina. Se puede observar en la Figura 7 cómo se oscurece más a medida que aumenta la concentración de ácidos húmicos, presentando un tono

marrón más fuerte. En los films con 3% de ácidos húmicos, se pudo observar la presencia de pequeñas partículas que no disolvieron completamente en la disolución formadora.

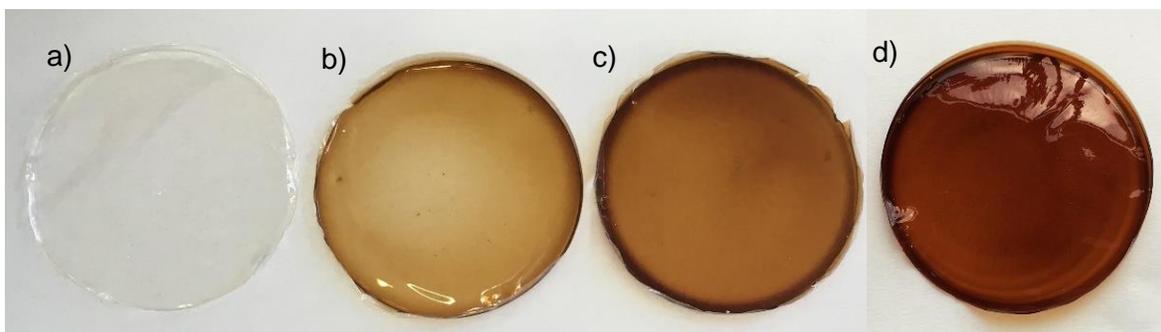


Figura 7: color de los films con ácidos húmicos. a) control, b) 1% ácidos húmicos, c) 2% ácidos húmicos, d) 3% ácidos húmicos

## 2. Propiedades físicas

Se midieron las propiedades físicas de los films tales como humedad, solubilidad, fuerza de punción y elongación con punción, estos datos se presentan en la Tabla 4 (como valores absolutos) y la Figura 8 (como porcentajes con respecto al control).

Tabla 4: Humedad, solubilidad del film, fuerza de punción (PS), deformación en punción (PD) de films con ácidos húmicos

<b>Film</b>	<b>C</b>	<b>1%</b>	<b>2%</b>	<b>3%</b>
Humedad (%)	16.945 ± 0.001	13.35 ± 0.03	17.76 ± 0.03	19.72 ± 0.02
Solubilidad (%)	71.23 ± 0.07	64.737 ± 0.008	64.363 ± 0.004	50.10 ± 0.02
PS (N/mm)	202 ± 45	170 ± 49	228 ± 43	273 ± 31
PD (%)	0.39 ± 0.2	0.55 ± 0.3	0.73 ± 0.4	0.81 ± 0.2

\*C: control, 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de ácidos húmicos en el biofilm

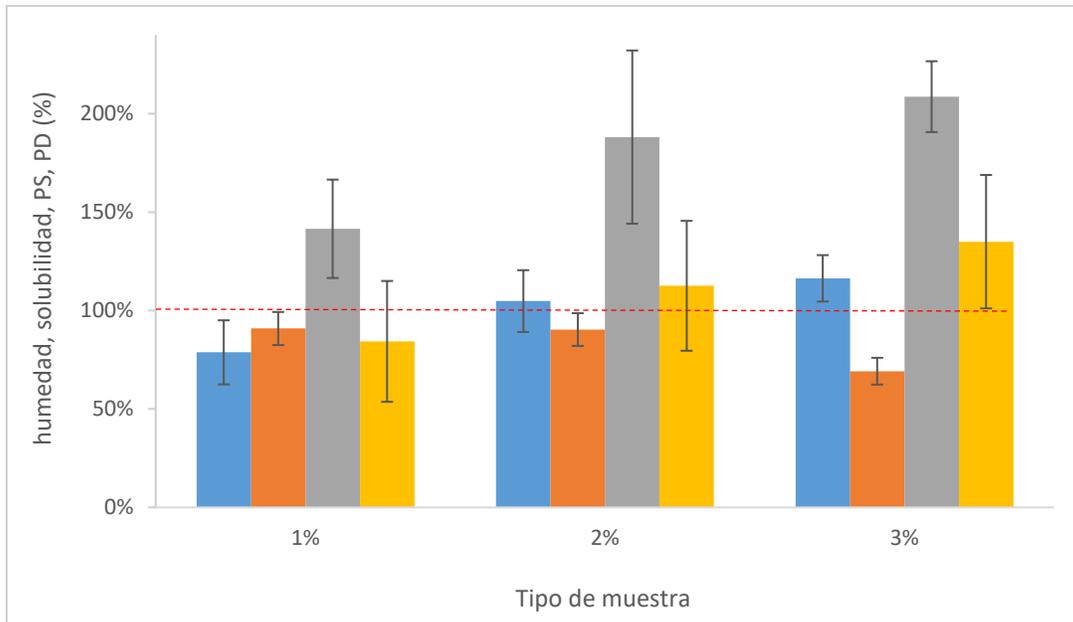


Figura 8: Propiedades físicas de los films aditivados con ácidos húmicos

--- Control ■ humedad, ■ solubilidad, ■ fuerza de punción, ■ elongación en punción

Los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración de ácidos húmicos en el film, aumenta la humedad. La solubilidad del film en agua, en cambio, disminuye conforme aumenta la concentración de ácidos húmicos en el biofilm. Esto se puede deber a que los ácidos húmicos no son solubles en agua sino en medios básicos, por lo que la alta concentración de ácidos húmicos en el film puede no estar disuelta completamente y disminuye su solubilidad. Al momento de disolver el film en agua disminuye el pH de la disolución, provocando también la agregación de las partículas no disueltas y disminuyendo su solubilidad.

Como se ha comentado anteriormente, los biofilms deben poseer fuerza mecánica y extensibilidad adecuadas para soportar el estrés que experimentan durante el procesamiento, empaque y almacenamiento de alimentos. Los parámetros como la conformación estructural de sus componentes y sus interacciones, la presencia de imperfecciones en la estructura (fisuras, vacíos, grietas) y la cantidad de agentes plastificantes se han reportado que influyen en el perfil mecánico de los films (Falguera *et al.*, 2011). En este trabajo la cantidad de plastificante fue uniforme para toda la experimentación, a 25% sobre la cantidad de proteína, que facilitó el desarrollo de estructuras flexibles y extensibles sin ser pegajosos o frágiles. Los resultados de las

propiedades mecánicas de los films permiten ver la forma positiva de cómo afecta la adición de ácidos húmicos a los films de gelatina.

La presencia de ácidos húmicos también tiene un efecto positivo sobre la fuerza de punción y la elongación en punción del film. Según los análisis de texturometría de los films, la fuerza de punción es mayor a medida que aumenta la concentración de ácidos húmicos. Para una concentración de 3% de ácidos húmicos, la fuerza de punción aumenta un 35% con respecto al control, por lo que presenta una firmeza y resistencia. En cambio, la elongación en punción, aumenta un 50% con 1% de ácidos húmicos y hasta el doble con 3% de ácidos húmicos. Por lo tanto, la presencia de ácidos húmicos en el film hace que éste sea más resistente y flexible, permitiendo mayores elongaciones antes de deformarse y romperse.

### 3. Propiedades químicas

Los empaques con antioxidantes son una categoría de empaques activos muy prometedora para extender la vida útil de los productos alimentarios. Enriquecer films con antioxidantes permite mejorar los aspectos nutricionales y estéticos sin afectar la integridad del alimento. Es por ello que es de gran importancia evaluar la capacidad antioxidante que pueden tener los ácidos húmicos y la forma en que se manifiestan en un film de gelatina.

La actividad antioxidante se muestra en la Tabla 5. Se emplearon tres métodos distintos para determinar la capacidad antioxidante de los films con ácidos húmicos: DPPH, ABTS y quelación del ion férrico. En el caso del método del DPPH, no se obtuvieron resultados debido a que los ácidos húmicos no son solubles en presencia del etanol que se añade en este ensayo como disolvente, precipitando (Figura 31, Anexo C).

Tabla 5: Actividad antioxidante: ABTS, quelación ion férrico de films con ácidos húmicos

Film	ABTS		Quelación ion férrico	
	%AA (30 µgAH/mL)	IC <sub>50</sub> (µgAH/mL)	%AA (150 µgAH/mL)	IC <sub>50</sub> (µgAH/mL)
1%	99.39	13	56.71	118
2%	63.44	23	ND	ND
3%	43.17	36	ND	ND

\*ND: no determinado, 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de ácidos húmicos en el biofilm

Los ácidos húmicos presentan actividad antioxidante por la presencia de fenoles, ácidos carboxílicos y quinonas en su estructura. Esto se pudo observar en los resultados de la prueba ABTS que se llevó a cabo. El film control presenta valores muy bajos, que no es representativo para indicar que tiene actividad antioxidante. La capacidad antioxidante de los ácidos húmicos para eliminar  $ABTS^{\cdot+}$ , sí fue alta y más aún en los films con 1% de ácidos húmicos (Figura 9). A esta concentración,  $13 \mu\text{g/mL}$ , de ácidos húmicos son capaces de retirar del medio el 50% de los radicales  $ABTS^{\cdot+}$ . Sin embargo y de acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla 5, el  $IC_{50}$  aumenta según aumenta la concentración de ácidos húmicos en la disolución formadora de films. Por lo tanto, al aumentar la concentración de ácidos húmicos en los films la capacidad antioxidante de los films disminuye, presentando un óptimo para un 1%. Esto puede deberse a que, a medida que aumenta su concentración, desciende su solubilidad en la disolución, apareciendo pequeños agregados dentro del biofilm. De hecho, éstos son directamente observables a las máximas concentraciones ensayadas (3%). Estos agregados modifican la estructura del film, lo que podría reducir la capacidad antioxidante, dando como resultado la disminución del  $IC_{50}$  observado. Se puede concluir entonces, que la adición de ácidos húmicos a una concentración de tan solo  $13 \mu\text{g/mL}$  le da a los films de gelatina una capacidad secuestrante de radicales libres, del 50%, demostrando así su capacidad antioxidante.

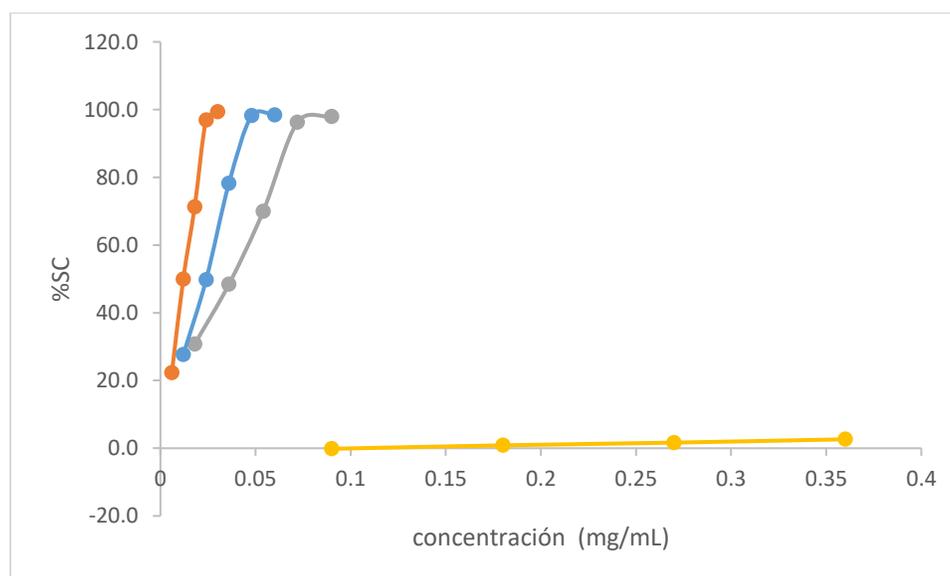


Figura 9: capacidad antioxidante de ácidos húmicos a distintas concentraciones según análisis ABTS

— Control, — film 1% ácidos húmicos — film 2% ácidos húmicos — film 3% ácidos húmicos

