

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,
para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ingeniería Química en el campo
de la Ingeniería de las Polimerizaciones

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS MATERIALES
POLIMÉRICOS CON LA INCORPORACIÓN DE
BIOCOMPUESTOS, PARA SU APLICACIÓN
COMO RECUBRIMIENTOS**

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), dependiente de
la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y del Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET)

Ing. Mariana Allasia

Director de Tesis: Dr. Roque J. Minari
Codirector de Tesis: Dr. Luis M. Gugliotta
Miembros del Jurado: Dra. Norma B. D'Accorso
Dr. Javier I. Amalvy
Dra. Paulina Mocchiutti

A mis padres y a mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que de una forma u otra han colaborado en la realización de este trabajo. Muy especialmente quiero agradecer:

A mi director y codirector, Dres. Roque J. Minari y Luis M. Gugliotta, por su dedicación, paciencia, confianza y correcta dirección.

A los Dres. Miren Aguirre y José R. Leiza del POLYMAT, por su dedicación, paciencia y dirección durante mi estancia en San Sebastian (España).

A los Dres. Victoria A. Vaillard y Santiago E. Vaillard del Grupo de Química Orgánica Aplicada (INTEC), y a la Dra. Ana S. Sonzogni del Grupo de Polímeros y Reactores de Polimerización (INTEC), por su dedicación, paciencia, guía y colaboración en parte del trabajo de esta Tesis.

Al Dr. Mario C.G. Passeggi y a la Lic. Paula G. Felaj del IFIS, por su colaboración en las observaciones por AFM.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la ayuda económica para poder realizar mi Doctorado.

A los demás miembros del Grupo de Polímeros y Reactores de Polimerización de INTEC, Verónica G., Ludmila R., Carlos C., Ana A., Lis F., Luisa C., Marcelo B., Mariana Y., Celina B., y Sofía C. por su amistad y apoyo.

A toda mi familia, y especialmente a mis padres, María del Carmen y Juan Antonio, por su ejemplo de honestidad, y por el constante apoyo, estímulo y confianza; a mis hermanos por estar siempre presente y a mis abuelos que me acompañan a la distancia. A mi sobrina por iluminar nuestra vida. A mis primos y tíos españoles, por su cariño y apoyo.

A mi novio Fernando y a mi mejor amiga Mariana, por su cariño y su apoyo incondicional.

RESUMEN

La producción de materiales poliméricos híbridos en base acuosa a partir de recursos derivados de fuentes renovables, tiene un importante interés en la industria química a nivel mundial, debido a las altas exigencias medioambientales y del mercado para reemplazar los solventes orgánicos y los monómeros derivados del petróleo. La incorporación de biopolímeros o monómeros biobasados, se encuentra entre las principales estrategias empleadas actualmente para la síntesis de materiales poliméricos más amigables con el medioambiente, al reducir la huella de carbono y potenciar la biodegradabilidad.

En esta Tesis se investiga la síntesis de diferentes materiales poliméricos híbridos basados en recursos derivados de fuentes naturales, para diferentes aplicaciones. En este sentido, se plantea la incorporación de una o dos proteínas, caseína (proteína de la leche) y zeína (proteína del maíz), buscando obtener un polímero híbrido nanoestructurado con una alta sinergia entre las fases. Por otro lado, el empleo de monómeros biobasados permite incrementar la sustitución de monómeros derivados del petróleo, minimizando el impacto ambiental de los materiales. En el esquema de la Figura I se representa el contenido de esta Tesis, donde se incluye las proteínas utilizadas, el método de síntesis, el material y aplicación perseguida, el grupo de investigación con quien se colaboró y la publicación asociada (cuando corresponde). A continuación, se hace una pequeña reseña de cada capítulo de la Tesis.

En el Capítulo 1, se introducen los principales antecedentes y conceptos relacionados con las técnicas de polimerizaciones empleadas, como la polimerización en emulsión batch y semi-batch y la polimerización en miniemulsión. Además, se incluyen consideraciones generales en cuanto a las proteínas empleadas (caseína y zeína); y sobre los monómeros bioderivados [metacrilato de isobornilo (IBOMA) y acrilato de 2-octilo (OA)] empleados para la preparación de los materiales. Además, se realizan consideraciones generales sobre las principales aplicaciones de interés en esta Tesis.

El Capítulo 2 considera la modificación química de la zeína (proteína hidrofóbica), con el objetivo de obtener una proteína capaz de polimerizar radicalmente. Este estudio involucró el uso de variados agentes modificantes que poseen diferentes grupos reactivos, para determinar el sistema más indicado para la funcionalización de la zeína. El grado de modificación de la zeína se evaluó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis elemental.

El Capítulo 3 contiene la investigación de la incorporación de la zeína metacrilada como bio-macroentrecruzante, en la síntesis de hidrogeles termosensibles basados en poli(*N*-vinilcaprolactama). Se analizó el efecto de la incorporación de la zeína modificada químicamente frente a la proteína nativa. Además, se sintetizaron y caracterizaron hidrogeles con diferentes concentraciones de zeína, para su potencial aplicación en la liberación controlada de fármacos. Por último, se comparó el desempeño de la zeína funcionalizada como bio-macroentrecruzante respecto a un entrecruzante convencional de bajo peso molecular (*N,N*-metilenacrilamida).

En el Capítulo 4, se investigó la síntesis de látex híbridos basados en caseína metacrilada por polimerización batch en emulsión, con la incorporación de monómeros biobasados (OA e IBOMA), para su aplicación como recubrimiento decorativo. Se investigaron diferentes composiciones en la mezcla de monómeros empleando OA e IBOMA como reemplazo de los monómeros derivados del petróleo BA y MMA, para incrementar el contenido biológico final de los materiales. Se analizó el mecanismo de nucleación de las partículas, la cinética de polimerización, la fracción biológica final y las propiedades de aplicación, haciendo hincapié en la resistencia al agua y en la biodegradabilidad de las películas.

En el Capítulo 5, se presenta el estudio de la incorporación de zeína y caseína en la síntesis de látex híbridos acrílico/proteínas, con un contenido de sólidos moderado (35%), para su aplicación como recubrimiento decorativo. Debido a la hidrofobicidad de la zeína, la estrategia de síntesis empleada fue la polimerización en miniemulsión batch. El trabajo involucró la preparación de las miniemulsiones con diferentes combinaciones de las proteínas (manteniendo un contenido total de 25 % de proteína respecto a los monómeros acrílicos), y la polimerización de las mismas. Se

evaluó la cinética, el mecanismo de nucleación, la morfología de las nanopartículas obtenidas y las propiedades de aplicación de las películas producidas a partir de los látex. Además, se comparó el desempeño del látex híbrido respecto de la mezcla física de un látex de acrílico puro con las proteínas.

El Capítulo 6 involucra la síntesis de nanopartículas híbridas acrílico/caseína-zeína, mediante la polimerización semi-batch en emulsión, con una siembra inicial de biopartículas, con el objetivo de incrementar el contenido de la proteína hidrofóbica. Por un lado, se investigó la estrategia de obtención de las biopartículas a partir de las proteínas. Luego, estas biopartículas fueron empleadas como siembras en la polimerización semi-batch de BA/MMA dosificados en forma de mezcla a caudal constante. Se evaluó el desempeño de la polimerización semi-batch respecto de la batch, para este sistema. Se estudió la cinética de reacción, el diámetro y la morfología de las nanopartículas sintetizadas y las propiedades de las películas obtenidas, para su posible aplicación como recubrimiento entérico.

Finalmente, en el Capítulo 7 se extrajeron las principales conclusiones del trabajo de investigación y se formularon algunas sugerencias para trabajos futuros.

Además de los resultados incluidos en los capítulos antes mencionados, durante la ejecución de esta Tesis se avanzó también en el estudio de la producción de recubrimientos termocurables basados en aceite epoxidado de soja, entrecruzados con ácidos dicarboxílicos de diferentes pesos moleculares (sin catalizadores). Este trabajo fue publicado en Allasia *et al.*, *Polymer*, Volumen 232, 124143 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124143> y no forma parte del contenido de esta Tesis.

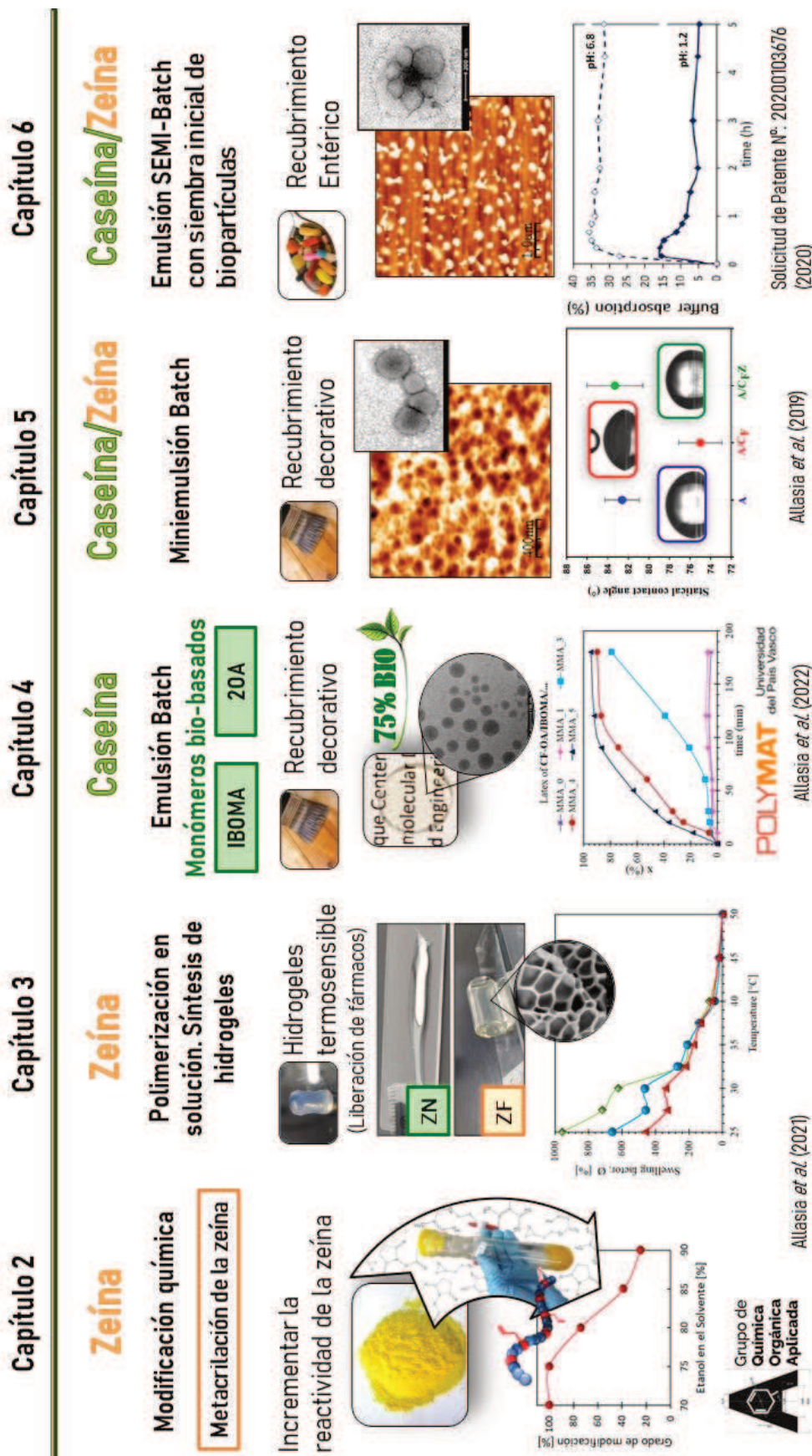


Figura I. Resumen del contenido de los capítulos 2-6 de la Tesis.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ÍNDICE GENERAL.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xx
ABREVIATURAS	xxix
NOMENCLATURAS.....	xxxii
PRÓLOGO	xxxiv

CAPÍTULO 1: CONSIDERACIONES GENERALES

1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. PROTEÍNAS.....	3
1.2.1. Caseína.....	4
Generalidades	4
Incorporación de la caseína en la síntesis de materiales híbridos	5
Metacrilación de la caseína.....	8
1.2.2. Zeína	11
Generalidades	11
Método antisolvente de precipitación para la síntesis de nanopartículas.....	12
Obtención de biopartículas basadas en zeína, empleando la técnica antisolvente de precipitación	17
1.3. MONÓMEROS BIOBASADOS	18
1.4. MECANISMOS DE POLIMERIZACIÓN	20
1.4.1 Polimerización en emulsión.....	21

1.4.2 Polimerización en miniemulsión	23
1.5. GENERALIDADES SOBRE APLICACIONES. RECUBRIMIENTOS	27
1.5.1. Recubrimiento del tipo estético o decorativo	27
Proceso de formación de film o película.....	28
Temperatura mínima de formación de film (MFFT)	29
Propiedades mecánicas	31
Resistencia al bloqueo	34
Resistencia química	34
Resistencia al agua.....	35
1.5.2. Recubrimientos entéricos.....	36
Metodologías empleadas para el recubrimiento	39
Caracterización de los comprimidos recubiertos	40
1.6. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS	41
1.6.1. Objetivos generales.....	42
1.6.2. Objetivos específicos	42
 <u>CAPÍTULO 2: FUNCIONALIZACIÓN DE LA ZEÍNA</u>	
2.1. INTRODUCCIÓN	44
2.2. TRABAJO EXPERIMENTAL	46
2.2.1 Modificación química de la zeína con miristato de NHS (m-NHS)	46
2.2.2 Modificación química de la zeína con cloruros	48
2.2.3 Modificación química de la zeína con metacrilato de glicidilo (GMA)	49
2.2.4 Caracterización de la zeína modificada	51
2.2.5 Prueba de concepto de la capacidad de polimerización de la zeína metacrilada	51
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
2.3.1 Modificación química de la zeína con miristato de NHS (m-NHS)	52
2.3.2 Modificación química de la zeína con Cloruros	56

Cloruro de oleilo (CLO).....	56
Cloruro de Acriloilo (CIA)	58
2.3.3 Modificación química de la zeína con metacrilato de glicidilo (GMA)	60
2.3.4 Prueba de concepto de la capacidad de polimerización de la zeína metacrilada	66
2.4 CONCLUSIONES	67
<u>CAPÍTULO 3: UTILIZACIÓN DE LA ZEÍNA METACRILADA COMO MACRO-ENTRECRUZANTE, EN LA SÍNTESIS DE HIDROGELES</u>	
3.1 INTRODUCCIÓN	69
3.2. TRABAJO EXPERIMENTAL	71
3.2.1 Síntesis de hidrogeles de zeína-PVCL.....	72
3.2.2 Caracterización de los hidrogeles	72
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
3.3.1 Síntesis de los hidrogeles empleando zeína como bio-macro-entrecruzante.....	75
Punto de gelificación	75
Morfología de los hidrogeles	79
Propiedades mecánicas	80
Análisis termogravimétrico.....	82
Respuesta térmica de los hidrogeles	83
Degradación enzimática de los hidrogeles.....	84
Hidrogeles como plataformas de liberación controlada.....	85
3.3.2 Comparación del desempeño de los hidrogeles sintetizados con ZF como bio-macro-entrecruzante, respecto a un reticulante de bajo peso molecular	86
3.4. CONCLUSIONES	91
<u>CAPÍTULO 4: INCORPORACIÓN DE MONÓMEROS BIODERIVADOS EN LA SÍNTESIS DE LÁTEX BASADOS EN CASEÍNA</u>	
4.1. INTRODUCCIÓN	93

4.2. TRABAJO EXPERIMENTAL	96
4.2.1. Síntesis de látex híbridos Acrílico/Proteínas	96
4.2.2. Caracterización de los látex híbridos Acrílico/Proteínas	98
4.2.3. Caracterización de los <i>films</i>	98
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	100
4.3.1. Copolimerización en emulsión de OA y IBOMA, empleando caseína nativa o funcionalizada como emulsificante.....	101
4.3.2. Síntesis de látex híbridos basados en caseína funcionalizada, empleando monómeros bioderivados y monómeros derivados del petróleo en la formulación.	104
4.3.3. Optimización de la fracción de origen natural.....	106
4.3.4. Propiedades de aplicación de los materiales híbridos obtenidos	109
Tg de la fase acrílica y MFFT del látex	110
Propiedades mecánicas	112
Resistencia a los solventes	113
Hidrofobicidad superficial	115
Biodegradabilidad de los films en compost orgánicos	116
4.4. CONCLUSIONES	117
<u>CAPÍTULO 5: SÍNTESIS DE LÁTEX HÍBRIDOS ACRÍLICO/CASEÍNA CON INCORPORACIÓN DE ZEÍNA MEDIANTE POLIMERIZACIÓN EN MINIEMULSIÓN</u>	
5.1. INTRODUCCIÓN	119
5.2. TRABAJO EXPERIMENTAL	120
5.2.1. Síntesis de látex híbridos Acrílico/Proteínas	121
Preparación de las miniemulsiones.....	121
Polimerización batch de las miniemulsiones	123
5.2.2. Caracterización de las miniemulsiones y de los látex.....	124

5.2.3. Caracterización de las películas.....	125
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	127
5.3.1. Caracterización de las miniemulsiones y de los látex híbridos.....	127
Conversión de monómeros, diámetros de gotas y de partículas	127
Microestructura molecular de las partículas híbridas (proteína libre y fracción insoluble).	129
Morfología de las partículas híbridas.....	130
5.3.2. Caracterización de las películas híbridas	131
Formación de films	131
Propiedades térmicas de los films.....	135
Comportamiento mecánico	136
Resistencia a los solventes	139
Biodegradabilidad de las películas en compost orgánico	143
5.4. CONCLUSIONES	144
<u>CAPÍTULO 6: LÁTEX HÍBRIDOS BASADOS EN ZEÍNA-CASEÍNA SINTETIZADOS</u>	
POR POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN	
SEMI-BATCH SEMBRADA, PARA SU APLICACIÓN COMO RECUBRIMIENTO	
ENTÉRICO	
6.1. INTRODUCCIÓN	146
6.2. TRABAJO EXPERIMENTAL	149
6.2.1. Síntesis de biopartículas zeína-caseína. Optimización del proceso	150
6.2.2. Síntesis de látex híbridos Acrílico/Proteínas	152
6.2.3. Caracterización de la dispersión de biopartículas zeína-caseína y los látex híbridos	154
6.2.4. Caracterización de las películas.....	155
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	156
6.3.1. Obtención de las biopartículas zeína/caseína. Selección y optimización del proceso.	156
Estabilidad de las dispersiones	156

6.3.2. Polimerización en emulsión semi-batch, empleando diferentes velocidades de alimentación de los monómeros.....	162
Conversión de los monómeros y el Dp.....	162
Morfología de las partículas híbridas acrílico/proteínas.....	165
Formación de film híbrido y su morfología.....	167
Sensibilidad de las películas híbridas a variaciones del pH.....	169
Ángulo de contacto.....	172
Ensayos de reología.....	172
6.4. COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LAS DIFERENTES PELÍCULAS HÍBRIDAS QUE CONTIENEN ZEÍNA-CASEÍNA.....	176
6.5. CONCLUSIONES.....	178
<u>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS</u>	
FUTUROS	
7.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	181
7.2 SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS.....	185
ANEXO	
A.1. Materiales.....	189
A.2. Equipamiento e instalaciones utilizadas para la síntesis de los materiales en esta Tesis.....	191
A.2.1. Sistema de modificación química de la zeína.....	191
A.2.2. Sonificador empleado en la preparación de las miniemulsiones y en la síntesis de las biopartículas.....	192
A.2.3. Reactores de polimerización y bombas de dosificación.....	194
A.3. Caracterizaciones de LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS.....	195
A.3.1. Resonancia magnética nuclear de protones (1H -RMN).....	196
A.3.2. Método del o-ftalaldehido (OPA): Determinación del porcentaje efectivo de dobles enlaces incorporados a la caseína metacrilada.....	197

A.3.3. Tensión superficial de la solución de caseína, para la determinación de la CMC	198
A.3.4. Análisis elemental, para la determinación del grado de modificación de la zeína	199
A.4. Caracterizaciones de los látex y DE las partículas	201
A.4.1. Conversión de monómeros por gravimetría.....	201
A.4.2. Tamaño medio de gotas o de partículas por dispersión de luz dinámica	201
A.4.3. Proteína libre (FP).....	202
A.4.4. Morfología de las partículas por TEM.....	206
A.4.5. Distribución de tamaño por DCP.....	208
A.5. Caracterizaciones de los Materiales finales.....	210
A.5.1. Morfología de los hidrogeles por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	210
A.5.2. Morfología de las películas por microscopía de fuerza atómica (AFM)	211
A.5.3. Temperatura mínima de formación de film (MFFT)	212
A.5.4. Hinchamiento o absorción de los materiales en solventes, por gravimetría	213
A.5.5. Fracción insoluble (IF) del material.....	214
A.5.6. Propiedades mecánicas	215
A.5.7. Ensayos térmicos	216
A.5.8. Hidrofobicidad superficial, mediante el análisis del ángulo de contacto.....	217
A.5.9. Propiedades reológicas	219
A.5.10. Resistencia al bloqueo (<i>Anti-blocking</i>) de las películas.....	221
A.5.11. Biodegradabilidad en compost de las películas híbridas	221
REFERENCIAS.....	222

ÍNDICE DE TABLAS

1.1. Receta general para la obtención de caseína metacrilada.....	9
1.2. Concentración micelar crítica (CMC) y grupos NH ₂ disponibles, para la caseína nativa y funcionalizada. Resultados obtenidos en esta Tesis.	11
1.3. Biopartículas basadas en zeína, estabilizadas por diferentes biomateriales	17
1.4. Monómeros bioderivados de aceites vegetales y ácidos grasos empleados en la síntesis de adhesivos o recubrimientos	20
1.5. Polímeros empleados para la síntesis de recubrimientos entéricos	38
2.1. Grupos laterales reactivos de diferentes proteínas	45
2.2. Relación de las áreas de las señales usadas para el cálculo del grado de modificación de la zeína funcionalizada con ClO (ZO-1:20)	58
2.3. Resumen de los resultados obtenidos del análisis elemental para la zeína nativa y para la zeína con el mayor grado de modificación (70 % etanol).....	66
3.1. Diferentes composiciones utilizadas para la síntesis de hidrogeles	72
4.1. Comparación de los monómeros convencionales y los monómeros derivados de fuentes naturales.....	95
4.2. Composición general de la mezcla de monómeros (T _g ≈ -10 °C) y emulsificante empleado en cada experimento.....	97
4.3. Receta general para la síntesis de los látex híbridos mediante la polimerización en emulsión batch	98
4.4. Resultados de las polimerizaciones en emulsión de los monómeros bioderivados (OA/IBOMA = 72/28) en presencia de caseína nativa o funcionalizada	101
4.5. Formulación de las mezclas monoméricas empleadas. Fracción natural obtenida y disponibilidad de dobles enlaces en la fase acuosa, aportados por los monómeros	104

4.6. Resultados de las polimerizaciones en emulsión batch en presencia de caseína funcionalizada. Efecto de la sustitución de los monómeros bioderivados por su monómero análogo derivado del petróleo	105
4.7. Resultados de las polimerizaciones en emulsión batch en presencia de caseína funcionalizada. Efecto de la incorporación de una pequeña cantidad de MMA como monómero soluble en agua	107
4.8. Resultados de las reacciones de polimerizaciones de OA/IBOMA/MMA	108
4.9. Resultados de los ensayos de antibloqueo, para todos los látex híbridos.....	111
4.10. Fracción insoluble y propiedades mecánicas para todos los sistemas evaluados.....	113
5.1. Receta general para la síntesis de los látex híbridos mediante polimerización en miniemulsión	122
5.2. Formulación de los látex híbridos sintetizados	123
5.3. Resultados de polimerización finales para la obtención de los látex híbridos	128
5.4. T _g y T _{d,max} de los materiales híbridos. Comparación con sus componentes	135
5.5. Rendimiento mecánico de películas híbridas acrílicas/proteicas. Comparación con una película acrílica.....	138
6.1. Ejemplo de una receta para sintetizar las nanopartículas de zeína/caseína	151
6.2. Experimentos realizados para la optimización de la obtención de las biopartículas.....	152
6.3. Receta modelo para obtener 50 g de látex híbrido	153
6.4. Resultados de diámetro, potencial zeta y rendimiento de partícula, para las dispersiones A-S(5) y A-S(2.5).....	161
6.5. Resultados de x, D _p , FP, y coágulos obtenidos para los látex híbridos	162
6.6. Resumen de las soluciones comúnmente empleadas para la caracterización de recubrimientos entéricos.....	169
6.7. Comparación de los materiales híbridos basados en zeína-caseína, obtenidos en los Capítulos 5 y 6 de esta Tesis.....	177
A.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental	189

A.2. Rangos de detección y de sensibilidad del equipo	200
A.3. Escala para la determinación de la resistencia al bloqueo, según la norma ASTM D4946-89.....	221

ÍNDICE DE FIGURAS

I. Resumen del contenido de los capítulos 2-6 de la Tesis.....	viii
1.1. Conjunto de aminoácidos que conforman la estructura primaria de las proteínas	4
1.2. Mecanismo de nucleación de partículas sugerido por Li y mejorado por Picchio.....	7
1.3. Esquema de reacción para la obtención de la caseína metacrilada, empleando GMA como agente funcionalizante	9
1.4. Espectros 1H -RMN del GMA puro, la caseína metacrilada y nativa (a), y una ampliación correspondiente a la zona 4.5-6.5ppm (b). Resultados obtenidos en esta Tesis.....	10
1.5. Tensión superficial de soluciones acuosas de caseína nativa y funcionalizada, con diferentes concentraciones de la proteína. Resultados obtenidos en esta Tesis	11
1.6. Clásica ilustración esquemática del método LaMer-Dinegar, que representa el proceso de formación de nanopartículas de solutos mediante la técnica de precipitación. Etapas: a) zona metaestable; b) sobresaturación del soluto; c) tiempo de inducción; d) nucleación de las partículas; e) crecimiento por condensación; y f) crecimiento por coagulación. El eje del tiempo no está escalado para poder mostrar con detalle las diferentes etapas	14
1.7. Esquema del proceso de polimerización en emulsión.....	22
1.8. Preparación de la miniemulsión y su polimerización, en presencia de un material preformado, altamente hidrofóbico.....	25
1.9. Etapas involucradas en el proceso de formación de película	29
1.10. Proceso para la determinación de la MFFT, en látex poliméricos	30
1.11. Curvas de esfuerzo-deformación para materiales poliméricos duros y quebradizos (A), dúctiles y tenaces (B), y blandos y elastoméricos (C).....	32
1.12. Resumen de las partes que conforman el tracto gastrointestinal, con las correspondientes condiciones (pH, enzimas y tiempo de permanencia) que debe atravesar un fármaco.....	36

2.1. Esquema de síntesis del miristato de NHS (a) y la posterior modificación de la zeína (b).....	47
2.2. Esquema de síntesis del cloruro de oleilo y/o acrililo (a) y la reacción de modificación de la zeína (b).....	49
2.3. Esquema de las posibles vías de modificación de la zeína con GMA.....	50
2.4. Fotoiniciador 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959 ®) utilizado para la preparación de films de zeína (a); Fotorreactor formado por 8 lámparas germicidas UV de 8W cada una (254 nm).	52
2.5. Espectro ¹ H-RMN completo (a) y una ampliación (b) del m-NHS, zeína nativa y modificada de la reacción llevadas a cabo en etanol-agua y en DMF. Referencias: + señales de DMF, *señal de protones pertenecientes al anillo, **señal de protones pertenecientes al 2do carbono del ácido mirístico	53
2.6. Espectro ¹ H-RMN completo y una ampliación del m-NHS, zeína nativa y modificada y sobrenadante recuperado de la etapa de purificación, para las reacciones llevadas a cabo en etanol-agua(a-b) y en DMF(c-d)- Referencias: *señal atribuida a la modificación de la zeína.....	54
2.7. Espectro de ¹ H-RMN simulados de los carotenos existentes en la zeína (β -caroteno, luteína y zeaxantina) y espectros de los sobrenadantes de la etapa de purificación, para las reacciones llevadas a cabo en etanol-agua (ZM-EA). Referencias: *señal atribuida a la modificación de la zeína.....	55
2.8. Espectro ¹ H-RMN completos y ampliación de la zeína modificada en etanol-agua(a-b) y en DMF (c-d)- Referencias: *señal atribuida a la modificación de la zeína.	56
2.9. Foto del producto de modificación de la zeína con una relación molar zeína C10=1:150 (a). Espectro ¹ H-RMN completo (b) y su ampliación entre 3.8-7.5 ppm (c) del C10, zeína nativa (ZN) y funcionalizada (ZO-1:20). Referencias: *señal correspondiente a los protones de los carbonos C9 y C10 del cloruro de oleilo; **señal atribuida a la modificación de la zeína.....	57

2.10. Espectro de 1H -RMN de la zeína nativa sin lavar (marrón) y lavada (azul) según el procedimiento de purificación.....	58
2.11. Espectro 1H -RMN completo (a) y una ampliación (b) del CLA, zeína nativa y modificada (ZA-1:150). Referencias: ** señal atribuida a la modificación de la zeína.....	59
2.12. Espectro 1H -RMN completo (a) y su ampliación 4.8-6.8 ppm (b) correspondiente al GMA, ZN, ZG-DMSO y ZG-E70- Referencias: * señal atribuida a los protones que conforman el enlace vinílico del GMA, ** señal atribuida a la modificación de la zeína	61
2.13. Variación en el grado de modificación de la zeína con GMA, al cambiar la hidrofobicidad del medio de reacción.....	63
2.14. Variación del tamaño de los agregados al variar la fracción de etanol del solvente	64
2.15. Esquema de la reestructuración de la zeína frente al cambio de la hidrofobicidad del solvente.....	64
2.16. Fotografía de películas curadas con UV de ZN y de ZG (ZG-E70), antes y durante la prueba de inmersión en una solución de etanol al 90% v/v (a); y las fracciones insolubles obtenidas después de la inmersión, para films ZG y ZO curados por VV 30 min, 60 min y 3 h (b)	66
3.1. Representación del cambio volumétrico de los hidrogeles basados en VCL frente a la T°	71
3.2. Evolución temporal de G' y G'', para las reacciones con diferentes entrecruzantes: V ₃₀ ZN ₄ (a), V ₃₀ ZF ₄ (b) y V ₃₀ B ₄ (c); y fotografías de las soluciones V ₃₀ ZN ₄ y V ₃₀ ZF ₄ después de la reacción (d).....	76
3.3. Fotos de la solución V ₄₀ ZF ₁₀ antes y después de la reacción (a) y del hidrogel y xerogel V ₃₀ B ₄ y V ₄₀ ZF ₁₀ (b).....	77
3.4. Evolución temporal de G' y G'' durante la polimerización de V ₄₀ ZF ₆ (a), V ₄₀ ZF ₈ (b), V ₄₀ ZF ₁₀ (c) y la comparación del módulo G' de los hidrogeles luego de la geleficación (d).....	78
3.5. Foto del producto de reacción, empleando zeína nativa como agente entrecruzante (V ₄₀ ZN ₁₀).....	78

3.6. Imágenes del SEM (380x y 4400x) del corte de los hidrogeles V ₄₀ ZF ₆ (a), V ₄₀ ZF ₈ (b), y V ₄₀ ZF ₁₀ (c) con sus respectivas distribuciones de tamaño.....	79
3.7. Curvas de esfuerzo de compresión para hidrogeles con diferentes concentraciones de ZF. Los primeros puntos de deformación no se muestran debido a que las fuerzas registradas estaban por debajo de la sensibilidad del sensor de la celda de carga.....	81
3.8. Viscosidad dinámica de una solución de PVCL lineal, y su mezcla física con diferentes cantidades de zeína nativa	82
3.9. Curvas de la derivada de la pérdida de peso de los xerogeles basados en zeína (V ₄₀ ZF ₆ , V ₄₀ ZF ₈ , V ₄₀ ZF ₁₀), el xerogel sin zeína (V ₃₀ B ₄) y la ZF	83
3.10. Factor de hinchamiento (\emptyset) en función de la temperatura para hidrogeles con diferente contenido de zeína metacrilada como macro-entrecruzante.....	84
3.11. Degradación del V ₄₀ ZF ₁₀ en fluido intestinal simulado (pH 6.8) con y sin pancreatina, 4, 25 y 37 °C.....	85
3.12. Perfil de liberación acumulada de MB para hidrogeles V ₄₀ ZF ₆ , V ₄₀ ZF ₈ y V ₄₀ ZF ₁₀	86
3.13. Fotos de las mezclas de reacción V ₃₀ B ₄ (a), V ₄₀ B _{0.08} (b) y V ₄₀ B _{0.13} (c), después de la polimerización.....	87
3.14. Representación esquemática de los hidrogeles basados en ZF como macro-entrecruzante, donde además de los enlaces covalentes PVCL-ZF, podría haber presencia de entrelazamientos físicos e interacciones secundarias PVCL-ZF o ZF-ZF.	88
3.15. Desempeño de los hidrogeles de PVCL con ZF como macro-entrecruzante de base biológica (V ₄₀ ZF ₆) y BIS como reticulante de bajo peso molecular (V ₃₀ B ₄).	89
3.16. Termogramas de DSC obtenidos al aplicar diferentes velocidades de calentamiento (0.5, 1, 3 y 5 °C/min), para los hidrogeles V ₄₀ ZF ₆ y V ₃₀ B ₄	90
4.1. Conversión de monómeros obtenida en la polimerización en emulsión de monómeros bioderivados (OA/IBOMA = 72/28) en presencia de caseína nativa o funcionalizada, en comparación con el experimento libre de proteína.....	101

4.2. Fotografías de la película de CN-OA/IBOMA, durante el ensayo de resistencia a la inmersión en agua.....	103
4.3. Conversión de los monómeros obtenida a lo largo de las polimerizaciones en emulsión descritas en la Tabla 5.4 empleando BA, MMA y los monómeros bioderivados (OA e IBOMA) en la formulación	105
4.4. Conversión de los monómeros obtenida en la polimerización batch en emulsión de CF-OA/IBOMA incorporando diferentes cantidades de MMA	108
4.5. Derivadas del flujo de calor (obtenido por DSC), para películas híbridas obtenidas a partir de los látex sintetizados en la sección 4.3.2 (a) y 4.3.3 (b).	110
4.6. Foto del equipo (a), y de los films formados a partir de los látex híbridos MMA_4 (arriba) y MMA_5 (abajo) (b). A partir de los -0.8 °C se observa la congelación del agua.....	111
4.7. Curvas de tensión-deformación para películas híbridas.....	112
4.8. Absorción y pérdida de peso en agua (a y b, respectivamente) y en MEK (c y d, respectivamente), después de 6 horas de inmersión en cada solvente.....	115
4.9. Hidrofobicidad superficial de las películas híbridas	116
4.10. Biodegradabilidad en compost orgánico, basado en el contenido de proteína (fase degradable) del film.....	117
5.1. Esquema general para la síntesis de las nanopartículas híbridas acrílico/proteínas por polimerización en miniemulsión. Fotografías de las soluciones/dispersiones obtenidas al finalizar cada etapa	122
5.2. Morfología de partículas de látex híbridos A/CF (a-b) y A/CFZ (c-d), obtenidos por TEM.....	131
5.3. Distribución de las partículas de los látex híbridos A/CF y A/CFZ obtenidos por DLS ...	131
5.4. Imagen de películas (con forma de disco hueco) obtenidas a partir de diferentes formulaciones	132
5.5. Imagen de la película obtenida a partir de PMix.....	132

5.6. imágenes de AFM en fase (2000nm x 2000nm) de la película acrílica pura (a,b); película A/CFZ (e,f).....	134
5.7. Imágenes de AFM en fase (5000 nm x 5000 nm) de la superficie de películas de PMix (a) y A/CFZ (b).....	135
5.8. Derivada de la pérdida de peso para componentes puros y películas híbridas (a), y pérdida de peso para las proteínas nativas y el film de acrílico puro (b).....	136
5.9. Resistencia al bloqueo de películas híbridas y acrílicas puras	137
5.10. Resultados de la prueba de tracción para películas híbridas de acrílico/proteína y la película acrílica pura (a), y su comparación con la mezcla física PMix (b).....	139
5.11. Ángulos de contacto de una gota de agua sobre las superficies de las películas híbridas y de acrílico pura (a); Imagen de una gota de agua sobre superficies de películas híbridos con y sin zeína (b)	140
5.12. Absorción de agua (a) y de disolvente orgánico (b) para películas de acrílico puro y acrílico-proteínas	141
5.13. Comparación de la resistencia a disolventes de PMix con sus películas homólogas A/CFZ.....	142
5.14. Biodegradación de películas híbridas tras 7 y 14 días de enterramiento en compost orgánico	143
6.1. Representación genérica del perfil de concentración del fármaco, para los diferentes tipos de liberación	147
6.2. Estructura básica del Eudragit®, y sus derivados	147
6.3. Esquema de síntesis de las biopartículas empleando la técnica antisolvente de precipitación. Las partículas estabilizadas aparecen una vez comenzada la alimentación.....	151
6.4. Fotografías de todas las redispersiones de biopartículas obtenidas por las técnicas A-S y S-A sintetizadas con 5% de zeína, antes y después de centrifugar	157
6.5. Esquema representativo de la variación de la caseína (estabilizante) y del etanol en la solución receptora, durante los métodos aplicados para producir las biopartículas.....	158

6.6. Estabilidad de las dispersiones de biopartículas. Variación del Dp en el tiempo, para las dispersiones S-A(5) y S-A(2.5), centrifugadas a 2500, 4000 y 10000 rpm.....	159
6.7. Distribución del tamaño de partícula determinado por DCP, de las dispersiones S-A(5) después de ser centrifugadas a 2500, 4000 y 10000 rpm. Además, se agregó la dispersión antes de centrifugar S-A(5) ₀	160
6.8. Imagen, de las biopartículas zeína/caseína para la dispersión S-A(5) ₂₅₀₀ , obtenida por TEM.....	160
6.9. Evolución de la conversión y el Dp de las polimerizaciones P(0) o batch (a), P(0.056) (b), y P(0.037) (c). En el caso de las polimerizaciones semi-batch se agregó la curva de dosificación porcentual del monómero, a lo largo de la polimerización. La masa total de monómero incorporado se considera el 100% del monómero dosificado	164
6.10. Morfología de las partículas obtenidas por TEM, de los tres látex sintetizados	165
6.11. Diagrama de morfologías propuesto por Blenner <i>et al.</i> El rango 1-10 asignado a las partículas, es una clasificación visual, en términos del grado en el que las partículas se desvían de la esfericidad (1) hacia una naturaleza multilobular, o no esférica (10).....	166
6.12. Fotografía de las películas formadas a partir de los látex híbridos sintetizados de forma batch y semi-batch, junto a la morfología superficial de las mismas obtenida por AFM.	168
6.13. Sensibilidad de los materiales con el pH. Curvas de absorción para las películas híbridas (a) y para el film de biopartículas puras (b), y pérdida de peso (c) registrada para los materiales después de 5 horas de inmersión en fluidos gástrico e intestinal simulados. Foto de los films P(0.056) y BP antes y después del ensayo (d).....	170
6.14. Angulo de contacto de una gota de agua depositada sobre la superficie de las películas híbridas.....	172
6.15. Barrido de amplitud. Determinación de la RVE del film P(0.037) seco, e hinchado en los distintos fluidos (pH 1.2 y pH 6.8). En líneas de trazos se indican los valores de amplitud empleado en los estudios de barrido de frecuencia	174

6.16. Variación del módulo de almacenamiento (G') para los films P(0.056) y (0.037), secos e hinchados en diferentes fluidos (pH 1.2 y 6.8).....	175
A.1. Equipos utilizados para la modificación química de la zeína con miristato de NHS (m-NHS) y el cloruro de acrililo (CIA)	192
A.2. Equipo sonicador Sonic VC 750. La bomba de jeringa sólo se utilizó durante la síntesis de las biopartículas zeína-caseína, y no en la preparación de miniemulsiones	193
A.3. Sistema completo de reacción utilizado. La bomba de dosificación sólo se emplea cuando las polimerizaciones son semi-batch	194
A.4. Detalle de las conexiones de los reactores de 300 y 70 ml. La diferencia entre los sistemas es la forma de agitación.....	195
A.5. Esquema representativo de la variación de la tensión superficial respecto a la concentración, para una solución de un emulsificante convencional	198
A.6. Fotómetro de dispersión de luz Brookhaven	202
A.7. Representación de la caseína en un látex híbrido (A), y etapas para la determinación de la caseína libre a través de espectroscopia de absorbancia UV	203
A.8. Curva de calibración para la determinación de la concentración de la caseína soluble en agua y en solución de SLS (0.5%)	204
A.9. Espectros UV para 3 concentraciones de zeína y caseína, en una solución de SLS (a), y variación de la relación entre las dos señales que presenta la zeína, para soluciones con diferentes concentraciones de proteína (b)	205
A.10. Curvas de calibración en solución de SLS, obtenidas para la caseína y para la zeína	206
A.11. Equipo JEOL JEM-2100 plus perteneciente al SECEGRIN del CCT-Santa Fe empleado en la determinación de la morfología de las partículas	208
A.12. Equipo empleado para la determinación de la distribución de tamaño de las biopartículas zeína-caseína.	209
A.13. Principio de funcionamiento del equipo DCP	209
A.14. Imagen del equipo empleado para el estudio de la morfología de los hidrogeles	211

A.15. Equipo de AFM (a), con la correspondiente ampliación del cabezal del microscopio (b), y una imagen tomada por microscopio óptico del <i>cantiléver</i> y del <i>tip</i> (c).....	212
A.16. Ejemplo de aplicación del látex sobre el equipo empleado para la determinación de la MFFT (a), y el programa de control del funcionamiento del mismo (b)	213
A.17. Imagen de una probeta y del ensayo de tracción (a), e imagen del ensayo de dureza por penetración (b).....	216
A.18. Foto del equipo empleado para medir el CA (a), y muestra de un material con la superficie hidrofílica (b) e hidrofóbica (c).	218
A.19. Imagen del reómetro empleado (a), y foto de unas muestras hinchadas ubicadas entre los dos platos del equipo (b).....	220
A.20. Foto de la muestra antes de ser enterrada en el compost (a), e imagen del compost después del cernido (b).	222

ABREVIATURAS

AA	Ácido acrílico
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AIBN	2,2-azobisisobutironitrilo
AM	Acrilamida
APS	Persulfato de amonio
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales
BA	acrilato de n-butilo
BIS	<i>N,N</i> -metilenacrilamida
BMA	Metacrilato de butilo
BP	Biopartículas
CA	Ángulo de contacto
CAMA	Metacrilato de cardanol
CAP	Ftalato de acetato de celulosa
CF	Caseína funcionalizada
CIA	Cloruro de ácido acrílico o cloruro de acrililo
CIO	Cloruro de ácido oleico o cloruro de oleoilo
CMC	Concentración micelar crítica
CMCS	Quitosano carboximetilado
CN	Caseína nativa
CSA	Amilosa carboximetilada de cadena corta
DCP	Fotosedimentometría centrífuga de disco
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EP	Polimerizaciones en emulsión
FA	Fase acuosa
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FNP	Nanoprecipitación flash
FO	Fase orgánica
FP	Fracción de proteína libre
GDOL	Glicidol
GMA	Metacrilato de glicidilo
GRAS	Material generalmente reconocido como seguro
HPMCP	Ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa
HR	Humedad relativa
IBOA	Acrilato de isobornilo
IBOMA	Metacrilato de isobornilo
IF	Fracción insoluble
IPHA	<i>N</i> -isopropil hidroxilamina

ISOMA	Metacrilato de isosorbida
KPS	Persulfato de potasio
MA	Acrilato de metilo
MB	Azul de metileno
MEK	Metil etil cetona
MEP	Polimerizaciones en miniemulsión
MFFT	Temperatura mínima de formación de film
MLA	Metacrilato de linoleico
MMA	Metacrilato de metilo
MMGA	Agregados globulares-micelares macromoleculares
m-NHS	Miristato de NHS
MOA	Metacrilato de oleico
Mw	Peso molecular
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
OA/2OA	Acrilato de 2-octilo
OPA	O-ftalaldehido
PBS	Buffer fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
PIPEMA	Metacrilato de piperonilo
PMMA	Polimetacrilato de metilo
PVCL	Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama)
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP	Rendimiento de partículas
RVL	Región viscoelástica lineal
SAM	Acrilato derivado de soja
SC	Contenido de sólidos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SLS	Lauril sulfato de sodio
TBHP	Hidroperóxido de tert-butilo
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Tg	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
TP	Proteína total
TPS	Polisacárido del té
UA	Unidades de absorbancia
UAc	Acetato de uranilo
USP	Farmacopea de EE. UU.
UV	Ultravioleta
VAC	Acetato de vinilo
VCL	<i>N</i> -vinilcaprolactama
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
VPTT	Temperatura de transición de fase volumétrica
ZF	Zeína funcionalizada
ZG	Zeína modificada con GMA
ZM	Zeína modificada

ZN	Zeína nativa
ZNL	Zeína nativa lavada
ZO	Zeína modificada con ClO
wbFA	Peso en base al contenido a la fase acuosa
wbFO	Peso en base al contenido a la fase orgánica
wbm	Peso respecto a los monómeros
wbSC	Peso en base al contenido de sólido
wbTP	Peso en base al contenido de proteína total
wbv	Peso basado en VCL

NOMENCLATURA

A_0	Área original de la sección transversal (mm^2)
A_B	Absorbancia obtenida el blanco (UA)
A_{CF}	Absorbancia obtenida para la caseína metacrilada (UA)
A_{CN}	Absorbancia de la caseína nativa (UA)
A_S o A_{MEK}	Absorción de MEK (%)
A_W	Absorción de agua (%)
c	Concentración de soluto
C_{eq}	Concentración de soluto en equilibrio
c_v	Masa del contenedor vacío (g)
D_d	Diámetro de gota (nm)
D_p	Diámetro medio de partícula (nm)
F	Fuerza uniaxial (N o mN)
G'	Módulo elástico (MPa o Pa)
G''	Módulo de pérdida (MPa o Pa)
GM	Grado de modificación (%)
J	Velocidad de nucleación
L	Longitud del espécimen después del estiramiento (mm)
L_0	Longitud inicial del espécimen (mm)
m	Masa del monómero (g)
M_{fs}	Masa de la muestra seca final (g)
M_i	Masa de la muestra seca inicial (g)
M_t	Masa de la muestra hinchada en el tiempo t (g)
N_d	Número de gotas
N_p	Número de partículas
P_0	Contenido inicial de proteínas en las películas (g)
P_f	Peso de la proteína perdida (g)
P_i	Peso inicial de las biopartículas (film) (g)
r	Radio de la muestra (mm)
R	Radio del plato (mm)
r_e	Radio externo del anillo (m)
r_i	Radio interno del anillo (m)
S	Grado de sobresaturación
T	Temperatura ($^{\circ}\text{K}$)
$T_{d,max}$	Temperatura de descomposición máxima ($^{\circ}\text{C}$)
$T_{g,2nd\ stage}$	Tg de la fase dosificada de froma continua ($^{\circ}\text{C}$)
$T_{g,seed}$	Tg de la fase sembrada ($^{\circ}\text{C}$)
$T_{reaction}$	Temperatura de reacción ($^{\circ}\text{C}$)
W	Masa del látex (g)
$W(T)$	Peso del hidrogel hinchado a una temperatura dada (g)
$W(50^{\circ}\text{C})$	Peso del hidrogel hinchado a 50°C (g)
x	Conversión de los monómeros (%)

Símbolos griegos

σ_r	Esfuerzo ingenieril (%)
ε	Deformación relativa
\emptyset	Factor de hinchamiento (%)
γ_0	Amplitud de deformación
η	Viscosidad dinámica (Pa.s)
ν	Frecuencia de transporte molecular en la interfaz sólido-líquido
N_0	Número de moléculas de soluto por unidad de volumen
σ	Tensión interfacial en la interfaz sólido-líquido (mN/m)
v	Volumen de una molécula de soluto
κ	Constante de Boltzmann (J/°K)
γ	Tensión superficial (mN/m)
γ_c	Tensión superficial crítica (mN/m)
ρ_p	Densidad del polímero (g/cm ³)
ρ_w	Densidad estimada del látex (g/cm ³)

PRÓLOGO

Actualmente, la industria de polímeros debe enfrentarse a grandes desafíos, como lo son el reemplazo de sustancias petroquímicas por materias primas renovables, junto al desarrollo de nuevos procesos ecológicos, impulsados por las cada vez más exigentes reglamentaciones medioambientales. Además, el empleo de sustancias renovables podría resultar en nuevos materiales con mayor valor agregado, menor toxicidad y alta biodegradabilidad. Algunas de las materias primas naturales ampliamente utilizadas en la industria química incluyen aceites vegetales, polisacáridos (principalmente celulosa, quitosano y almidón), proteínas y lignina, entre otros.

Particularmente, las proteínas poseen un extraordinario potencial para la síntesis de nuevos materiales debido a su gran número de funcionalidades (amino, carboxilo, hidroxilo), que otorgan ilimitadas oportunidades para introducir modificaciones en su estructura. En este sentido, la caseína bovina (principal proteína de la leche) y la zeína (principal proteína del maíz), son materiales con muy buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, fácilmente disponible en alta pureza y a bajo costo.

Además de las proteínas, otra forma muy empleada para reducir la huella de carbono de los materiales poliméricos, como adhesivos y recubrimientos, ha sido el reemplazo parcial de los monómeros derivados del petróleo por monómeros derivados de la biomasa, como por ejemplo el metacrilato de isobornilo y el acrilato de 2-octilo, derivados de la resina de pino y del aceite de ricino, respectivamente.

Por otro lado, debido a las crecientes regulaciones a nivel mundial para sustituir los procesos basados en solventes orgánicos por aquellos más amigables con el medioambiente, los procesos de polimerización en medio acuoso presentan actualmente un gran interés industrial. Su principal ventaja, se debe a que el empleo de agua abarata el proceso, reduce la contaminación ambiental y disminuye la toxicidad de los productos obtenidos. En este sentido, las polimerizaciones en emulsión y en miniemulsión, representan una alternativa para la síntesis de látex híbridos, permitiendo controlar y/o diseñar estructuras a escala nanométrica, dando la posibilidad de obtener materiales poliméricos

nanoestructurados con propiedades atractivas para diferentes aplicaciones (adhesivos, pinturas, recubrimientos, y barnices, entre otros).

En este sentido, el objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral es la síntesis de nanopartículas híbridas de acrílico-proteína con nanoestructura y nanomorfología controladas, para su potencial aplicación en recubrimientos, sustituyendo parcialmente monómeros derivados del petróleo por sustancias de origen natural como la caseína, la zeína y los monómeros bioderivados, mediante un procesos de bajo impacto medio ambiental como las polimerizaciones en medio disperso acuoso (emulsión batch/semi-batch y miniemulsión batch). Para esto, se abordaron problemas ligados a la modificación química de la zeína, y a la síntesis y caracterización de los látex, como: i) la funcionalización de una proteína hidrofóbica (zeína), para mejorar su reactividad y su incorporación en materiales híbridos; ii) el empleo de diferentes combinaciones de caseína/zeína en látex híbridos, mediante la polimerización en miniemulsión batch y en emulsión semi-batch y el estudio de su influencia sobre la propiedades finales de los materiales obtenidos; y iii) la utilización de formulaciones acrílicas conteniendo monómeros bioderivados y caseína, para incrementar el contenido de materia prima proveniente de fuentes naturales; y el estudio de su efecto sobre el mecanismo de nucleación de partículas en la polimerización en emulsión. Finalmente, se efectuó un estudio de las propiedades de los látex obtenidos para su potencial aplicación en recubrimientos decorativos o recubrimientos entéricos.

CAPÍTULO 1: CONSIDERACIONES GENERALES^a

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, muchos productos de origen natural han sido empleados en varias aplicaciones con el propósito de sustituir materiales de origen sintético y obtener productos que sean más amigables con el medio ambiente.¹ En este contexto, diferentes alternativas han sido empleadas, como por ejemplo, la incorporación de biopolímeros (como las proteínas) o monómeros bioderivados, en las formulaciones de nuevos materiales puros o híbridos (es decir, cuando se combina un componente biobasado con otro de origen sintético).

Las proteínas, tanto de origen vegetal como animal, han sido ampliamente utilizadas debido a que la compleja estructura aminoácida que la conforman le otorga a estas macromoléculas una alta funcionalidad y polaridad natural. Estas características permite que las proteínas tengan excelentes propiedades, como adhesión, emulsificación, sensibilidad al cambio del pH, capacidad para formar Películas (*film*), entre otras.² Por este motivo, las proteínas han sido ampliamente utilizadas en aplicaciones de recubrimientos, adhesivos, en el acabado de papel, cueros y maderas, o como aditivos para mejorar las películas y como emulsionantes. Otra gran ventaja que poseen las proteínas, deriva directamente de su origen natural, ya que provienen de fuentes renovables, bajando el impacto medioambiental del proceso de producción, al reducir la huella de carbono de la materia prima.^{3,4} Además, son capaces de ser biodegradadas (en condiciones de compostaje, o en presencia de enzimas específicas); y se ha probado que pueden ser biocompatibles, por lo que también tienen especial interés en el área biomédica, ingeniería de tejidos, cosméticos, etc.⁵⁻¹¹ Sin embargo, generalmente estos biopolímeros presentan falta de uniformidad entre lotes, y poseen baja resistencia mecánica debido a sus altas Tg, además de baja resistencia al ataque microbiano, entre otras desventajas, representando un serio inconveniente en la mayoría de las aplicaciones.¹

^a Parte de la revisión bibliográfica mostrada en este Capítulo forma parte de una revisión publicada por Cencha *et al.* en *Ind. Eng. Chem. Res.* (2021), 60, 4745–4765.

Por otro lado, la necesidad de incorporar dentro de los materiales poliméricos sustancias de origen natural, como aceites vegetales o ácidos grasos (los cuales poseen una baja o nula capacidad de polimerizar), han impulsado el desarrollo de monómeros bioderivados. En este sentido, la modificación química de estos materiales ha sido altamente estudiada para incorporarle diferentes grupos funcionales, que permitan su copolimerización en masa, en solventes orgánicos o en dispersiones acuosas, para la síntesis principalmente de polímeros termoendurecibles y termoplásticos, y de adhesivos.¹² Los monómeros bioderivados se pueden obtener de diversas fuentes de origen natural, contribuyendo a la reducción de la huella de carbono del producto final. Además, la estructura o funcionalidad de los monómeros bioderivados puede variarse dependiendo del agente modificante utilizado durante su obtención, para ajustarse a la aplicación requerida. Sin embargo, los monómeros bioderivados, como su nombre lo indica, poseen una fracción derivada de origen natural y una fracción sintética (proveniente del agente modificante), y a diferencia de las proteínas, no suelen ser biodegradable.

Otro aspecto importante a considerar cuando se analiza el impacto ambiental de los materiales, es el proceso de producción. En otras palabras, un producto con alto contenido de materiales proveniente de la naturaleza y biodegradable, obtenido mediante un proceso con baja emisión de solventes orgánicos, hacen al conjunto producto-proceso una alternativa amigable con el medio ambiente. En este sentido, la síntesis de polímeros en base acuosa, permite reducir la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), al evitar el uso de solventes orgánicos (como medio de reacción), generalmente empleados en las polimerizaciones en solución.¹³⁻¹⁵ En este sentido, los polímeros dispersos en medio acuoso (látex) obtenidos por polimerización en emulsión o en miniemulsión, tienen gran interés industrial en la producción de plásticos, recubrimientos, adhesivos, materiales de construcción, modificadores de impacto y materiales para el tratamiento de cueros, entre otros. Además, el empleo de agua como medio de dispersión abarata el costo del proceso, reduce la viscosidad final del látex, ayuda a mejorar el control de la temperatura de reacción, y permite obtener látex con un alto contenido de sólidos, a elevadas conversiones y de elevado peso molecular.¹⁶

En este contexto, muchas investigaciones han considerado la inclusión de proteínas naturales, centrándose en la posibilidad de introducir la funcionalidad y las estructuras de estos biopolímeros

dentro de los materiales híbridos. En algunos casos, se perseguía como objetivo principal mejorar las propiedades mecánicas y térmicas del material final, o reducir el ataque microbiano del biomaterial, mediante la presencia de un polímero sintético.¹⁷⁻²¹ En gran parte de estos trabajos, se empleó como método de síntesis la polimerización en emulsión, mediante el cual se logró la incorporación de diferentes proteínas solubles en agua. Sin embargo, algunos aspectos y propiedades de estos materiales híbridos se han visto desfavorecidos por el carácter hidrofílico de las proteínas incorporadas, por ejemplo, la reducción de la resistencia al agua que presentan los materiales híbridos basados en proteínas, como la caseína.²² Un caso no abordado en la bibliografía, es la obtención de materiales híbridos acrílicos/proteínas sintetizados en medio disperso con la inclusión de proteínas hidrofóbicas, para su aplicación en recubrimientos.

En esta Tesis se persigue mejorar la resistencia al agua de los recubrimientos híbridos acrílicos/proteínas, como así también incrementar el contenido de la fracción natural de estos materiales a través de la incorporación de monómeros bioderivados.

PROTEÍNAS

Entre las alternativas para la sustitución de polímeros a base de petróleo, las proteínas naturales representan una opción prometedora debido a su biodegradabilidad, comestibilidad, baja toxicidad y, en muchos casos, alta disponibilidad, con buena pureza y bajo costo. En general, las proteínas suelen estar infrautilizadas, lo que se suma a las ventajas antes mencionadas para hacer de estos biopolímeros una materia prima ecológica.^{23,24} Estructuralmente las proteínas están formadas por la unión de diferentes aminoácidos (Figura 1.1), que le proporcionan a la molécula múltiples grupos funcionales, como grupos amino, carboxilo, hidroxilo y tiol, a través de los cuales se pueden introducir modificaciones químicas, permitiendo mejorar el desempeño de las proteínas o adaptándolas para obtener propiedades específicas.²⁻⁴ A continuación se describen las generalidades de las proteínas empleadas en esta Tesis (caseína y zeína), incluyendo sus usos y modificaciones químicas propuestas.

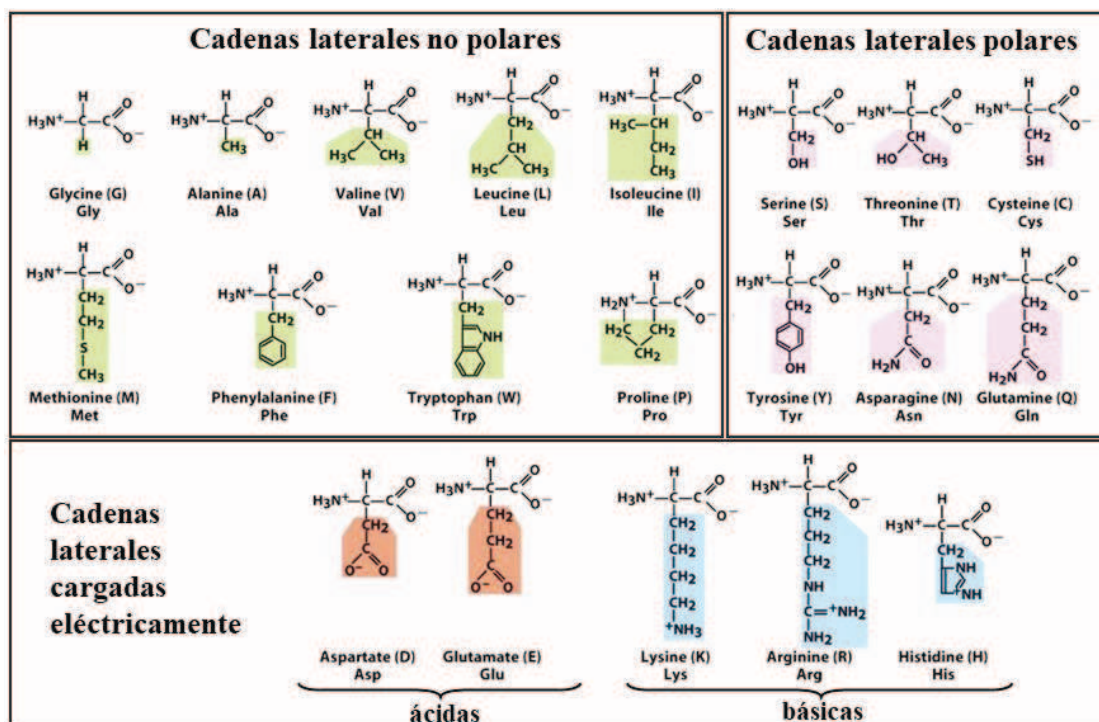


Figura 1.1. Conjunto de aminoácidos que conforman la estructura primaria de las proteínas

1.2.1. Caseína

Generalidades

La caseína es la principal proteína de la leche bovina y representa aproximadamente el 80% del total de las proteínas. En términos de composición, consta de cuatro subfracciones, α S1-, α S2-, β - y κ -caseínas, con una relación molar de aproximadamente 4:1:4:1, las cuales son anfifílicas y con pesos moleculares promedio entre 19 y 30 kDa.²⁵ La caseína, se obtiene por precipitación, mediante la acidificación a pH 4.6 (punto isoeléctrico de la proteína, IEP) de la leche cruda (sin calentar). Las proteínas que permanecen remanentes en solución ácida se conocen como proteínas del suero. La producción mundial de caseína, de grado comestible e industrial, se calcula entre 430.000 y 460.000 toneladas/año, siendo Nueva Zelanda, Países Bajos y Alemania sus principales productores, y se estima un incremento de la producción para 2025, alcanzando un 90.2% del mercado mundial total para el grado industrial y un 9.8% de la caseína de grado comestible.¹

Actualmente, debido a su excelente capacidad de formación de película y sus buenas propiedades adhesivas, la caseína (pura o modificada) se encuentra en aplicaciones de recubrimientos, adhesivos,

fabricación de papel, acabado de cuero y películas comestibles, entre otros.^{1,25-28} Además, debido a su biocompatibilidad y característica no inmunogénica, también se está estudiando en la síntesis de materiales con aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos.²⁸⁻³⁴ Sin embargo, muchas de las aplicaciones industriales de la caseína se encuentran limitadas, principalmente debido a su escasa resistencia al agua y pobre resistencia mecánica.¹

Incorporación de la caseína en la síntesis de materiales híbridos

La capacidad emulsificante que posee la caseína resultó prometedora para su empleo como sustituyente de surfactantes convencionales. En este sentido, las primeras polimerizaciones que incluyeron la incorporación de caseína se llevaron a cabo mediante una polimerización en emulsión libre de emulsificantes, e involucraron el uso de monómeros convencionales tales como acrilato de n-butilo (BA), acetato de vinilo (VAC), metacrilato de butilo (BMA), acrilamida (AM) y acrilato de metilo (MA), empleando persulfato de potasio (KPS) o persulfato de amonio (APS) como iniciadores.¹ Si bien no se informó un mecanismo de injerto de la proteína, se espera que este implique una abstracción de hidrógeno de la caseína por parte de la especie de radicales sulfato. Sin embargo, el uso de persulfatos como iniciadores presenta una limitación debido a que pueden producir una degradación oxidativa de la caseína, resultando en productos amarillentos.¹⁹ Estos problemas oxidativos fueron superados por Li *et al.*³⁵ quienes emplearon un sistema de iniciación redox para injertar de manera eficiente los monómeros sobre la cadena de la caseína, el cual implica el uso de un hidroperóxido orgánico (-ROOH) soluble en agua como agente oxidante, como el hidroperóxido de tert-butilo (TBHP), el cual reacciona con los grupos amino presentes en la caseína, generando dos radicales libres.³⁵ De esta manera, los radicales libres formados en los grupos amino de la caseína inician la copolimerización por injerto con el monómero vinílico disponible en la fase acuosa. Estos macroradicales se vuelven anfífilicos a medida que progresa la polimerización en fase acuosa y auto-ensamblan dando lugar a agregados precursores de nanopartículas núcleo-coraza.

Este método de iniciación propuesto por Li *et al.*³⁵, fue estudiado exhaustivamente en nuestro grupo por Picchio *et al.*,³⁶ donde se avanzó sobre los mecanismos de nucleación y crecimiento de las

nanopartículas involucrados en la síntesis de partículas híbridas acrílico-caseína. A partir del estudio de los parámetros de síntesis que afectan el grado de injerto de la caseína, la microestructura de las nanopartículas y las propiedades de los materiales obtenidos, se propuso el mecanismo de nucleación de la Figura 1.2 para la polimerización en emulsión libre de emulsificante convencional, conteniendo caseína nativa, metacrilato de metilo (MMA) como monómero y TBHP como iniciador.