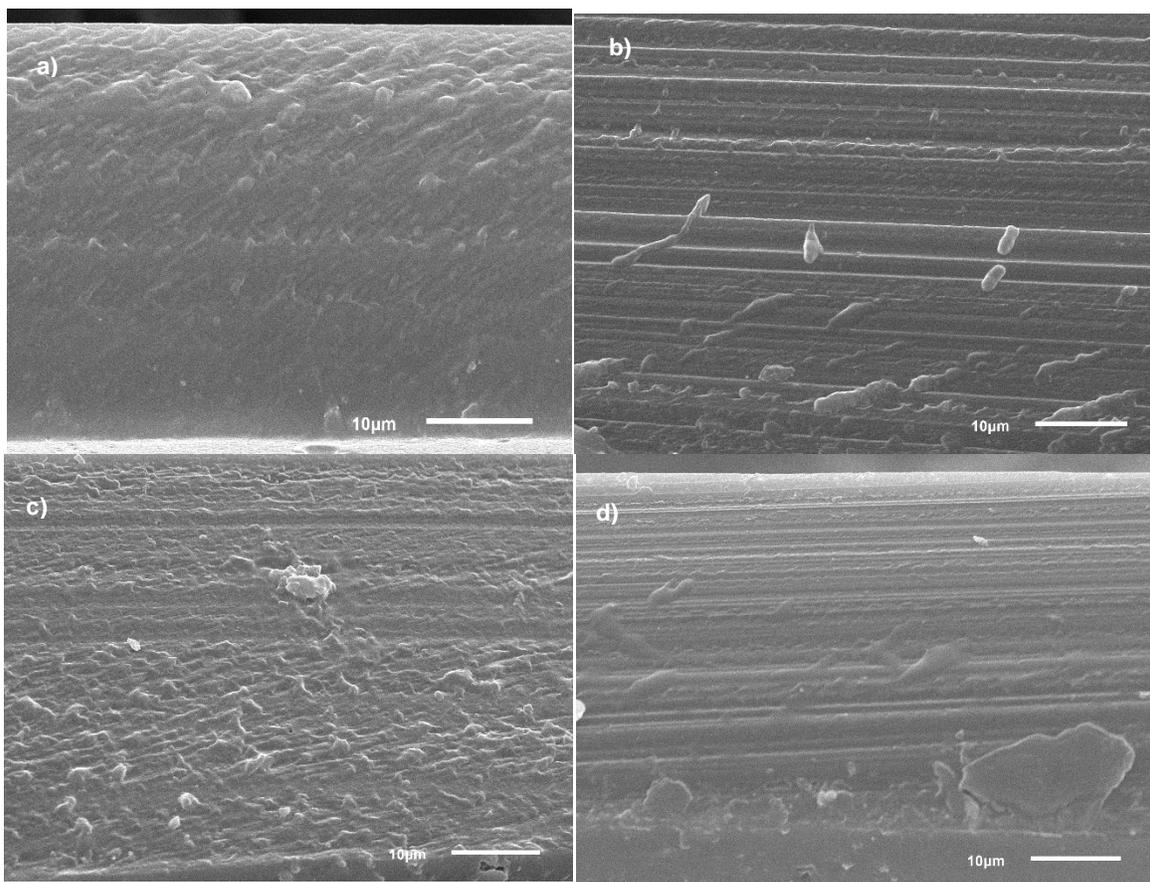
Con respecto al tercer método de medida de la actividad antioxidante, la capacidad de reducción del ion férrico se determinó únicamente en los films con 1% de ácidos húmicos, ya que para los films con 2% y 3%, el intenso color de la muestra no permitía leer la absorbancia correctamente. La concentración de ácidos húmicos para proveer 50% de inhibición (IC50) es 118µg/mL. Los compuestos con capacidad antioxidante presentes en los ácidos húmicos forman un complejo coordinado con los iones metálicos (hierro) e inhiben la transferencia de electrones. Así, la reacción de oxidación se detiene y no se producen radicales libres. Según Ortiz (2017), los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales de los aminoácidos tienen función quelante de iones metálicos debido a su capacidad de disociarse y ser donadores de protones, por lo que los ácidos carboxílicos que componen los ácidos húmicos son lo que le confieren estas propiedades.

Según los resultados en ambas pruebas, los ácidos húmicos sí presentan una actividad antioxidante significativa, por lo que los films aditivados con pequeñas cantidades de éstos pueden mejorar las propiedades químicas del film y evitar cambios en los alimentos causados por oxidación.

#### 4. Propiedades estructurales

##### a. Morfología

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido para investigar la estructura de la sección transversal de los films con diferentes concentraciones de ácidos húmicos (Figura 10). Las vistas microscópicas mostraron morfologías de la sección transversal relativamente lisas y uniformes sin grietas, cortes o aberturas. Las vistas SEM de los films con distintas concentraciones de ácidos húmicos no presentaron diferencia marcada en su estructura sino que muestra una estructura ordenada y homogénea. La estructura del film de 1% y 3% de ácidos húmicos incluso presenta una mayor uniformidad y superficie lisa que la superficie del film de gelatina control. La matriz homogénea de los films con ácidos húmicos es un indicador de su integridad estructural.



*Figura 10: Microscopía electrónica de barrido de la sección transversal de: a) film de gelatina (control), b) film con 1% ácidos húmicos, c) film con 2% de ácidos húmicos, d) film con 3% de ácidos húmicos*

#### b. Espectroscopía infrarroja de los films

En la figura 11 se muestra el espectro FTIR de los films y sus componentes. De este modo, se utilizó la espectroscopia infrarroja para identificar los diferentes grupos funcionales presentes en los films.

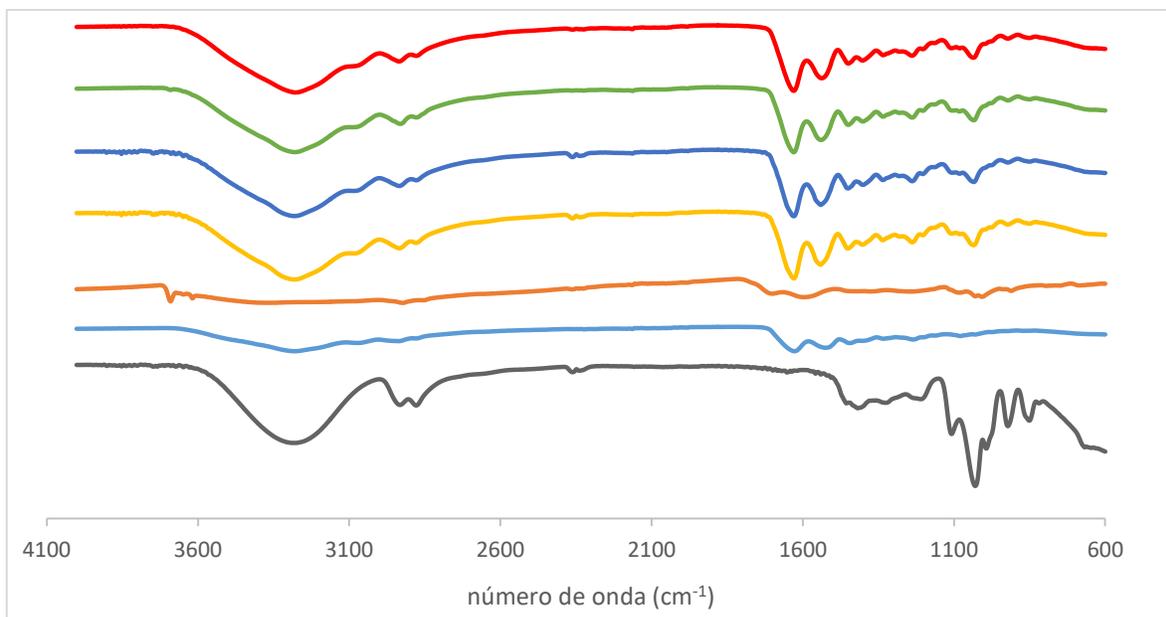


Figura 11: espectro FTIR entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  de los biofilms y sus componentes

— glicerol, — gelatina, — ácidos húmicos, — control, — 1% ácidos húmicos, — 2% ácidos húmicos, — 3% ácidos húmicos

Los biofilms presentan bandas de absorción características de las proteínas, esto es debido a que los films están compuestos principalmente por gelatina, sustancia en su mayor parte de tipo proteico. Dichos films presentaron bandas de absorción en la región de las amidas, que son características de las proteínas. Así, se observaron bandas de amida I a un número de onda de  $1627.63 \text{ cm}^{-1}$  para el control y a  $1629.55 \text{ cm}^{-1}$  para los films con 1%, 2% y 3% de ácidos húmicos. La banda de amida I se debe a la vibración de tensión del enlace  $\text{C}=\text{O}$  o enlaces de hidrógeno acoplados con  $\text{COO}$  (Nagaraja *et al.*, 2012). Este ligero aumento en el número de onda puede ser debido a la presencia de los ácidos húmicos, que en esa región presentan bandas derivadas de la vibración de tensión del enlace  $\text{C}=\text{O}$  del grupo  $\text{COOH}$  (usualmente se observa a números de onda de  $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ ). También presentaron bandas de absorción en la región de amida II, con números de onda de  $1540.85 \text{ cm}^{-1}$  para 1% y 2%,  $1536.99 \text{ cm}^{-1}$  para 3% y  $1538.92 \text{ cm}^{-1}$  para el control. La vibración de la amida II se produce por la combinación de la vibración en tensión fuera de fase del enlace  $\text{C}-\text{N}$  ( $\sim 40\%$ ) y la deformación dentro del plano del enlace  $\text{N}-\text{H}$  del grupo peptídico ( $\sim 60\%$ ) (Fuentes *et al.*, 2017). También se observan bandas pequeñas de amida III a  $1240 \text{ cm}^{-1}$  para el control y  $1236.15 \text{ cm}^{-1}$  para los films con ácidos húmicos. La banda de amida III se debe a la vibración de tensión del enlace  $\text{C}-\text{N}$  y la vibración de flexión del  $\text{N}-\text{H}$  y su intensidad está asociada a la estructura de triple hélice (Muyonga *et al.*, 2004). Los menores valores

del número de onda de los films con ácidos húmicos pueden deberse a la interacción que se da entre el enlace N-H con las cadenas peptídicas durante la fase de calentamiento en la preparación de los films.

Las bandas que aparecen a  $3280.32\text{ cm}^{-1}$ ,  $3278.39\text{ cm}^{-1}$ ,  $3276.47\text{ cm}^{-1}$  y  $3278.39\text{ cm}^{-1}$  para el film control, y los films aditivados al 1%, 2% y 3% respectivamente, puede deberse tanto a las proteínas como al glicerol, según el espectro de los componentes de los films. En el caso de las proteínas, la banda a la que aparece este pico es la Amida A, que resulta de la vibración de tensión del enlace N-H junto con un enlace de hidrógeno. Generalmente, dicha vibración del enlace N-H aparece a números de onda entre  $3400\text{-}3440\text{ cm}^{-1}$  (Muyonga *et al.*, 2004) pero cuando el N-H de un grupo peptídico forma un enlace con el hidrógeno, la posición cambia a una frecuencia más baja (Nagaraja *et al.*, 2012) Con respecto al glicerol, estas bandas en los films corresponden al grupo hidroxilo, que también cambió de frecuencia (los valores para únicamente glicerol están en  $3270\text{ cm}^{-1}$ ) debido a la interacción entre el poliol y la gelatina. En esta misma región se encuentran también los ácidos húmicos, que presentan bandas entre  $3300\text{ - }3400\text{ cm}^{-1}$ , que son debidas a la vibración de tensión del enlace del hidrógeno de los grupos OH. Sin embargo, al estar presentes simultáneamente las bandas del enlace N-H de un grupo peptídico enlazado con hidrógeno, se puede ver afectar su frecuencia, provocando su disminución (Khermakhem *et al.*, 2016). Asimismo, puede distinguirse la región donde aparece la Amida B, a  $3073.98\text{ cm}^{-1}$ ,  $3077.83\text{ cm}^{-1}$ ,  $3075.91\text{ cm}^{-1}$  y  $3075.91\text{ cm}^{-1}$  para el film control, film con 1% de ácidos húmicos, con 2% y 3% de ácidos húmicos respectivamente. Esta región está asociada con la vibración de tensión asimétrica de  $=\text{C-H}$  con  $-\text{NH}_3$ .

Las bandas que se observan a  $2875.34\text{ cm}^{-1}$  para el film control y el film con 1% de ácidos húmicos y  $2877.27\text{ cm}^{-1}$  para los films con 2% y 3% de ácidos húmicos, pueden atribuirse a la vibración de tensión simétrica del enlace C-H de los grupos  $-\text{CH}_2$  de las proteínas y el glicerol. (Fuertes *et al.*, 2017). Dichas bandas pueden verse afectadas por la presencia de ácidos húmicos, que presentan vibraciones a números de onda similares debidos a la tensión del enlace C-H de los grupos alifáticos. Además, se observan bandas a números de onda entre  $2931.27$  y  $2935.13\text{ cm}^{-1}$ , que pueden asociarse bien a la vibración de tensión simétrica del  $-\text{CH}_2$  debido a las proteínas o a la vibración de tensión asimétrica del  $-\text{CH}_2$  del alcohol primario ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) contenido en el glicerol.

Los films también exhiben bandas en el rango  $1448.28 - 1450.21 \text{ cm}^{-1}$  y  $1332.57 - 1334.50 \text{ cm}^{-1}$ , que pueden deberse a las vibraciones de flexión de los grupos  $-\text{CH}_2$  y  $-\text{CH}_3$  de la cadena lateral de aminoácidos respectivamente. Al mismo tiempo, se presentan bandas a números de onda  $1240.8 \text{ cm}^{-1}$  para el film control y  $1236.15 \text{ cm}^{-1}$  para los films aditivados con ácidos húmicos. Esto se puede deber a la vibración de tensión del enlace C-O y la deformación del enlace O-H del grupo COOH presente en los ácidos húmicos (Khermakhem *et al.*, 2016).

Por otro lado, los picos observados en los films a  $1106.94 - 1107.23 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de tensión del grupo C-C del glicerol. Las bandas a  $1027.81 - 1031.72 \text{ cm}^{-1}$  se deben a la vibración de tensión del grupo C-O del glicerol. Los films también mostraron bandas entre  $919 - 921 \text{ cm}^{-1}$  y  $854.45 - 850.21 \text{ cm}^{-1}$  que se dan por la vibración de torsión del grupo  $-\text{CH}_2$  y la vibración de tensión del grupo C-O-C del glicerol respectivamente.

A modo de conclusión, cabe indicar que los biofilms a base de gelatina aditivados con ácidos húmicos presentan grupos funcionales representativos de proteínas y glicerol, ya que son sus compuestos mayoritarios, pero al mismo tiempo se observa la presencia de grupos funcionales debidos a los ácidos húmicos. Las bandas de los ácidos húmicos presentan una menor intensidad, como se ve en la figura 11 en el espectro de dicho compuesto, pero las regiones en las que aparecen se solapan con las de las proteínas.

### c. Análisis termogravimétrico

En muchos materiales de embalaje y específicamente en biofilms, es importante conocer la estabilidad del material utilizado. Los termogramas TGA/DTG que representan el comportamiento de degradación térmica de los films de gelatina aditivados con ácidos húmicos se presentan en la Figura 12.

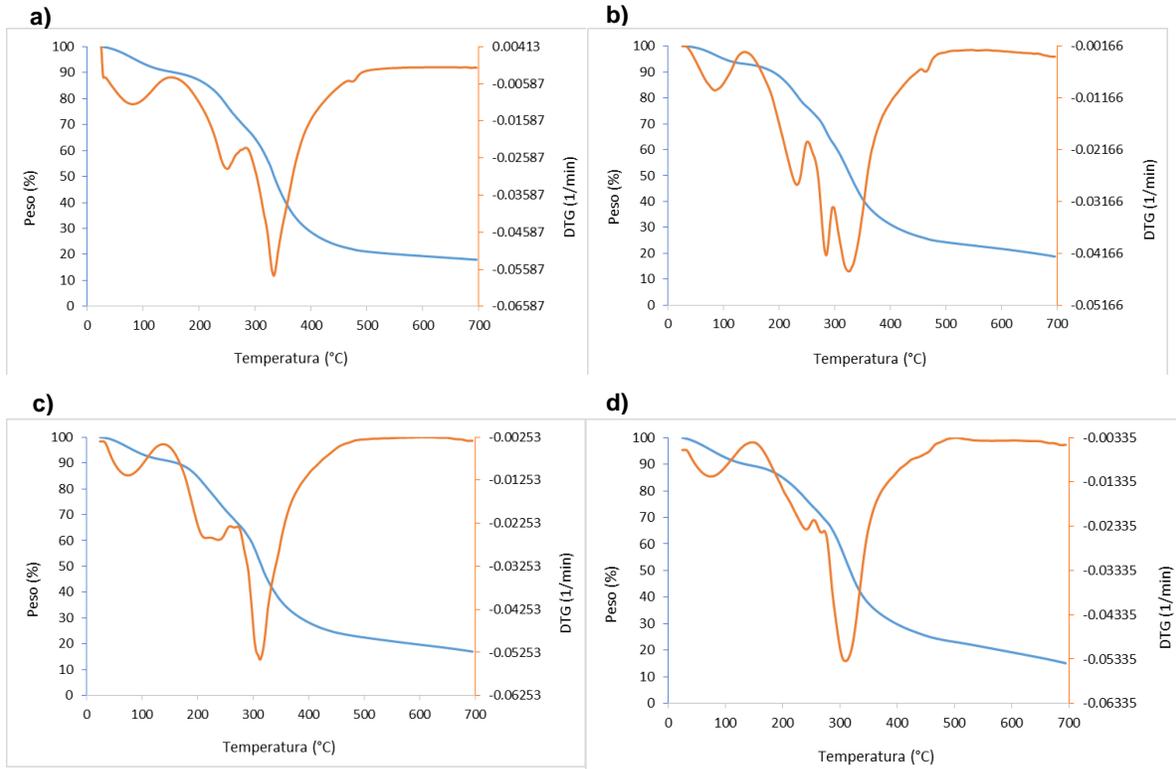


Figura 12: Curvas TGA (—) y DTG (—) de film de gelatina y films aditivados con ácidos húmicos: a) film control, b) film con 1% ácidos húmicos, c) film con 2% ácidos húmicos, d) film con 3% ácidos húmicos

Tabla 6: Datos termogravimétricos de los diferentes films aditivados con ácidos húmicos

Film	Etapas de descomposición	Rango de temperatura (°C)	pico DTG	Pérdida de peso (%)	Residuo a 700°C (%)	T <sub>50</sub> (°C)*	T <sub>max</sub> (°C)
C	1	35-155	80.47	82.03	17.97	333.86	333.55
	2	155-285	252.72				
	3	285-470	333.55				
1%	1	35-145	87.29	81.24	18.76	327.92	326.82
	2	145-255	231.48				
	3	255-298	284.82				
	4	298-460	326.82				
2%	1	35-145	80.47	82.99	17.01	315.83	312.63
	2	145-266	214.01				
	3	273-480	312.64				
3%	1	35-155	76.79	84.87	15.13	314.68	308.59
	2	155-260	241.62				
	3	260-460	308.59				

\*temperatura a la que se pierde el 50% del peso del film. C: control, 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de ácidos húmicos en el biofilm

En la tabla 6, se muestran los datos termogravimétricos obtenidos para los distintos films preparados. Así, se pueden observar tres etapas de cambio térmico de las propiedades de los films (pérdida de peso). La primera zona identificada se produce desde 35°C a 160°C aproximadamente que corresponde con la pérdida de agua contenida en los films (humedad). La segunda zona, entre 160 y ~280°C se debe a la evaporación del glicerol. La degradación de las proteínas de la gelatina se presenta en un rango de temperatura de 280°C – 470°C, que está asociado a la tercera etapa (Kumar *et al.*, 2008). Esta etapa está asociada con la ruptura de la cadena proteica y la ruptura de los enlaces peptídicos. En general, todos los films presentan estas tres etapas de pérdida de peso, observándose ligeros cambios en los rangos de temperatura. Sin embargo, cabe destacar la presencia de una pequeña curva que se genera en el film con 1% de ácidos húmicos entre la segunda y la tercera zona. Esta curva puede deberse a la presencia de los ácidos húmicos, ya que estos generalmente presentan picos de descomposición en rango de 170-220°C. No obstante, en estos análisis se ve desplazada hacia la izquierda por la presencia de proteínas en un rango similar. Esta zona de degradación de los ácidos húmicos se va solapando con la zona de las proteínas a medida que aumenta su concentración en los films, provocando su desplazamiento hacia la izquierda en la curva. Este solapamiento es más evidente para la máxima concentración ensayada (3%) y puede deberse a la interacción de los ácidos húmicos con las proteínas en la matriz del gel.

Como se puede observar en la tabla 6, los valores de T<sub>50</sub> de los films de gelatina con ácidos húmicos disminuyen con respecto al film control. Así, se observa una disminución de la temperatura a la que se pierde el 50% de la masa a medida que aumenta la cantidad de ácidos húmicos en el film. En el caso de la T<sub>max</sub> de pérdida de masa, se observó que dicha temperatura disminuye a medida que aumenta la concentración de ácidos húmicos en el film. Por tanto, la presencia de una mayor cantidad de ácidos húmicos genera una mayor pérdida de masa con el tiempo, es decir, la estabilidad del film disminuye con el aumento de temperatura. Además, la pérdida máxima de peso parece haber sido determinada por la T<sub>max</sub> del glicerol y la gelatina, 304°C y 310°C respectivamente (Fuentes *et al.*, 2017). Por otro lado, la pérdida de peso total fue muy similar en todos los films (control y aditivado con ácidos húmicos), variando entre el 81.0% y el 84.0%, aunque si se ve una tendencia de aumento de pérdida de peso a medida que aumenta la concentración de ácidos húmicos en el film.

### C. Caracterización films aditivados con hidrolizado de lodos

De la misma forma en que se llevaron a cabo los experimentos de adición de ácidos húmicos a films de gelatina y glicerol, se realizaron tres diferentes experimentos con adición de hidrolizado de lodo mediante oxidación húmeda en distinta concentración (1%, 2%, 3%). Previamente, se llevó a cabo un análisis completo de la composición de los lodos frescos e hidrolizados utilizados como aditivos. Un análisis detallado se puede verificar en el Anexo B.

Una vez caracterizado el hidrolizado, se llevó a cabo la evaluación de este aditivo en films de gelatina. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

#### 1. Apariencia

Los valores de los parámetros relacionados con la apariencia los films aditivados con hidrolizado se muestran en la Tabla 6. Los valores de grosor son muy similares en 2% (L2) y 3% (L3), que a su vez son un poco más altos que los de 1% (L1) y el control. Esto indica que los films con 2% y 3% de lodos presentan una red un poco menos densa y compacta que el film de gelatina control. La menor compactibilidad puede deberse a un entrecruce menos favorable entre la gelatina y los sólidos del hidrolizado. El film con 1% de hidrolizado no difiere mucho del film de gelatina control, ya que su espesor es muy similar, por lo que las redes formadas no se ven afectadas significativamente por la concentración de hidrolizado que contiene la disolución.

Tabla 7: Grosor y transparencia de los films con hidrolizado

<b>Film</b>	<b>C</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
Grosor ( $\mu\text{m}$ )	$82 \pm 16$	$85 \pm 12$	$92 \pm 11$	$94 \pm 13$
Transparencia	$0.44 \pm 0.07$	$0.34 \pm 0.02$	$0.49 \pm 0.07$	$0.7 \pm 0.1$

\*C: control (film de gelatina), L1: 1% hidrolizado, L2: 2% hidrolizado, L3: 3% hidrolizado

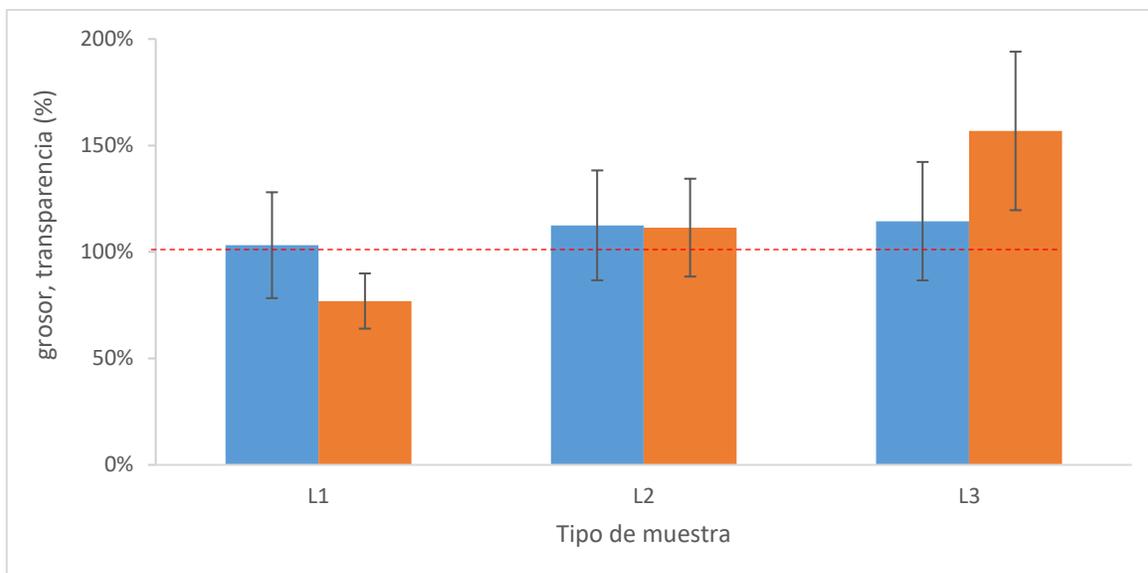


Figura 13: grosor y transparencia de los films aditivados con hidrolizado

--- Control ■ grosor, ■ transparencia

En general, los films con hidrolizado también presentaron baja transmisión de luz en el rango UV (200-280 nm) (Figura 14), proveyendo una eficiente barrera contra UV. En el rango visible, a partir de los 300nm empezó a aumentar la luz transmitida. El film con 1% de hidrolizado fue el más transparente (Tabla 6), aunque los films con 2 y 3% presentaron bajos valores de transparencia también, aunque ligeramente superiores a la del control. Los valores de transparencia son mucho más bajos que los de los films sintéticos comerciales, polipropileno (OPP), polietileno (LDPE y PE) y cloruro de polivinilideno (PVDC) (Shiku *et al.*, 2004), ya que ninguno de estos presenta valores de transparencia menores a 1, por lo que sí presentan una apariencia adecuada para ver a través de ellos y no son opacos.

Los films con 2% y 3% de hidrolizados presentaron un valor de transmitancia de luz muy similar al film de gelatina pero el film con 1% de hidrolizados tuvo un aumento de hasta 42% de transmisión de luz, en el rango 600-800 nm. El film con 3% de hidrolizados presentó la menor transmisión, hasta un 20% de luz, en el rango de 700-800 nm.

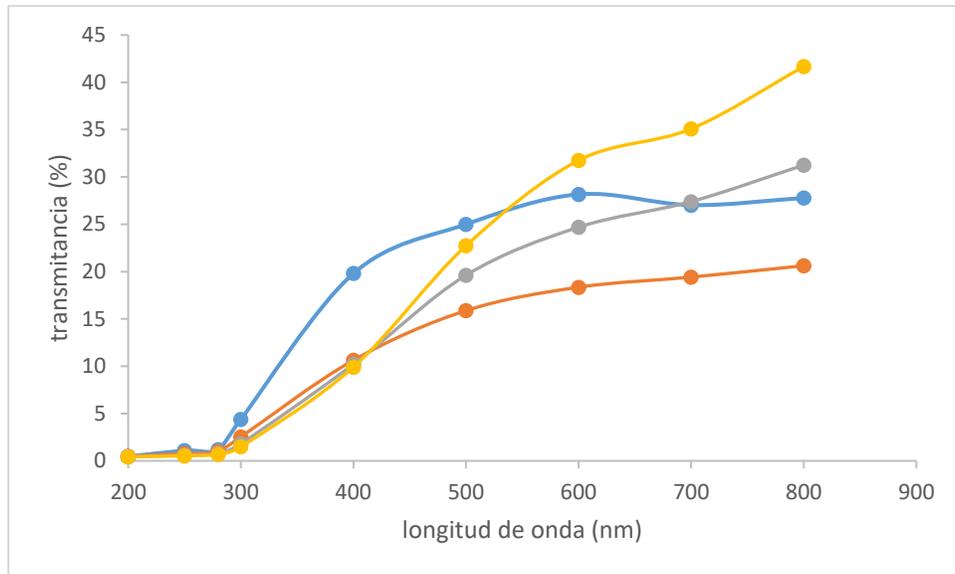


Figura 14: Transmisión de luz (T, %) a longitud de onda 200-80nm de films con hidrolizados

—●— control —●— 1% hidrolizado —●— 2% hidrolizado —●— 3% hidrolizado

En cuanto al color, se hizo una comparación óptica entre los distintos films con hidrolizados y el film de gelatina. Los tres films con hidrolizados presentaron un tono amarillo claro que fue más evidente a medida que aumentaba el porcentaje de hidrolizado en ellos. El film con 3% de hidrolizados presentó un tono amarillo oscuro más fuerte que los films con 1% y 2% pero los tres tipos de film mostraron un transparencia alta sin opacidad.