Antes de comenzar la polimerización, la dispersión inicial (Figura 1.2A) está compuesta por la caseína nativa que se encuentra disuelta en la fase acuosa o formando micelas, y el monómero, en este caso MMA, formando principalmente gotas y en menor medida solubilizado en la fase acuosa e hinchando el interior hidrófobo de las micelas de caseína. Una vez alcanzada la temperatura de reacción, se adiciona el TBHP, el cual quedará repartido entre las fases acuosa e hidrófoba. Durante la etapa de iniciación (Figura 1.2B), se produce la reacción redox entre los grupos amino de la caseína y el TBHP de acuerdo a la propuesta de Li *et al.*³⁵, formando 2 radicales libres, uno sobre el grupo amino de la caseína y un radical tert-butoxi. Estos radicales darán inicio a la nucleación de partículas por tres mecanismos posibles. Como se puede observar en la Figura 1.2B, el primer mecanismo (I) involucra el injerto de la caseína en la fase acuosa a través de la propagación de los radicales aminos con el MMA soluble en el agua, logrando el injerto de la proteína. Estos radicales de copolímero de injerto crecen hasta volverse insolubles en el agua y se auto-ensamblan para formar microdominios de tipo micelar.³⁶ Este mecanismo resulta en la formación de partículas compatibilizadas. Por otro lado, en la fase acuosa también ocurre la propagación de radicales tert-butoxi con el MMA (mecanismo II de nucleación), produciendo radicales homopoliméricos, los cuales pueden coagular produciendo nuevos microdominios de PMMA no compatibilizados y estabilizados con caseína adsorbida físicamente sobre la superficie. Estos radicales homopoliméricos también pueden ingresar dentro de los microdominios formados mediante el mecanismo I o dentro de las micelas de caseína hinchadas con MMA, para seguir su propagación. Por último, los radicales tert-butoxi (altamente hidrofóbicos) podrían ingresar dentro de las micelas de caseína hinchadas con monómero (mecanismo III de nucleación), produciendo partículas de acrílico estabilizadas por la proteína no injertada.

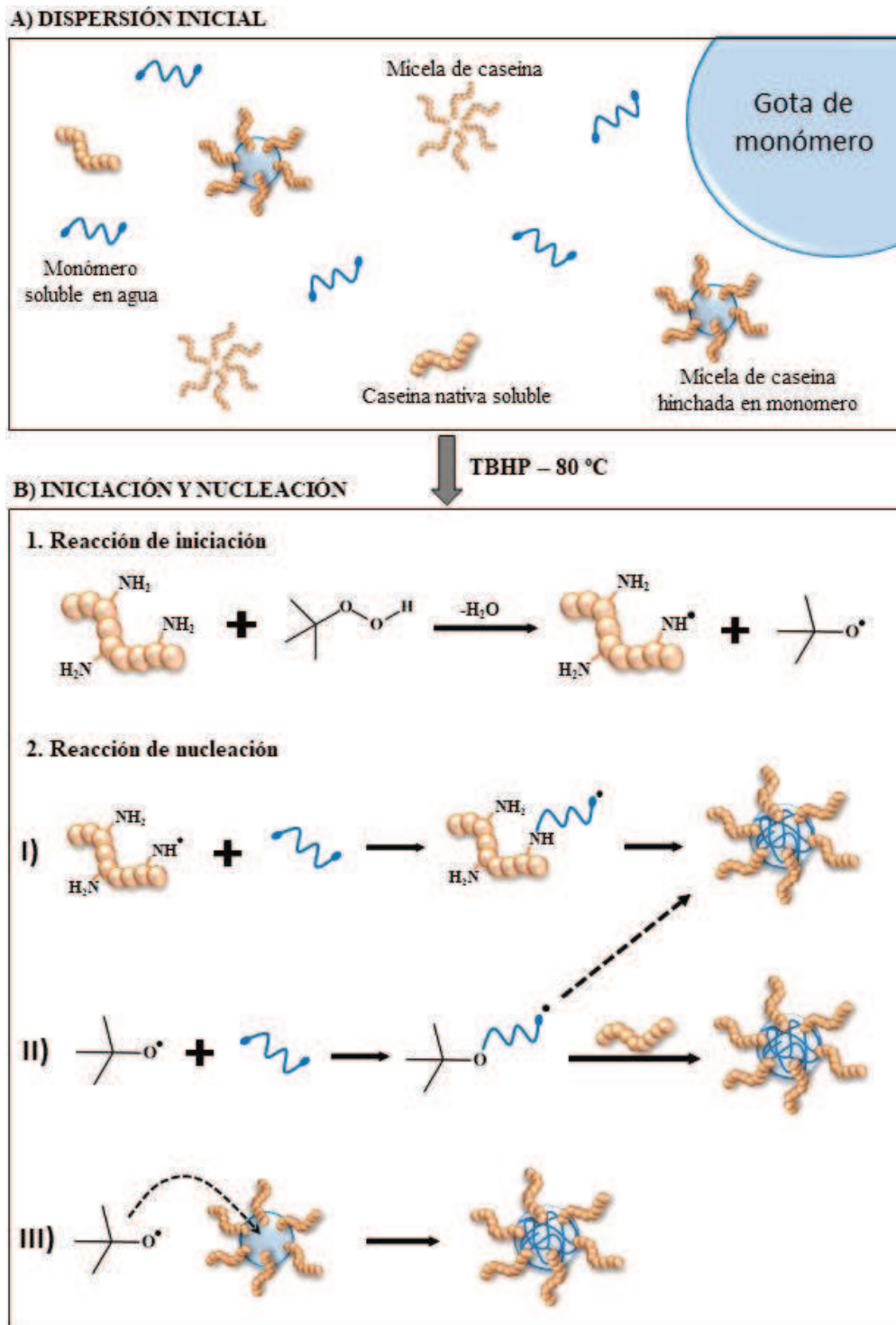


Figura 1.2. Mecanismo de nucleación de partículas sugerido por Li³⁵ y ampliado por Picchio³⁶.

Si bien este mecanismo permite obtener materiales compatibilizados, el grado de injerto de la caseína (proteína unida químicamente a PMMA) se reduce drásticamente cuando se incrementa la concentración de la misma, resultando en materiales con baja resistencia al agua.^{36,37} En otras palabras, el aumento de la concentración de caseína promueve la formación de micelas y los mecanismos de nucleación II y III

de la Figura 1.2B. Un enfoque utilizado para abordar este inconveniente, fue la modificación química de la caseína, a través de los grupos polares presentes en su estructura, como los grupos amino, hidroxilo y carboxilo.^{22,38,39} En este sentido, la funcionalización de la proteína permitió maximizar el grado de injerto proteína-acrílico, mejorando las propiedades finales de los materiales híbridos.

Metacrilación de la caseína

La modificación química de la caseína mediante la incorporación de grupos vinílicos en su molécula permitió obtener una proteína capaz de polimerizar radicalariamente, incrementando la reactividad de la proteína, mejorando drásticamente el injerto entre las fases proteica y acrílica. Esto se debe a que la caseína funcionalizada, a diferencia de la caseína nativa, puede injertarse al monómero mediante la propagación del radical amino generado en la etapa de iniciación y mediante los dobles enlaces ahora presentes en la molécula, aumentando significativamente la probabilidad de injerto.

Una alternativa de funcionalización reportada fue la acrilación de caseína empleando ácido acrílico (AA) como agente modificante y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) como agente activante; sin embargo esta técnica resultó ineficiente debido a que alcanza un bajo grado de modificación y produce una urea como subproducto.²² Por este motivo, la metacrilación de la caseína mediante la reacción amina-glicidil éter, empleando metacrilato de glicidilo (GMA) como agente modificante, surge como la alternativa más prometedora, debido a que no genera subproductos y permite obtener altos grados de modificación (hasta 30 grupos metacrílicos por molécula de proteína), mejorando el injerto de la proteína y por lo tanto la compatibilización entre las fases acrílica y proteica.⁴⁰ En la Figura 1.3 se presenta el esquema de reacción para la obtención de la caseína metacrilada empleando GMA. La reacción procede por el ataque nucleofílico del grupo amino sobre el carbono menos sustituido del oxirano, produciendo la apertura del anillo y la subsiguiente formación de una amina con enlaces vinílicos.⁴⁰ De esta forma, la proteína presenta una nueva funcionalidad metacrílica, que junto con los grupos amino, tiene la capacidad de propagar mediante polimerización radicalaria.

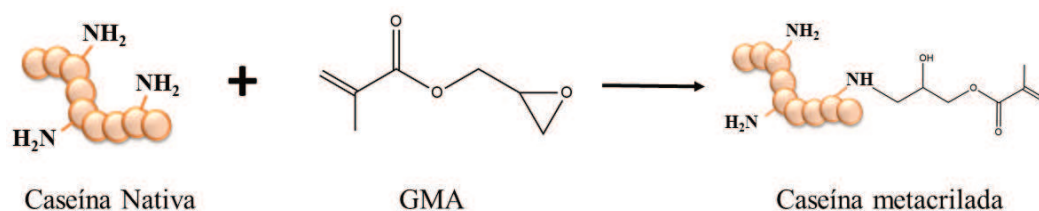


Figura 1.3. Esquema de reacción para la obtención de la caseína metacrilada, empleando GMA como agente funcionalizante.

A lo largo de esta Tesis, se empleó la caseína metacrilada, la cual se prepara con una formulación teórica para que contenga 8 grupos vinílicos por mol de proteína de acuerdo a la receta presentada en la Tabla 1.1. A continuación se describe el proceso empleado y algunas caracterizaciones realizadas. En este sentido, la caseína fue disuelta en una solución acuosa de Na_2CO_3 (pH 11), a 50 °C y bajo agitación continua. Luego se procede a la adición de GMA, manteniendo la mezcla reaccionante a la misma temperatura durante 4 h. Finalmente, esta solución de caseína sin purificar es empleada como base en la polimerización en emulsión o miniemulsión.⁴⁰

Tabla 1.1. Receta general para la obtención de caseína metacrilada.

Reactivos	Cantidades
Caseína (g)	4.5
Na_2CO_3 (g)	0.168
Agua (g)	42
GMA (g)	0.171
Sitios reactivos/molécula de caseína ^(a)	8

^(a) Considerando un peso molecular medio de la caseína de 30000 g/mol

La modificación de la caseína se caracteriza por resonancia magnética nuclear (RMN), empleando una solución de caseína previamente dializada (para eliminar el GMA no reaccionado). En la Figura 1.4, se presentan los espectros de ¹H-RMN del GMA puro, de la caseína nativa y la modificada. Como se puede observar, la caseína metacrilada presenta señales entre los corrimientos químicos 5.5-6.0 ppm, correspondientes a los protones de los dobles enlaces adicionados, mientras que la caseína nativa carece de señales en este rango, demostrando la modificación exitosa con el GMA.

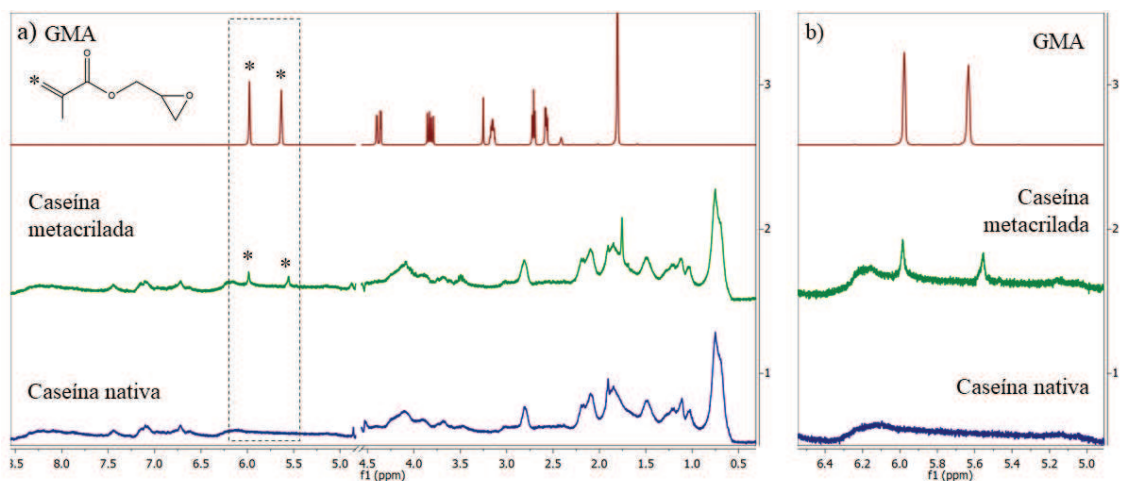


Figura 1.4. Espectros ^1H -RMN del GMA puro, la caseína metacrilada y nativa (a), y una ampliación correspondiente a la zona 4.5-6.5ppm (b). Resultados obtenidos en esta Tesis.

Además, la proteína modificada se caracterizó para determinar la reducción de los grupos amino presentes en la molécula, mediante el método del o-ftalaldehído (OPA) y la concentración micelar crítica (CMC) de la proteína, mediante la determinación de la tensión superficial de diferentes soluciones de caseína (Las técnicas de caracterización se encuentran detalladas en las secciones A.3.2 y A.3.3 del Anexo, respectivamente). En la Tabla 1.2 se resumen los resultados de estos ensayos. La determinación de los grupos amino remanentes en la estructura de la caseína, luego de la funcionalización, es importante debido a que no solo es indicativa del grado de modificación, sino que también su disponibilidad es necesaria en el proceso de iniciación con el TBHP (Figura 1.2B). Por lo tanto, cuanto mayor sea el grado de modificación de la proteína, menos grupos amino disponibles habrá para la iniciación con el TBHP. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 1.2 la reducción de estos grupos es baja cuando se adicionan 8 grupos vinílicos por mol de caseína (considerando la señal de la caseína nativa como un 100%), esperando que la reacción de iniciación redox no sea afectada por la metacrilación de la proteína. Por otro lado, la funcionalización de la proteína redujo levemente su CMC, concentración a partir de la cual la proteína forma micelas en soluciones acuosas (Figura 1.5), por lo que la caseína metacrilada se encuentra levemente menos soluble en la fase acuosa que la caseína nativa, en los sistemas de reacción empleados a lo largo de la Tesis.

Tabla 1.2. Concentración micelar crítica (CMC) y grupos NH_2 disponibles, para la caseína nativa y funcionalizada. Resultados obtenidos en esta Tesis.

Caseína	CMC		Grupos NH_2 disponibles	
	γ (mN/m)	Concentración (mg/ml)	Unidades de Absorbancia (AU)	(%)
Nativa	44.32	0.083	$0.315 \pm 6.4 \times 10^{-3}$	100.0
Metacrilada	42.87	0.059	$0.289 \pm 2.8 \times 10^{-3}$	91.8

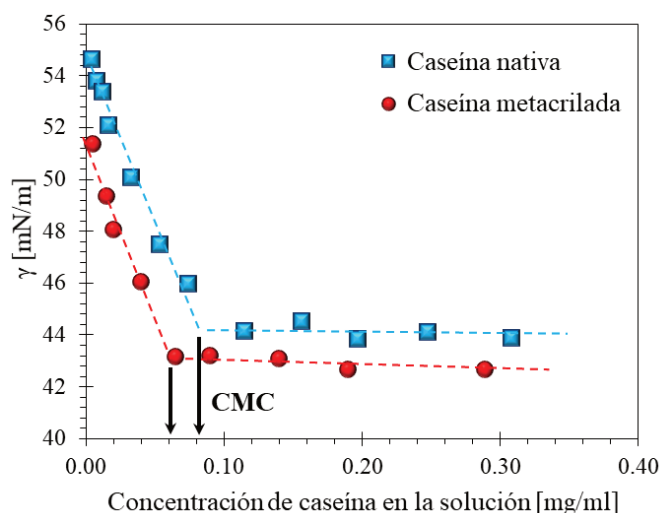


Figura 1.5. Tensión superficial de soluciones acuosas de caseína nativa y funcionalizada, con diferentes concentraciones de la proteína. Resultados obtenidos en esta Tesis.

1.2.2. Zeína

Generalidades

La zeína es la principal prolamina del maíz y comprende el 50% de la proteína total del endospermo.^{11,41} La zeína es una mezcla heterogénea de polipéptidos clasificados en cuatro fracciones denominadas δ -, γ -, β - y α -zeína (70-85% de zeína total) basándose en sus secuencias de aminoácidos, peso molecular, solubilidad y carga.⁴² A partir de 2010, la zeína comercial fue producida como un subproducto del proceso de obtención de la harina de gluten de maíz, principalmente por dos compañías, Flo Chemical Corp. (Ashburnham, Estados Unidos) y Showa Sangyo (Tokio, Japón), y como un subproducto del proceso de producción de bioetanol, por Prairie Gold, Inc. (Bloomington, Estados Unidos).⁴² Hoy en día, la zeína comercial es principalmente α -zeína con un peso molecular entre 19 y 22 kDa, aunque su composición puede variar según el método de obtención.^{42,43}

En comparación con otras proteínas de origen vegetal, la zeína tiene propiedades significativas y únicas debido a su secuencia de aminoácidos, que está compuesta principalmente por aminoácidos no polares y no cargados como la glutamina (21-26%), la leucina (20%), la prolina (10%) y la alanina (10%).⁴⁴ Aunque esta proteína tiene dominios laterales hidrófobos e hidrófilos (en menor medida) en su estructura, con frecuencia se considera una proteína hidrófoba debido a su insolubilidad en agua.^{6,42} En los últimos años, este biopolímero ha atraído el interés industrial para explorar su potencial como materia prima, debido principalmente a dos motivos: i) la zeína no es una proteína indispensable para el consumo humano por su escasa solubilidad en agua y su bajo nivel nutricional (carece de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano) y ii) como se mencionó anteriormente, la zeína se obtiene como subproducto de procesos bien establecidos.⁴²

Una gran ventaja que posee la zeína es que ha sido aprobada como un material generalmente reconocido como seguro (GRAS), por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos.^{8,44,45} Esto, sumado a su capacidad de formar películas, su biocompatibilidad, su biodegradabilidad y su capacidad para encapsular tanto activos hidrófobos como hidrófilos, le dieron a la proteína un amplio rango de aplicaciones, empleándose en la síntesis de materiales biobasados dentro de la industria de plásticos biodegradables, recubrimientos, cosméticos, como así también en aplicaciones biomédicas, de ingeniería de tejidos, y aplicaciones de control de administración de fármacos. En estas aplicaciones, la zeína ha sido empleada en forma prácticamente pura, en mezclas físicas con otros materiales o como parte de un material multifásico, obteniendo diferentes morfologías como nanofibras, micelas, nanopartículas, nanoesferas e incluso películas.^{11,31,53-55,44,46-52}

En el Capítulo 6 de la Tesis, se hará hincapié en el uso de nanopartículas basadas en zeína, empleando el método antisolvente de precipitación, por lo que a continuación se explicará en detalle este sistema.

Método antisolvente de precipitación para la síntesis de nanopartículas

La técnica antisolvente de precipitación, también se denomina desolvatación, precipitación por extracción o desplazamiento del disolvente; es una técnica ampliamente utilizada para obtener

nanopartículas, debido a que ofrece la posibilidad de formar nanopartículas completamente biobasadas, con excelentes propiedades finales como resultado de la sinergia de los biopolímeros combinados.⁴⁸ Esta técnica se basa en la disminución de la capacidad de solvatación del disolvente en el que se encuentra disuelto un soluto.⁵⁶ La precipitación se puede lograr mediante la adición de un antisolvente (líquido en el cual el soluto es insoluble, pero es miscible al solvente), para inducir la sobresaturación y precipitación del soluto que se encuentra soluble en el solvente. La principal fuerza impulsora para la formación de partículas durante la precipitación, es el desequilibrio de las interacciones moleculares entre soluto, disolvente y antisolvente. De esta manera, a una determinada relación solvente/antisolvente, las interacciones soluto-soluto son lo suficientemente fuertes como para superar la entropía de los efectos de mezcla y otras interacciones, dando lugar a la precipitación del soluto en forma de pequeñas partículas. Una vez formadas las nanopartículas, es importante que exista una repulsión suficientemente fuerte entre ellas para evitar la agregación de las mismas.^{48,56} LaMer y Dinegar (1950), desarrollaron un modelo que permite explicar la nucleación instantánea y el crecimiento de las nanopartículas, que ocurren durante la precipitación homogénea de un soluto que se encuentra en una solución saturada, a partir del estudio sobre la precipitación de partículas coloidales de azufre, donde observaron que la sobresaturación de las soluciones de azufre cambiaba con el tiempo durante la precipitación.^{57,58} En la Figura 1.6 se esquematiza dicho modelo, donde se pueden distinguir las diferentes etapas del proceso: generación de la sobresaturación, nucleación, y el posterior crecimiento de las partículas por condensación y coagulación.

A continuación, se describen los procesos de formación y crecimiento de las partículas formadas mediante la técnica antisolvente de precipitación.

- Sobresaturación y nucleación

Como se mencionó anteriormente, el proceso de formación de nanopartículas a través de esta técnica comienza con la adición de la solución que contiene el soluto al antisolvente (o viceversa), disminuyendo la calidad del solvente. Sin embargo, existe un breve período de tiempo previo a la precipitación. El intervalo de composiciones de solvente/antisolvente en el que no se observa nucleación dentro de un

marco de tiempo dado, se denomina zona metaestable (Figura 1.6-a), mientras que al tiempo transcurrido entre el inicio de la sobresaturación y la aparición de los núcleos se lo denomina tiempo de inducción (Figura 1.6-c).⁵⁹ Cuando la concentración del soluto excede la concentración de equilibrio de saturación (C_{eq}) asociada a una determinada relación solvente/antisolvente, el sistema se sobresatura de soluto (Figura 1.6-b), hasta alcanzar una concentración crítica a partir de la cual comienza la nucleación de las partículas (Figura 1.6-d). Mientras se mantenga la adición de soluto (es decir, disuelto en el solvente), la concentración de sobresaturación seguirá aumentando, generando nuevos núcleos de partículas. Sin embargo, cuando cesa la adición del solvente, la concentración de soluto puro comienza a disminuir, pasando por debajo de la concentración crítica de sobresaturación. En este punto cesa la nucleación y el número de núcleos formados ya no cambia,⁶⁰ dando lugar al crecimiento de las partículas por coagulación y condensación.

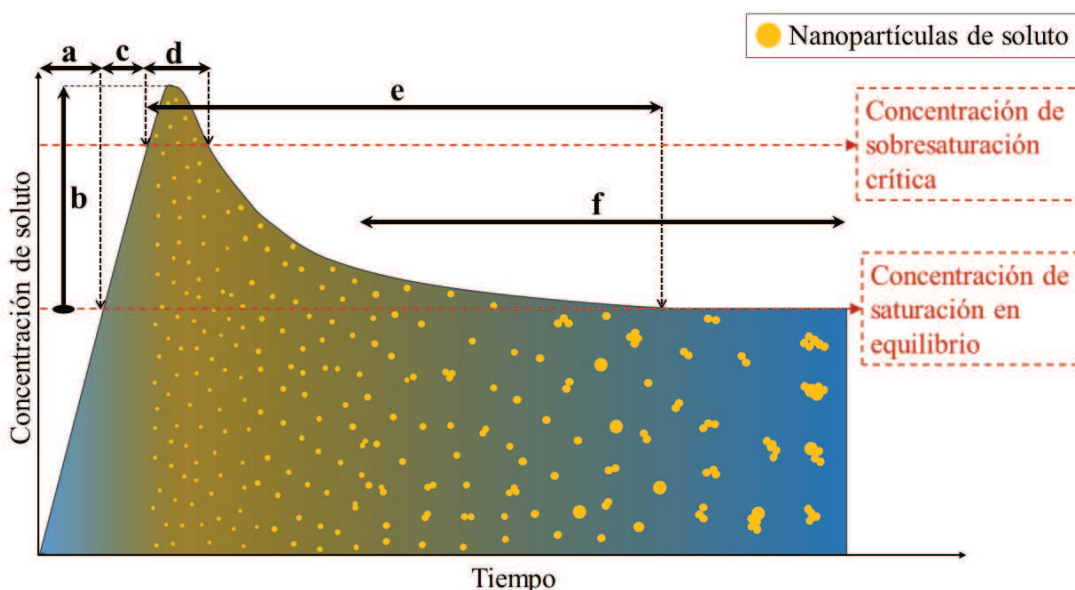


Figura 1.6. Clásica ilustración esquemática del método LaMer-Dinegar, que representa el proceso de formación de nanopartículas de solutos mediante la técnica de precipitación. Etapas: a) zona metaestable; b) sobresaturación del soluto; c) tiempo de inducción; d) nucleación de las partículas; e) crecimiento por condensación; y f) crecimiento por coagulación. El eje del tiempo no está escalado para poder mostrar con detalle las diferentes etapas.

De acuerdo a la teoría clásica de nucleación homogénea, la velocidad de nucleación (J), queda definida por la ecuación 1.1.⁵⁹ El grado de sobresaturación (S) se puede describir como la relación entre la concentración de soluto (c) y del soluto en equilibrio (C_{eq}) en una mezcla específica solvente/antisolvente (ecuación 1.2), mientras que v es la frecuencia de transporte molecular en la interfaz sólido-líquido, y se define según la ecuación 1.3.

$$J = N_0 v \exp \frac{-16\pi\sigma^3 v_s^2}{3\kappa^3 T^3 (\ln S)^2} \quad [1.1]$$

$$S = \frac{c}{C_{eq}} \quad [1.2]$$

$$v \approx \frac{\kappa T}{3\pi a_0^3 \eta} \quad [1.3]$$

donde, N_0 es el número de moléculas de soluto por unidad de volumen, σ es la tensión interfacial en la interfaz sólido-líquido, v_s es el volumen de una molécula de soluto, κ es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad de la solución circundante y a_0 es el diámetro efectivo medio de las especies en difusión.⁵⁶ De las ecuaciones 1.1 a 1.3, se puede deducir que los principales parámetros que inciden en la velocidad de nucleación, son la concentración del soluto, la relación antisolvente/solvente, la temperatura y la solubilidad del solvente en el antisolvente, y determinan las propiedades cruciales de las nanopartículas, como el tamaño, la morfología y la composición.⁶¹

- Crecimiento de núcleos por condensación y coagulación

La condensación se define como la adición de moléculas individuales a la superficie de la partícula y debe distinguirse de la coagulación, que ocurre cuando dos o más partículas se adhieren entre sí. La velocidad de condensación disminuye por la coagulación de las partículas, debido a que se reduce el número total y el área superficial de los núcleos iniciales. Finalmente, el crecimiento de las partículas por condensación cesa cuando la concentración de soluto libre (no absorbido) se reduce por debajo de la concentración de saturación de equilibrio (Fig.1.6-e).⁶²

Por su parte, la coagulación de partículas es otra fuerza impulsora importante para el crecimiento de partículas. Ocurre cuando las interacciones atractivas (como van de Waals o la atracción hidrófoba)

dominan por sobre las interacciones repulsivas (como la repulsión estérica o electrostática). Las partículas pueden fusionarse irreversiblemente después de la agregación, o pueden aglomerarse conservando sus formas individuales, pudiendo liberarse en ocasiones mediante la aplicación de fuerzas mecánicas, como agitación, homogeneización o tratamiento ultrasónico. La cinética de la coagulación de partículas depende tanto de la frecuencia de las colisiones (relacionadas con la concentración de partículas, el tamaño de las partículas y el movimiento browniano, gravitacional o mecánico de las partículas), como de la eficiencia de la colisión (relacionado con las interacciones atractivas y repulsivas existentes entre las partículas).⁵⁶

En este sentido, la clave para producir nanopartículas mediante esta técnica de precipitación con una distribución angosta del tamaño de partículas, es crear condiciones que favorezcan una nucleación rápida y un crecimiento lento de partículas. Sin embargo, es importante considerar que la precipitación de solutos en soluciones sobresaturadas consiste en una secuencia de eventos interdependientes, y que en ocasiones, dichos eventos no aparecen en sucesión, sino que pueden ocurrir simultáneamente, por lo que es posible que en algunos sistemas también ocurra la nucleación secundaria (a partir de núcleos foráneos formados *in situ* o adicionados).⁵⁷

Por otro lado, las partículas se pueden estabilizar contra la coagulación mediante la inclusión de agentes estabilizantes o tensioactivos, como por ejemplo los biopolímeros mencionados en la Tabla 1.3. Las moléculas estabilizadoras se adsorben en la superficie de las nanopartículas e imparten estabilidad al introducir interacciones repulsivas, como la repulsión electrostática y estérica.⁶² La fuerza impulsora para la adsorción de tensioactivos o biopolímeros es típicamente una atracción hidrófoba o electrostática, y permiten obtener partículas estables y capaces de ser redispersadas en agua, luego de ser liofilizadas. Estos agentes estabilizantes se pueden agregar después de la obtención de las partículas⁶¹ o se pueden disolver en la fase antisolvente, para que participen durante la formación de las partículas,⁶³⁻⁶⁶ siendo esta última la más empleada.

Tabla 1.3. *Biopartículas basadas en zeína, estabilizadas por diferentes biomateriales*

Sistemas	Relación zeína/X ^(a)	RP (%)	Dp (nm)	Aplicaciones	Ref.
Zeína/TPS	1:0.07-1:0.7	20-70	130-495	Sistema de administración de fármacos contra el cáncer (Paclitaxel)	65
Zeína/Pectina	1:0.32	> 92	250	Liberación controlada de suplementos dietéticos (curcumina)	67
Zeína/CSA	1:2 -1:13	No reportado	140-200	Administración de fármacos por vía oral (insulina)	68
Zeína/Alginato	1:0.25	95	160	Sistemas de nanoportación para moléculas bioactivas (No especificado)	69
Zeína/SC	1:1	No reportado	110 - 500	Encapsulación y/o liberación controlada de fármacos terapéuticos, componentes bioactivos y pigmentos alimentarios	70
	1:1-5:1	No reportado	100-130		71
	1:0.1-1:2	No reportado	120-150		64
	1:0.75-1:1.25	74-82	177-240		72
Zeína/CMCS	1:0.5-1:2	No reportado	86-200	Encapsulación y liberación controlada de vitamina soluble en grasa (Vitamina D3)	47
Zeína/Quitosano	1:0.05 - 1:0.2	No reportado	211-862	Liberación controlada de agente bioactivo (α -tocoferol)	73
	1:0.02 - 1:0.1	No reportado	60 - 1000	Estabilizador de emulsiones, conocida como <i>pickering emulsion</i>	65
Zeína/SC con PDC-CA	1:0.25-1:0.8	No reportado	141-421	Liberación controlada de fármaco (Exenatida)	74
Zeína/almidón	1:2 - 1:10	No reportado	115 - 564	Estabilizador de emulsiones, <i>pickering emulsion</i>	75
Zeína/ac. tánico	1:0.1 - 1:0.5	No reportado	96 - 250	Estabilizador de emulsiones, <i>pickering emulsion</i>	76

Obtención de biopartículas basadas en zeína, empleando la técnica antisolvente de precipitación

Debido a las dificultades que implican la incorporación de un material hidrofóbico en sistemas de base acuosa, la síntesis de nanopartículas basadas en zeína empleando la técnica antisolvente de precipitación, ha mostrado gran interés en los últimos años. En este contexto, diversos biomateriales anfifílicos han sido estudiados como estabilizadores, en la síntesis de nanopartículas de zeína, como por ejemplo el polisacárido del té (TPS),⁶⁵ la pectina,⁶⁷ la amilosa carboximetilada de cadena corta

(CSA),⁶⁸ el alginato,⁶⁹ el caseinato de sodio (SC),^{64,70-72} el quitosano,^{65,73} el quitosano carboximetilado (CMCS),⁴⁷ el almidón,⁷⁵ y el ácido tánico⁷⁶. En la Tabla 1.3 se resumen las nanopartículas basadas en zeína, sintetizadas por la técnica antisolvente de precipitación (o variantes de la misma), detallando los biomateriales empleados como estabilizantes, las composiciones estudiadas, el tamaño de las nanopartículas, el rendimiento de partículas (RP, relación entre las biopartículas producidas y la cantidad inicial de biomateriales empleados) y sus aplicaciones. Como se puede observar, es posible sintetizar una amplia variedad de biopartículas basadas en zeína para diferentes aplicaciones, con un amplio rango de diámetros y buenos rendimientos de partículas (70-90%).

Finalmente, debido al creciente interés en esta técnica para la obtención de nanopartículas basadas en zeína, algunas investigaciones se han centrado en el desarrollo de procedimientos que permitan obtener biopartículas estables, y que puedan ser escalables, continuos y económicamente atractivos para la industria, utilizando algunas variantes del método antisolvente de precipitación, como por ejemplo la nanoprecipitación flash (FNP),⁶⁶ la FNP de cuatro corrientes,⁴⁵ el método de microfluidización de doble canal,⁷⁷ y la combinación de la FNP con secado por aspersión.⁷⁸

Este procedimiento para la obtención de nanopartículas basadas en zeína, presenta un gran potencial para ser empleado como precursor en la formación de nuevas nanopartículas híbridasacrílico/proteínas con la incorporación de múltiples biomateriales, allanando el camino para su uso en otras aplicaciones industriales.

MONÓMEROS BIOBASADOS

Debido a las crecientes preocupaciones sobre el impacto ambiental de la utilización del petróleo y sus derivados, en la actualidad se está haciendo un gran esfuerzo por buscar alternativas renovables. Las denominadas biorrefinerías (análogo al proceso tradicional de refinería de petróleo) surgen como una alternativa para la obtención de productos químicos de interés, a partir de biomasa renovable. De esta manera es posible sintetizar diversos monómeros biobasados o bioderivados, como dioles, ácidos dicarboxílicos, monómeros aromáticos y diaminas, entre otros, por ejemplo a partir microorganismos modificados metabólicamente.⁷⁹ Sin embargo, la mayor parte de estos se han copolimerizado mediante

polimerizaciones de crecimiento por paso, en masa o en solución, para producir polímeros termoendurecibles (como compuestos fenólicos, poliepóxidos, poliuretanos) y algunos polímeros termoplásticos (como poliésteres o poliamidas). Esto se debe principalmente a que las moléculas derivadas de la biomasa contienen generalmente varios grupos funcionales (alcoholes, fenoles, ácidos, aminas, etc.), los cuales permiten obtener polímeros termoendurecibles a través de una policondensación directa.¹²

Por el contrario, la polimerización por crecimiento de cadena a partir de monómeros biobasados, ha sido menos investigada, debido a que estos rara vez poseen funciones reactivas adecuadas para la polimerización radicalaria. Por ejemplo, los dobles enlaces de los aceites vegetales son poco reactivos en la polimerización por radicales, mientras que los bifenoles se comportan como inhibidores de radicales.^{12,80} Por lo tanto, sintetizar monómeros de base biológica capaces de polimerizar por radicales libres ha sido un verdadero desafío, llevando a la necesidad de sintetizar monómeros biobasados que posean en su estructura enlaces vinílicos.

En este contexto, los aceites vegetales (y los ácidos grasos derivados de estos), han sido utilizados como la principal fuente para la síntesis de una amplia variedad de monómeros bioderivados. Los triglicéridos (éster obtenido por la unión de una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos) que conforman los aceites vegetales, poseen diferentes grupos funcionales (dobles enlaces internos, alcoholes, o epóxidos) permitiendo generar monómeros acrílicos biobasados. Esta estrategia resuelve el inconveniente de la baja reactividad de los triglicéridos naturales, mediante la introducción de grupos funcionales fácilmente polimerizables.^{12,81} Por otro lado, los monómeros derivados de ácidos grasos, en virtud de sus cadenas alifáticas, pueden ser excelentes plastificantes facilitando la coalescencia durante la formación de la película, resultando de gran interés como materia prima clave en la producción de recubrimientos y/o en aplicaciones de adhesivos.^{12,82}

En la Tabla 1.4 se resumen algunos monómeros derivados de aceites o ácidos grasos, aplicados en la síntesis de recubrimientos y adhesivos. Además, se mencionan otros monómeros derivados de otras fuentes, como la resina de pino y la glucosa.

Por otro lado, en menor medida, también se han desarrollado monómeros derivados de otras materias primas orgánicas, como por ejemplo a partir de moléculas pequeñas aisladas de la lignina (derivados de la vainillina, del ácido ferúlico, del eugenol y del creosol); de carbohidratos (derivados del almidón de papa o de maíz), o de azúcar (derivados de glucosa, ribosa, manosa, galactosa y glucosamina).^{12,82,83}

Tabla 1.4. Monómeros bioderivados de aceites vegetales y ácidos grasos empleados en la síntesis de adhesivos o recubrimientos

Nombre		Origen	Fracción natural (%)	Ref.
Acrilato de 2-octilo	2OA	Aceite de ricino	73	84
Metacrilato de piperonilo	PIPEMA	Piperina (alcaloide presente en la pimienta negra)	67	85
Acrilato derivado de soja	SAM	Aceite de sazafrás	74-88	12,86,87
Acrilamida de aceites Vegetales		Aceites de oliva, soja, girasol y linaza		12
Erucato de metilo	-	Ácido erúcico	82-88	88
Acrilato de ricinoleico	-	Ácido ricinoleico	86	89
Metacrilato de oleico	MOA	Ácido oleico	86	88,90
Metacrilato de linoleico	MLA	Ácido linoleico	73	88,90
Metacrilato de cardanol	CAMA	Ácido anacardico	73	91,92
Metacrilato de isobornilo	IBOMA	Resina de pino	71	84
Acrilato de isobornilo	IBOA	Resina de pino	77	84
Metacrilato isosorbida	ISOMA	Glucosa (almidón)	60-43	93,94

^a La fracción natural se calcula a partir de la cantidad de carbono derivados de la biomasa (C_{bio}), respecto al contenido total de carbono del monómero derivado ($C_{bio} + C_{proveniente\ del\ agente\ modificante}$)

MECANISMOS DE POLIMERIZACIÓN

Dentro de las polimerizaciones radicalarias, la polimerización en medio disperso acuoso resulta ser una alternativa de proceso más amigable con el medio ambiente, debido a que reducen la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), en comparación con los procesos basados en solventes orgánicos, como la obtención de polímeros en solución. Además, el empleo de agua como fase continua en las dispersiones, trae grandes ventajas a estos sistemas debido a su alta capacidad calorífica y a su baja viscosidad, facilitando el control térmico.^{1,12} Además de los beneficios antes mencionados, los látex (polímeros dispersos en agua) presentan otras ventajas adicionales respecto a las alternativas a base de

solventes, como por ejemplo, la reducción del olor y del tiempo de secado.⁹⁵ En este contexto, las polimerizaciones en emulsión (EP) y en miniemulsión (MEP) ocupan un papel clave en muchas industrias de producción de polímeros, para la síntesis de látex con aplicaciones como recubrimientos, adhesivos, tintas, envases, caucho, etc.^{1,12}

1.4.1 Polimerización en emulsión

La polimerización en emulsión es hoy en día la técnica más extendida para producir a gran escala materiales de alta calidad, de una manera consistente, segura y cuidadosa con el medio ambiente. Actualmente la producción mundial de materiales poliméricos mediante esta técnica es de más de 25 millones de toneladas/año, y se prevé un aumento en su valor de USD 7,6 mil millones (2019) a USD 11.8 mil millones (2027).¹

En los procesos en emulsión, antes de iniciar la polimerización (Figura 1.7A) el sistema se encuentra formado por agua (fase continua), un emulsificante (con una concentración que excede la CMC en agua, para asegurar la presencia de micelas), y el/los monómeros (fase discontinua) formando principalmente gotas estabilizadas por el emulsificante, y en menor medida disuelto en el agua (dependiendo de la solubilidad del monómero), o hinchando las micelas de emulsificante. Luego de la adición de un iniciador (comúnmente soluble en fase acuosa), se generan radicales libres que comienzan la formación o “nucleación” de las partículas. Debido a que los radicales generados por el iniciador en la fase acuosa son sustancias iónicas muy solubles en agua, rara vez se absorben directamente en la fase orgánica, por lo que comienzan la reacción con el monómero disuelto en la fase acuosa produciendo radicales oligoméricos que crecen hasta ser suficientemente hidrofóbicos como para poder entrar a la fase orgánica (Figura 1.7B). Los mecanismos de nucleación ampliamente aceptados para las polimerizaciones en emulsión incluyen a las nucleaciones homogénea, micelar (ó heterogénea), y coagulativa.

➤ Nucleación homogénea: los radicales generados en fase acuosa reaccionan con el monómero disuelto formando radicales oligoméricos, que crecen hasta un tamaño crítico en el cual se hacen

insolubles y precipitan, formando partículas que se estabilizan con emulsificante. Este mecanismo permite explicar la formación de partículas de polímero en ausencia de micelas (es decir, con una concentración de emulsificante $<$ CMC).

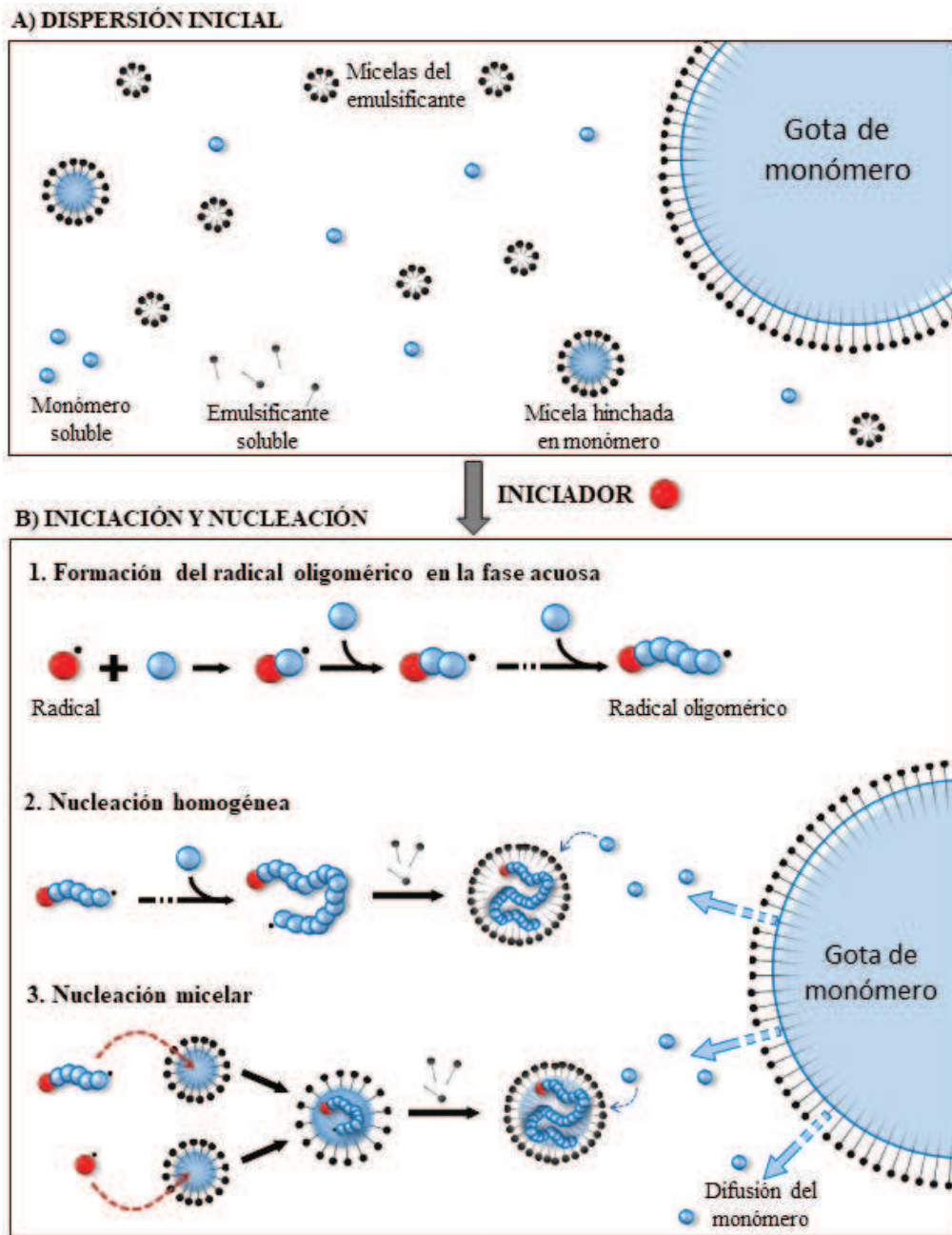


Figura 1.7. Esquema del proceso de polimerización en emulsión.

➤ Nucleación micelar (ó heterogénea): los radicales oligoméricos formados en la fase acuosa entran en las micelas (la concentración del emulsificante $>$ CMC) que se encuentran hinchadas con monómero,

el cual polimeriza con los radicales que ingresan a ellas, dando origen a nuevas partículas de polímero. El número de micelas presente en el sistema disminuye, debido a que se convierten en partículas de polímero (sólo una pequeña fracción), o a que se desintegran para proporcionar emulsificante que estabiliza las partículas en crecimiento.

➤ Nucleación coagulativa: Este mecanismo ocurre en dos etapas. Primero, se forman las partículas precursoras inestables por entrada de los radicales a las micelas o por precipitación de oligorradicales; luego estas partículas crecen por coagulación entre ellas hasta alcanzar un tamaño que les proporcione estabilidad y se convierten en verdaderas partículas de polímero.

Es importante considerar que, debido a que las gotas de monómero son relativamente grandes (1-10 μm) en comparación con las micelas, el área de micelas es varios órdenes de magnitud mayor que el área de gotas, y por lo tanto es poco probable la entrada de radicales a las gotas; y por lo tanto la formación de partículas a partir de estas últimas es prácticamente nula.

En la Figura 1.7 se representa el proceso de formación de partículas mediante los mecanismos más comúnmente encontrados (nucleación micelar y homogénea) y su crecimiento durante una polimerización en emulsión. Las gotas de monómero actúan como reservorio, desde donde difunden las moléculas de monómero a través de la fase acuosa, hacia las partículas en crecimiento, en las cuales se consume mayoritariamente por la reacción de propagación. Mientras la polimerización ocurre en presencia de gotas de monómero, la concentración de monómero en las partículas es prácticamente constante. Una vez consumidas las gotas, la polimerización prosigue con el monómero disuelto en las partículas, disminuyendo progresivamente la concentración de monómero en el sitio de polimerización (es decir, en las partículas) y por lo tanto la velocidad de polimerización, a menos que la influencia del efecto gel en las partículas sea más importante que la reducción de la concentración de monómero.

1.4.2 Polimerización en miniemulsión

Si bien la polimerización en emulsión ocupa un lugar destacado entre las técnicas de síntesis de polímeros por vía radicalaria, este método de síntesis presenta limitaciones cuando se emplean monómeros muy hidrofóbicos o cuando se desea incorporar un segundo material preformado como una

resina polimérica, un compuesto orgánico o un material inorgánico, el cual tiene serias limitaciones para difundir desde las gotas de monómero hasta las partículas a través de la fase acuosa. Es por ello que en la polimerización en miniemulsión, a diferencia de la emulsión convencional, se reduce el tamaño de las gotas de la dispersión, alcanzándose diámetros de gotas entre 50-500 nm. De esta manera, se genera un área de gotas muy elevada, que favorece su nucleación durante la polimerización. En efecto, en una polimerización en miniemulsión se busca que la nucleación ocurra en estas pequeñas gotas previamente estabilizadas (Figura 1.8), tratando de evitarse la formación de partículas por otros mecanismos de nucleación (micelar u homogénea). Este tipo de nucleación en gotas permite incorporar un material preformado, debido a que se evita en gran medida la transferencia de materia de los componentes a través de la fase acuosa. En este sentido, y a diferencia de las polimerizaciones en emulsión convencionales, las polimerizaciones en miniemulsión permiten incorporar eficientemente materiales preformados, o materiales altamente hidrófobos dentro de las partículas de polímero.

Cabe destacar que el concepto de miniemulsión no está restringido a una dispersión de una fase orgánica en una fase acuosa (conocido como sistema directo o “aceite en agua”), sino que también se aplica al sistema inverso o “agua en aceite”. Dado que en esta Tesis (Capítulo 3) se emplea el método de miniemulsión directa, en lo que sigue la discusión se limitará a este sistema.

Un sistema típico de miniemulsión directa, está formado por una fase acuosa continua que contiene agua, buffer y emulsificante (para estabilizar las gotas); y una fase orgánica constituida por el(los) monómero(s), el coestabilizante (compuesto de bajo peso molecular insoluble en agua, que protege a las gotas contra la degradación difusional) y en algunos casos un polímero preformado u otro material insoluble en agua que se desee incorporar. Para obtener una miniemulsión, primero se forma una pre-emulsión mezclando ambas fases con agitación mecánica, y luego se homogeniza para reducir el tamaño de gotas (Figura 1.8). Esta última etapa involucra los procesos de: a) deformación y ruptura de las gotas; b) estabilización con el emulsificante de la nueva área interfacial formada; y c) coalescencia de las gotas no estabilizadas, reduciéndose la polidispersidad de la distribución de tamaños de gotas en la miniemulsión. Los métodos que comúnmente se utilizan en la etapa de minimulsificación son agitación

mediante rotor-estator, homogenización de alta presión o por ultrasonido (técnica empleada en esta Tesis).

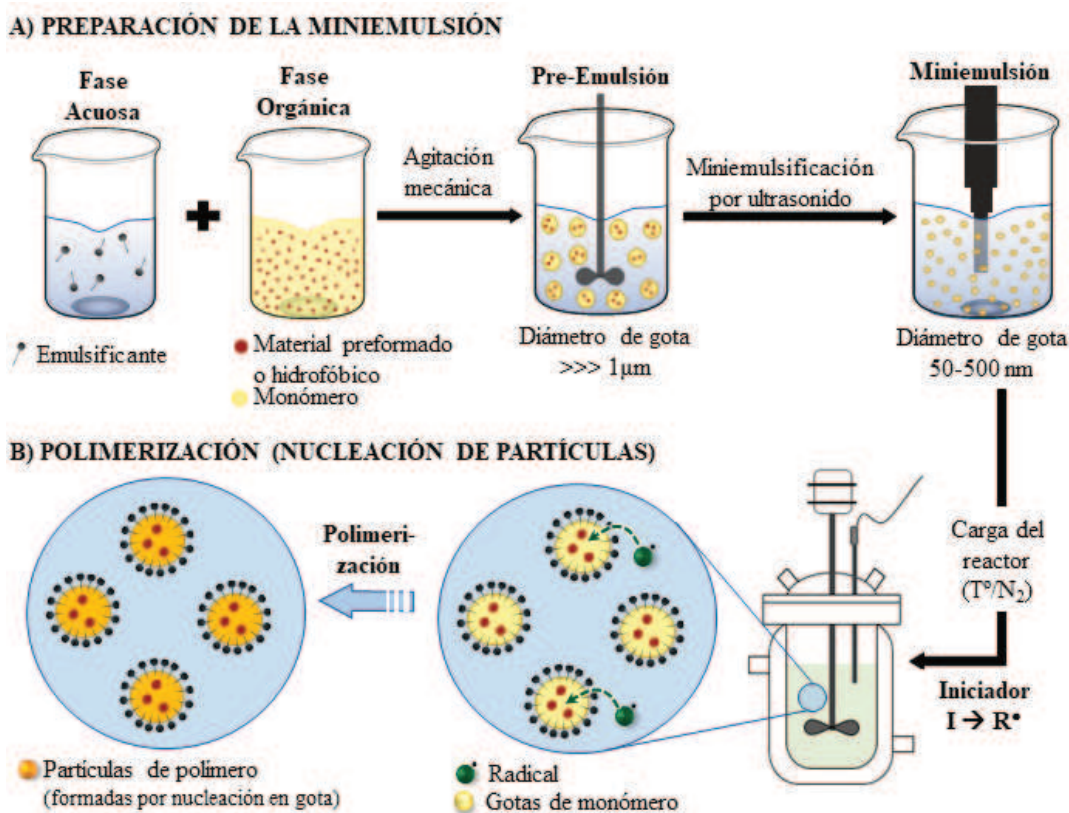


Figura 1.8. Preparación de la miniemulsión y su polimerización, en presencia de un material preformado, altamente hidrofóbico.

Una vez formada la miniemulsión, el proceso de polimerización puede iniciarse mediante la adición de un iniciador soluble en agua, formándose los radicales en la fase acuosa por la descomposición del iniciador, o empleando iniciadores solubles en fase orgánica que generan radicales dentro de las gotas de monómero por encontrarse previamente disueltos en las mismas. Los iniciadores solubles en la fase acuosa generan radicales que suelen ser demasiado hidrofílicos para entrar directamente a la fase orgánica. Por ello, estos radicales primero deben reaccionar con el monómero presente en la fase acuosa hasta alcanzar una longitud que los haga suficientemente hidrofóbicos como para ser absorbidos por las gotas.¹⁶

En una polimerización en miniemulsión la ocurrencia de nucleación en gotas es un factor importante que asegura la formación de partículas poliméricas con la composición deseada a partir de la formulación inicial. Sin embargo, es posible la existencia de otros mecanismos de nucleación, distintos a la nucleación en gotas, como la nucleación micelar, favorecida por la presencia de altas concentraciones de emulsificante. En la mayoría de los casos, este inconveniente, se evita o se reduce ajustando la concentración de emulsificante y las condiciones de homogeneización, que permita disminuir la presencia de micelas. Pero aún en estas condiciones, puede haber nucleación homogénea causada por la precipitación de oligoradicales que crecen en la fase acuosa. Por ejemplo, se ha reportado que al realizar una polimerización en miniemulsión de estireno y acrilato de butilo, manteniendo la concentración de emulsificante por debajo de la CMC, se produjo la nucleación homogénea de partículas, además de la nucleación de gotas.⁹⁶ También se ha reportado la ocurrencia de nucleación homogénea en la síntesis de látex híbridos dando origen a partículas homogéneas compuestas solamente por el polímero formado a partir de los monómeros acrílicos empleados.⁹⁷

Una técnica que permite inferir sobre el mecanismo de nucleación involucrado, es la determinación del número de gotas (N_d) de la miniemulsión previo a la polimerización, y la evolución del número de partículas (N_p) a lo largo de la polimerización. En una polimerización en miniemulsión con nucleación en gotas, como principal mecanismo de formación de partículas, N_d y N_p deberían ser semejantes, debido a que cada gota se debería convertir en una partícula. Por lo tanto, si se calcula el cociente N_p/N_d se puede inferir que: i) una alta eficiencia de nucleación en gotas, daría $N_p/N_d \approx 1$; ii) una significativa formación de nuevas partículas por mecanismos de nucleación secundaria, incrementaría el valor de N_p con respecto a las gotas de la miniemulsión, resultando $N_p/N_d \gg 1$; y iii) una ineficiente nucleación de gotas (como resultado de la desintegración de las gotas no nucleadas, por difusión del monómero a las partículas en crecimiento), se visualizaría como $N_p/N_d \ll 1$.¹⁶

1.5. GENERALIDADES SOBRE APLICACIONES. RECUBRIMIENTOS

A lo largo de la Tesis, se propone como principal aplicación para los materiales sintetizados, su uso como recubrimientos. Por tal motivo, en esta sección se introducirá generalidades de este tipo de aplicación.

Muchas veces la palabra recubrimiento es erróneamente utilizada como sinónimo de pintura; sin embargo, los recubrimientos tienen como propósito la protección del material que se recubre, con propiedades que pueden variar según el tipo y la aplicación específica del recubrimiento. En este sentido, las características de un recubrimiento variarán dependiendo de si será empleado con fines estéticos y decorativos, como recubrimientos anticorrosivos, o como un recubrimiento para proteger alimentos o fármacos, entre otras aplicaciones. Debido a que en esta Tesis se hace hincapié en aplicaciones para recubrimientos del tipo decorativo (Capítulos 4 y 5) y entérico (Capítulo 6), a continuación se describirán los conceptos y características principales de los mismos.

1.5.1. Recubrimiento del tipo estético o decorativo

Un recubrimiento de base acuosa (como los tratados en esta Tesis), desde un punto de vista fisicoquímico es considerado como un sistema disperso, constituido generalmente por sólidos finamente particulados (principalmente polímeros y otros aditivos) dispersos en un medio fluido (agua) denominado vehículo. La dispersión inicial de polímeros, se denomina “látex”, y el polímero empleado se caracteriza por ser una sustancia filmógena o aglutinante (de baja Tg), también llamada formadora de *film* (película). Además de ser estéticos, desde un punto de vista técnico-económico, los recubrimientos constituyen el método más adecuado para la protección de los materiales empleados en la construcción y en la industria.

Generalmente las formulaciones comerciales de este tipo de recubrimientos suelen ser complejas, y contienen entre 10 a 20 componentes, cuya naturaleza específica depende de la aplicación prevista. Una formulación podría incluir: sólidos dispersos como pigmentos y rellenos estabilizados por un agente dispersante polimérico, un polímero en emulsión disperso que actúa como aglutinante, un espesante para proporcionar una reología adecuada, coalescentes y cosolventes para promover la formación de películas

y optimizar el proceso de secado, tensioactivos para mejorar la estabilidad coloidal y promover la humectación del sustrato, un biocida para evitar el deterioro microbiano, un antiespumante para reducir la formación de espuma durante la fabricación y aplicación, y un agente neutralizante para ajustar el pH. Muchas formulaciones optimizadas contienen más de un componente de cada una de estas clases. Por lo tanto, el principal desafío técnico es desarrollar formulaciones de recubrimientos rentables, que permanezcan estables en estado húmedo, se apliquen correctamente al sustrato, formen films libres de defectos y cumplan con los requisitos de apariencia y rendimiento de la aplicación prevista.⁵

En este sentido, dentro de los requisitos de aplicación, los recubrimientos deben tener la capacidad de formar *film* a temperatura ambiente, poseer buenas propiedades mecánicas, resistencia al rayado, resistencia al agua, resistencia química (como por ejemplo a solventes orgánicos), resistencia a la abrasión (en seco y húmedo), resistencia al bloqueo, buena adhesión al sustrato, entre otras. A continuación, se describen las características aplicadas a los látex obtenidos en el marco de esta Tesis (el detalle de las técnicas se presenta en el Anexo al final de la Tesis).

Proceso de formación de film o película

El proceso de formación de película, es un punto importante en la tecnología de recubrimientos de base acuosa, y consiste en la coalescencia de las partículas individuales de látex (es decir de la compactación, deformación, cohesión e interdifusión de las cadenas poliméricas). El proceso de formación de *film* es comúnmente dividido en una serie de etapas (Figura 1.9): (I) Evaporación, concentración de las partículas y ordenamiento; (II) Deformación de las partículas; y (III) Coalescencia (difusión de las cadenas poliméricas a través del límite de las partículas).

Las partículas que conforman el látex, normalmente se encuentran estabilizadas por fuerzas electrostáticas y/o estéricas (otorgadas por grupos polares en la cadena polimérica o por el surfactante adsorbido sobre la partícula). Sin embargo, durante la evaporación de la fase acuosa, estas fuerzas, y otras que se oponen a la deformación de las partículas, pueden ser superadas. Esto se debe a que la pérdida de agua conduce a la concentración de las partículas poliméricas, forzando su acercamiento, hasta alcanzar la compactación de las partículas (disposición más o menos densamente empaquetada,

con los intersticios de agua). En este punto, las partículas se adhieren fuertemente entre sí debido a la creciente tensión superficial ocasionada por la disminución de las distancias entre ellas. Cuando las fuerzas que acompañan el secado exceden el módulo elástico de las partículas, éstas se deforman produciendo una película libre de huecos que todavía es débil mecánicamente. En la etapa final de formación de película, se produce la difusión del polímero a través del límite entre partículas, proporcionando el enredamiento entre cadenas que le confieren resistencia mecánica. Este proceso, generalmente es asistido por un agente coalescente (o solvente orgánico).¹⁶

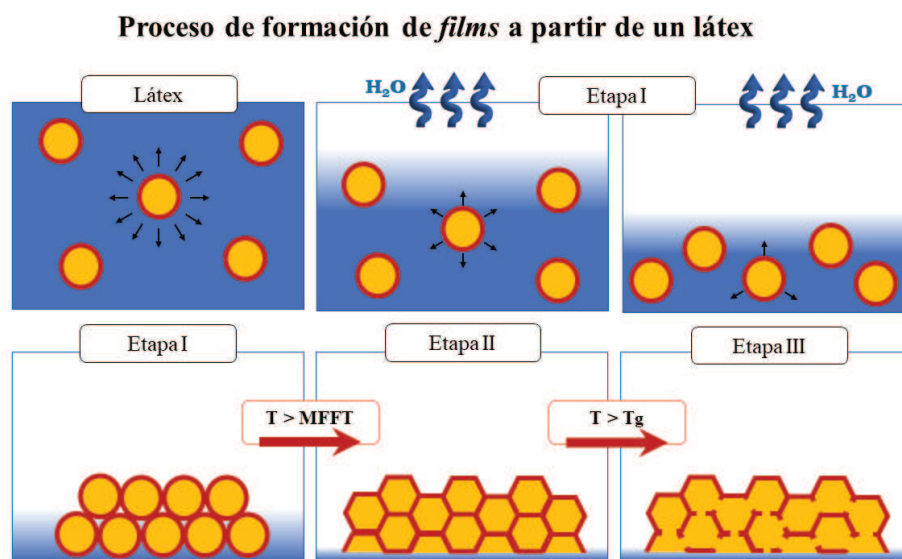


Figura 1.9. Etapas involucradas en el proceso de formación de película

Es importante aclarar que estas etapas no siempre están bien definidas y a menudo, algunas de sus características difieren según el sistema coloidal. Por ejemplo, todas las partículas de látex tienen grupos polares o iónicos en su superficie que proporcionan estabilidad coloidal. En algunos sistemas, esta capa polar tiene el espesor suficiente como para formar una membrana continua en la película recién formada. La rotura de esta membrana se convierte en un paso importante para lograr que los núcleos de partículas entren en contacto íntimo y pueda ocurrir la interdifusión.

Temperatura mínima de formación de film (MFFT)

La MFFT es una medida de la deformabilidad de las partículas durante la etapa de secado, y está directamente relacionada con la T_g del material polimérico, su módulo elástico (resistencia a la

deformación de las partículas), y en menor medida, con su viscosidad. La MFFT se determina mediante un método óptico⁹⁸, y se define como la temperatura a partir de la cual un látex forma una película homogénea y transparente (Sección A.5.3 del Anexo). La Figura 1.10 muestra claramente la MFFT, adoptada como la temperatura a la cual se observa la transición de turbio a transparente de una película formada a partir de un látex polimérico sobre una placa que tiene un perfil de temperatura. Como se puede observar en la ampliación de la imagen, por debajo de esta temperatura, la película adquiere un aspecto turbio, agrietado o polvoriento.

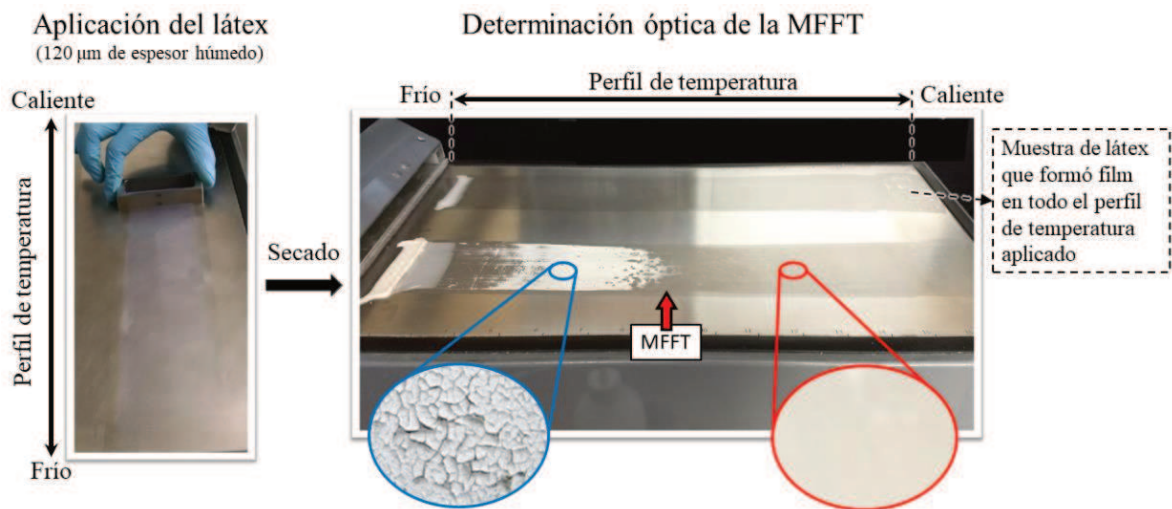


Figura 1.10. Proceso para la determinación de la MFFT, en látex poliméricos.

La importancia del conocimiento y manejo de la MFFT, radica en que la mayoría de los recubrimientos se aplican en condiciones de temperatura ambiente (entre 10 y 40 °C), por lo que la MFFT debe estar en este rango. Para asegurar una buena formación de película a bajas temperaturas, los valores de temperatura de transición vítrea del polímero (T_g) deberían estar en el rango próximo a esa temperatura, sacrificando las propiedades y el rendimiento final del material (que requieren de una alta T_g). Como una alternativa a este problema, se emplean agentes coalescentes, que permiten reducir temporalmente la T_g y la MFFT. Los disolventes oxigenados de polaridad moderada como los éter-ésteres de propileno, etilenglicoles, y éster-alcoholes suelen ser empleados como coalescentes. Después de que se aplica el látex, durante la formación del *film*, el agente coalescente se difunde lentamente hacia la superficie y se evapora, permitiendo que la T_g efectiva se eleve, incrementando la dureza y resistencia

final del recubrimiento. El coalescente debe ser compatible con la fase polimérica y de un peso molecular relativamente bajo para poder difundir a través de la matriz polimérica.

Propiedades mecánicas

El comportamiento mecánico de un recubrimiento describe la respuesta del material al estrés y tensiones a las cuales es sometido durante su aplicación. Además, una vez aplicado, debe acompañar los movimientos de contracción y expansión del sustrato recubierto. La falta de resistencia a algún tipo de esfuerzo físico o mecánico, siempre debe considerarse como un parámetro de desempeño limitante, ya que dichas carencias conducen a la formación de grietas y subsiguiente fallo del recubrimiento. Los requisitos de desempeño físico y mecánico de los recubrimientos pueden variar enormemente con las diferentes aplicaciones de uso final del sustrato recubierto. En general, la naturaleza del polímero le confiere elasticidad; a pesar de no ser necesario, se suelen incorporar plastificantes para presentar un satisfactorio módulo de Young (relación entre la tensión y la deformación específica) sin disminuir excesivamente la dureza.