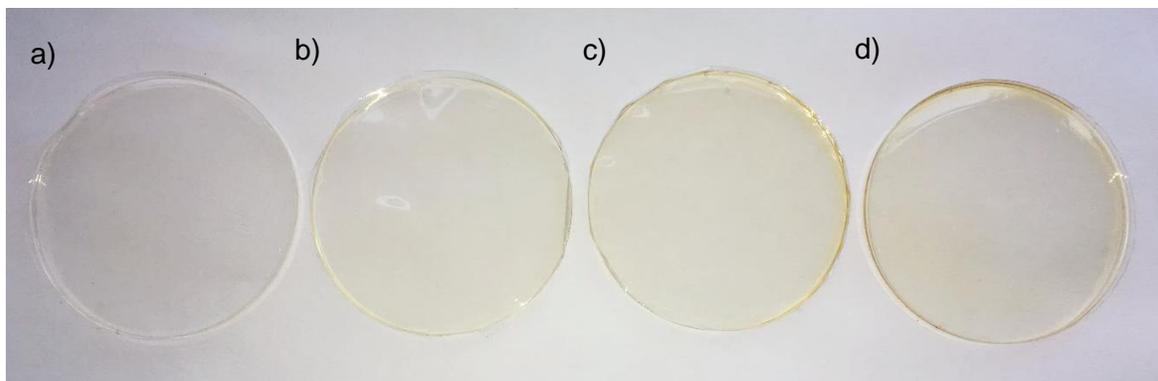


Figura 15: color de los films con hidrolizado, a) control (gelatina), b) 1% hidrolizado, c) 2% hidrolizado, d) 3% hidrolizado

## 2. Propiedades físicas

Se midieron las propiedades físicas de los films tales como humedad, solubilidad, fuerza de punción y elongación con punción, estos datos se presentan en la Tabla 7 y la Figura 15.

Tabla 8: Humedad, solubilidad del film, fuerza de punción (PS), deformación en punción (PD) y transparencia de los films con hidrolizado

Film	C	L1	L2	L3
Humedad (%)	17.0 ± 0.1	18 ± 2	18 ± 1	18 ± 2
Solubilidad (%)	71 ± 7	56 ± 6	69 ± 1	84 ± 7
PS (N/mm)	202 ± 45	133 ± 10	124 ± 18	116 ± 10
PD (%)	0.4 ± 0.2	2.0 ± 0.3	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.3

\*C: control (film de gelatina), L1: 1% hidrolizado, L2: 2% hidrolizado, L3: 3% hidrolizado

El contenido de humedad no varía entre los distintos films con hidrolizados y el control. Sin embargo, la solubilidad del film con el 1% de hidrolizado fue menor que para 2% y 3% de hidrolizado. A medida que aumenta la concentración de hidrolizado en los films, aumenta la solubilidad del film en agua. Los minerales y moléculas degradadas en los hidrolizados generaron films más débiles.

Las propiedades mecánicas de los films se ven afectadas según la concentración de hidrolizado que tiene adicionado. Los tres tipos de films con hidrolizado presentan una fuerza de punción menor al film de control, por lo que estos films son más débiles y no presentan gran resistencia. Así, el film con 3% de hidrolizado pierde un 40% de fuerza en comparación con el control. La deformación por punción se ve afectada de la misma forma, cuanto mayor porcentaje de hidrolizado contenga el film, menor elongación presenta antes de romper. Aun así, los biofilms con hidrolizado presentan valores mayores al film de gelatina, hasta 4 veces mayor con el 3% de hidrolizado; esto se puede deber a la higroscopicidad que presentan estos films al estar en contacto con el ambiente, por lo que se obtienen films elásticos pero no resistentes.

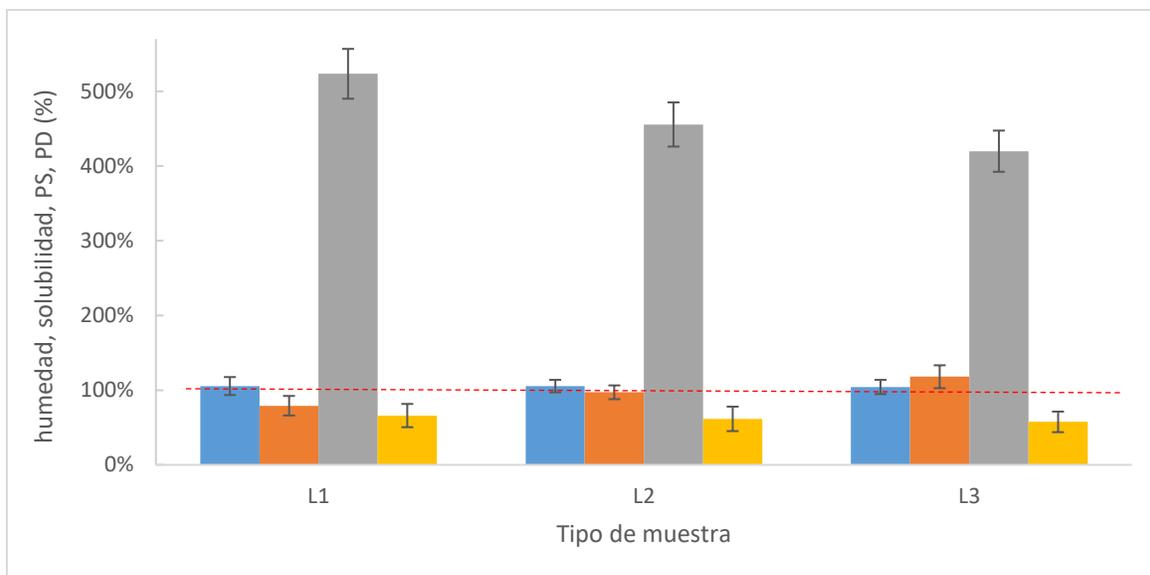


Figura 16: Propiedades físicas de films de gelatina con hidrolizado

--- Control ■ humedad, ■ solubilidad, ■ fuerza de punción, ■ elongación en punción

### 3. Propiedades químicas

La actividad antioxidante se muestra en la Tabla 8. Se realizaron las mismas pruebas que para determinar capacidad antioxidante de los films con ácidos húmicos: DPPH, ABTS y quelación del ion férrico. De nuevo, el método DPPH no fue útil debido a la presencia de ácidos húmicos y otros compuestos oxidados en los hidrolizados que no son solubles en etanol. (Figura 32, Anexo C)

Tabla 9: Actividad antioxidante: ABTS, quelación ion férrico de films con hidrolizados

Film	ABTS		Quelación ion férrico	
	%AA (90 µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	%AA (150 µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1%	66.84	67	2.27	ND
2%	61.62	68	2.88	ND
3%	60.70	70	2.59	ND

\*ND: no determinado, 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de hidrolizado en el biofilm

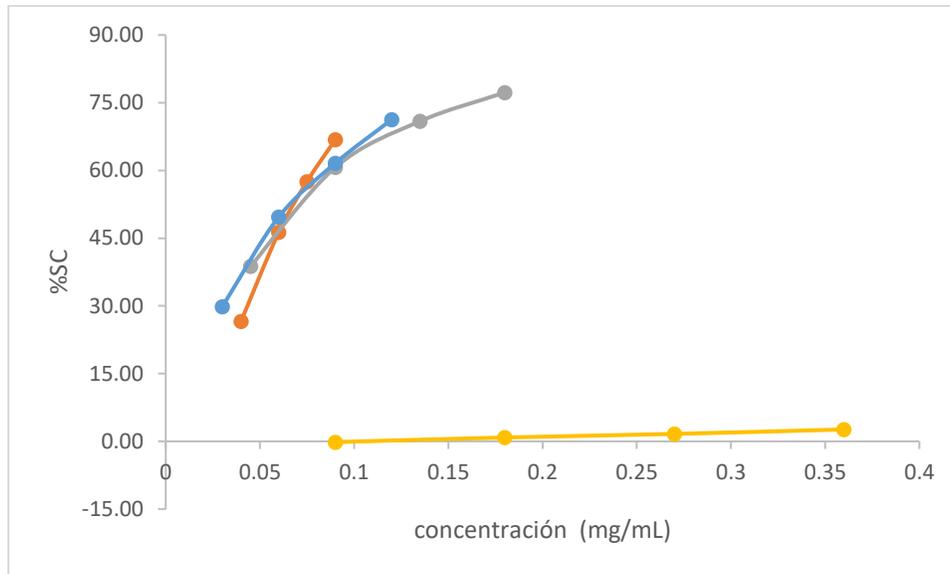


Figura 17: capacidad antioxidante de hidrolizado de lodos a distintas concentraciones según análisis ABTS

— Control, — film con 1% hidrolizado — film con 2% hidrolizado — film con 3% hidrolizado

Según los resultados obtenidos en la prueba ABTS, los hidrolizados de lodos presentan actividad antioxidante, probablemente debido a la presencia de ácidos húmicos, aminoácidos y otros compuestos presentes en los hidrolizados. El film control presenta valores muy bajos, que no es representativo para indicar que tiene actividad antioxidante, por lo que el hidrolizado aditivado en el film sí mejora esta propiedad en los films. El porcentaje de hidrolizado adicionado a la disolución formadora de film no afectó a la capacidad antioxidante que pudiera presentar. Como promedio, una concentración de 68  $\mu\text{g/mL}$  de hidrolizados, es capaz de retirar del medio el 50% de los radicales  $\text{ABTS}\cdot^+$ . Esta actividad antioxidante que presenta el hidrolizado puede deberse al bajo peso molecular de sus compuestos por el tratamiento tan agresivo al que se somete. Según García (2016), a lo largo del tratamiento hidrotérmico a alta temperatura y presión, el contenido de sólidos aumenta, donde la concentración de moléculas de tamaño mediano y pequeño (13-35kDa) aumenta considerablemente tras 1 hora de tratamiento a temperatura mayor a  $100^\circ\text{C}$  y a 40 bar. Alrededor del 90% de las moléculas son de pequeño tamaño, debido a la ruptura de las moléculas de mayor tamaño por procesos de hidrólisis y/u oxidación. Según Ortiz (2017), la capacidad secuestrante de radicales libres de un hidrolizado de zeína obtenido con alcalasa, estuvo relacionado con el peso molecular y la hidrofobicidad de los constituyentes del péptido. En este trabajo, las distintas fracciones del hidrolizado de zeína, fraccionadas por ultrafiltración se analizaron para determinar la capacidad de captación de

radicales. La capacidad secuestrante del radical ABTS no fue dependiente del peso molecular del péptido, en cambio, la capacidad para captar los radicales DPPH y  $O_2^-$  si lo fue. Asimismo, al investigarse péptidos obtenidos de plasma bovino, los resultados sugieren que su capacidad antioxidante también depende de su peso molecular. Los péptidos con peso molecular menor a 3 kDa exhibieron actividad FRAP y de captación de radicales ABTS. La actividad antioxidante aumentó junto con el grado de hidrólisis, lo cual se atribuyó a la exposición al medio de los residuos de aminoácidos capaces de reaccionar con oxidantes, promovida por los cambios estructurales en las proteínas como consecuencia de la hidrólisis (Kong & Xiong, 2006). Este mismo comportamiento ha sido reportado en investigaciones realizadas con plasma de porcino (Q. Liu, Kong, Jiang, Cui & Liu, 2009)

En cuanto al análisis de reducción del ion férrico, se obtuvieron valores del 2% de actividad antioxidante, por lo que el hidrolizado no presenta alta actividad quelante y no inhibe la transferencia de electrones de manera significativa. Como se mencionó anteriormente, los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales de los aminoácidos tienen función quelante de iones metálicos que le proveen la capacidad de disociarse y ser donadores de protones. Pero al haber sometido el hidrolizado a un tratamiento tan agresivo, la mayor parte de las moléculas presentan probablemente una estructura degradada. En este tratamiento, algunos residuos se oxidan, como la fenilalanina y triptófano. Estas oxidaciones llevan a un cambio en la cadena lateral del aminoácido, lo que afecta a todas sus propiedades (Devlin, 2014). Al verse afectada la cadena lateral del aminoácido, pierde su capacidad de disociarse y su función como quelante de iones metálicos.

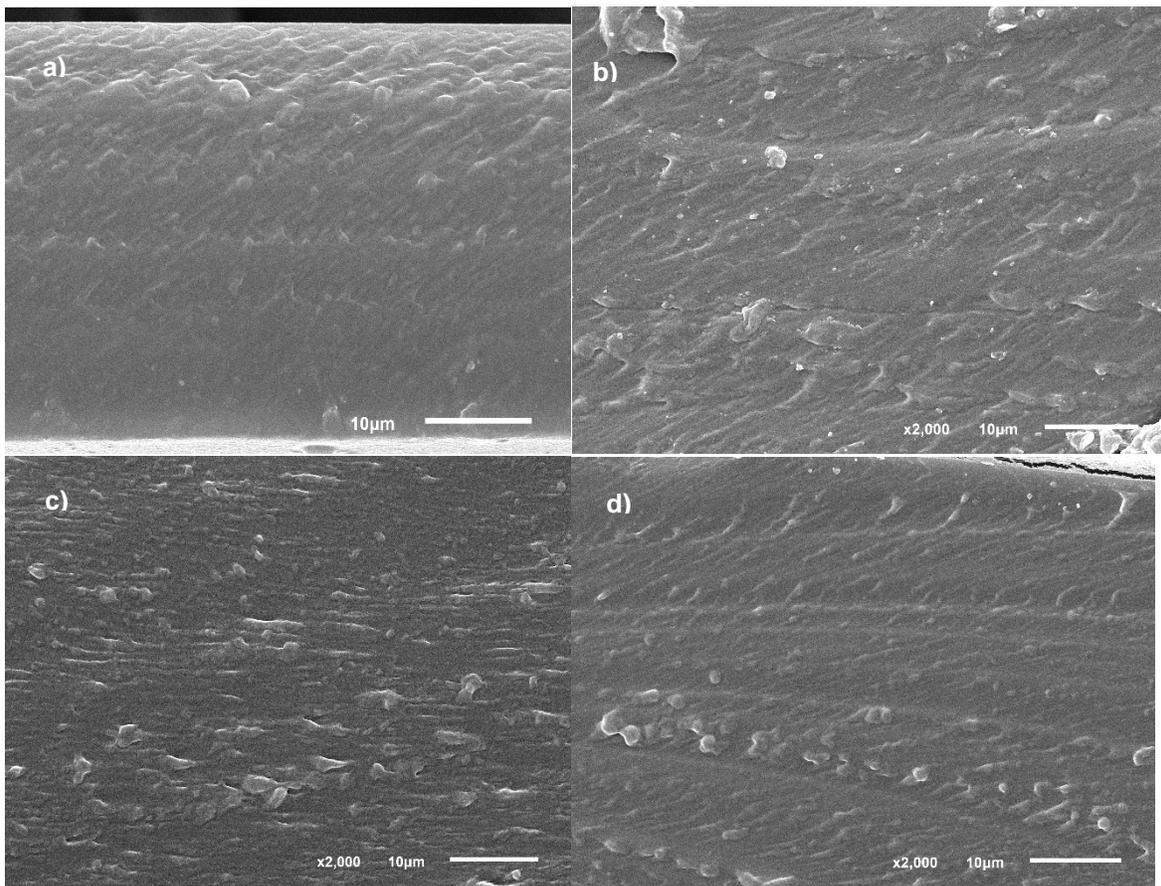
Se puede concluir entonces que la adición de hidrolizados a los films de gelatina mejora propiedades antioxidantes captando radicales prooxidantes pero no funciona como quelante de iones metálicos.