Tradicionalmente, para determinar el desempeño mecánico de un recubrimiento se realizan ensayos de tensión-deformación y mediciones de dureza. El equipo y las condiciones para las determinaciones a través de estos métodos de ensayo se encuentra descrito en la sección A.5.6 del Anexo de esta Tesis.

- *Ensayo tensión-deformación*

Este ensayo mide la resistencia a la deformación y rotura, de un material al aplicarle una deformación de elongación a una velocidad de deformación constante, registrándose la fuerza uniaxial (F). Para un material dado, los resultados de un solo ensayo son aplicables a todo tamaño y formas de muestras, si se convierte la fuerza en esfuerzo ingenieril (Ecuación 1.4) y la extensión en deformación relativa (Ecuación 1.5).

$$\text{Esfuerzo ingenieril } (\sigma_r) = \frac{F}{A_0} \quad [1.4]$$

$$\text{Deformación relativa } (\varepsilon) = \frac{L - L_0}{L_0} \quad [1.5]$$

donde A_0 es el área original de la sección transversal de la muestra antes de iniciar el ensayo, L_0 la longitud inicial del espécimen y L la longitud del espécimen después de iniciar el estiramiento.

A través del control de parámetros como la morfología de las partículas y de los films, la temperatura de transición vítrea de los polímeros, el grado de cristalinidad, entre otros, es posible obtener materiales poliméricos (y por lo tanto recubrimientos) que exhiban una amplia gama de comportamientos de tensión-deformación (Figura 1.11), para ajustarse a las exigencias requeridas para cada aplicación. De esta manera, es posible obtener: (A) un material duro y quebradizo que soporte grandes esfuerzos de deformación, pero a muy bajas deformaciones; (B) un material dúctil y tenaz, con un comportamiento intermedio; y (C) un polímero blando y elastomérico que soporte grandes deformaciones a bajos esfuerzos.

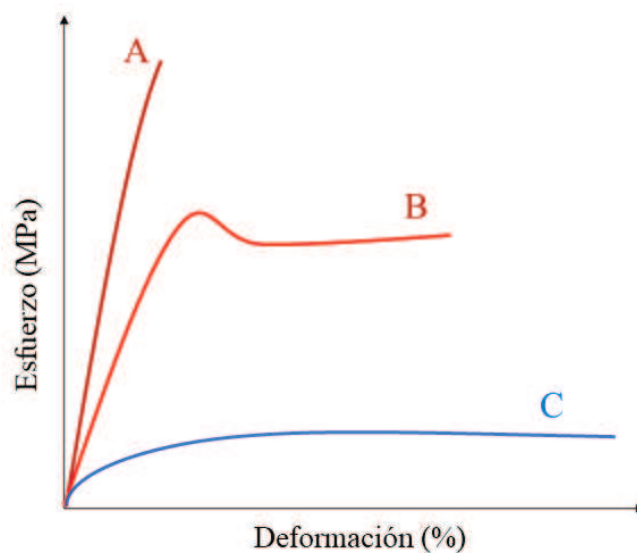


Figura 1.11. Curvas de esfuerzo-deformación para materiales poliméricos duros y quebradizos (A), dúctiles y tenaces (B), y blandos y elastoméricos (C).

A partir de estas curvas, es posible obtener propiedades mecánicas de importancia en tecnología de recubrimientos, como:

- Módulo de elasticidad: En general, los materiales muestran una relación lineal entre el esfuerzo y la deformación en la zona elástica lineal (primera parte del ensayo y a baja deformación), la cual se describe mediante la ley de Hooke. En esta zona el material se deforma elásticamente, recuperando su longitud inicial al eliminar la carga a la que está sometido.

- Punto de cedencia: Es el esfuerzo (tensión), a partir del cual el material comienza a deformarse irreversiblemente (deformación plástica), es decir, al retirar la carga una fracción de la deformación será permanente.
- Resistencia tensil: Es la máxima tensión alcanzada en la curva esfuerzo-deformación, de acuerdo a ella podemos definir a un material cómo fuerte o débil.
- Elongación a la rotura: Es la máxima elongación alcanzada por el material antes de la falla o rotura de la probeta. Es una medida de la ductilidad del recubrimiento.
- Tenacidad: Es la energía total asociada a la falla del material y se estima como el área bajo la curva de tracción-deformación. Una forma de entender la tenacidad cualitativamente, es considerando que las grietas internas de los materiales se propagan más rápidamente mientras menor sea la tenacidad del material. Por ejemplo, un material blando se deformará con facilidad; sin embargo, la porción del material que rodea la grieta también se deformará consumiendo energía, retardando así la propagación de la grieta y aumentando su tenacidad. Por el contrario, en un material duro y poco tenaz, la deformación del material que rodea a las grietas no se produce, por lo que las grietas disponen de mucha más energía para propagarse. No obstante, esto no implica que exista una relación inversa entre dureza y tenacidad, ya que la propagación de grietas depende de otros factores, como el tipo de proceso de deformación o las dimensiones de la grieta inicial.

- *Ensayos de Dureza*

La dureza de un recubrimiento puede definirse como su resistencia al rayado o a la penetración. Una de las técnicas históricamente utilizadas para determinar la dureza en recubrimientos es a través de un durómetro de lápiz. En este caso, la dureza es expresada como el “grado de dureza del lápiz” que causa un profundo arañazo sobre la superficie del recubrimiento. Si bien esta es un prueba rápida, fácil y muy utilizada, puede ser algo subjetiva y depender del operador.

Estos problemas pueden superarse mediante el uso de la técnica clásica de medición de la tensión requerida para la penetración de la muestra, con un indentador (en nuestro caso, de punta plana), a una velocidad dada y hasta una profundidad conocida.

Resistencia al bloqueo

La resistencia al bloqueo es una medición de la capacidad que presenta un recubrimiento para evitar la adherencia entre dos superficies distintas en las que fue aplicado y son puestas en contacto. Este es uno de los requisitos clave para el adecuado desempeño de films decorativos, ya que con frecuencia en este tipo de aplicaciones las superficies recubiertas pueden entrar en contacto (por ejemplo, durante el cierre de puertas y ventanas) y la adherencia o bloqueo es una propiedad indeseable. Un recubrimiento con buena resistencia al bloqueo conserva la integridad de la película luego de cesar el contacto entre las superficies, mientras que un desempeño pobre causa que las dos superficies en contacto se adhieran, provocando la rotura o desprendimiento de sus capas. El comportamiento de bloqueo de un recubrimiento depende de su dureza, la presión, la temperatura, la humedad y la duración del contacto entre las superficies. El método de ensayo más utilizado para determinar la resistencia al bloqueo de recubrimientos es el establecido por la norma ASTM D 4946-89, que se encuentra descrito en la sección A.5.10 del Anexo de esta Tesis.

Resistencia química

Algunas de las aplicaciones más exigentes desde el punto de vista tecnológico para recubrimientos, es la protección de estructuras contra el ataque químico. En general, podemos separar la función de resistencia química de un recubrimiento en dos grandes categorías: I) cuando la resistencia química no es la principal función del recubrimiento; sin embargo el sustrato recubierto puede estar expuesto ocasionalmente a alguna forma de estrés químico, como por ejemplo, los recubrimientos para automóviles; en ellos además de ser estético, tienen que hacer frente a soluciones jabonosas, a los hidrocarburos y a fluidos hidráulicos (como combustibles y lubricantes); II) cuando la resistencia química es la función primaria del recubrimiento, como por ejemplo la protección contra la corrosión.

En cualquiera de los casos, la exposición a un ambiente químico no debe causar la pérdida de adhesión al sustrato o la disolución del recubrimiento, ni volverlo mecánicamente débil permitiendo la absorción de fluidos.

Resistencia al agua

De igual forma que la resistencia química, la resistencia al agua puede ser considerada la función principal o no de los recubrimientos, dependiendo de la aplicación específica del sustrato y de la frecuencia con la que puede estar expuesto al agua o a condiciones húmedas. Por ejemplo, el recubrimiento aplicado en el casco de un barco o en materiales expuestos a la intemperie (como las pinturas de exterior en hogar y obra), deberán tener una resistencia al agua superior que los materiales que tengan menor contacto, como una pintura de pared de interior.

Esta propiedad está relacionada con la cantidad de agua que resulta absorbida por la película (en condiciones de equilibrio), en los espacios intermoleculares del polímero, poros, discontinuidades, etc. La absorción de agua puede producir el hinchamiento del recubrimiento, produciendo un debilitamiento del mismo, manifestado a través de la pérdida de adhesión (ampollamiento, escamación, delaminación, etc.) o del ablandamiento (disminución de la dureza, resistencia a la abrasión, excesiva flexibilidad, etc.). El grado de hinchamiento de un polímero reticulado depende de un número de factores, de los cuales los dos más importantes son la densidad de reticulación y el nivel de interacción termodinámico entre el polímero y el disolvente.

En algunos recubrimientos, durante el proceso de hinchamiento en agua, puede ocurrir un efecto conocido como “*overshooting*”, donde el material absorbe agua hasta alcanzar un máximo de absorción y a partir del cual luego disminuye hasta alcanzar el equilibrio. Este comportamiento se debe a que durante el hinchamiento, las cadenas que conforman la estructura del material asumen una conformación elongada. Esta dilatación va acompañada de la aparición de fuerzas retractoras, en oposición al hinchamiento, inducidas por la presión que las cadenas poliméricas ejercen sobre el fluido contenido entre su estructura. Esta dinámica, se ve afectada por diversos factores como las fuerzas intra e intermoleculares, las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, y el grado de entrecruzamiento de la matriz. Finalmente, el material alcanza un equilibrio cuando se llega a un balance de estas fuerzas.⁹⁹

Debido a que el carácter hidrofílico de la caseína afecta fuertemente la resistencia al agua de los materiales híbridos basados en esta proteína, a lo largo de la Tesis se hará principal hincapié en esta propiedad (la técnica de caracterización se detalla en la sección A.5.4 del Anexo)

1.5.2. Recubrimientos entéricos

El tracto gastrointestinal de los seres humanos (boca, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso) posee diferentes fluidos con un amplio rango de pH (desde 1.2 a 8.5), que junto con las enzimas digestivas se encargan del procesamiento de los alimentos, facilitando la incorporación de nutrientes al resto del organismo (Figura 1.12).^{100,101} Esto plantea un problema para la administración de medicamentos por vía oral, debido a la existencia de múltiples sustancias farmacológicas que son lábiles al ácido gástrico (como por ejemplo, la eritromicina, pancreatina, omeprazol, proteínas en general, etc.). En este sentido, el recubrimiento entérico, también conocido como recubrimiento gastrorresistente, surge como una solución a este inconveniente, basado en la respuesta del polímero (que conforma el recubrimiento) a los cambios de pH del medio en el que se encuentra.

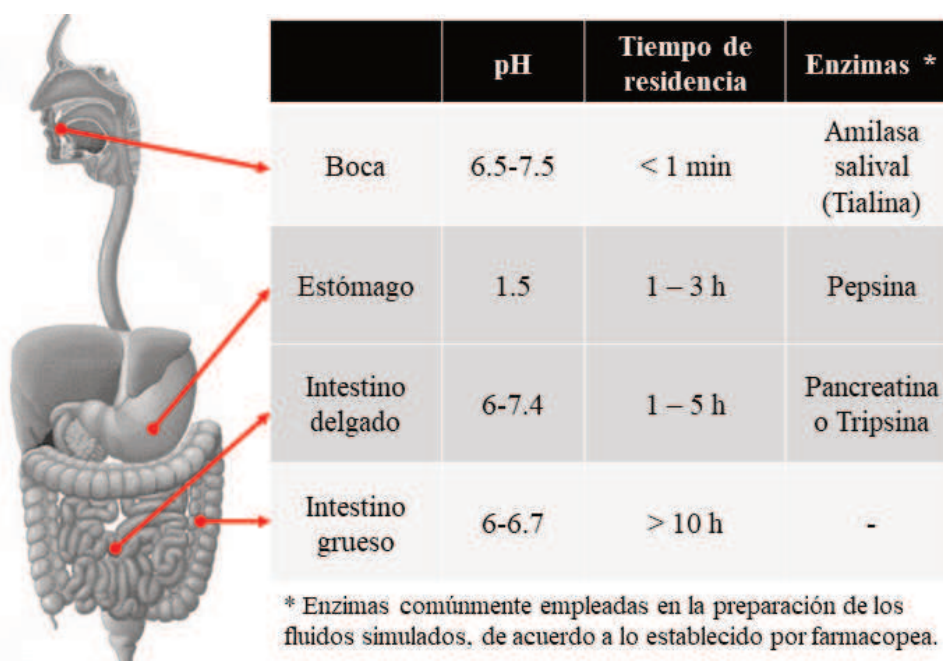


Figura 1.12. Resumen de las partes que conforman el tracto gastrointestinal, con las correspondientes condiciones (pH, enzimas y tiempo de permanencia) que debe atravesar un fármaco.¹⁰¹⁻¹⁰³

Este tipo de recubrimiento se emplea no solo para proteger el fármaco, sino también, para prevenir malestar/ulceración gástrica o náuseas debido a la irritación causada por ciertos medicamentos, como la aspirina o ciertos compuestos antiinflamatorios no esteroideos, y para retrasar la administración del

medicamento, permitiendo una acción local en alguna zona determinada del intestino delgado, mejorando la biodisponibilidad del principio activo, y proporcionando la dosis apropiada.

En este contexto, los recubrimientos entéricos modernos se formulan a partir de polímeros, generalmente poliácidos, que contienen grupos funcionales ionizables (-COOH), los cuales se ionizan en un medio neutro o ligeramente alcalino (similar a la condición del intestino delgado), permitiendo la solubilización del polímero y la liberación del fármaco. Por el contrario, en condiciones ácidas (como el ambiente del estómago) estos polímeros permanecen no ionizados, volviéndose insolubles y protegiendo el fármaco.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ En la Tabla 1.5 se resumen los principales polímeros empleados actualmente como recubrimientos entéricos, donde se muestra el pH en el cual actúan, su presentación, y otras características.

De igual forma que los recubrimientos empleados para decoración (tratados en la sección anterior), los polímeros empleados para un recubrimiento gastrorresistente deben ser capaces de formar películas entéricas uniformes, lisas, resistentes, y con buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 1.5, la mayor parte de estos polímeros requieren la adición de agentes plastificantes, para lograr la correcta formación de película, reducir la Tg e incrementar la flexibilidad del polímero. Los plastificantes más empleados son el ftalato de dietilo, el triacetato de glicerilo, el monocaprilato de glicerilo, el citrato de trietilo, el triacetato de glicerilo, el trietilcitrato de acetilo, y el PEG 400, entre otros.^{104,107}

Sin embargo, las características que destacan a estos materiales es que deben: i) presentar resistencia a los fluidos gástricos; ii) ser susceptibles o permeables a los fluidos intestinales; iii) poseer una alta compatibilidad con otros aditivos y con el fármaco que se está recubriendo; iv) no ser tóxico, ni poseer actividad farmacológica; y v) ser estable (en su estado sólido o en solución).¹⁰⁴

Tabla 1.5. Polímeros empleados para la síntesis de recubrimientos entéricos^{104,107}

Nombre		Rango de pH	Presentación	Observaciones
Ftalato de acetato de celulosa	CAP Aquacoat ECD	4.1-4.3	Polvo blanco Látex con 30% de sólidos	21-26% p/p de grupos acetilo y 30-36.0% p/p de grupos ftalilo (respecto al polímero seco). Es insoluble en agua, alcoholes, hidrocarburos e hidrocarburos clorados. Es soluble en cetonas, éteres, ésteres. Rápida disolución al pH alcalino. Requiere agente plastificante
Trimelitato de acetato de celulosa	CAT	4.7-5.0	Polvo blanco	29% de grupos trimelitilo y 22% de grupos acetilo. Soluble en agua. Requiere plastificantes
Ftalato de hidroxipropilmetil-celulosa	HPMCP	5.0-5.5	Polvo granular o escamas	Soluble en medios acuosos, acetona, tetrahidrofurano, mezclas de diclorometano y metanol. Insoluble en diclorometano, metanol, isopropanol. Polímero más flexible, por lo que requiriere menos plastificante como CAP o CAT.
Acetato succinato de hidroxipropil metil celulosa (HPMCAs)	Aqoat	5.0	Polvo o gránulos de color blanco a blanquecino	Insoluble en medios ácidos, pero soluble en pH neutro; es más estable químicamente que CAP y HPMCP; temperatura de transición vítrea que varía entre 120 ° C -135 ° C; requiere el uso de plastificantes
Ftalato de acetato de polivinilo (PVAP)	Sureteric	5.0 5.5 6.5	Polvo de color blanco a blanquecino	Estructuralmente similar a CAP, pero es relativamente más estable a la hidrolisis. Requiere plastificantes
Copolímeros de ácido metacrílico (Eudragit®)	L 30 D-55	5.5	Dispersión acuosa (30% sólidos)	Copolímeros aniónicos, catiónicos y neutros a base de ácido metacrílico y ésteres metacrílicos o acrílicos o sus derivados en proporciones variables. Estos copolímeros presentan un grado variable de perfiles de solubilidad dependientes del pH, de forma que se puede usar un tipo u otro dependiendo de las necesidades. Son polímeros no tóxicos, amorfos, con temperaturas de transición vítrea de entre 9 y >150°C. Son polímeros sintéticos por lo que son reproducibles, lo cual supone una ventaja frente a los derivados celulósicos, ya que en estos las propiedades fisicoquímicas pueden variar dependiendo de la fuente de materia prima. Incompatible con algunos fármacos (como, diflunisal, flurbiprofeno y piroxicam) que poseen grupos ácidos que interaccionan electrostáticamente con los grupos amonio del polímero.
	L 100 D-55	5.5	Polvo	
	L 100	6.0-7.0	Polvo	
	L 12.5	6.0-7.0	Solución orgánica (12.5 % sólidos)	
	S 100	7.0	Polvo	
	S 12.5	7.0	Solución orgánica (12.5 % sólidos)	
FS 30 D	7.0	Dispersión acuosa (30% sólidos)		

Metodologías empleadas para el recubrimiento

El recubrimiento de los comprimidos se puede realizar por 3 métodos básicos, como la aplicación de una película por evaporación de solvente (en paila grageadora o lecho fluidizado), el recubrimiento por compactación y el recubrimiento por termofusión. Además de estos, otros métodos de recubrimiento incluyen la microencapsulación, el recubrimiento electrostático y el recubrimiento de impresión 3D.¹⁰⁰ A continuación, se describe brevemente cada una de estas técnicas.

- **Recubrimiento por evaporación del solvente:** Se rocía una solución o dispersión de polímero sobre la superficie del comprimido, aplicando simultáneamente un flujo de aire caliente que ayuda a evaporar el disolvente. Los comprimidos se mantienen en constante movimiento para asegurar una distribución equitativa de la solución de recubrimiento sobre las tabletas y un secado uniforme (tanto en la paila grageadora, como en el lecho fluidizado), al mantener un equilibrio controlado entre la pulverización y la evaporización. Este proceso se mantiene hasta lograr el espesor deseado de recubrimiento.^{105,106} En el Capítulo 6 de esta Tesis, se investiga la síntesis de un látex para recubrimientos entéricos, que podría ser utilizado en el tratamiento de comprimidos, con las ventajas que tiene esta tecnología ampliamente utilizada a nivel industrial.

- **Recubrimiento de compactación:** Consiste en presionar el recubrimiento (coraza) alrededor de la tableta (núcleo). Primero se forma un núcleo blando aplicando una compresión inicial, luego se coloca el recubrimiento y se compacta el conjunto. Este es un método de recubrimiento útil en los casos en los que no es posible utilizar calor o disolventes.

- **Recubrimiento por termofusión:** Es una variante del proceso de recubrimiento con película, en el que los polímeros tradicionales se reemplazan por materiales de recubrimiento de bajo punto de fusión que se mantienen a temperaturas de aproximadamente 40 a 60 °C. Es una técnica que presenta grandes ventajas ya que no emplea solventes, el proceso es más rápido, la tecnología es más económica, y se reduce el riesgo de que el fármaco se disuelva durante el recubrimiento. Generalmente, esta técnica de recubrimiento utiliza excipientes a base de lípidos

como ésteres de ácidos grasos de cadena larga, resinas termoplásticas o productos sintéticos como polietilenglicol u óxido de polietileno

- **Microencapsulación:** Este método permite el recubrimiento de partículas con materiales poliméricos. La metodología más empleada consiste en inducir la coacervación de macromoléculas alrededor de los núcleos, mediante un estímulo como el cambio de temperatura o el cambio de disolvente. Esta técnica requiere la dispersión de las partículas (fármaco) que se desea recubrir, en un medio en el cual se pone en contacto con el recubrimiento. Generalmente, esta capa debe tratarse para que se vuelva rígida.
- **Recubrimiento electrostático:** La formación de la película se logra mediante la atracción de cargas opuestas entre las partículas formadoras de película y las partículas a recubrir. Esta técnica permite recubrir sin solvente, pero requiere sustratos conductores. Una vez depositado el recubrimiento, se cura por calor para producir la película.
- **Impresión 3D:** Es actualmente la tecnología más innovadora. Se emplea un dispositivo de extrusión para preparar filamentos de polímero cargados con uno o más fármacos (adecuados para la impresión 3D, por deposición fundida).¹⁰⁰

Caracterización de los comprimidos recubiertos

Dentro de las caracterizaciones, se pueden mencionar aquellas que se realizan sobre: i) los núcleos antes de ser recubiertos, como su forma, tamaño, porosidad, uniformidad del peso, dureza, friabilidad, estudios del contenido de fármacos, tiempo de desintegración, etc; ii) el polímero que se emplea como recubrimiento, como la capacidad de formar *film*, morfología de la película, coloración, ensayos termogravimétricos, resistencia mecánica, dureza, permeabilidad, resistencia a pH ácidos, tiempo de desintegración en medios alcalinos, etc; iii) el sistema final recubierto, como la estabilidad, liberación *in vitro* en medios ácidos y alcalinos simulando los fluidos gástricos e intestinales, respectivamente, con y sin la presencia de enzimas, y liberación *in vivo*. En el Capítulo 6 de esta Tesis, se apunta a una aplicación de los materiales desarrollados como

recubrimiento entérico, por lo que se hace hincapié en la caracterización del polímero, como la composición y la morfología de la película, la resistencia al medio ácido, alcalino y la sensibilidad al cambio de pH, a través de la medición del grado de hinchamiento en cada uno de estos medios (Sección A.5.4 del Anexo).

1.6. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

La producción de látex híbridos acrílico/caseína con capacidad de formación de películas, ha sido estudiado en detalle en el Grupo donde se ha desarrollado la presente Tesis. En este sentido, se ha avanzado en el entendimiento del proceso de polimerización en emulsión y del mecanismo de nucleación de las partículas híbridas producidas,³⁶ como así también en el control de la compatibilidad entre las fases acrílica y proteica, mediante la modificación química de la caseína,^{22,38} su efecto sobre las propiedades finales de las películas para su aplicación como recubrimiento decorativo,³⁸ la factibilidad para su implementación industrial,³⁹ e incluso su potencial aplicación como recubrimiento entérico.¹⁰⁸ Si bien este avance permitió establecer las bases para el empleo de la caseína para la producción de látex híbridos con una excelente capacidad de formación de película, las mejoras en la compatibilidad entre los compuestos (proteína y acrílico) no fue suficiente para garantizar la producción de un material polimérico con alto contenido de biomaterial y que presente la resistencia al agua requerida para las aplicaciones estudiadas. Es por ello, que en esta Tesis se propuso investigar la síntesis de látex híbridos basados en caseína, con la incorporación de una proteína hidrofóbica, como la zeína, para mejorar la susceptibilidad en agua de los materiales híbridos; y se avanzó en el empleo de monómeros bioderivados, para incrementar el contenido de biomaterial total. Además, se estudió la modificación de la zeína para incrementar su reactividad y favorecer su compatibilización con las fases de los materiales híbridos.

1.6.1. Objetivos generales

El principal aporte de esta Tesis radica en el desarrollo de un procedimiento amigable con el medio ambiente, para la síntesis de nuevos materiales poliméricos nanoestructurados, con la incorporación de una combinación de proteínas hidrofílicas (caseína) e hidrofóbicas (zeína) mediante polimerización en medio disperso, que tengan propiedades mecánicas, térmicas y de resistencia a solventes mejoradas, aplicables a recubrimientos parcialmente biodegradables, y que presenten altos contenidos de materiales derivados de fuentes naturales. Esta propuesta requirió del desarrollo de novedosas técnicas de síntesis, capaces de balancear sinérgicamente las propiedades de los compuestos naturales y del polímero acrílico; y para ello fue necesario realizar un estudio previo para la funcionalización de la zeína.

1.6.2. Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo general planteado se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar una estrategia que permita incorporar enlaces vinílicos en la estructura de la zeína, para obtener una proteína hidrofóbica capaz de polimerizar radicalariamente.
2. Evaluar el desempeño de la zeína funcionalizada obtenida, empleándola en la síntesis de un sistema híbrido sencillo y determinar su efecto en las propiedades finales de los materiales obtenidos.
3. Incorporar monómeros bioderivados en la síntesis de látex híbridos basados en caseína para incrementar su contenido de origen natural. Analizar el impacto de estos monómeros bioderivados sobre las propiedades de los recubrimientos resultantes.
4. Reducir la susceptibilidad al agua de los látex basados en caseína, incorporando una proteína hidrofóbica (zeína), empleando la polimerización en miniemulsión batch como técnica de síntesis. Estudiar el impacto de la hidrofobicidad de la zeína sobre las propiedades de los recubrimientos obtenidos.

5. Desarrollar una técnica de polimerización que permita incorporar una mayor proporción de zeína en los materiales híbridos, haciendo hincapié en su efecto sobre las características de los materiales híbridos resultantes.

CAPÍTULO 2: FUNCIONALIZACIÓN DE LA ZEÍNA^b

2.1. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo, múltiples proteínas tales como la caseína, zeína, gelatina y derivados del colágeno, gluten del trigo, proteína de soja y proteína del suero lácteo se han utilizado en diferentes sectores para aplicaciones tales como recubrimiento de alimentos, plásticos biodegradables, pinturas, adhesivos, aplicaciones biomédicas, bioelectrónica, ingeniería de tejidos, entre otros.^{44,109-111} Sin embargo, es sabido que su uso presenta algunas desventajas como la falta de uniformidad de la materia prima natural, la formación de *films* frágiles, con alta sensibilidad a la humedad, con pobre barrera al vapor de agua o a gases y baja resistencia al ataque microbiano, en comparación con los materiales convencionales derivados de polímeros sintéticos.¹¹² Con el objetivo de superar estos inconvenientes, se han utilizado diversos métodos físicos (calentamientos, cizallamiento, presión hidrostática, ultrasonido e irradiación gama y ultravioleta), químicos (alquilación, acilación, acetilación, succinilación) y bioquímicos (hidrólisis enzimática, reticulación por acción de transglutaminasas o peroxidasas), para modificar las proteínas.^{109,112}

Dentro de las modificaciones químicas de las proteínas, las utilizadas para la conjugación de proteínas son aquellas que implican una reacción con el aminoácido lisina, debido a la alta reactividad que presenta el grupo residual (ϵ -NH₂).^{2,22,40,113-115} Las proteínas de soja y de suero lácteo, junto con la caseína y la proteína del gluten de trigo, son materiales abundantes y de fácil obtención, todos ellos conjugados mediante reacciones de acilación o alquilación, aprovechando su alto contenido natural de residuos ϵ -NH₂ de aminoácidos lisina (Tabla 2.1). Por el contrario, como se puede observar en la Tabla 2.1, la zeína no posee lisina en su estructura por lo que su modificación química debe realizarse mediante otros grupos nucleofílicos, menos reactivos que

^b Los resultados presentados en este Capítulo fueron realizados en colaboración con el grupo de química orgánica aplicada de INTEC (CONICET-UNL) con los Doctores Victoria Vaillard y Santiago Vaillard. Gran parte de estos resultados fueron publicados en Allasia *et al. Polymer*, Volumen 235, 12427819 (2021).

los ϵ -NH₂, tales como los presentes en la cisteína, tirosina, ácido aspártico, e histidina, entre otros.^{2,43}

Aunque la modificación química de la zeína se ha informado anteriormente,^{11,113,116-119} en la mayoría de los casos, la química que involucra el proceso de conjugación se aborda de manera superficial, atribuyéndose a dichas modificaciones químicas los cambios obtenidos en las propiedades finales de los productos sintetizados. Además, debido al bajo contenido de grupos nucleofílicos presentes en la zeína, los grados de modificación alcanzados son notablemente inferiores a los obtenidos para otras proteínas.¹²⁰ En particular, la derivatización de la zeína con acrilatos o grupos relacionados, permitiría convertir a esta proteína en una molécula capaz de ser polimerizada por vía radicalaria, resultando de gran interés para su uso en otras aplicaciones como la síntesis de materiales fotocurados (películas o fibras), la preparación de nanopartículas híbridas (ya que permitiría mejorar la compatibilidad entre los diferentes componentes de las fases del nanocompuesto), y como macro-entrecruzante en la preparación de hidrogeles.

Tabla 2.1. Grupos laterales reactivos de diferentes proteínas.

Grupo reactivo	Amino ácidos	Proteína de Soja ¹²¹ (β -Conglicinina)	Caseína ¹²²	Proteína de suero ^{123,124} (β -Lactoglobulina)	Gluten de trigo ^{125,126} (γ -Gliadina)	Zeína ¹⁰⁹ (α -zeína)
Amino	Lys	58.85	23.89	18.70	11.44	0.00
	Arg					2.07
Carboxílicos	Glx	148.39	63.49	39.35	117.92	38.14
	Asp					
Imidazol	His	10.03	2.20	1.91	5.50	0.91
Indol	Trp	0.00	0.84	1.17	0.00	0.00
Fenólico	Tyr	6.51	10.10	3.66	8.58	5.63
Aromático	Trp	38.79	17.27	7.24	22.22	9.65
	His					
	Phe					
Sulfhidrilo	Cys	0.76	0.74	5.11	0.00	1.32
Tioéter	Met	1.27	6.03	3.93	3.96	2.68
Hidroxilo	Ser	54.92	36.88	18.03	30.14	21.01
	Thr					
	Tyr					

Las concentraciones de aminoácidos se adoptaron de diferentes referencias y los valores se recalcularon para expresarlos como mol de aminoácido/mol de proteína.

En el presente Capítulo se investiga la modificación química de la zeína empleando diferentes agentes modificantes, tales como ésteres de *N*-hidroxisuccinimida (NHS), cloruros derivados del ácido oleico y el ácido acrílico, y metacrilato de glicidilo, con el principal objetivo de obtener una proteína (zeína) capaz de ser polimerizada por vía radicalaria, que permita su correcta incorporación en la síntesis de nuevos materiales poliméricos compuestos con un alto grado de compatibilización molecular. La eficiencia de la modificación de la zeína se analizó principalmente por resonancia magnética nuclear (RMN) y por análisis elemental. Además, se realizaron pruebas de concepto de la capacidad de incorporación de la proteína mediante polimerización radicalaria. Para ello, se utilizó la zeína modificada en la preparación de *films* puros de zeína mediante fotocurado por UV.

2.2 TRABAJO EXPERIMENTAL

La descripción detallada de los materiales, la especificación de los equipos, y los métodos de síntesis y caracterización empleados a lo largo del trabajo experimental de esta Tesis, se presenta en el Anexo. Por esta razón, a continuación, se hará referencia sólo a los aspectos del trabajo experimental que se aplican específicamente a este Capítulo.

Para la síntesis de los agentes modificadores (miristato de NHS, cloruro de oleoilo y cloruro de acrililo) se adoptaron condiciones bien conocidas y estudiadas, que escapan del objetivo final de esta Tesis, por lo que dichas metodologías de obtención no se incluyen en este Capítulo, y sólo se mostrará un esquema de la reacción de síntesis para cada agente modificante.

2.2.1 Modificación química de la zeína con miristato de NHS (m-NHS)

Los ésteres de *N*-hidroxisuccinimida son reactivos ampliamente utilizados en diversas áreas de la química, como la síntesis de péptidos, bioconjugados, materiales funcionalizados y polímeros. La estrategia habitual empleada para preparar los diferentes ésteres activos, se basan en la reacción de acoplamiento de NHS con aminas primarias, ácidos carboxílicos, alcoholes o aldehídos, en presencia de un agente de acoplamiento.^{2,112,127} El ácido mirístico es un ácido graso monocarboxílico saturado de cadena lineal (C₁₄H₂₈O₂). Se encuentra ampliamente distribuido en

grasas y aceites de origen vegetal y animal, tales como el aceite de palma, aceite de coco, aceite de nuez moscada, entre otros. Si bien este ácido no presenta insaturaciones, se utilizó para comprender la reacción entre NHS y la proteína como alternativa de modificación de la zeína. La Figura 2.1 esquematiza el método completo de modificación basado en la *N*-hidroxisuccinimida con ácido mirístico.