#### 4. Propiedades estructurales

##### a. Análisis morfológico

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido para investigar la estructura de la sección transversal de los films con diferentes concentraciones de hidrolizado (Figura 17). Las vistas microscópicas mostraron morfologías de la sección transversal uniformes sin

grietas, cortes o aberturas. Las vistas SEM de los films con distintas concentraciones de hidrolizado no presentaron diferencia marcada en su estructura sino que muestra una estructura ordenada y homogénea, presentando más gránulos formados en ellos que en el film de gelatina, pero esto puede ser provocado por el corte del film para hacer la prueba.



*Figura 18: Microscopía electrónica de barrido de la sección transversal de: a) film de gelatina (control), b) film con 1% hidrolizado, c) film con 2% de hidrolizado, d) film con 3% de hidrolizado*

#### b. Espectroscopia infrarroja de los films

El espectro FTIR de los films y sus componentes se muestran en la figura 19. Nuevamente, se empleó esta técnica para la identificación de los grupos funcionales presentes en los films.

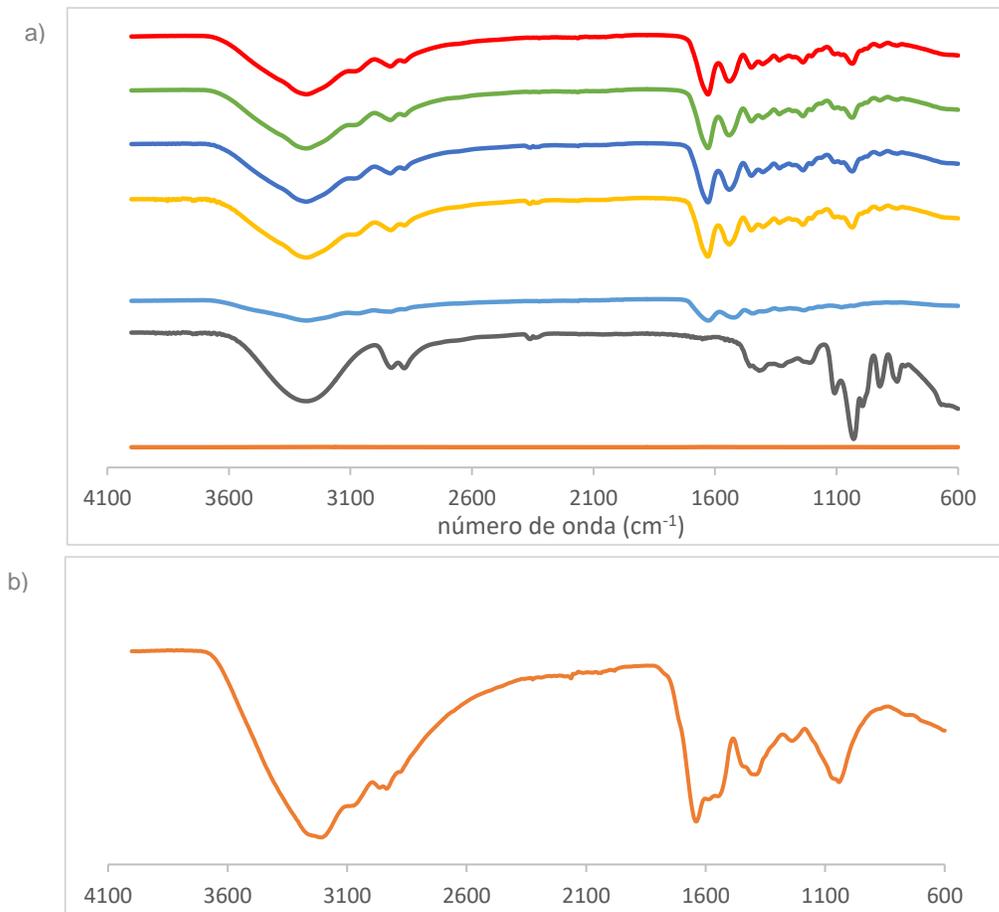


Figura 19: a) espectro FTIR entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  de biofilms aditivados con hidrolizado de lodos y sus componentes — glicerol, — gelatina, — hidrolizado, — control, — 1% hidrolizado, — 2% hidrolizado, — 3% hidrolizado. b) detalle del espectro FTIR entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  del hidrolizado del lodo

Los biofilms presentan bandas de absorción características de las proteínas y del glicerol, esto se debe a que los films están compuestos principalmente por gelatina, que como ya se ha comentado, está compuesta mayoritariamente por proteínas, y por la presencia de glicerol (25% sobre la proteína). Todos los films presentaron bandas típicas de las amidas I, II y III y amida A y B, que son grupos funcionales característicos de las proteínas. Con respecto a la banda de la amida I, se observó a un número de onda de  $1627.63 \text{ cm}^{-1}$  para el control y  $1625.63 \text{ cm}^{-1}$  para los films aditivados. La banda de amida I se debe a la vibración de tensión del enlace C=O o a enlaces de hidrógeno acoplados con COO (Nagaraja *et al.*, 2012). También presentaron bandas de absorción en la región de la amida II, con números de onda de  $1536.99 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1535.06 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1540.85 \text{ cm}^{-1}$  y  $1538.92 \text{ cm}^{-1}$  para el film control y, con 1%, 2% y 3% de hidrolizado, respectivamente. La vibración de la amida II, como ya se ha comentado, se produce por la combinación de la vibración en tensión fuera de fase del enlace C-N (~40%) y la deformación dentro del plano del enlace

N-H del grupo peptídico (~60%) (Fuentes *et al.*, 2017). También se observan bandas menos intensas de amida III a números de onda 1232.29  $\text{cm}^{-1}$  para el control, 1232.29  $\text{cm}^{-1}$ , 1234.22  $\text{cm}^{-1}$  y 1236.15  $\text{cm}^{-1}$  para los films con 1%, 2% y 3% de hidrolizado respectivamente. Dicha banda es debida a la vibración de tensión del enlace C-N y la vibración de flexión del N-H, siendo la estructura de triple hélice que presentan las proteínas la que determina su intensidad (Muyonga *et al.*, 2004).

Las bandas que aparecen a 3276.47  $\text{cm}^{-1}$  para el film control, 3288.04  $\text{cm}^{-1}$  para el film con 1% de hidrolizado y 3280.32  $\text{cm}^{-1}$  para los films con 2% y 3% de hidrolizado, pueden deberse tanto a las proteínas como al glicerol, ya que dichas bandas están presentes en el espectro de ambos componentes de los films. Respecto a las proteínas, la banda a la que aparece es características de la Amida A, que resulta de la vibración de tensión del enlace N-H junto con un enlace de hidrógeno. Generalmente, la vibración de tensión de un enlace N-H aparece a números de onda entre 3400-3440  $\text{cm}^{-1}$  (Muyonga *et al.*, 2004), sin embargo, cuando el N-H de un grupo peptídico forma un enlace con el hidrógeno, se produce un desplazamiento de la posición frecuencias más bajas (Nagaraja *et al.*, 2012). En lo relativo al glicerol, las bandas que se observan en los films se deben al grupo hidroxilo, en el que también se produjo un cambio en la frecuencia por la interacción entre el poliol y la gelatina (el valor observado para solamente el glicerol está en 3270  $\text{cm}^{-1}$ ). La Amida B aparece en la región de 3064.33  $\text{cm}^{-1}$  y 3070.12  $\text{cm}^{-1}$ , para el film control y para los films con 1%, 2% y 3% de hidrolizado, respectivamente. Dicha región está asociada con la vibración de tensión asimétrica del enlace =C-H con  $-\text{NH}_3$ .

Las bandas que se observan a 2871.49  $\text{cm}^{-1}$  para el film control y el film con 1% de hidrolizado y 2875.34  $\text{cm}^{-1}$  para los films con 2% y 3% de hidrolizados, pueden atribuirse a la vibración de tensión simétrica del enlace CH- y los grupos  $-\text{CH}_2$  de las proteínas y el glicerol. (Fuentes *et al.*, 2017). A la vista de la figura 19a, también se identificaron bandas a números de onda 2927.31 y 2940.20  $\text{cm}^{-1}$ , que son característicos tanto de la vibración de tensión simétrica del  $\text{CH}_2$  debido a las proteínas como de la vibración de tensión asimétrica del  $\text{CH}_2$  presente en el alcohol primario ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) contenido en el glicerol. Los biofilms también exhibieron bandas en el rango de 1448.21 – 1450.50  $\text{cm}^{-1}$  y de 1332.67 - 1334.43  $\text{cm}^{-1}$ , que pueden deberse a las vibraciones de flexión de grupos  $-\text{CH}_2$  y grupos  $-\text{CH}_3$  de la cadena lateral de aminoácidos, respectivamente.

Con respecto al glicerol, se puede observar en la figura 19a que la presencia de grupos funcionales del glicerol también es muy marcada en estos films. Se observan picos a  $1105.94 - 1108.72 \text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de tensión del grupo C-C del glicerol. Las bandas de  $1030.61 \text{ cm}^{-1}$  para el film control y  $1033.66 \text{ cm}^{-1}$  para los films con hidrolizados, se deben a la vibración de tensión del grupo C-O del glicerol. Asimismo, los films también mostraron bandas entre  $912.14 - 917.26 \text{ cm}^{-1}$  y  $854.45 - 856.24 \text{ cm}^{-1}$  que son característicos de la vibración de torsión del grupo  $-\text{CH}_2$  y la vibración de tensión del grupo C-O-C del glicerol, respectivamente.

Los biofilms a base de gelatina aditivados con hidrolizado de lodos también presentan grupos funcionales representativos de proteínas y glicerol, ya que dichos compuestos son mayoritarios, al igual que ocurría con los films aditivados con ácidos húmicos. Sin embargo, la presencia de grupos funcionales relativos al hidrolizado de lodos es muy difícil de observar, debido a que la intensidad de los picos característicos de dicho compuestos es muy baja (Figura 19b) y a la ligera aditivación. Las bandas de las proteínas, gelatina y glicerol son las que exhibieron una mayor intensidad, disminuyendo su frecuencia levemente en comparación con el film de gelatina.

### c. Análisis termogravimétrico

Dada la importancia de la estabilidad de los materiales que se van a emplear en el embalaje de productos, se realizaron análisis de tipo termogravimétrico para estudiar el comportamiento de degradación térmico de los films de gelatina aditivados con hidrolizado de lodos. Los termogramas TGA/DTG se muestran en la Figura 20.

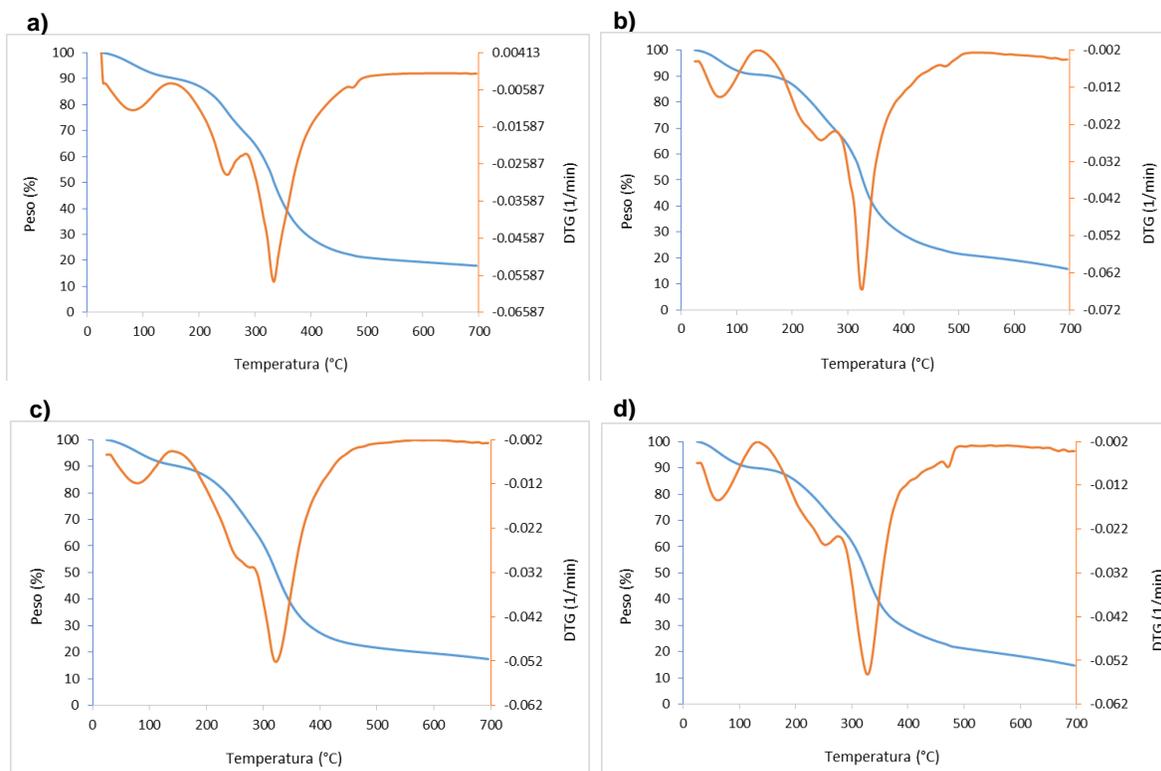


Figura 20: Curvas TGA (—) y DTG (—) del film de gelatina y los films aditivados con hidrolizado: a) film control, b) film con 1% hidrolizado, c) film con 2% hidrolizado, d) film con 3% hidrolizado