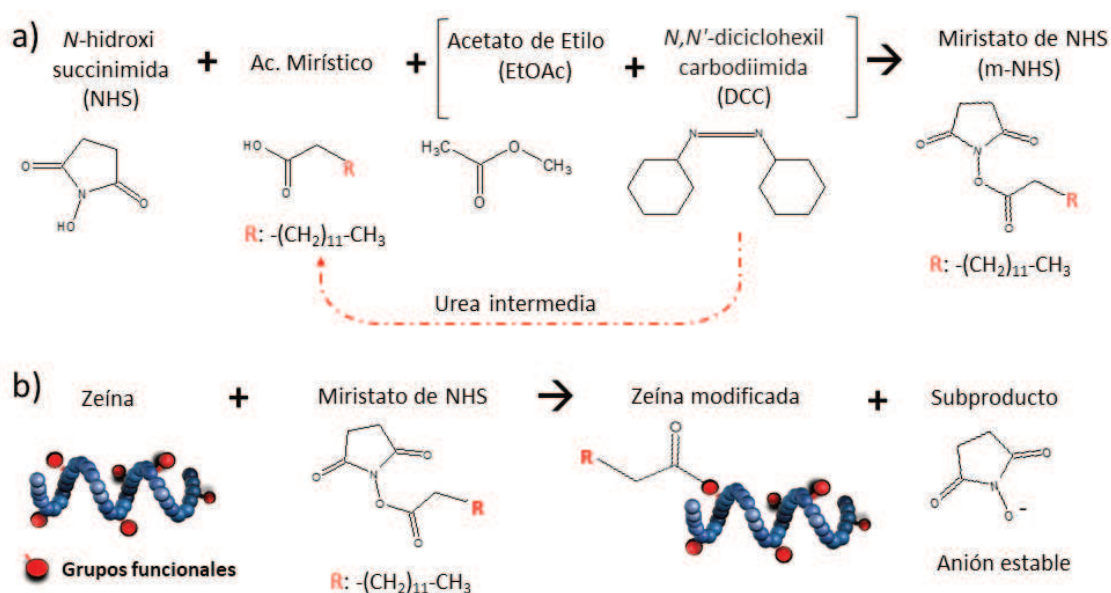


Figura 2.1. Esquema de síntesis del miristato de NHS (a) y la posterior modificación de la zeína (b).

Las reacciones de modificación con miristato de NHS se llevaron a cabo durante 12 h, en tubos Schlenk con agitación magnética constante y temperatura controlada mediante un baño de aceite a 60 °C cuando se usó una solución alcohólica (90%v/v), o a temperatura ambiente con dimetilformamida (DMF) como solvente. Se emplearon diferentes relaciones molares zeína:agente modificante (1:5; 1:10 y 1:20), manteniendo la misma concentración de zeína respecto al solvente (140 mg/ml), e incorporando trietilamina (Et_3N) como base (relación molar m-NHS: Et_3N 1:2). Por último, la purificación de la zeína modificada se llevó a cabo mediante múltiples lavados con acetona, para eliminar el miristato de NHS no reaccionado, la Et_3N y el subproducto de la reacción.

2.2.2 Modificación química de la zeína con cloruros

En general los cloruros resultan prometedores para la modificación de la zeína debido a que ya se ha reportado el uso de cloruros de ácidos grasos para la modificación de proteínas.¹¹² Es conocido que los cloruros pueden reaccionar por acilación o esterificación con diferentes grupos, como las aminas (primarias, secundarias y terciarias), amidas, alcoholes, aldehídos y cetonas.¹²⁸ En esta Tesis se exploró la utilización de cloruros de ácido oleico (CIO) y de ácido acrílico (CIA).

El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado insoluble en agua, que se encuentra en la mayoría de las grasas y aceites naturales, tales como los aceites de soja, cártamo, oliva, palta, semilla de uvas y girasol, entre otros. El origen natural de este ácido, le otorga al cloruro de oleoilo una ventaja como agente modificador para la zeína, ya que permitiría incrementar, en el material final, el contenido proveniente de fuentes naturales. Además, la instauración que contiene el ácido oleico permitiría su compatibilización en un sistema híbrido con un polímero sintético en la etapa de polimerización por radicales libres.

Por otro lado, el ácido acrílico es conocido como el ácido carboxílico insaturado más simple, con un enlace vinílico y un grupo carboxilo unido a su C3. Se caracteriza por ser un líquido corrosivo e incoloro, soluble en agua, alcoholes, éteres y cloroformo. A diferencia del ácido oleico, el ácido acrílico no proviene de una fuente natural, sino que se produce a partir del propileno, y cuenta con un doble enlace terminal el cual presenta una mayor reactividad que el doble enlace interno del ácido oleico.

Las reacciones de modificación con cloruros de ácido, se llevaron a cabo en tubos Schlenk con agitación magnética constante, durante 12 h a temperatura ambiente. En ambos casos se emplearon diferentes relaciones molares zeína:CIO (1:5, 1:10, 1:20 y 1:150) y zeína:CIA (1:50, 1:100 y 1:150), manteniendo la misma concentración de zeína respecto al solvente empleado (DMF, 140 mg/ml). Se incorporó Et₃N como base (relación molar cloruro de ácido:Et₃N igual a 1:2). En la Figura 2.2 se esquematiza en forma general la síntesis de los cloruros de ácido (2.a) y su aplicación en la modificación de la zeína (2.b).

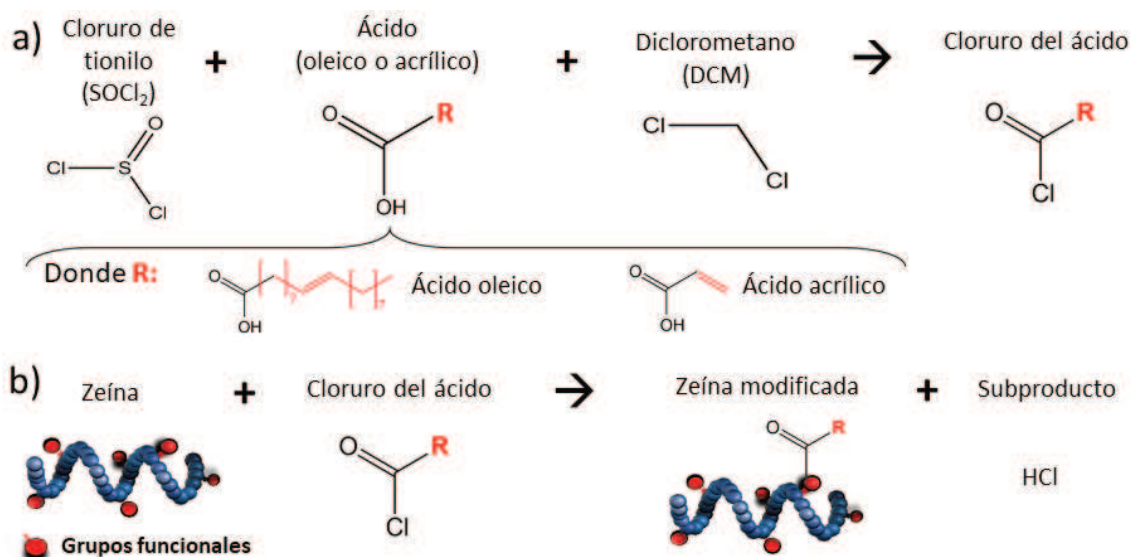


Figura 2.2. Esquema de síntesis del cloruro de oleoilo y/o acríloilo (a) y la reacción de modificación de la zeína (b).

En estos casos, a diferencia de la zeína modificada con miristato de NHS, el proceso de purificación requiere del uso de diferentes soluciones para neutralizar y eliminar el exceso de Et₃N (solución ácida), y para neutralizar y eliminar los restos de ácido acrílico u oleico no reaccionados (solución alcalina). A continuación, se detalla el proceso de purificación:

- Precipitación de la zeína funcionalizada en una solución de HCl (0.1 M), para neutralizar y eliminar el Et₃N. La zeína modificada se recupera mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. Esta etapa se realiza por duplicado
- Solubilización de la zeína recuperada en el paso anterior en etanol/agua (90 %v/v)
- Precipitación de la zeína modificada en una solución de NaHCO₃ (0.05 M), para neutralizar y eliminar los restos de ácido acrílicos que no reaccionaron. La zeína modificada se recupera mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min.
- Por último, se lava con agua para eliminar el bicarbonato de la etapa anterior.

2.2.3 Modificación química de la zeína con metacrilato de glicidilo (GMA)

En este caso, a diferencia de los anteriores, se empleó GMA comercial (Sigma). El GMA es un monómero sintético de particular interés debido a su doble funcionalidad (grupos vinílico y

epóxido). Se caracteriza por ser un líquido incoloro, soluble en agua, etanol, acetona, entre otros.^{2,129}

La modificación de la zeína se llevó a cabo en un reactor de vidrio encamisado de 100 ml equipado con un baño térmico para el control de la temperatura, una termorresistencia Pt100 para el monitoreo de la temperatura y agitación magnética constante. La reacción se realizó a 60 °C durante 5 hr empleando dos solventes diferentes: i) DMSO; y ii) un conjunto de soluciones alcohólicas con diferentes contenidos de etanol (70, 75, 80, 85 y 90 %v/v). En ambos casos, la concentración de zeína fue 10 % p/v, con un 25 % de GMA respecto a la zeína. A la mezcla de reacción se le adicionó unas gotas de *N*-isopropilhidroxilamina (IPHA) como inhibidor de radicales libres, para evitar la polimerización del GMA. En la Figura 2.3 se esquematizan las posibles vías de reacción entre el GMA y la zeína. La zeína modificada fue purificada mediante múltiples etapas de precipitación-redispersión en agua, para eliminar el agente inhibidor y el exceso de GMA no reaccionado. Para esto, se vertió lentamente la mezcla de reacción en agua ultrapura, promoviendo la precipitación de la proteína. La zeína modificada se recuperó por centrifugación (4000 rpm durante 15 min), y se redispersó nuevamente en una solución fresca de etanol/agua. Este procedimiento de purificación se repitió 3 veces.

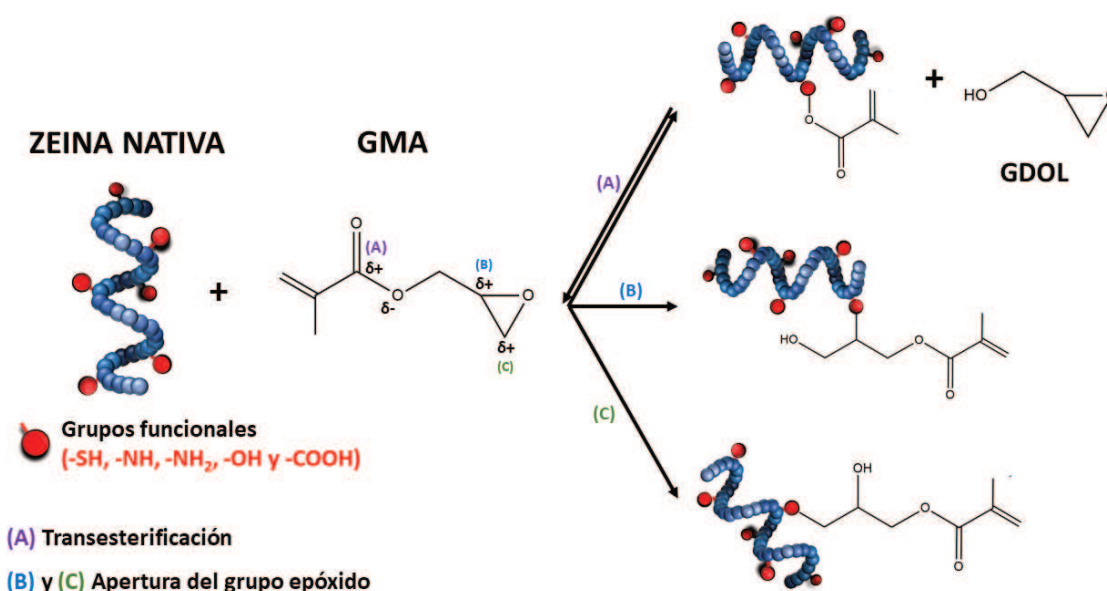


Figura 2.3. Esquema de las posibles vías de modificación de la zeína con GMA.

Las posibles vías de reacción química seguidas por el GMA han sido ampliamente estudiadas, por lo que se conoce que ocurren a través de dos mecanismos posibles: I) mediante la apertura del anillo epóxido, dando dos productos según el sitio de apertura del anillo (reacción B y C); y II) mediante la reacción de transesterificación, donde la molécula del GMA se divide y forma glicidol (GDOL) como subproducto (reacción A). Aunque la reacción mediante la apertura del epóxido se produce principalmente con el grupo NH_2 , también pueden participar en esta reacción otros grupos nucleofílicos, como imidazol, sulfhidrilo, carboxilo o incluso grupos hidroxilo.¹³⁰ Es importante aclarar que, si bien las 3 reacciones suelen coexistir, la preferencia entre la apertura del anillo y la transesterificación dependen del pH del medio y del solvente utilizado.

2.2.4 Caracterización de la zeína modificada

La determinación de la modificación de la zeína se estudió mediante RMN, comparando los espectros $^1\text{H-RMN}$ de la zeína modificada, con el de la zeína nativa y los respectivos agentes modificadores. La zeína modificada con GMA se caracterizó además mediante análisis elemental de carbono (C) y nitrógeno (N), el cual permitió calcular de forma más precisa el contenido de enlaces vinílicos adheridos a la molécula de zeína (los detalles de las técnicas están explicados en las secciones A.3.1 y A.3.4 del Anexo, respectivamente)

2.2.5 Prueba de concepto de la capacidad de polimerización de la zeína metacrilada

Como una primera prueba de la efectividad de la modificación y la capacidad de la zeína funcionalizada para polimerizar a través de los enlaces vinílicos adicionados, se llevó a cabo la formación de *films* fotocurables a partir de la zeína funcionalizada con cloruro de oleilo (ZF-ClO) y con GMA (ZF-GMA), empleando 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure2959) como fotoiniciador (Figura 2.4a). El Irgacure2959 es un compuesto soluble en etanol, agua y ácido acético, resistente a la temperatura, que posee baja volatilidad, poco olor y que absorbe a una longitud de onda entre 200-360 nm.

Para la obtención de los *films*, se preparó una solución de zeína en ácido acético (0.12 g/ml) y se adicionó 3% del fotoiniciador respecto a la masa de proteína. Luego se secó 1 ml de la solución

sobre una placa de teflón, en estufa con vacío a 50°C. Los *films* se cortaron en forma de discos de 20 mm de diámetro, y se procedió a su curado en un fotorreactor (Figura 2.4b) durante 30 min, 60 min y 3 hr. De igual manera, se preparó como referencia un *film* a partir de una solución de zeína pura sin modificar. Una vez obtenidos los *films* curados, estos fueron sumergidos en una solución de etanol/agua (90% v/v) para determinar su fracción insoluble (IF) por gravimetría (el proceso esta detallado en la sección A.5.5 del Anexo).

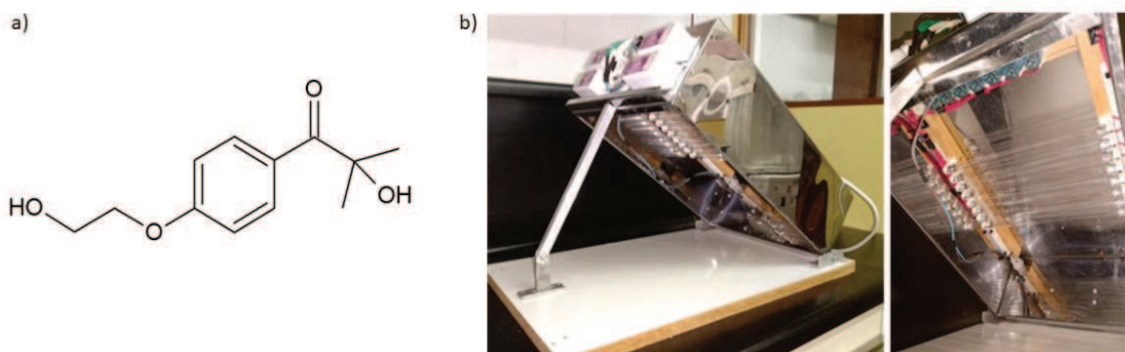


Figura 2.4. Fotoiniciador 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959 ®) utilizado para la preparación de films de zeína (a); Fotorreactor formado por 8 lámparas germicidas UV de 8W cada una (254 nm).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las diferentes estrategias de modificación de la zeína explorados.

2.3.1 Modificación química de la zeína con miristato de NHS (m-NHS)

Si bien el ácido mirístico no aportaría funcionalidad a la proteína debido a que no posee enlaces vinílicos, se esperaba con estos experimentos aportaran luz al sistema de reacción de modificación de la zeína.

En la Figura 2.5 se muestra el espectro 1H -RMN para el m-NHS, la zeína nativa (ZN), y la zeína modificada (ZM) obtenida a partir de la relación molar ZN:m-NHS más alta (1:20) llevadas a cabo en etanol-agua (ZM-EA) y en DMF (ZM-D). Como se puede observar en la Figura 2.5.b, el m-NHS posee una señal característica a los 2.65 ppm correspondiente a los protones del C₂ de

la cadena del ácido mirístico, mientras que la ZN en dicho corrimiento químico no presenta ninguna señal. En los espectros 1H -RMN de las proteínas modificadas (ZM-EA y ZM-D) se puede observar la aparición de nuevas señales entre 2.52-2.60 ppm, que podrían atribuirse a la unión de la cadena del ácido mirístico a la cadena proteica. Si bien estas señales difieren según el medio utilizado para la reacción, podría estar relacionado a los cambios de la estructura que presenta la zeína en los diferentes solventes.

Por otro lado, se puede observar que ZM-EA fue correctamente purificada, ya que en su espectro 1H -RMN no se observan señales de residuos de m-NHS (a 2.65 y 2.80 ppm), mientras que ZM-D permanece contaminada con el agente modificador y requiere más etapas de lavado para su completa purificación. Contrario a lo esperado, en ambos casos, durante la etapa de purificación la acetona utilizada en el lavado de la zeína modificada se tornaba de un color amarillo intenso (Figura 2.6.a), que es característico de la proteína. Debido a esto, se analizaron los sólidos recuperados del tercer lavado tanto para la ZM-EA (Figura 2.6.b-c), como para la ZM-D (Figura 2.6.d-e).

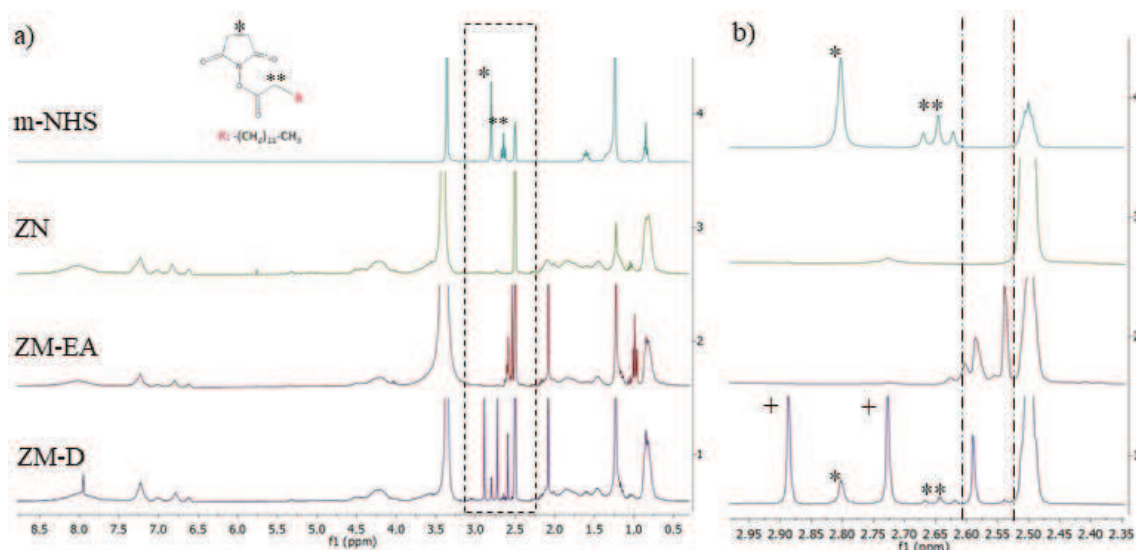


Figura 2.5. Espectro 1H -RMN completo (a) y una ampliación (b) del m-NHS, zeína nativa y modificada de la reacción llevada a cabo en etanol-agua y en DMF. Referencias: + señales de DMF, * señal de protones pertenecientes al anillo, ** señal de protones perteneciente al 2do carbono del ácido mirístico.

Los espectros 1H -RMN de los sobrenadantes de ZM-EA y ZM-D no presentan señales típicas correspondientes a la zeína; sin embargo, en ambos espectros 1H -RMN aparece la señal entre los valores 2.52-2.60 ppm, anteriormente atribuido a la modificación de la proteína, poniendo en duda la efectividad de la modificación. En una etapa posterior se estudió dicho sobrenadante, comparando las señales con los espectros 1H -RMN simulados correspondientes al de los carotenos presentes en la zeína (β -caroteno, luteína y zeaxantina)¹³¹ que son los responsables de su coloración tan característica. Como se puede apreciar en la Figura 2.7, en los espectros 1H -RMN de los sobrenadantes no se observan señales claras de los carotenoides β -caroteno, Luteína, Zeaxantina simulados, descartando la presencia de los mismos en el líquido residual del lavado, y concluyendo que dicha coloración podría deberse a algún subproducto no identificado obtenido durante la reacción de modificación.

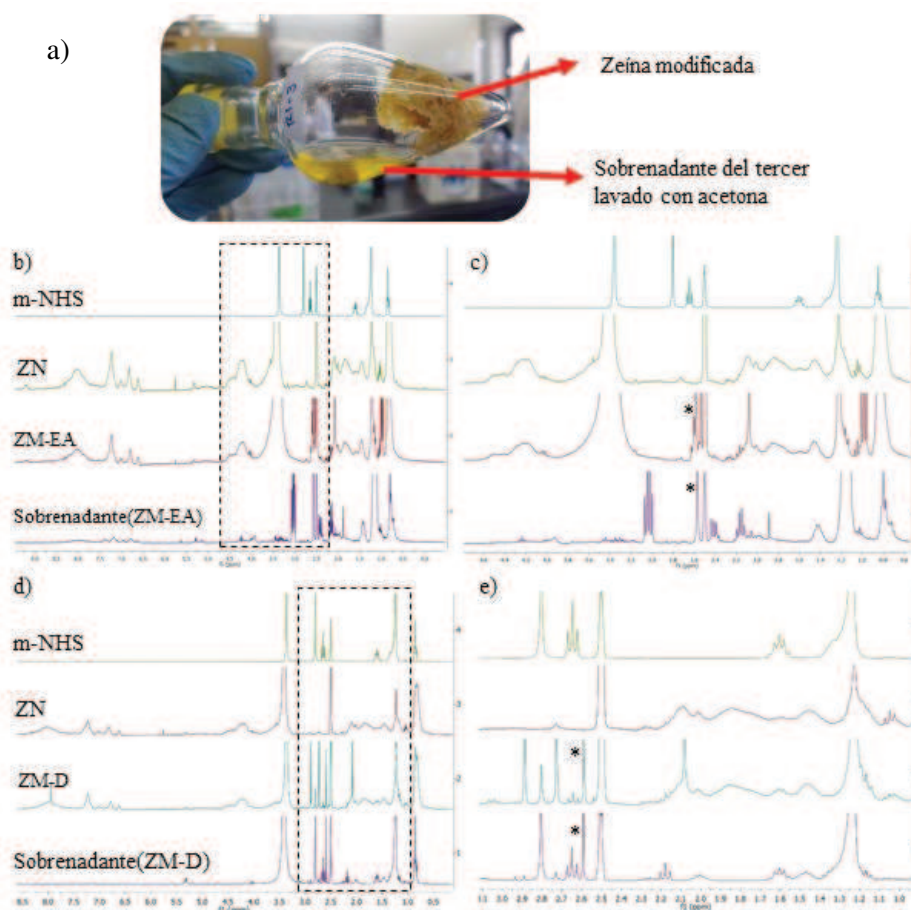


Figura 2.6. Espectro 1H -RMN completo y una ampliación del m-NHS, zeína nativa y modificada y sobrenadante recuperado de la etapa de purificación, para las reacciones llevadas a cabo en etanol-agua (a-b) y en DMF (c-d). Referencias: * señal atribuida a la modificación de la zeína.

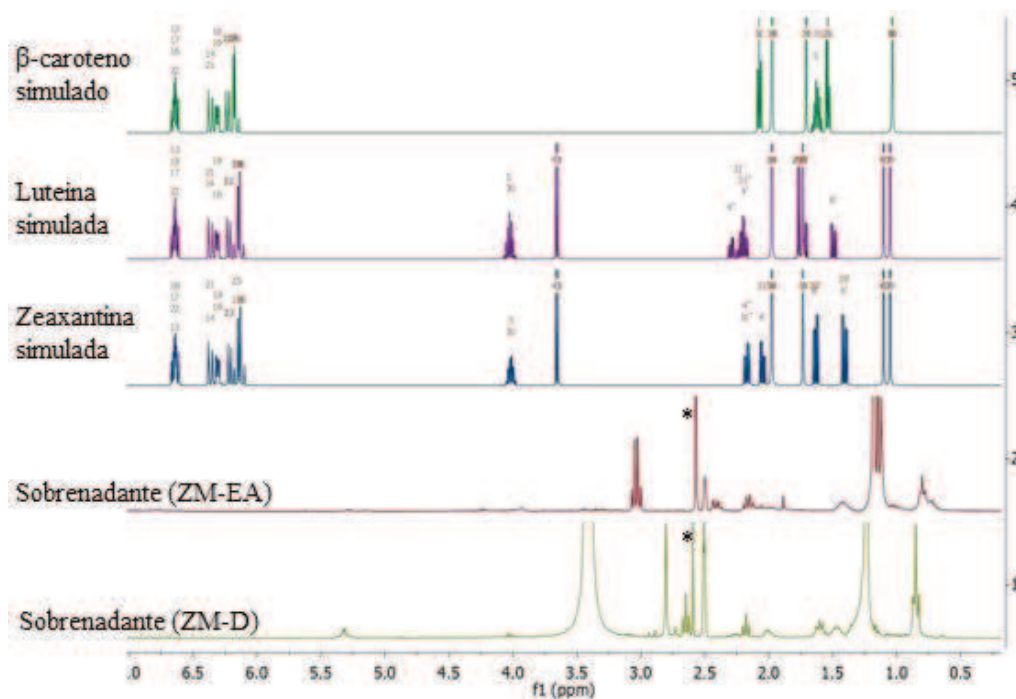


Figura 2.7. Espectros ^1H -RMN simulados de los carotenos existentes en la zeína (β -caroteno, luteína y zeaxantina) y espectros de los sobrenadantes recuperados de la etapa de purificación, para las reacciones llevadas a cabo en etanol-agua (ZM-EA) y en DMF (ZM-D). Referencia: * señal atribuida a la modificación de la zeína.

Por último, se repitió la medición de RMN de las proteínas modificadas 1 mes después de ser sintetizadas (Figura 2.8), obteniendo el mismo espectro ^1H -RMN para el caso ZM-D, pero no así para el caso ZM-EA, indicando que esta última no es estable en el tiempo.

En base a los resultados poco concluyentes obtenidos, no fue posible confirmar que la modificación de la zeína haya sido exitosa, descartándose el uso del éster de NHS para modificar la zeína. Sin embargo, es importante aclarar que tampoco se puede asegurar que el sistema NHS no sea exitoso para modificar la zeína, debido a que existen reportes donde se obtuvieron resultados positivos, como el caso de Kim *et al.* (2004)¹³² que lograron un entrecruzamiento intermolecular de la zeína, o Liu *et al.* (2019)¹³³ que adicionaron a la molécula de zeína una molécula de ácido 4-azidobenzoico.

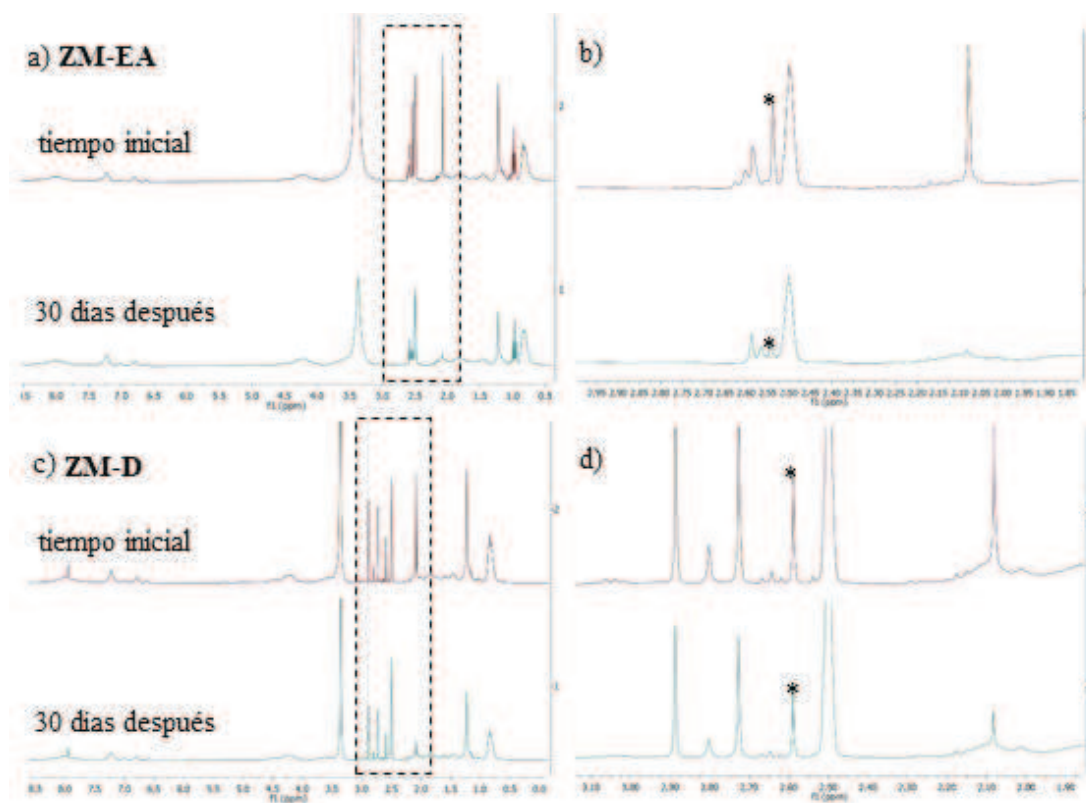


Figura 2.8. Espectros ^1H -RMN completos y ampliación de la zeína modificada en etanol-agua (a-b) y en DMF (c-d) Referencia: * señal atribuida a la modificación de la zeína.

2.3.2 Modificación química de la zeína con Cloruros

Cloruro de oleilo (CIO)

Si bien la reacción del CIO con zeína nativa (ZN) se llevó a cabo variando las relaciones molares entre ZN:CIO (1:5, 1:10, 1:20 y 1:150), en esta sección solo se mostrarán los resultados para la relación 1:20 (ZO-1:20). La zeína modificada obtenida a partir de la relación 1:150 no fue posible purificarla ni caracterizarla, debido a que no se logró solubilizarla en ningún solvente, incluidos DMSO, DMF y la mezcla etanol/agua (Figura 2.9.a), probablemente por el entrecruzamiento del ácido oleico que se encuentra en exceso.