Tabla 10: Propiedades termogravimétricas de los films de gelatina aditivados con hidrolizado de lodo

Film	Etapas de descomposición	Rango de temperatura (°C)	pico DTG	Pérdida de peso (%)	Residuo a 700°C (%)	T <sub>50</sub> (°C)*	T <sub>max</sub> (°C)
C	1	35-155	80.47	82.03	17.97	333.86	333.55
	2	155-285	252.72				
	3	285-470	333.55				
1%	1	34-145	73.21	84.18	15.82	326.99	326.25
	2	147-285	255.89				
	3	283-476	326.25				
2%	1	32-145	80.44	82.53	17.47	322.97	322.73
	2	147-284	287.62				
	3	284-480	322.73				
3%	1	35-140	63.00	85.22	14.78	314.68	325.95
	2	140-280	252.6				
	3	280-466	329.72				

\*temperatura a la que se pierde el 50% del peso del film. C: control, 1%, 2%, 3% corresponden a la concentración de hidrolizado en el biofilm

En la Figura 20, se puede observar una etapa de pérdida de peso inicial de aproximadamente el 10%, en un rango de temperatura de 35 a 160°C, que se debe a la pérdida de humedad que contenían los films. Además, el glicerol se descompone entre 160 y 280°C, que se corresponde con la segunda etapa que se observa en la Figura 20. Finalmente, se produce la degradación de las proteínas de la gelatina, que se observa en un rango de temperatura de 280°C y 470°C (Kumar *et al.*, 2008). Esta etapa está asociada con la ruptura tanto de la cadena proteica como de los enlaces peptídicos. Cabe destacar que, todos los films presentan las mismas etapas de descomposición y no se observa alguna zona que explique la participación del hidrolizado como aditivo en los films de gelatina. Esto puede deberse a que el porcentaje añadido es relativamente bajo o al estado de los compuestos del hidrolizado. En este sentido, dichos compuestos estarían degradados lo que dificultaría su identificación en este análisis. Por otro lado, no se observa un comportamiento específico al aumentar el porcentaje de hidrolizado en los films y esto puede deberse a que la composición del hidrolizado es variada y el tratamiento al que se sometió provocó una degradación y pérdida de funciones de los compuestos presentes en el mismo, perdiendo propiedades y, a su vez, evitando que se identifique un efecto en los films de gelatina al aditarlo en baja concentración.

Como se puede observar en la tabla 10, los valores de  $T_{50}$  de los films de gelatina con hidrolizado disminuyen con respecto al film control. Asimismo, se observa una disminución de la temperatura a la que se pierde el 50% de la masa a medida que aumenta la cantidad de hidrolizados en el film. En el caso de la  $T_{max}$  de pérdida de masa, los valores de los films con hidrolizados resultaron ser menores que para el film control, por lo que la aditivación con hidrolizado en films de gelatina provoca una rápida pérdida de la masa con el tiempo, o lo que es lo mismo, una disminución de su estabilidad a medida que aumenta la temperatura. El valor del residuo del film a los 700°C está en concordancia con lo comentado anteriormente, ya que al aditar los films con hidrolizado de lodos, éstos presenta una mayor pérdida de peso al aumentar la temperatura, indicando que a altas temperaturas se descomponen más rápido que los biofilms de gelatina sin aditivos. Con relación a la pérdida de peso total, ésta fue muy similar en todos los films y a pesar de que no se observa una tendencia definida, los films aditivados con hidrolizados presentaron mayor pérdida de peso que el film control.

## D. Comparación entre films aditivados con ácidos húmicos o hidrolizado

Tabla 11: Efecto de aditivos en films de gelatina

<b>Propiedades</b>	<b>Ácidos húmicos</b>	<b>Hidrolizado</b>
Grosor	+	=
Transparencia	=	+
Barrera luz UV	++	+
Transmitancia	++	=
Solubilidad	+	-
Fuerza de punción	++	-
Elongación en punción	+	++
Actividad antioxidante	+	+
Morfología	=	=
Estabilidad a alta T°	-	-

\*efectos de aditivos sobre las propiedades de los films se clasificaron como: (+) mejora, (=) igual al control, (-) menor al control

La aditivación de ácidos húmicos o hidrolizados de lodos en films de gelatina tuvo efectos positivos en las propiedades, mejorando muchas de ellas en comparación a los de control. Se obtuvieron mejoras en las propiedades físicas, específicamente en solubilidad y en texturometría, en las propiedades químicas y en la apariencia de los films. La fuerza de punción y la elongación en punción mostraron resultados de mejora con la aditivación de ácidos húmicos; sin embargo, los films aditivados con hidrolizado de lodos presentaron valores menores, indicando que los ácidos húmicos mejoran la propiedad de resistencia y extensibilidad al film. Esto mismo se ve con los valores del grosor del film, aun así, ambos tipos de films mostraron estructuras muy homogéneas. Con los ácidos húmicos se vieron mejoras en la transmitancia del film y en la barrera de luz UV, pudiendo actuar como mejor opción de envoltorio para alimentos sensibles a la luz. La solubilidad de los films mejoró con la aditivación de ácidos húmicos, mientras que el agregar hidrolizado de lodos aumentó la solubilidad de los films y su higroscopicidad también se vio afectada. En cuanto a las propiedades químicas, se obtuvo un incremento en la capacidad antioxidante, proveyendo al film la capacidad de quelar metales y de secuestrar radicales libres; con la aditivación con hidrolizado de lodos se observó un aumento en la capacidad antioxidante, pero menos acusado que en el caso de los ácidos húmicos. En las propiedades estructurales, los efectos

que se observaron fueron ligeramente positivos, para ambos tipos de films aditivados, la morfología es muy similar al igual que la estabilidad. Conforme aumenta la concentración de aditivo, el tiempo de descomposición del material es menor, pero aun así muestran estabilidad hasta 300°C.

#### E. Otras pruebas con hidrolizado de lodos

Dado que el hidrolizado de lodos está compuesto principalmente por proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos y, que éste aditivado a los films de gelatina presentó un efecto positivo como barrera de luz UV, capacidad antioxidante y resistencia para deformarse, se planteó la posibilidad de emplear sólo estos polímeros para la formación del film, sin que fuese necesario añadir gelatina ni glicerol a la formulación o, al menos, en un porcentaje mucho menor al necesario para el control. A su vez, se ensayaron tanto los biopolímeros extracelulares (EPS) (separados de la célula mediante un tratamiento térmico a 100°C) como el hidrolizado obtenido tras el tratamiento de oxidación húmeda del lodo. En la siguiente tabla se muestra la composición de ambas disoluciones.

Tabla 12: composición de disoluciones de biopolímeros obtenidos a partir del lodo

<b>Tratamiento</b>	<b>Proteínas (mg/g ssv)</b>	<b>Ácidos húmicos (mg/g ssv)</b>	<b>Carbohidratos (mg/g ssv)</b>	<b>Total (mg/g ssv)</b>
EPS extraídos	38.16 ± 0.05	31.568 ± 0.001	8.66 ± 0.05	81.39 ± 0.07
OH 120 min	322.91 ± 0.03	134.217 ± 0.006	118.02 ± 0.04	575.15 ± 0.05

Como cabía esperar, la concentración de sólidos disueltos en la muestra de EPS extraídos es muy baja, con 0.65% de sólidos en disolución. Con el fin de concentrar esta muestra, fue liofilizada para tener un 100% de sólidos en materia seca y con estos poder formar una disolución con 3% de sólidos capaz de formar un film. Con la muestra de lodos que se sometió a un tratamiento hidrotérmico se obtuvo un 1.42% de sólidos en la solución (con un 56% de proteína). En este caso, se decidió experimentar con el hidrolizado sin concentrar para ver su capacidad de formar film. Paralelamente, se tomó otra muestra de estos lodos hidrolizados y se liofilizó para tener un 100% de sólidos en materia seca y, con estos, poder formar una disolución con 3% de sólidos capaz de formar un film. En la

siguiente tabla se puede observar la capacidad de formación de film que tuvo cada experimento según su composición de sólidos.

Tabla 13: capacidad de formación de films de lodos con distintos tratamientos

Muestra	Tratamiento	Composición Solución		Concentración sólidos	Glicerol	Capacidad de formar film	Características
		Muestra	Gelatina				
E1	extracción EPS liofilizada	100%		3%	40%	-	mal olor, aspecto de precipitado, gelatinoso, pegajoso
E2	extracción EPS liofilizada	100%		3%	30%	-	pegajoso, aspecto de precipitado gelatinoso
E3	extracción EPS liofilizada	100%		3%	25%	+	mal olor, despegó solamente una parte del plato
E4	extracción EPS liofilizada	75%	25%	3%	25%	-	mal olor
E5	extracción EPS liofilizada	50%	50%	3%	25%	-	mal olor
L1	OH	100%		1.42%	40%	-	aspecto de gel o mermelada
L2	OH	100%		1.42%	20%	-	no despegó
L3	OH	50%	50%	3%	0%	-	quebradizo
L4	OH	50%	25%	2%	25%	-	quebradizo
A1	OH liofilizado	100%		3%	20%	-	falta maleabilidad
A2	OH liofilizado	100%		3%	30%	-	pegajoso
A3	OH liofilizado	75%	25%	3%	25%	+	higroscópico
A4	OH liofilizado	50%	50%	3%	25%	++	muy higroscópico, pegajoso

\*Capacidad de formar films se clasificó como: (-) sin capacidad, (+) capacidad moderada, (++) buena capacidad

Como se observa en la Tabla 12, la capacidad de formación de films a partir de formulaciones con porcentajes elevados de biopolímeros provenientes de los lodos es prácticamente nula, a pesar de tener un contenido de sólidos, *a priori*, apropiado para proveer capacidad de formar films, según la bibliografía. Esto es probablemente debido a que el proceso al que se someten los lodos es muy agresivo, degradando y oxidando los compuestos que contiene. A pesar que el contenido de sólidos aumenta con el tiempo con este tipo de tratamiento, no se conoce con certeza el grado de degradación que estos presentan en su estructura, tamaño y propiedades. Teniendo en cuenta que el 56% de los

sólidos presentes en los lodos son proteínas, se esperaría que esta composición fuese capaz de formar films mediante la unión de las proteínas, pero al tener tan degradadas las moléculas con el tratamiento, no es posible definir si sus propiedades han sido modificadas, no permitiendo que se enlazasen para formar films. A este respecto, García (2016) expone que a lo largo del tratamiento hidrotérmico a alta temperatura y presión, la concentración de moléculas de tamaño mediano y pequeño (13-15 kDa) aumenta considerablemente con el tratamiento. Tras una hora de tratamiento, las moléculas de tamaño grande (151-549 kDa) conformaban el 2.5% del total de las moléculas, las moléculas de tamaño mediano (35-151 kDa) representaban alrededor de un 50% y las moléculas pequeñas (13-35 kDa), un 46%. Es probable también que las moléculas de mediano y pequeño tamaño, presenten una estructura degradada.

## V. CONCLUSIONES

- La aditivación de ácidos húmicos en films de gelatina tuvo efectos positivos sobre sus propiedades físicas, químicas y en su apariencia. La aditivación con hidrolizados presentó efectos positivos sobre propiedades físicas y químicas en los films de gelatina.
- El grosor de los films no se vio afectado por la aditivación de ácidos húmicos; sin embargo, sí afectó fue mayor con la aditivación de hidrolizado de lodos.
- Los films presentaron mejores barreras contra luz UV al ser aditivados con ácidos húmicos o hidrolizados, de la misma manera fue afectada la transparencia de los films, pudiendo actuar éstos como buena opción de envoltorio para alimentos sensibles a la luz.
- La humedad de los films no se ve afectada por la aditivación de ácidos húmicos pero sí aumenta con la aditivación de hidrolizado de lodos. Esto impacta en la higroscopicidad de los films y al mismo tiempo, en la resistencia que puede tener como material de embalaje.
- La solubilidad de los films aditivados con ácidos húmicos se mantuvo muy similar al control mientras que los films aditivados con hidrolizado presentaron una solubilidad mayor al aumentar su concentración en los films, lo cual podría perjudicar la resistencia del film como material de embalaje.
- La texturometría de los films se midió mediante la fuerza de punción y la elongación en punción, donde los films aditivados con ácidos húmicos presentaron mejores propiedades, resultando en films más resistentes y flexibles.
- Una de las propiedades más interesantes a resaltar es la capacidad antioxidante presentada por los films aditivados. Los ácidos húmicos presentaron un  $IC_{50}$  de 13  $\mu\text{g/mL}$ , proveyendo al film la capacidad para quelar metales y secuestrar radicales libres; mientras que el hidrolizado de lodos presentó un  $IC_{50}$  de 68  $\mu\text{g/mL}$ , que le da al film la capacidad de secuestrar radicales libres.
- Los experimentos realizados demostraron que mientras más alta sea la concentración de ácidos húmicos en la disolución del film, mayor es el  $IC_{50}$ , debido a la agregación de partículas generada en la disolución, por lo que es necesario generar una disolución completa de los ácidos húmicos a pH básico en el momento de preparar la disolución formadora de films.