Como se puede observar en el espectro ^1H -RMN (Figura 2.9.b-c), la ZN presenta una señal próxima a los 5.35 ppm, que se superpone a la señal del doble enlace que presenta el CIO, afectando la cuantificación del grado de modificación de la zeína. Para la estimación del grado de modificación se adoptó como referencia el área de una señal presente en la ZN (6.6 ppm), y se la

comparó con el área de las señales a 5.35 ppm de la ZN y la zeína funcionalizada (ZO), de acuerdo con la ecuación 2.1.

$$\text{Grado de modificación} = \frac{\text{area}(5.35\text{ppm})_{ZF}}{\text{area}(6.6\text{ppm})_{ZF}} \frac{\text{area}(5.35\text{ppm})_{ZN}}{\text{area}(6.6\text{ppm})_{ZN}} \quad [2.1]$$

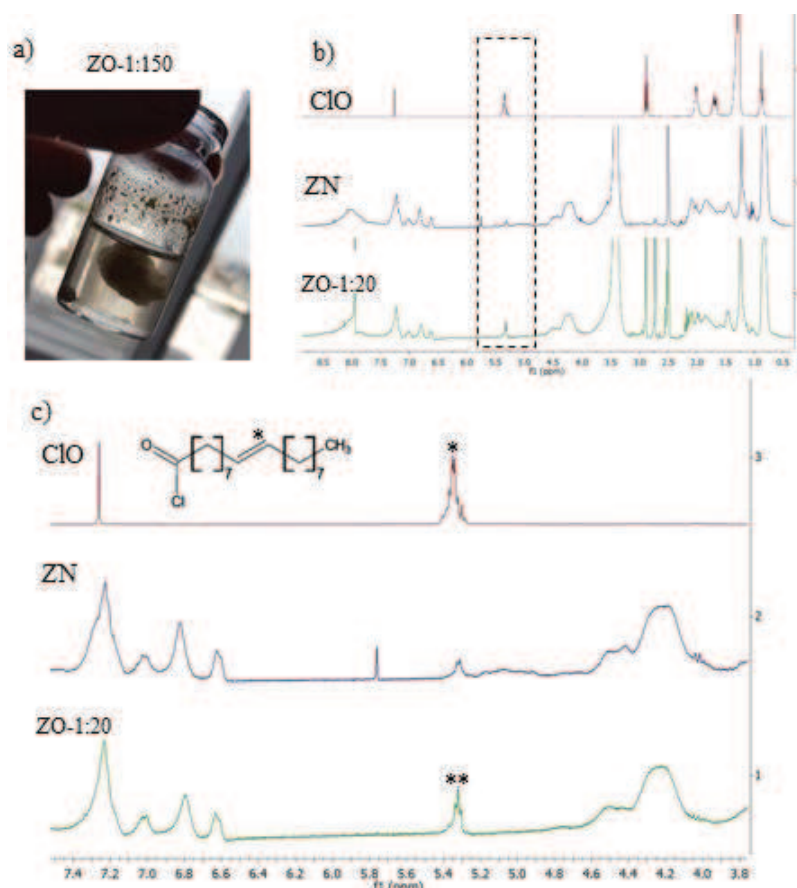


Figura 2.9. Foto del producto de modificación de la zeína con una relación molar zeína:CIO = 1:150 (a). Espectro ^1H -RMN completo (b) y su ampliación entre 3.80-7.50 ppm (c) del CIO, zeína nativa (ZN) y funcionalizada (ZO-1:20). Referencias: *señal correspondiente a los protones de los carbonos C_9 y C_{10} del cloruro de oleoilo; ** señal atribuida a la modificación de la zeína.

En la Tabla 2.2, se resumen los valores para la relación entre el área de la señal 5.35 ppm (medido entre los corrimientos 5.24-5.40 ppm) y área de la señal a 6.65 ppm (medido entre los valores 6.55-6.88 ppm) para ZN y ZO-1:20. En base a estos valores se puede decir que el grado de modificación alcanzado es de 0.28. Sin embargo, al analizar el espectro ^1H -RMN obtenido para una zeína nativa lavada (ZNL), es decir sometida al mismo proceso de purificación de la proteína

modificada, se puede observar un cambio en su espectro 1H -RMN con respecto al de la ZN (Figura 2.10), donde la señal a 6.65 ppm se reduce notablemente. Esta variación, podría estar indicando que la zeína nativa sufre alguna modificación durante el proceso de purificación debido a las diferentes soluciones utilizadas (ácidas y alcalinas), poniendo en duda el grado de modificación calculado anteriormente, el cual asciende a 0.45 si se determina a partir de la ZNL (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Relación de las áreas de las señales usadas para el cálculo del grado de modificación de la zeína funcionalizada con ClO (ZO-1:20).

	Área(5.35)/ área(6.65)
Zeína nativa (ZN)	0.90
Zeína nativa lavada (ZNL)	0.73
ZO-1:20	1.18

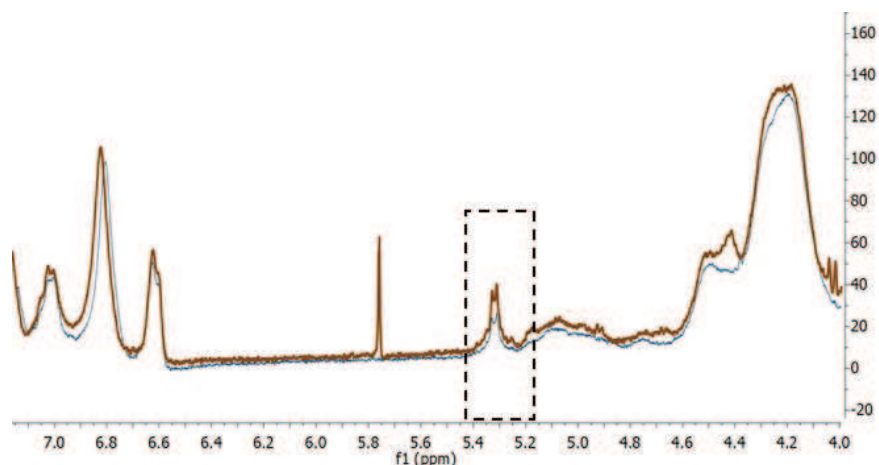


Figura 2.10. Espectro de 1H -RMN de la zeína nativa sin lavar (marrón) y lavada (azul) según el procedimiento de purificación

Cloruro de Acriloilo (CIA)

La modificación química de la zeína nativa (ZN) con CIA se realizó empleando 3 relaciones molares ZN:CIA (1:50, 1:100 y 1:150). En la Figura 2.11 se presenta únicamente el espectro 1H -RMN obtenido para la relación de modificación más alta (ZA-1:150) junto a los obtenidos para el ácido sintetizado y la ZN. Como se puede observar en la Figura 2.11.b, el CIA presenta un conjunto de señales entre los corrimientos químicos 5.7-6.5 ppm, las cuales también aparecen en el espectro 1H -RMN de la zeína modificada (ZA-1:150), por lo que se puede considerar que la

modificación se logró con éxito. Sin embargo, la gran cantidad de señales que presenta el CIA entre los corrimientos 5.80-6.70 ppm (Figura 2.11.a), estarían indicando que el reactivo de partida contiene un alto grado de contaminantes, ya que este sólo debería presentar 3 señales dobles en este rango (aproximadamente a 6.16, 6.63, 6.35 ppm, valores que pueden variar levemente según el solvente que se utilice). Debido a que no fue posible eliminar ni distinguir estos contaminantes, no se puede asegurar con certeza el grado de modificación alcanzado. Además, como en el caso anterior, existen diferencias en el espectro 1H -RMN de la zeína nativa y modificadas, que son atribuidos a la etapa de purificación.

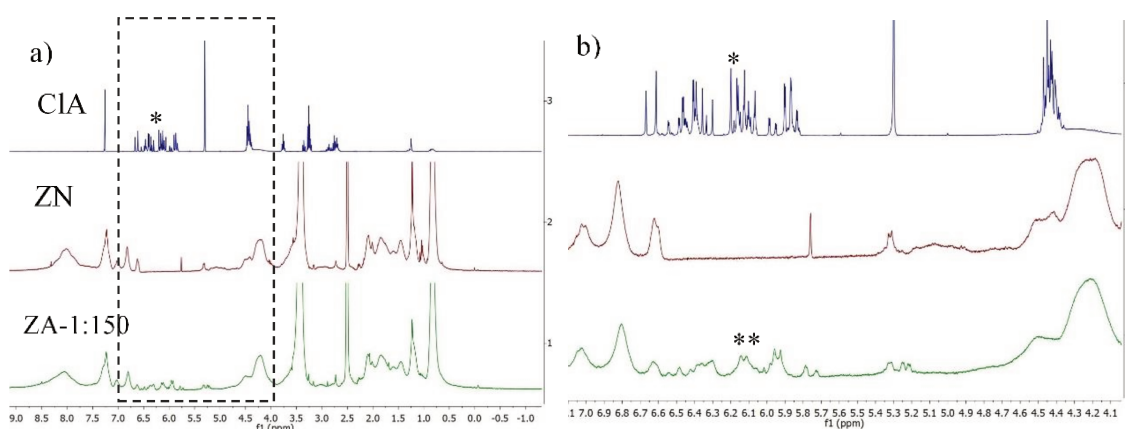


Figura 2.11. Espectro 1H -RMN completo (a) y una ampliación (b) del CIA, zeína nativa y modificada (ZA- 1:150). Referencias: ** señal atribuida a la modificación de la zeína.

Por lo tanto, si bien la modificación de la zeína mediante el uso de cloruros es factible, presenta desventajas, tales como:

- 1) La síntesis de estos reactivos (ClO y CIA) requiere tomar precauciones debido a su alta reactividad con el agua y la humedad ambiente, que produce ácido clorhídrico. Por lo tanto, es necesario realizar un pretratamiento tanto a los reactivos de síntesis, como en los equipos utilizados.
- 2) La alta reactividad de los cloruros, no solo dificulta su manipulación y producción a escala, sino que impide su completa purificación (sólo se elimina el cloruro de tionilo por destilación). Los diversos subproductos o contaminantes pueden interferir durante la modificación de la zeína o incluso reaccionar con la misma.

- 3) Dado que los contaminantes o subproductos no son fácilmente identificables, no es posible cuantificar el grado de funcionalización mediante un análisis elemental, debido a que para esto se requiere conocer con exactitud la estructura química del agente modificador (específicamente, la cantidad de carbono en su molécula).
- 4) La zeína modificada requiere una extensa purificación que implica el uso de soluciones ácidas (para neutralizar y eliminar Et_3N) y soluciones alcalinas (para neutralizar y eliminar restos de ácidos acrílicos que no reaccionaron) las cuales afectan la estructura de la proteína, afectando la estimación del grado de modificación obtenido por RMN.

Teniendo en cuenta que el propósito de esta Tesis es la generación de biocompuestos reactivos para producir nuevos materiales con alto contenido de proteínas, se procuró encontrar estrategias de modificación de la zeína que tengan una complejidad tecnológica escalable, para ser utilizadas en un proceso posterior de polimerización en emulsión. Es por ello que a continuación se considera otra alternativa de modificación de la zeína, utilizando GMA como reactivo de vinilización de la proteína.

2.3.3 Modificación química de la zeína con metacrilato de glicidilo (GMA)

En la Figura 2.12 se muestra el espectro $^1\text{H-RMN}$ para el GMA, la zeína nativa (ZN) y modificada con GMA en una solución de etanol al 70 %v/v (ZG-E70) y en DMSO (ZG-DMSO).

Como se muestra en la Figura 2.3, la reacción del GMA puede ocurrir con los grupos nucleofílicos apenas presentes de la zeína (Tabla 2.1), como el -SH de la cisteína, el -NH de la histidina, o incluso los grupos $-\text{NH}_2$ terminales. Sin embargo, se ha sugerido que los grupos -OH de aminoácidos como treonina, serina y tirosina y los grupos carboxilato del ácido aspártico y glutámico poseen una mayor probabilidad de reaccionar dado el alto contenido de dichos aminoácidos de la zeína. Todos estos procesos deberían proporcionar zeína con grupos de metacrilato disponibles, susceptibles a la polimerización radicalaria. Como se puede observar, el GMA puro presenta una señal (5.65-6.05 ppm) correspondientes a los protones que conforman el enlace vinílico, los cuales no se superponen con ninguna señal de la zeína nativa. Curiosamente, no se observó la modificación de zeína en DMSO, ZF-DMSO (Figura 2.12.b), mientras que

cuando se empleó el disolvente binario (ZG-E70) se obtuvo una clara evidencia de incorporación de grupos metacrilato en la estructura de la proteína, sugiriendo que la reacción no solo depende del pH del medio sino también del solvente utilizado.

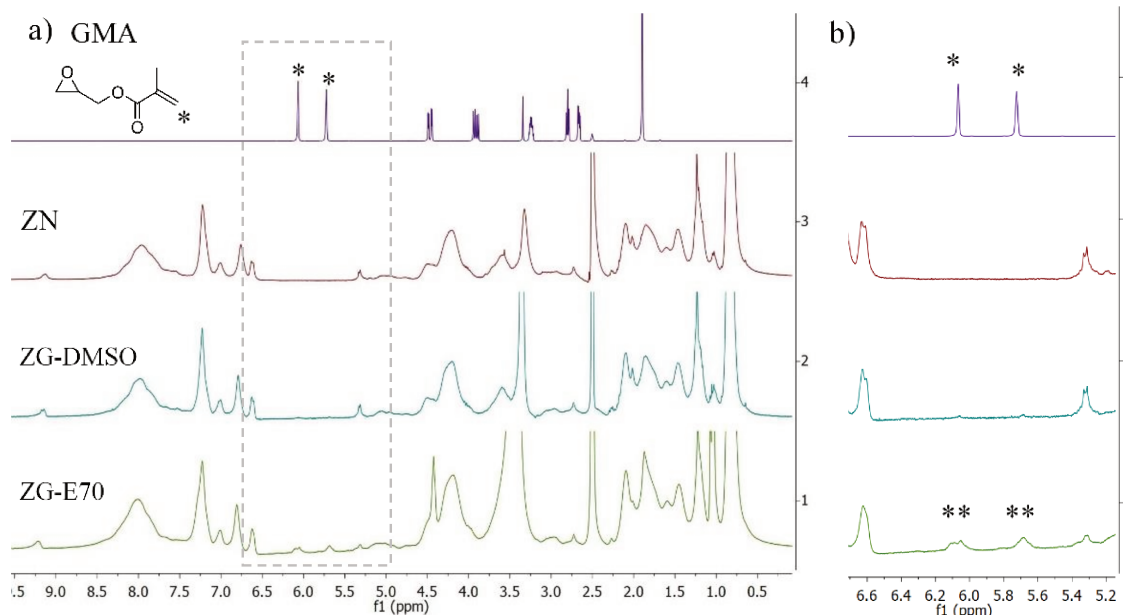


Figura 2.12. Espectro ¹H-RMN completo (a) y su ampliación 4.8-6.8 ppm (b) correspondiente al GMA, ZN, ZG-DMSO y ZG-E70. Referencias: * señal atribuida a los protones que conforman el enlace vinílico del GMA; ** señal atribuida a la modificación de la zeína.

Este resultado podría deberse a que en un solvente prótico polar, como las soluciones alcohólicas, predomina el mecanismo de apertura de anillo del GMA, mientras que cuando la reacción se lleva a cabo en solventes apróticos polares, tales como DMSO o DMF, prevalece una transesterificación.¹³⁴ Además, el pH de las soluciones de zeína en cada uno de estos solventes difiere, afectando también los mecanismos de reacción de las conjugaciones con GMA. Para las soluciones de zeína, se obtuvieron valores de pH de 8.8 ± 0.09 en DMSO y 5.5 ± 0.02 en solución alcohólica (70 %v/v). El efecto del pH de las soluciones acuosas sobre las reacciones de GMA ha sido estudiado en detalle por Reis et. al.,^{135,136} quienes determinaron la ruta de modificación del poli(vinil alcohol) (polímero que sólo posee grupos -OH) y el poli(ácido acrílico) (polímero que sólo posee grupos -COOH) con GMA en un medio acuoso. Estos autores concluyeron que, en una solución ácida el GMA podría reaccionar tanto con los grupos carboxilo como hidroxilo a través de la apertura del anillo epóxido; mientras que en medios alcalinos, el GMA solo reacciona con

los grupos hidroxilo, primero mediante una reacción de transesterificación y luego mediante un mecanismo de apertura del anillo epóxido.

Por otro lado, se sabe que la naturaleza y la composición del disolvente pueden inducir cambios conformacionales significativos de la zeína en solución, dependiendo del tipo de interacción del solvente con los grupos hidrofílicos o hidrofóbicos de la proteína. Cuando el disolvente utilizado interactúa con los grupos hidrofóbicos de la proteína, como DMSO y ácido acético, se favorecen las interacciones hidrofílicas intramoleculares,¹³⁷ dejando menos accesibles los grupos nucleofílicos de la zeína y afectando negativamente las reacciones de conjugación con el GMA. Contrariamente, cuando se utiliza un disolvente binario de etanol-agua, se favorecen las interacciones hidrofóbicas intramoleculares, exponiendo los grupos nucleofílicos de la proteína y favoreciendo su modificación química.^{138,139}

El efecto de la reestructuración de la zeína sobre el grado de modificación se estudió para el caso del solvente binario, donde los experimentos de modificación de la proteína con GMA se llevaron a cabo variando únicamente la concentración alcohólica de etanol en el solvente desde 70 a 90 %v/v (rango de concentración reportado donde la zeína es soluble^{138,140,141}). Para cada uno de los experimentos, se estimó el grado de modificación (GM) a partir de las áreas de las señales correspondiente a los grupos metacrílicos (5.70 y 6.10 ppm) de los espectros ¹H-RMN obtenidos, de acuerdo a la ecuación 2.2. Además, el GM se puede referir al valor alcanzado con la zeína modificada en el solvente con 70 %v/v etanol (ZG-E70) de acuerdo a la ecuación 2.3.

$$\text{Grado de modificación (GM)} = \frac{\text{area}(5.7\text{ppm})_{ZF}}{\text{area}(6.6\text{ppm})_{ZN}} = \frac{\text{area}(6.1\text{ppm})_{ZF}}{\text{area}(6.6\text{ppm})_{ZN}} \quad [2.2]$$

$$\text{Grado de modificación relativo} = \frac{GM_{ZF} \times 100}{GM_{ZF-E70}} \quad [2.3]$$

Como se puede observar en la Figura 2.13, el grado de modificación relativo de la zeína se ve significativamente afectado por el contenido de etanol en el solvente, resultando en un mayor grado de metacrilación cuanto menor es el contenido alcohólico del solvente. Es decir, al

incrementar la polaridad del disolvente mediante la dilución del etanol desde el 90 al 70 %v/v, se logró aumentar un 75 % el GM de la zeína.

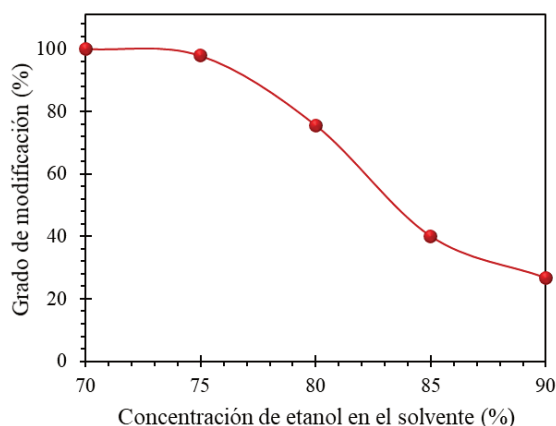


Figura 2.13. Variación del grado de modificación de la zeína con GMA, al cambiar la hidrofobicidad del medio de reacción

Este resultado, está de acuerdo con lo observado por Kim *et al.* (2008 y 2010)^{138,139}, quienes estudiaron la estructura de la zeína variando la hidrofobicidad del medio en una solución alcohólica de etanol, entre el 70-90 %v/v. Aunque todas las concentraciones alcohólicas mostraron una capacidad similar para solubilizar la zeína, la medición de transmitancia mostró que existe una variación en el tamaño del agregado dependiendo del contenido de etanol en la mezcla de disolventes. Ellos observaron un incremento en la transmitancia al incrementar el contenido de etanol de 70 a 90 %v/v, sin observar precipitación dentro de este rango, indicando una variación de tamaño de las moléculas de zeína a medida que cambia el porcentaje de etanol. Esto también fue comprobado mediante dispersión de luz dinámica (DLS), donde la evolución de los tamaños de los agregados de zeína permitió comprender mejor el comportamiento de agregación de la zeína en una solución alcohólica. La Figura 2.14 muestra el resultado de la evolución del volumen de los agregados, extraída de Kim *et al.* (2010).¹³⁸

En base a esto, Kim *et al.* proponen que la molécula de zeína forma agregados globulares-micelares macromoleculares (MMGA, por sus siglas en ingles), capaces de invertir su estructura a medida que la composición del disolvente cambia de un entorno hidrofílico a uno más hidrofóbico. En este sentido, la solución de etanol al 90 %v/v resultó ser el mejor disolvente para

la zeína, ya que el número de agregación era mínimo a esta concentración. Al reducir el contenido de etanol se favorecen las interacciones hidrofóbicas intramoleculares, quedando la fracción hidrófila de la proteína expuesta en la superficie de los MMGA. En este caso, las cargas superficiales de las partículas se repelen entre sí evitando la precipitación, formando una solución turbia.

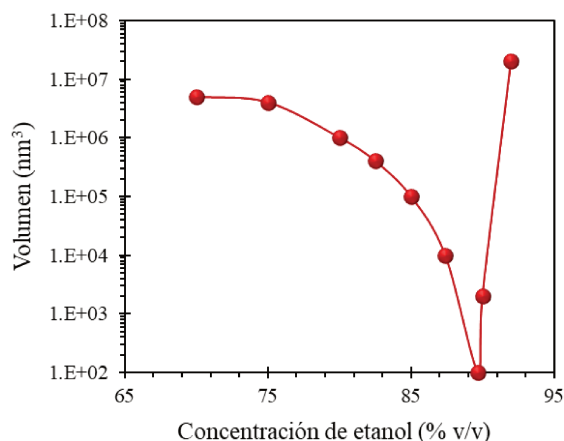


Figura 2.14. Variación del tamaño de los agregados al variar la fracción de etanol del solvente.¹³⁸

En la Figura 2.15 se esquematiza el cambio de la reestructuración de la proteína cuando se encuentra por debajo del 90 %v/v de etanol. Por encima del 90 %v/v de etanol se favorecen las interacciones hidrofílicas intramoleculares, resultando en un tipo diferente de MMGA, con la fracción hidrofóbica completamente orientada hacia el medio disolvente. En este caso, las partículas se atraen entre sí por fuerzas de van der Waals, de modo que se induce la agregación seguida de la precipitación.

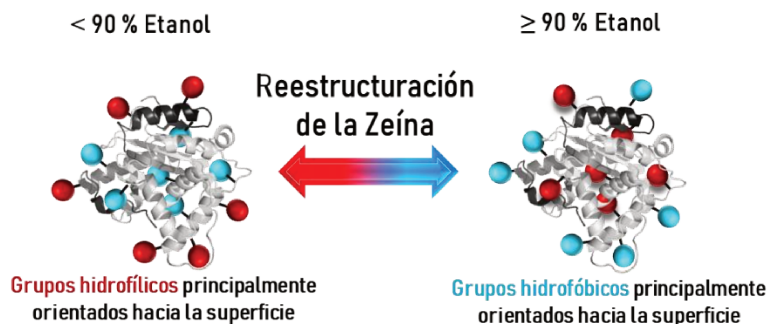


Figura 2.15. Esquema de la reestructuración de la zeína frente el cambio de la hidrofobicidad del solvente.

La estructura que propone Kim es importante si se considera que los grupos nucleofílicos de la zeína que pueden reaccionan con el GMA, son grupos hidrofílicos y que los mismos quedan expuestos sobre la superficie de los MMGA a bajos contenidos alcohólicos, incrementando las posibilidades de que la reacción de conjugación de la proteína ocurra. Sin embargo, es importante considerar que la estructura de la zeína sigue sin estar clara, y esto se debe principalmente a que la misma depende fuertemente del medio en el que se encuentra; y además las modificaciones reportadas para la zeína generalmente se termina confirmando a través de las evidentes diferencias que presentan las propiedades de los materiales resultantes.

Un estudio de análisis elemental de carbono (C) y nitrógeno (N) de la zeína modificada ZG-E70, nos permitió calcular con precisión la cantidad de grupos vinílicos adicionados por mol de proteína, aplicando las ecuaciones 2.4-2.5. Para esto se cuantificó el contenido de C y N para la zeína nativa (%C(ZN) y %N(ZN), respectivamente) y para la zeína modificada liofilizada (%C(ZG) y %N(ZG), respectivamente). Además, se consideró que la relación C/N de la zeína nativa es un valor característico de la proteína, y que el exceso de C existente en la zeína funcionalizada está dado únicamente por el grupo metacrilato adicionado (proveniente del GMA). En la Tabla 2.3 se detallan los contenidos de C, N y la relación de C/N, tanto para la zeína nativa (ZN), como para la ZG-E70.

$$\%C(ZG_{GMA}) = \%C(ZF) - \%N(ZF) \times \frac{\%C(ZN)}{\%N(ZN)} \quad [2.4]$$

$$\frac{\text{mol grupos vinílicos}}{\text{mol ZF}} = \%C(ZG_{GMA}) \times \frac{1 \text{ molGMA}}{84 \text{ gC}} \times MW_{Zein} \quad [2.5]$$

donde %C(ZG_{GMA}) representa el contenido de C en la molécula de zeína modificada aportado por las unidades de GMA adicionadas, expresado en gC/100gZG.

En base a estos valores, se determinó que la zeína modificada posee 0.0179 mol de grupos vinílicos por cada 100 g de proteína. Sin embargo, para poder expresar dicho resultado como una relación molar, se debe considerar que la zeína es una mezcla de diferentes tipos de zeínas ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), cada una con un peso molecular de 19000 y 22000 g/mol, respectivamente. Por lo tanto,

podemos decir que al realizar la reacción de modificación a 70%v/v de etanol, se logra adicionar entre 3.4 y 3.9 moles de dobles enlaces por mol de zeína, si se adopta 19000 o 22000 g/mol como peso molecular de la zeína, respectivamente.

Tabla 2.3. Resumen de los resultados obtenidos del análisis elemental para la zeína nativa y para la zeína con el mayor grado de modificación (70 % etanol)

	% N	Promedio	% C	Promedio	C/N
ZN	14.73	14.75	54.15	54.42	3.69
	14.77		54.69		
ZG-E70	14.56	14.53	55.00	55.11	3.79
	14.50		55.22		

2.3.4 Prueba de concepto de la capacidad de polimerización de la zeína metacrilada

A partir de las zeínas funcionalizadas con GMA (ZG) y con CIO (ZO) se procedió a formar una película fotocurable sin el agregado de un monómero de baja masa molar. Luego del curado de las películas formadas por UV, se analizó su fracción insoluble como medida del grado de polimerización. En la Figura 2.16.a se puede apreciar una foto del *film* obtenido a partir de la ZG-E70 inmersa en una solución etanol/agua 90 %v/v y su comparación con una película de referencia obtenida con ZN. En la Figura 2.16.b se muestran los resultados de las fracciones insolubles obtenidas para los *films* curados de ZN y de la zeína modificada con GMA (ZG) y con CIO (ZO), obtenidas con el mayor grado de modificación.

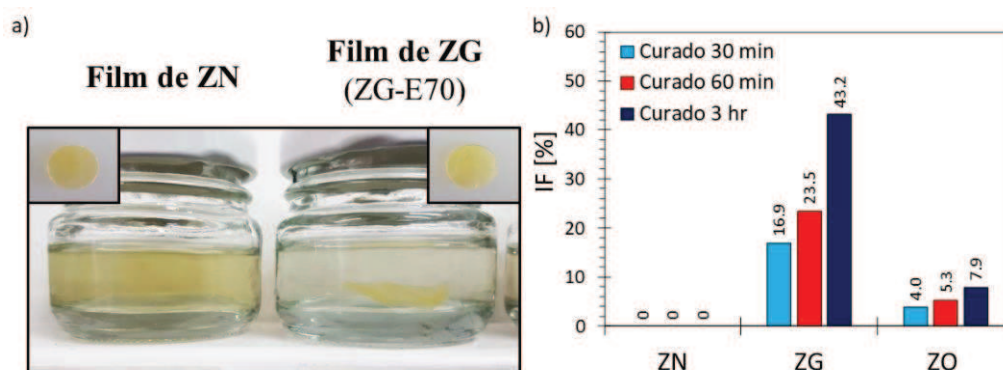


Figura 2.16. Fotografía de películas curadas con UV de ZN y de ZG (ZG-E70), antes y durante la prueba de inmersión en una solución de etanol al 90% v/v (a); y las fracciones insolubles

obtenidas después de la inmersión, para los *films* ZG y ZO curados por UV durante 30 min, 60 min y 3 h (b).

Como se puede observar en la Figura 2.16, independientemente del tiempo de curado, los *films* obtenidos a partir de la ZN se solubilizan rápidamente y por completo al sumergirlos en etanol-agua, indicando que la reacción de entrecruzamiento no ocurre. Por el contrario, los *films* formados a partir de ZG y ZO resisten la inmersión al solvente, incrementando la fracción de material insoluble al aumentar el tiempo de curado. Este resultado permitió corroborar que es posible la adición de grupos vinílicos reactivos a la molécula de zeína a través de su conjugación con GMA o cloruros de ácidos grasos. Sin embargo, existe una marcada diferencia entre los valores de IF alcanzados por ZG y ZO, pudiendo deberse a un menor grado de entrecruzamiento para el ZO respecto al ZG. Se debe tener en cuenta que la ZO puede presentar un menor grado de modificación debido a la diferencia en la longitud de cadena adicionada y a la menor reactividad del doble enlace intermedio del ácido oleico frente al metacrilato del GMA.

2.4 CONCLUSIONES

La particular composición de aminoácidos de la zeína, hace que esta proteína sea de gran interés en múltiples aplicaciones. Sin embargo, la gran proporción de aminoácidos no polares y la ausencia de grupos amino (-NH₂), presentan una desventaja para su modificación química respecto a otras proteínas, tales como la caseína, la proteína de suero lácteo, y la proteína de soja, entre otras. Sin embargo, fue posible modificarla a partir de los grupos oxidrilos, carboxilos y sulfhidrilos que posee en su molécula, a través de su reacción con agentes modificadores que presentan en su estructura grupos funcionales como cloruros y anillos epóxidos. En una primera instancia, se estudió la modificación con m-NHS, con resultados poco concluyentes, por lo que se descartó su implementación para la conjugación de la zeína. Por otro lado, se ha demostrado que la modificación a partir de cloruros (ClO y ClA) es factible, lográndose obtener para el caso del ZO, un *film* fotocurable capaz de resistir la inmersión en un solvente etanol-agua. Los bajos valores de IF alcanzados por estos *films* sugieren un bajo grado de entrecruzamiento, atribuido a

un menor grado de modificación y a la baja reactividad del doble enlace intermedio del ácido oleico. Pero la dificultad que presenta la síntesis de los cloruros (ClO y ClA) y la imposibilidad de purificarlos completamente, no permite cuantificar con exactitud el grado de modificación alcanzado por la zeína. Además, en estos casos, se requiere de un proceso largo de purificación para la obtención de la proteína final modificada, por lo que se descarta la modificación a través de cloruros como una vía factible para la funcionalización de la proteína, que resulte escalable.

La modificación mediante la apertura de un anillo epóxido resulta de mayor interés tecnológico debido a su sencillez, no generándose subproductos y requiriéndose de un reducido número de etapas en el proceso de purificación de la proteína modificada. En este sentido, el GMA resultó ser un excelente agente modificador para la zeína, cuando se emplea etanol-agua como solvente de reacción. Si bien la reestructuración de la zeína en los distintos solventes aún no está completamente comprendida, se ha podido demostrar que una solución alcohólica con 70 %v/v de etanol (cerca al límite inferior de solubilidad) favorece la reacción entre la proteína y el GMA, logrando incorporar alrededor de 3.5 dobles enlaces por molécula de zeína.

Los experimentos de prueba de concepto mediante la producción de *films* fotocurados a partir de la zeína metacrilada mostraron un elevado grado de entrecruzamiento, con una significativa fracción de material insoluble y alta resistencia a la inmersión en etanol-agua. Estos experimentos han demostrado que la zeína metacrilada obtenida por funcionalización con GMA, es un producto con características prometedoras para su incorporación en la síntesis de materiales compuestos. En este sentido, en el siguiente Capítulo de esta Tesis, esta proteína será utilizada como *bio-macro-entrecruzante* en la síntesis de hidrogeles a base de *N*-vinilcaprolactama.

CAPÍTULO 3: UTILIZACIÓN DE LA ZEÍNA METACRILADA COMO MACRO-ENTRECRUZANTE, EN LA SÍNTESIS DE HIDROGELES^c

3.1 INTRODUCCIÓN

En el Capítulo anterior se investigó la modificación química de la zeína con GMA, permitiendo ampliar el campo de aplicación de la proteína mediante la incorporación de dobles enlaces en su molécula. La zeína metacrilada, por ser radicalmente polimerizable, sería de gran interés en aplicaciones como la síntesis de materiales foto-reticulados (como películas o fibras), la preparación de nanopartículas híbridas (ya que podría mejorar la compatibilización entre los diferentes componentes de las fases del nanocompuesto), o como macro-entrecruzante en la preparación de hidrogeles.