- La aditivación en los films no tuvo un efecto significativo en sus propiedades estructurales, ya que presentaron una morfología muy homogénea y los grupos funcionales encontrados en el análisis FTIR son los típicos de la composición de proteínas y glicerol.
- Al analizar la estabilidad de los films a altas temperaturas, se observó que la temperatura máxima de descomposición disminuye al incrementar el porcentaje de aditivo en los films, aun así, presentan valores cercanos a los films control y presenta estabilidad incluso a 300°C.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

Aeschbacher, M., Gra, C., Schwarzenbach, R., Sander, M. Antioxidant properties of humic substances. *Environmental Science and Technology*. 46: 4916-4925. (2012)

Al-Hassan, A.A., Norziah M.H. Starch – gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*. 26: 108-117. (2012)

Azeredo, H. Waldron, K. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 109-122. (2016)

Basiak, E. *et al* . Effect of oil lamination between plasticized starch layers on film properties. *Poland. Food Chemistry*, 195, 56-63. (2016)

Bertanza, G., Galessi, R., Menoni, L. and Zanaboni, S. Wet oxidation of sewage sludge from municipal and industrial WWTPs. *Desalination and Water Treatment* 57(6), 2422-2427. (2016)

Bezawada, J., Hoang, N.V., More, T.T., Yan, S., Tyagi, N., Tyagi, R.D. and Surampalli, R.Y. Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia* sp.1 using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the EPS produced. *Journal of Environmental Management* 128, 83-91. (2013)

Blanco-Pascual, N. Montero, P. Gómez-Guillén, M. Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitate* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*. 37, 100-110, 2014.

Bricaud, A. Babin, M., Morel, A., & Claustre, H. Variability in the chlorophyll specific absorption coefficients of natural phytoplankton: analysis and parameterization. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 100 (7): 13321-13332. (1995)

Carvalho, R.A. Grosso, C.R.F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Brazil. Food Hydrocolloids*, 18, 717-726. (2003)

Coimbra, P. Gil, M. H., Figueiredo, F. Tailoring the properties of gelatin films for drug delivery applications: Influence of the chemical cross-linking method. *International Journal of Biological Macromolecules*. 70: 10-19. (2014)

Colla, E. *et al.*. Amaranthus cruentus Flour Edible Films: Influence of Stearic Acid Addition, Plasticizer Concentration, and Emulsion Stirring Speed on Water Vapor Permeability and Mechanical Properties. *Brazil. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6645-6653. (2006)

Coppola, M. Djabourov, M. & Ferrand, M. Unified phase diagram of gelatin films plasticized by hydrogen bonded liquids. *Polymer*. 53: 1483-1493. (2012)

Devlin, T.M. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté. (2004)

Duconseille, A. *et al.*. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*. 43: 360-376. (2015)

Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J.A. & Ibarz, A. Edible films and coating: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (6): 292-303. (2011)

Fakhouri, F. *et al.*. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*. 95: 681-689. (2013)

Ferrara, G. Loffredo, E., Senesi, N., Marcos, R. Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6. *Mutagenetic Response*. 603 (1): 27-32. (2006)

García, M. *Tratamientos hidrotérmicos para la revalorización de lodos de industria alimentaria: obtención de proteína e hidratos de carbono*. (1), 59 pp. (2016)

Genç, N., Yonsel, Ş., Dağaçan, L. and Onar, A.N. Wet oxidation: a pre-treatment procedure for sludge. *Waste Management* 22(6), 611-616. (2002)

Guadipati, V. Fish gelatin: A versatile ingredient for the food and pharmaceutical industries. In S.k. Kim (Ed.), Marine proteins and peptides – biological activities and applications. John Wiley & Sons, Ltd. Cap. 13. (2013)

Gomes, B. Motta, F., Andrade, M. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering*. 62: 967-974. (2016)

Hongyang, P. *et al.* Blend-modification of soy protein/lauric acid edible films using polysaccharides. *China. Food Chemistry*, 151, 1-6. (2014)

Ho J. *et al.* Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. USA. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 287-294. (2004)

Khermakhem, M. Papadimitriou, V., Sotiroidis, G., Zoumpoulakis, P., Arbez-Gindre, C., Bouzouita, N., Sotiroidis, T. Melanin and humic acid-like polymer complex from olive mill waste waters. Part I. Isolation and characterization. *Food Chemistry*, 203: 540-547. (2016)

Khil'ko, S. Efimova, I., Smirnova, O. Antioxidant properties of humic acids from Brown coal. *Solid Fuel Chemistry*. 45 (6): 367-371. (2011)

Kim, J., Remick, D. Tumor necrosis factor inhibitors for the treatment of asthma. *Currently Allergy Asthma Reports*. 7 (2): 151-156. (2007)

Kumar, R. Wang, L.X., Zhang, L.N. Structure and mechanical properties of soy protein material plasticized by thiodiglycol *Journal of Applications of Polymers and Science*, 111: 970:977. (2008)

Li, J., Miao, J., Wu, J., Chen, S., Zhang, Q. Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*. 37, 166-173, 2014.

Liu, H. and Fang, H.H.P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* 95(3), 249-256. (2002).

Margquié, C. *et al.* Biodegradable Packaging Made from Cottonseed Flour: Formation and Improvement by Chemical Treatments with Gossypol, Formaldehyde, and Glutaraldehyde. Francia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43, 2762-2767. (1995)

Martini, S., D'Addario, C., Bonechi, C., Leone, G., Tognazzi, M. Magnani, A., Rossi, C. Increasing photostability and water-solubility of carotenoids: synthesis and characterization of  $\beta$ -carotene-humic acid complexes. *Journal of Photochemical, Photobiological and Biology*. 101 (3): 335-361. (2010)

Matta, F. *et al.* Edible films made from blends of manioc starch and gelatin – Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *LWT – Food Science and Technology*. 49: 149-154. (2012)

Mihaly, A. *et al.* Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hem and sage oils. *Food Hydrocolloids*. 49: 144-155. (2005)

Mishra, V.S., Mahajani, V.V. and Joshi, J.B. Wet Air Oxidation. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 34, 2-48. (1995)

Neyens, E., Baeyens, J., Dewil, R. and De heyder, B. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *Journal of Hazardous materials*, 106(2–3), 83-92. (2004)

Ni, B.-J., Zeng, R.J., Fang, F., Xu, J., Sheng, G.-P. y Yu, H.-Q. A Novel Approach to Evaluate the Production Kinetics of Extracellular Polymeric Substances (EPS) by Activated Sludge Using Weighted Nonlinear Least-Squares Analysis. *Environmental Science & Technology*, 43(10), 3743-3750. (2009)

Ortiz, M. A. Propiedades funcionales de hoy. *OmniaScience*. Universidad Nacional Autónoma de México. 1: 117-135. (2017)

Prado, A.G.S., Pertusatti, J. Nunes, A.R. Aspects of protonation and deprotonation of humic acid Surface on molecular conformation. *Journal of Chemical Society*. 22 (8): 178-1483. (2011)

Rezvani, E. *et al.* Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films. Austria. *Journal of Food Engineering*, 116, 598-605. (2013)

Sato, T. Ose, Y., Nagase, H. Desmutagenic effect of humic acid. *Mutagenetic Response*. 162: 173-178. (2006)

Sun, J. *et al.* Structural and functional properties of organic matters in extracellular polymeric substances (EPS) and dissolved organic matters (DOM) after heat pretreatment with waste sludge. *Bioresource Technology*. 219: 614-623. (2016)

Milford A., Xu, Y. Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources, *Starch–Fiber Composites*, 340-363. (2009)

## VII. ANEXOS

### A. Glicerol

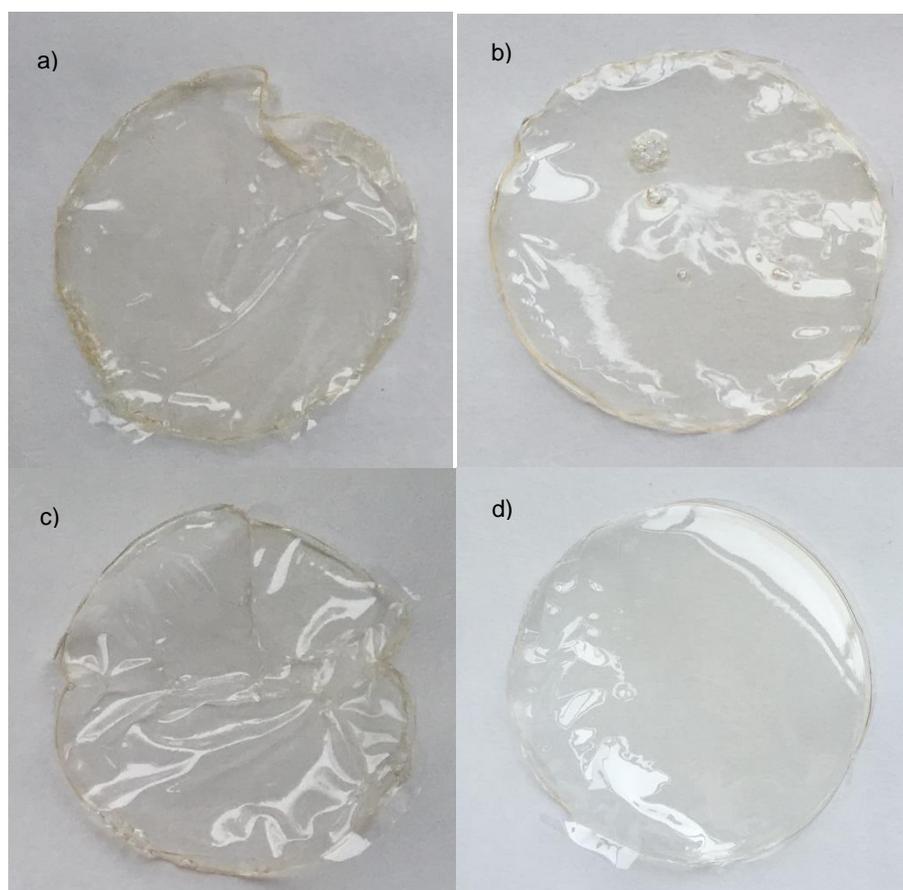


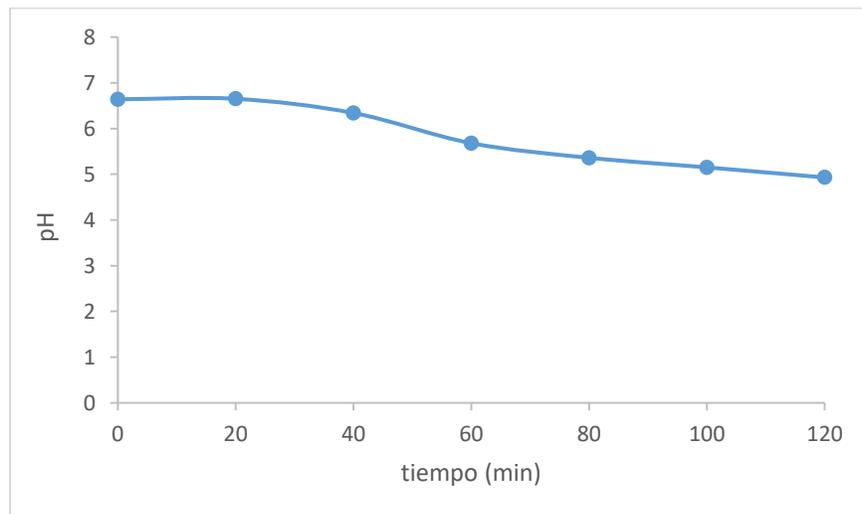
Figura 21: films de gelatina al 3% con distintas concentraciones de glicerol. a) 40% glicerol, b) 35% glicerol, c) 30% glicerol, d) 25% glicerol

## B. Caracterización del proceso de hidrolizado de lodos mediante oxidación húmeda

Se llevó a cabo el análisis de las propiedades de los lodos a lo largo del tratamiento hidrotérmico para determinar el efecto de la oxidación húmeda sobre las características que presenta a través del tiempo.

### 1. Características físicas

El pH comienza a disminuir ligeramente a medida que aumenta la temperatura. Esto se debe a que aumentan las reacciones de oxidación hacia ácidos carboxílicos de bajo peso molecular y también se liberan compuestos intracelulares ácidos: ADN, ácidos húmicos, intermediarios metabólicos, etc.



*Figura 22: pH de los lodos a lo largo del tratamiento*

Durante el proceso de oxidación húmeda a alta presión y temperatura, las moléculas y los compuestos de los lodos se ven afectados y cambian su composición y su color a lo largo del tiempo. Los cambios que sufrieron los lodos durante este proceso se ven en la siguiente figura:

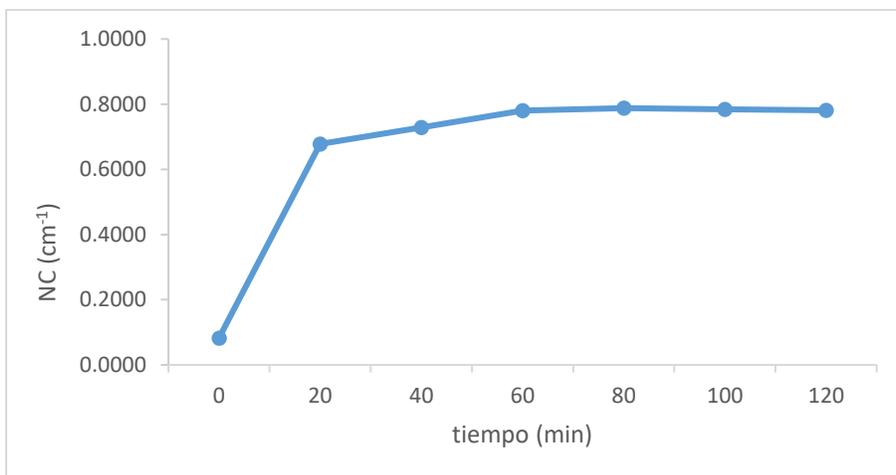


Figura 23: desarrollo del color durante el tratamiento hidrotérmico

Las muestras de lodos presentan color diferente durante el tratamiento, siendo la inicial la que presenta un color claro y la última muestra presenta un color marrón rojizo, como se puede ver en la Figura 24. Se muestra la máxima intensidad de color cuando se alcanzan las condiciones de operación, es decir cuando llega a 140°C, para luego mantenerse constante hasta el final del experimento (Figura 23). Esto se debe a que el tratamiento al que se someten los lodos produce reacciones de oxidación que destruyen compuestos cromógenos, tales como los ácidos húmicos.



Figura 24: color en el sobrenadante del hidrolizado de lodos a 140°C por 120min

La carga orgánica del lodo en forma de DQOt se muestra en la siguiente figura:

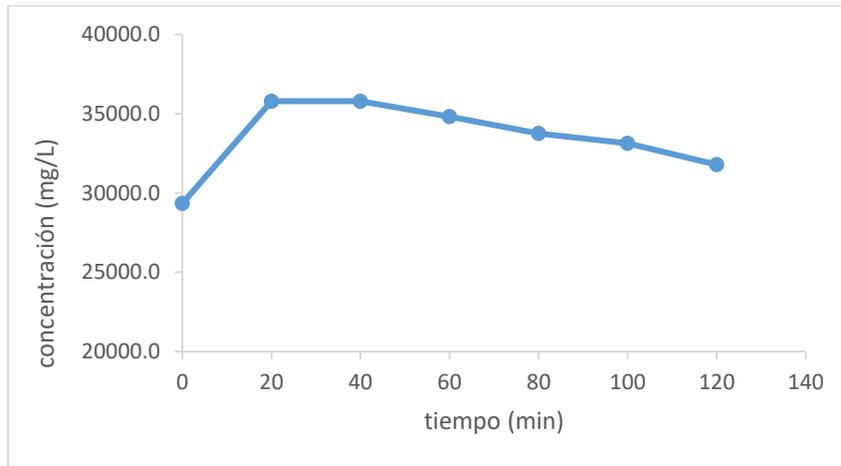


Figura 25: evolución de la DQOt durante el tratamiento hidrotérmico

La DQOt aumenta ligeramente en los primeros minutos y luego mantiene una concentración casi constante a lo largo del tiempo. Esto se debe a que los compuestos presentes comienzan a hidrolizarse y oxidarse, dejando  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  como productos finales.

A diferencia de la DQOt, la DQO soluble sufre un gran aumento, pasando de 811  $\text{mg O}_2/\text{L}$  a 19608  $\text{mg O}_2/\text{L}$ . Desde que empieza el tratamiento, hay un aumento exponencial del DQOs hasta llegar al minuto 80, a partir de este punto el aumento ya no es significativo y empieza a mantenerse constante hasta llegar a los 120min. Esto se debe probablemente a que en ese punto, la mayor parte de la materia orgánica sólida ya ha sido solubilizada.

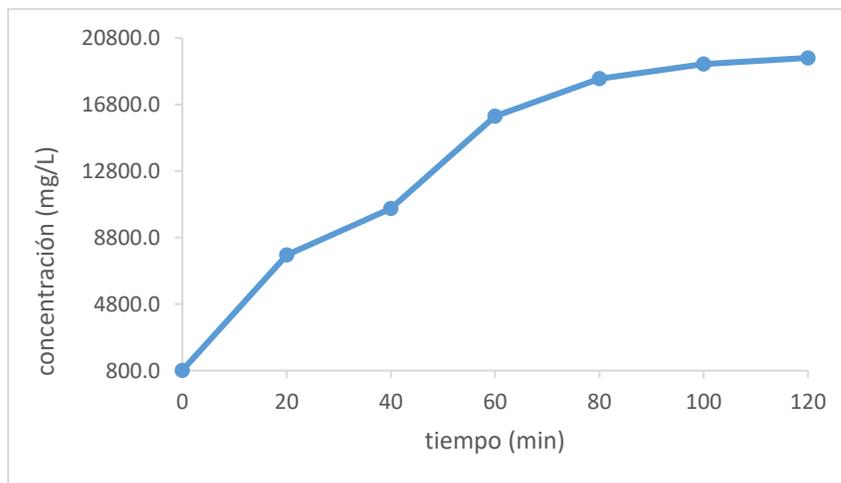


Figura 26: DQO soluble durante el tratamiento hidrotérmico

Los sólidos totales y los sólidos volátiles disminuyen a medida que avanza el proceso de oxidación húmeda, hasta reducirse en un 57% los sólidos volátiles. Este comportamiento se debe a que los compuestos se van hidrolizando y solubilizando, pasando así a fase líquida.

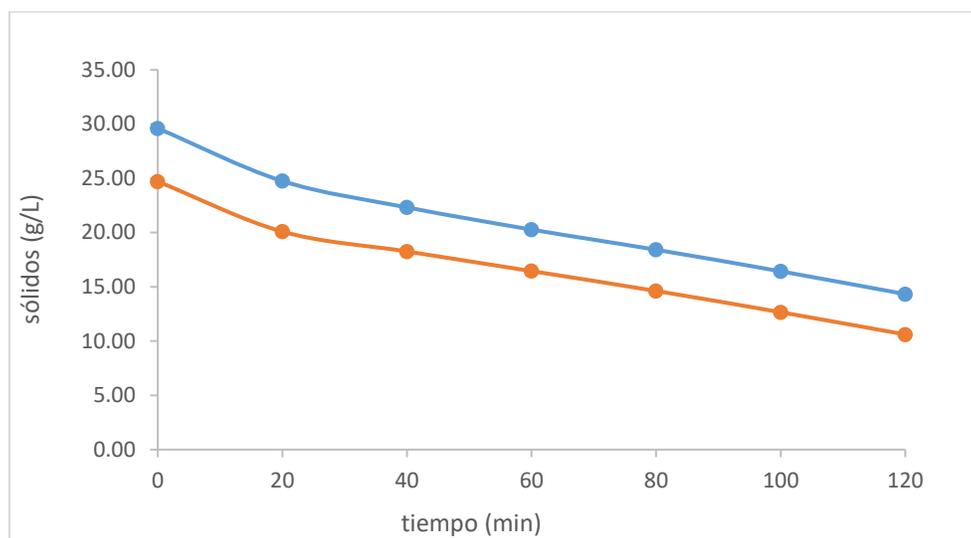


Figura 27: evolución de sólidos totales y sólidos volátiles durante el tratamiento hidrotérmico

— Sólidos totales, — sólidos volátiles

En el caso de los sólidos fijos, se trata de sólidos no hidrolizables ni volátiles como sales binarias ( $\text{SiO}_2$ ) o terciarias ( $\text{CaCO}_3$ ), por lo que su concentración permanece constante durante todo el proceso. Esto se puede observar en la Figura 27, donde la diferencia entre ST y SV permanece constante durante todo el tratamiento.

Con respecto al IVF, el indicador de la sedimentación del fango, se determinó mediante el reposo de 12 mL de muestra en 30 minutos y ninguna de las muestras sedimentó en ese tiempo.

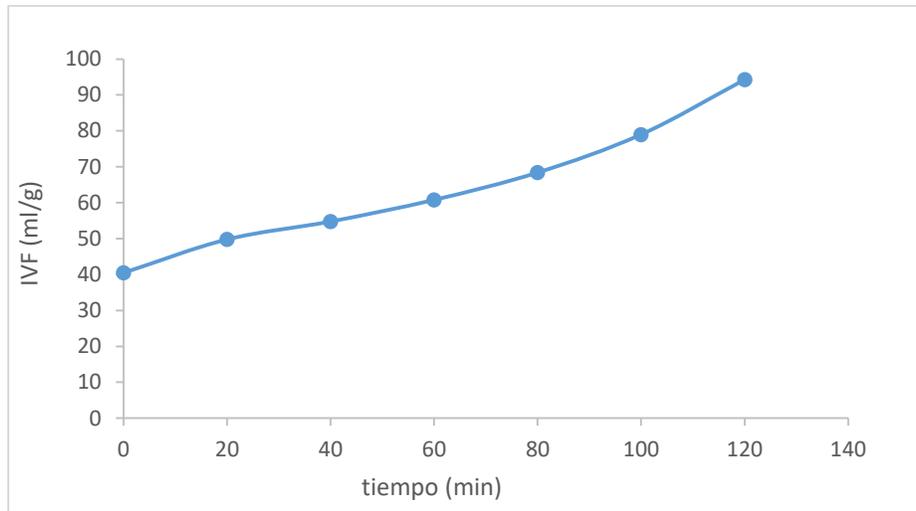


Figura 28: Evolución del IVF durante la oxidación hidrotérmica de los lodos

El volumen que ocupa un gramo de fango va aumentando a medida que avanza el proceso hidrotérmico hasta llegar a un valor mayor al doble. Esto se debe a que las reacciones que se dan en el proceso liberan polímeros en la fase líquida, lo que aumenta la viscosidad y afecta la sedimentación, haciendo que esta sea una sedimentación difusa. En la siguiente imagen se puede apreciar el fenómeno:

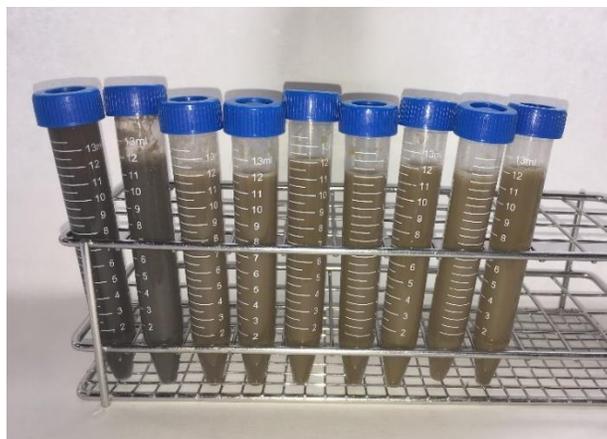


Figura 29: volumen ocupado por el lodo en cada muestra tomada (inicial y en tiempos crecientes de izquierda a derecha) tras 30 minutos en reposo

## 2. Productos solubles en hidrolizados

A pesar de que hay gran cantidad de biomoléculas en un lodo, sólo hay tres tipos de compuestos que genera interés determinar: proteínas, ácidos húmicos y carbohidratos. Debido a la necesidad de altas concentraciones de sólidos disueltos para formar films,

específicamente de proteínas, a partir de los siguientes resultados se pudo determinar el tiempo óptimo de tratamiento hidrotérmico para obtener la mayor concentración de sólidos solubles en el medio.

El comportamiento de la concentración de carbohidratos durante el tratamiento hidrotérmico se encuentra en la Figura 29. Se puede observar que la concentración de carbohidratos aumenta a lo largo del tiempo, llegando a una concentración final de 2915 mg/L.

La concentración de hidratos de carbono aumenta exponencialmente hasta alcanzar su máximo en el minuto 80, 2915 mg/L, a partir de ese tiempo, ya no es significativo el aumento en la concentración de carbohidratos sino que más tiende a mantenerse constante para luego disminuir por la degradación provocada por la oxidación.

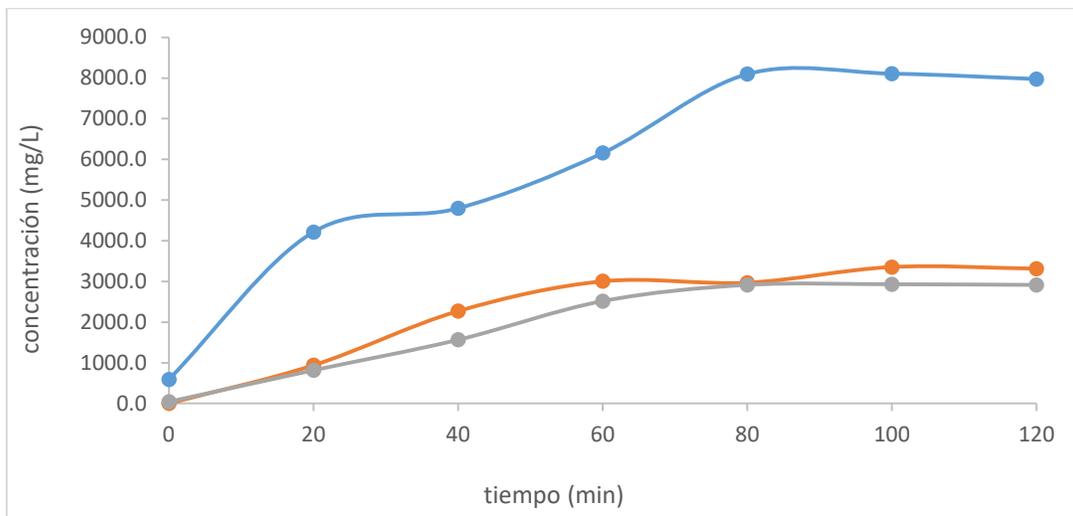


Figura 30: concentración de proteínas y ácidos húmicos durante el tratamiento hidrotérmico

— proteínas, — ácidos húmicos — carbohidratos

La concentración de proteínas incrementa notablemente durante los primeros minutos del experimento, llegando a un punto máximo a los 80 minutos y a los 120 minutos tiene una concentración de 8000 mg/L.

Con respecto a los ácidos húmicos, se puede observar en la Figura 30 cómo aumenta la concentración a lo largo del tiempo, siguiendo la misma tendencia que las proteínas. La

concentración aumenta notablemente hasta alcanzar un máximo a los 80 minutos, en este caso 300mg/L.

Según los datos obtenidos respecto a la alta concentración de carbohidratos, proteínas y ácidos húmicos, se seleccionó 120 min como el tiempo de tratamiento térmico óptimo para la obtención del hidrolizado de lodos más concentrado.

### C. Método DPPH



*Figura 31: prueba DPPH para films con ácidos húmicos*



*Figura 32: prueba DPPH para films con hidrolizado de lodo*