Entre los materiales basados en proteínas reportados, los hidrogeles han recibido mucha atención debido a sus propiedades únicas y a las ventajas sustanciales que presentan, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas ajustables. Además para varios hidrogeles se ha reportado una respuesta inteligente a estímulos externos como el pH, la fuerza iónica y la temperatura.¹⁴² Debido a su versatilidad, los hidrogeles pueden diseñarse para cubrir diferentes necesidades y aplicaciones, como por ejemplo para procesos de liberación controlada de aditivos alimentarios o productos farmacéuticos, implantes biomédicos o en ingeniería de tejidos, entre otros.^{28,142-144}

Dentro de los hidrogeles, podemos encontrar aquellos de origen natural o sintético. Los hidrogeles sintéticos exhiben una alta capacidad de absorción de agua y una resistencia mecánica adecuada, aunque sus aplicaciones pueden verse limitadas en el campo de la biomedicina debido a la baja biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como a la toxicidad derivada de los

^c Los resultados presentados en este Capítulo fueron realizados en colaboración con el grupo de química orgánica aplicada de INTEC (CONICET-UNL) con los Doctores Victoria Vaillard y Santiago Vaillard. Gran parte de estos resultados fueron publicados en Allasia *et al.*, Polymer, Volumen 235, 12427819 (2021)

monómeros sin reaccionar que pueden permanecer en la estructura del gel. Los hidrogeles naturales derivados de polisacáridos y proteínas tienen ventajas sustanciales como biocompatibilidad y biodegradabilidad, entre otras. Sin embargo, los hidrogeles naturales tienen desventajas inherentes, como una escasa resistencia mecánica e incluso podrían producir una respuesta inmunitaria inflamatoria. Además, algunos tipos de hidrogeles proteicos, por ejemplo, los inducidos térmicamente, no pueden volver a hincharse completamente hasta su volumen original después del secado, debido al incremento de interacciones proteína-proteína a través de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que ocurren como resultado de la deshidratación. Las ventajas y desventajas de ambos hidrogeles (naturales y sintéticos) ha motivado el desarrollo de hidrogeles híbridos capaces de combinar sinérgicamente las propiedades químicas, físicas y biológicas de dichos materiales.¹⁴²

Los hidrogeles derivados de la *N*-vinilcaprolactama (VCL) han sido ampliamente estudiados y se caracterizan por poseer una respuesta térmica, que consiste en un cambio reversible en su volumen a causa de variaciones en la temperatura del medio en el que se encuentra. De esta manera, el hidrogel se encuentra en un estado hinchado a bajas temperaturas y colapsa, expulsando gran parte del líquido contenido, a altas temperaturas (Figura 3.1). La temperatura a la cual ocurre este cambio se conoce como temperatura de transición de fase volumétrica (VPPT), y en estos hidrogeles suele estar cercana a la temperatura fisiológica (entre 31 y 38 °C).^{145,146}

Por otro lado, la naturaleza del agente entrecruzante utilizado para la síntesis de la red polimérica juega un papel crucial en las propiedades de los hidrogeles. Cuando se utilizan reticulantes de bajo peso molecular, tales como *N,N*-metilenacrilamida (BIS), las propiedades mecánicas de los hidrogeles son difíciles de ajustar sin interferir con su capacidad de hinchamiento, dado que las mismas se ven afectadas en dirección opuesta al grado de reticulación.¹⁴⁷ El uso de macromoléculas como reticulantes (es decir, macro-entrecruzantes) permite mejorar tanto las propiedades mecánicas, como la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles.^{142,148,149}

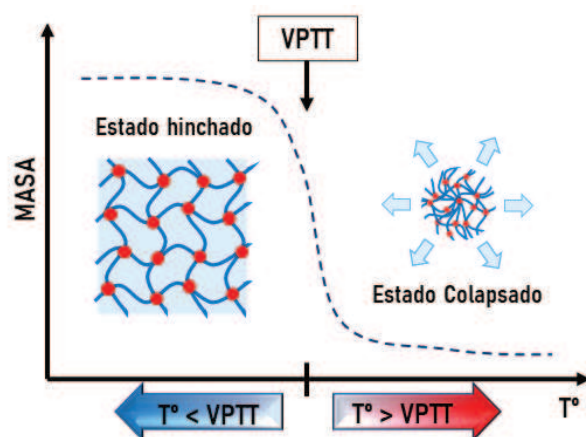


Figura 3.1. Representación del cambio volumétrico de los hidrogeles basados en VCL frente a la T°

En el presente Capítulo se investiga el empleo de zeína metacrilada con GMA como bio-macro-reticulante para producir hidrogeles termosensibles basados en poli(*N*-vinilcaprolactama) (PVCL), con diferentes grados de entrecruzamiento. Los hidrogeles se caracterizaron completamente en términos de su morfología, respuesta térmica, grado de hinchamiento, comportamiento reológico y mecánico, y capacidad de carga y liberación de un colorante. Finalmente, se comparó el desempeño entre los hidrogeles basados en este bio-macro-entrecruzante y los obtenidos con un reticulante de bajo peso molecular (en este caso, BIS).

3.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

La descripción detallada de los materiales, la especificación de los equipos, y los métodos de síntesis y caracterización empleados a lo largo del trabajo experimental de esta Tesis, se presenta en el Anexo. Por esta razón, a continuación, se hará referencia sólo a los aspectos del trabajo experimental que se aplican específicamente a este Capítulo.

Para la síntesis de los hidrogeles, se utilizó la zeína metacrilada ZG-E70 (cuya síntesis y caracterización se detalló en el Capítulo 2) como bio-macro-entrecruzante, la cual presenta entre 3.4-3.9 grupos vinílicos adicionados por mol de proteína.

3.2.1 Síntesis de hidrogeles de zeína-PVCL

Los hidrogeles basados en PVCL se sintetizaron mediante polimerización radicalaria en una solución alcohólica como medio de reacción. Se disolvió zeína nativa (ZN) o funcionalizada (ZF) en una solución de etanol al 70% v/v, a temperatura ambiente. Luego, se adicionó VCL (monómero), y AIBN como iniciador (1% en base al monómero). Posteriormente se burbujeó nitrógeno durante 10 min, se colocaron en jeringas y se mantuvieron en estufa a 70 °C durante una noche.

La Tabla 3.1 resume las formulaciones realizadas para la síntesis de los diferentes hidrogeles. Los códigos de los hidrogeles sintetizados contienen la información de su composición mediante la abreviatura "V", para el monómero VCL, "ZN o ZF" para zeína nativa o funcionalizada, respectivamente, o "B" para BIS, y los subíndices indican las concentraciones. Se sintetizaron algunos hidrogeles de referencia: i) tres hidrogeles de PVCL con ZN como entrecruzante; y ii) un hidrogel de PVCL con B como reticulante de bajo peso molecular.¹⁴⁶

Tabla 3.1. Diferentes composiciones utilizadas para la síntesis de hidrogeles.

Reacciones	VCL ¹ (%)	Entrecruzante (% wbVCL) ²		
		ZN	ZF	BIS
V ₃₀ ZN ₄	30	4	-	-
V ₃₀ ZF ₄	30	-	4	-
V ₃₀ B ₄	30	-	-	4
V ₄₀ ZN ₆	40	6	-	-
V ₄₀ ZN ₁₀	40	10	-	-
V ₄₀ ZF ₆	40	-	6	-
V ₄₀ ZF ₈	40	-	8	-
V ₄₀ ZF ₁₀	40	-	10	-

¹ Porcentaje en peso, basado en el solvente. ² Porcentaje en peso, basado en VCL (wbVCL)

3.2.2 Caracterización de los hidrogeles

Las morfologías de los hidrogeles se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un equipo Phenom World ProX. Todas las muestras de xerogel se hidrataron hasta el equilibrio, se cortaron en discos de aproximadamente 2 mm de espesor y se liofilizaron.

Las secciones transversales de las muestras liofilizadas hinchadas se observaron a diferentes aumentos (380 × y 4400 ×).

Los estudios reocinéticos de la formación de gel se realizaron usando un reómetro Haake (RheoStress RS80) equipado con geometría de cono y placa (ángulo de cono de 1 °, diámetro de 60 mm y espacio de 0.05 mm). Los experimentos se realizaron a una frecuencia y amplitud de deformación de 0.1 Hz y 0.1%, respectivamente. Para la determinación del punto de gelificación, se aplicó una rampa de temperatura de 40 a 70 °C con una velocidad de calentamiento de 2.25 °C/min y luego la temperatura se mantuvo constante durante 10 min adicionales.

Los hidrogeles hinchados en agua se ensayaron bajo compresión usando una máquina universal de ensayos (INSTRON 3344), equipada con una punta cilíndrica plana de 10 mm de diámetro, a 23 °C y 50% de humedad relativa.

Se analizó la descomposición térmica mediante análisis termogravimétrico (TGA), empleando el equipo Q500 de TA Instruments. Para esto, 3 mg de las muestras de xerogel se sometieron a un calentamiento desde 25 a 700 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, bajo atmósfera de nitrógeno. Se adoptó la temperatura máxima de descomposición ($T_{d,max}$) como la temperatura en la que se produce la mayor pérdida de peso, determinada como el máximo del pico principal de la curva de la derivada de la pérdida de masa.

La respuesta térmica de los hidrogeles se estudió siguiendo el hinchamiento de los mismos por gravimetría, en un rango de temperatura de 20-50 °C. A cada temperatura, un disco de xerogel se sumergió en agua ultrapura durante 15 min para alcanzar el equilibrio térmico. Luego, las muestras se retiraron del medio, se secaron cuidadosamente con papel de filtro y se pesaron, antes de volver a sumergirlas en agua (este procedimiento se realizó por duplicado). Para comparar la respuesta térmica entre los hidrogeles, se definió el factor de hinchamiento por peso (ϕ) de acuerdo con la ecuación 3.1, donde $W(T)$ es el peso del hidrogel hinchado a cada temperatura, y $W(50^{\circ}C)$ es el peso del hidrogel en estado colapsado (a 50 °C). La VPTT de los hidrogeles se definió como la temperatura a la que $\phi = 50\%$.

$$\phi = \frac{W(T) - W(50^{\circ}\text{C})}{W(50^{\circ}\text{C})} \times 100 \quad [3.1]$$

Se estudió la degradación de los hidrogeles en fluidos intestinales simulados (pH 6.8) con y sin pancreatina (enzima) a tres temperaturas: 4, 25 y 37 °C. La pérdida de peso (%) de los materiales se cuantificó comparando el peso seco de xerogeles, antes y después de la inmersión en el medio de degradación a lo largo del ensayo.

Además, se estudió la carga y la liberación in vitro del hidrogel, utilizando azul de metileno (MB) como modelo de compuestos hidrofílicos. Para la carga del hidrogel, se sumergió una cantidad conocida de xerogel en 3 ml de una solución de MB (66.2 mg/ml) durante 3 horas, a temperatura ambiente. Luego, se separó de la solución, se secó cuidadosamente con papel para extraer el exceso de MB remanente en la superficie y se dejó secar durante 24 h a temperatura ambiente para obtener el xerogel cargado. Los estudios de liberación in vitro se realizaron sumergiendo el xerogel cargado con MB en 3 ml de buffer PBS (pH 7.4) a 37 °C, con agitación orbital. A intervalos de tiempo seleccionados, se recogió 1 ml de la solución y se reemplazó por PBS fresco. El MB liberado se cuantificó mediante espectrofotometría UV/vis a 663 nm, empleando una curva de calibración para el MB. La masa de MB cargada (mg MB/ mg de xerogel) se determinó como la masa de liberación total acumulada en el medio (100% de liberación de MB), mientras que los perfiles de liberación se muestran como la fracción de masa acumulada de MB frente al tiempo.

Por último, se evaluó la velocidad de respuesta térmica del hidrogel (cinética de contracción) utilizando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Teniendo en cuenta que un hidrogel polimérico necesita un tiempo para realizar el cambio volumétrico cuando es sometida a un cambio de temperatura, la variación observada en el VPTT con respecto a la velocidad de calentamiento en experimentos de DSC a diferentes velocidades de calentamiento podría usarse como información de su velocidad de respuesta térmica. Para esto, se realizó el análisis por DSC de hidrogeles hinchados con agua ultrapura, aplicando un barrido de temperatura entre 20-70 °C con diferentes velocidades de calentamiento (0.5, 1, 3 y 5 °C/min). El valor mínimo del pico

endotérmico observado en el termograma de DSC se consideró como la VPTT de la muestra. Entonces, la cinética de contracción se obtuvo a partir de la pendiente resultante del gráfico de VPTT en función de la velocidad de calentamiento, donde una pendiente baja significa que el hidrogel presenta una alta velocidad de contracción. Lo contrario indica que la velocidad de contracción es alta y el valor de VPTT es importantemente influenciado por la velocidad de calentamiento. Los análisis de DSC se llevaron a cabo en un instrumento TA (Q2000) en atmósfera de N_2 y utilizando capsulas de aluminio T-Zero.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las diferentes estrategias de modificación de la zeína explorados.

3.3.1 Síntesis de los hidrogeles empleando zeína como bio-macro-entrecruzante

Punto de gelificación

En una primera etapa se estudió la incorporación de ZF como agente entrecruzante y su comparación con la ZN y BIS. En la Figura 3.2 se muestra la evolución temporal de G' y G'' para los sistemas, $V_{30}ZN_4$, $V_{30}ZF_4$ y $V_{30}B_4$. Cuando se incorporó ZN (Figura 3.2a), el módulo G' permaneció casi constante durante toda la reacción (y por debajo de G''), lo que indica la ausencia de un proceso de gelificación y que la solución de reacción permaneció líquida. Por otro lado, cuando se incorporó un 4% de ZF (Figura 3.2b), el módulo G' aumentó lentamente al llegar a los 70 °C, hasta aproximadamente 5 Pa, lo que indica que la elasticidad de la solución de reacción se incrementó significativamente. A pesar de que luego de alcanzados los 70 °C se observa un punto gel ($G' = G''$) como consecuencia del incremento del peso molecular de la PVCL debido a la reticulación con la ZF, el gel obtenido resultó demasiado blando y difícil de manipular a causa del bajo grado de reticulación alcanzado. Además, se observó una variación en el color final de la solución de reacción donde se utilizó ZF ($V_{30}ZF_4$), la cual se tornó transparente después de la

reacción, como evidencia de que la ZF se incorporó molecularmente con PVCL, mientras que la muestra $V_{30}ZN_4$ permaneció con una coloración amarilla intensa, típica de la zeína (Figura 3.2d).

A diferencia de los experimentos con ZF, cuando se añadió 4% wbv de BIS como reticulante de bajo peso molecular ($V_{30}B_4$), se detectó rápidamente la inversión de los módulos ($G' > G''$), antes de alcanzar $70\text{ }^\circ\text{C}$, lo que indica la aparición de la gelificación, y por lo tanto que el material se convirtió en uno con comportamiento como sólido viscoelástico (Figura 3.2c). Es decir, al utilizar la misma concentración de reticulante (4%), con la BIS se alcanzó un grado de reticulación superior, obteniéndose rápidamente altos valores de G' (6700 Pa) en el mismo tiempo de reacción, en comparación con ZF. Esto se debe principalmente a la gran diferencia en el peso molecular de estos dos agentes entrecruzantes, ya que en estas condiciones la BIS estaría proporcionando 7.2×10^{-2} moles de grupos vinílicos/mol de VCL, mientras que ZF apenas 9.7×10^{-4} moles de grupos vinílicos/mol de VCL. Además, la BIS es una molécula pequeña que puede difundirse fácilmente y, por lo tanto, podría esperarse una reacción más rápida.

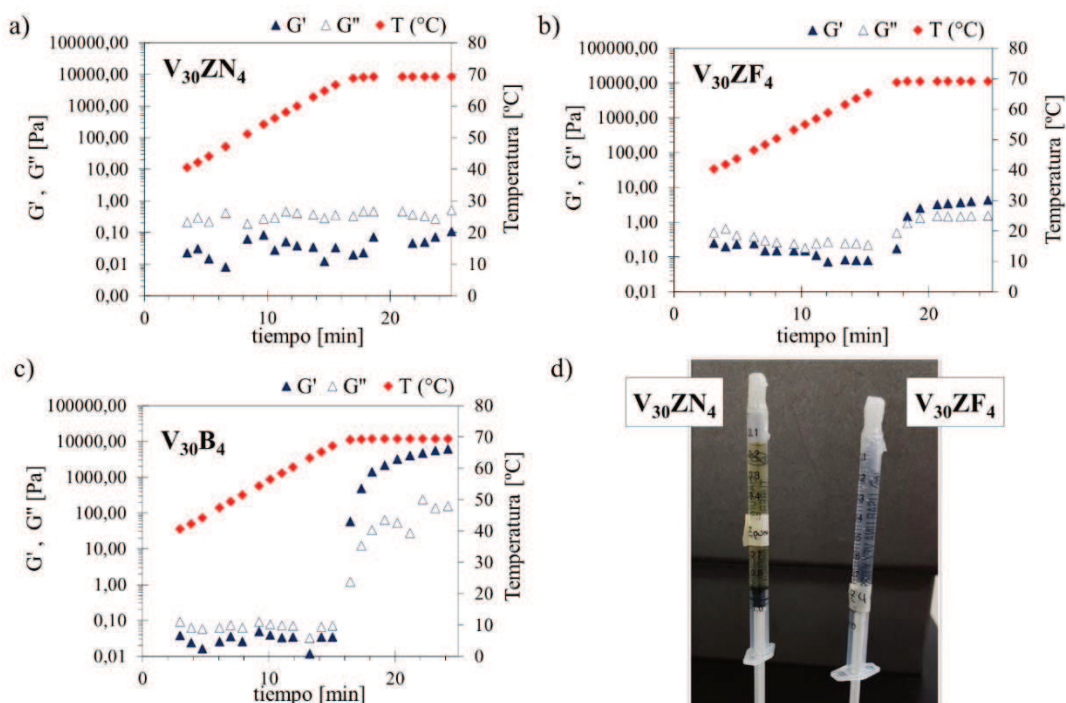


Figura 3.2. Evolución temporal de G' y G'' , para las reacciones con diferentes entrecruzantes: $V_{30}ZN_4$ (a), $V_{30}ZF_4$ (b) y $V_{30}B_4$ (c); y fotografías de las soluciones $V_{30}ZN_4$ y $V_{30}ZF_4$ después de la reacción (d).

En una segunda etapa, se sintetizaron hidrogeles incrementando la concentración de VCL de 30 a 40%, con diferentes concentraciones de ZF ($V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$ y $V_{40}ZF_{10}$ de la Tabla 3.1). Al igual que en el caso anterior, la presencia de ZF cambió el color de una solución amarillenta (antes de la polimerización) a un hidrogel transparente y de color pálido (después de la reacción), lo que indica que la zeína se incorporó molecularmente en la red de PVCL (Figura 3.3a). Cabe destacar que el uso de ZF como macro-reticulador, en estas condiciones permitió obtener hidrogeles con consistencia equivalente a la producida con BIS (Figura 3.2b).

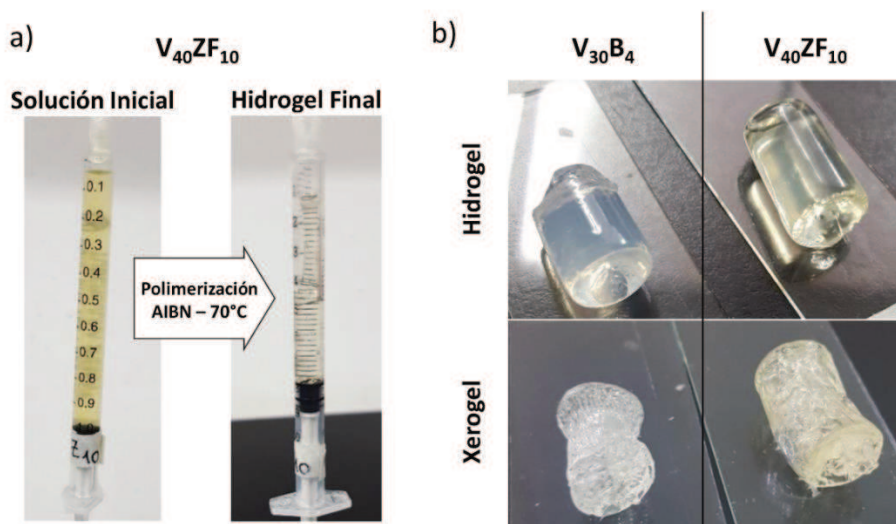


Figura 3.3. Fotos de la solución $V_{40}ZF_{10}$ antes y después de la reacción (a) y del hidrogel y xerogel $V_{30}B_4$ y $V_{40}ZF_{10}$ (b).

Los ensayos reocinéticos de las mezclas de reacción $V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$ y $V_{40}ZF_{10}$ se muestran en la Figura 3.4a-c. Como se puede observar, los tres se convirtieron en materiales con comportamiento de sólidos viscoelásticos, alcanzando un G' superior a G'' antes de la temperatura de reacción (aproximadamente a los 67 °C), lo cual confirma que la gelificación se produjo exitosamente.

La Figura 3.4d muestra que al incrementar el contenido de ZF de 6 a 10%, los geles presentaron un incremento en el valor de G' (354, 765 y 1080 Pa para los geles $V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$ y $V_{40}ZF_{10}$, respectivamente), indicando una mayor rigidez de la estructura de la red, debido al aumento en el grado de reticulación. Estos resultados concuerdan con los reportados por Jin *et al.*¹⁵⁰, donde se

demonstró que la magnitud de G' está directamente relacionada con el número de unidades de reticulación.

Por otro lado, se probó sintetizar un hidrogel con ZN en estas mismas condiciones, es decir con un 40% de VCL y con 6 y 10 % de zeína, $V_{40}ZN_6$ y $V_{40}ZN_{10}$ respectivamente. Como era esperado, y en contraste con los resultados obtenidos para la ZF, la polimerización en presencia de la ZN (no polimerizable) no mostró gelificación durante el proceso. En la Figura 3.5 se demuestra por imagen, para el caso $V_{40}ZN_{10}$, como luego de la polimerización la solución de reacción permaneció líquida.

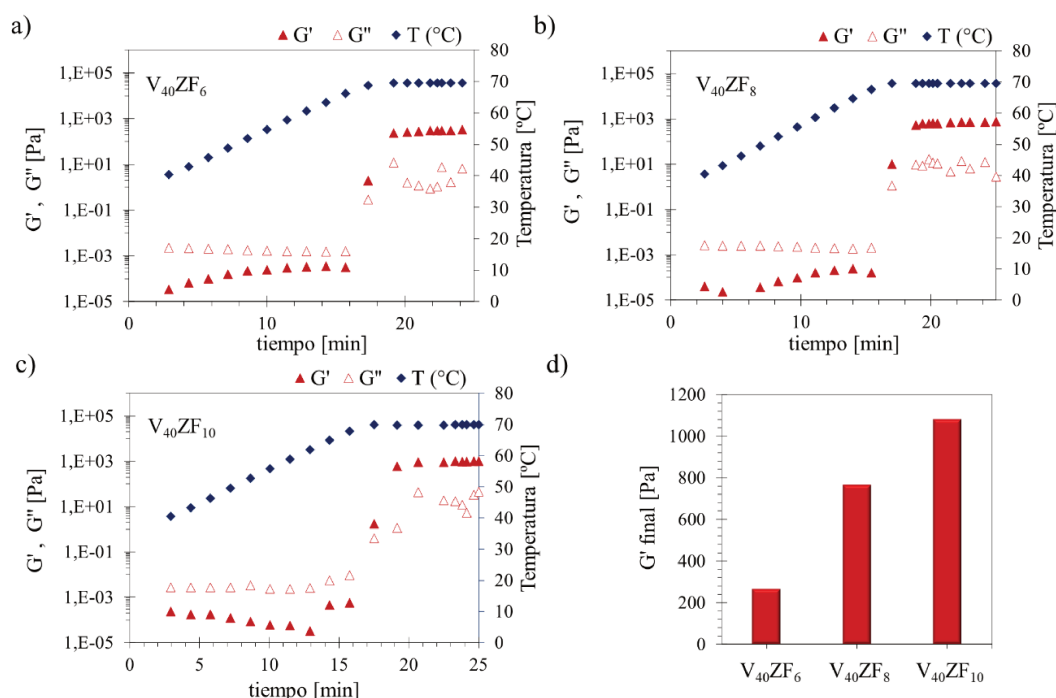


Figura 3.4. Evolución temporal de G' y G'' durante la obtención de $V_{40}ZF_6$ (a), $V_{40}ZF_8$ (b), $V_{40}ZF_{10}$ (c) y la comparación del módulo G' de los hidrogeles luego de la geificación (d).



Figura 3.5. Fotografía del producto de reacción, empleando zeína nativa como agente entrecruzante ($V_{40}ZN_{10}$).

Morfología de los hidrogeles

La morfología de los hidrogeles es un factor clave, ya que el tamaño, el volumen y la estructura de los poros controlan la hinchazón, las propiedades mecánicas, la respuesta térmica y el comportamiento de liberación del fármaco.¹⁵¹

La Figura 3.6 muestra las microestructuras internas de los hidrogeles liofilizados, con sus respectivas distribuciones de tamaño de poro. Los análisis estadísticos del tamaño de poro mostraron que el hidrogel V₄₀ZF₆ presenta el valor de tamaño de poro promedio más alto (45.5 µm) con una distribución más amplia (entre 20-140 µm) debido a su bajo grado de reticulación. En contraste a esto, los hidrogeles V₄₀ZF₈ y V₄₀ZF₁₀ presentaron redes poliméricas más densas, con una microestructura más uniforme, ordenada, y menor tamaño medio de poro (cerca de 15.5 y 12.1 µm, respectivamente). Aunque ambos hidrogeles tienen un tamaño de poro similar, los histogramas de V₄₀ZF₁₀ mostraron una tendencia hacia valores más pequeños.

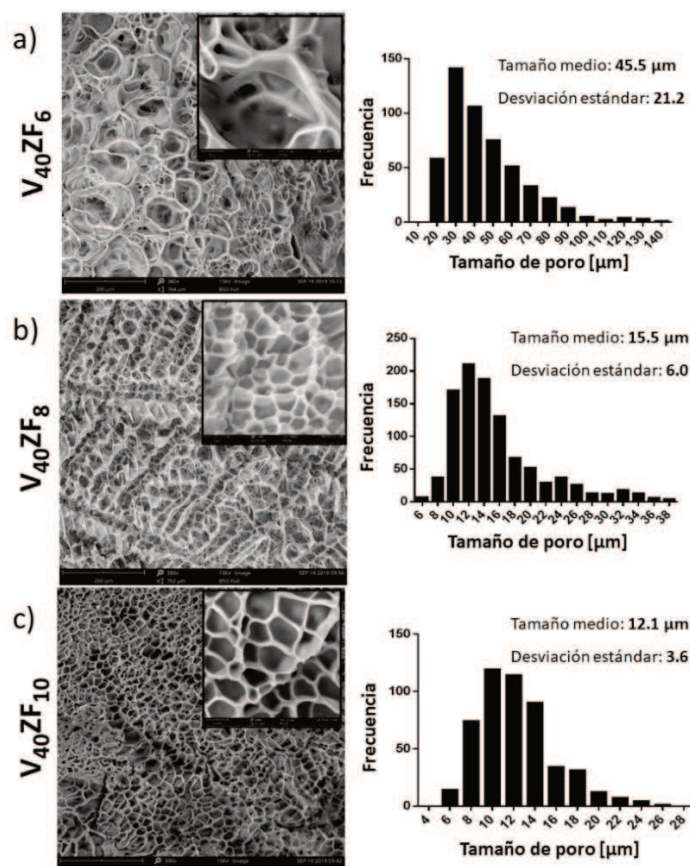


Figura 3.6. Imágenes de SEM 380× (imagen insertada 4400×) del corte de los hidrogeles V₄₀ZF₆ (a), V₄₀ZF₈ (b), y V₄₀ZF₁₀ (c) con sus respectivas distribuciones de tamaño.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los hidrogeles están fuertemente relacionadas con su estructura molecular y densidad de reticulación. Los resultados reocinéticos mostrados en la Figura 3.4 demuestran que los hidrogeles basados en zeína se comportan como materiales de tipo sólido con un módulo elástico predominante. Estas observaciones se limitan a pequeñas deformaciones (0.1%). Para proporcionar una visión más profunda de las respuestas a la deformación de estos hidrogeles, se investigó la compresión axial a una deformación del 25%. Suponiendo a los hidrogeles incompresibles (es decir, su volumen permanece constante durante la prueba), una deformación por compresión del 25% representa una expansión en su diámetro de alrededor del 77%.

Los hidrogeles de PVCL basados en ZF presentaron un comportamiento elástico, es decir, son capaces de resistir grandes deformaciones y recuperar inmediatamente su forma inicial después de la remoción de la carga, manteniendo una evolución no lineal del esfuerzo de compresión versus deformación (Figura 3.7). Los hidrogeles sintetizados con diferentes concentraciones de ZF respondieron elásticamente a la deformación por compresión sin fallar, lo que indica que tienen una buena resistencia mecánica. Además, se pudo observar una fuerte influencia del contenido de ZF sobre la resistencia a la compresión de los hidrogeles. Los hidrogeles con concentraciones de zeína más altas (V_{40ZF_8} y $V_{40ZF_{10}}$) exhibieron mayores resistencias a la deformación, con curvas de tensión-deformación de compresión similares y superior a las observadas para V_{40ZF_6} . Este resultado podría ser consecuencia de que los hidrogeles con mayor contenido de ZF tienen estructuras similares (Figura 3.6), indicando que su resistencia mecánica está relacionada con la densidad de la red.

Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Cao *et al.*¹⁵², quienes observaron que los hidrogeles de poliacrilamida/quitosano modificado resultaron ser extremadamente resistentes, como resultado de que la tensión aplicada podría distribuirse en la microestructura de la red y que éste está fuertemente relacionado al tipo de entrecruzante utilizado. Como es sabido, existen dos

tipos principales de geles, físicos y químicos. Los geles físicos están formados por redes tridimensionales reversibles que se crean por enlaces iónicos, fuerzas de tipo Van der Waals y/o interacciones polares o estéricas; mientras que, por el contrario, los geles químicos son redes estables formadas por enlaces covalentes.^{153,154} En este sentido, la utilización de un macro-entrecruzante como la ZF, podría proporcionar hidrogeles donde las interacciones químicas y físicas ZF-ZF y ZF-PVCL dentro del gel químico ayudan a una mejor distribución de las tensiones en su microestructura de red, mejorando su resistencia mecánica.

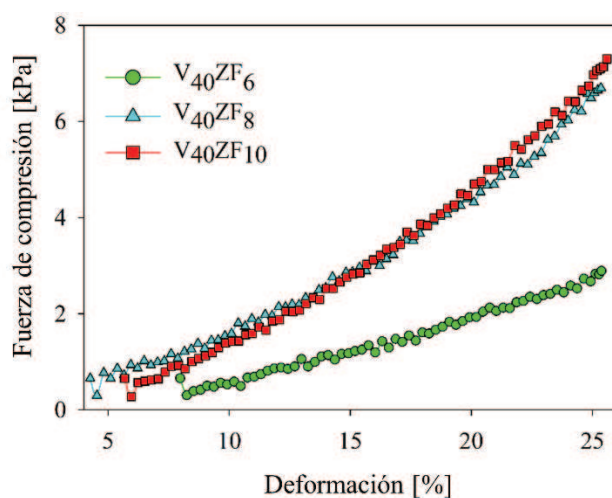


Figura 3.7. Curvas de esfuerzo de compresión para hidrogeles con diferentes concentraciones de ZF. Los primeros puntos de deformación no se muestran debido a que las fuerzas registradas estaban por debajo de la sensibilidad del sensor de la celda de carga.

Dichas interacciones físicas entre PVCL y zeína, pueden confirmarse a partir del estudio de la viscosidad dinámica (η') de una solución de PVCL lineal pura y con el agregado de 2 cantidades diferentes de zeína nativa. Todas las soluciones tienen un contenido de sólidos constante e igual a 20%. De esta manera como se puede observar en la Figura 3.8, las 3 soluciones muestran un comportamiento pseudoplástico, donde la viscosidad disminuye al aumentar la frecuencia, sin embargo, al incorporar un 10 y 20% wbVCL de zeína (PVCL-ZN10 y PVCL-ZN20, respectivamente) se produce un incremento en la η' de la solución, la cual a su vez aumenta al aumentar la concentración de proteína. Teniendo en cuenta que las tres mediciones se realizaron a la misma temperatura y contenido de sólidos, y que se pueden descartar interacciones covalentes

entre ZN y PVCL, el aumento de la η' podría estar asociado a las interacciones secundarias (hidrofóbicas, electrostáticas, interacciones de Van der Waals, entrelazamientos moleculares, entre otros) existentes entre ZN y PVCL, ya que es conocido que las interacciones macromoleculares pueden reducir o incrementar la movilidad molecular y por tanto modificar la resistencia al flujo, controlando así la η' de las soluciones poliméricas.¹⁵⁵

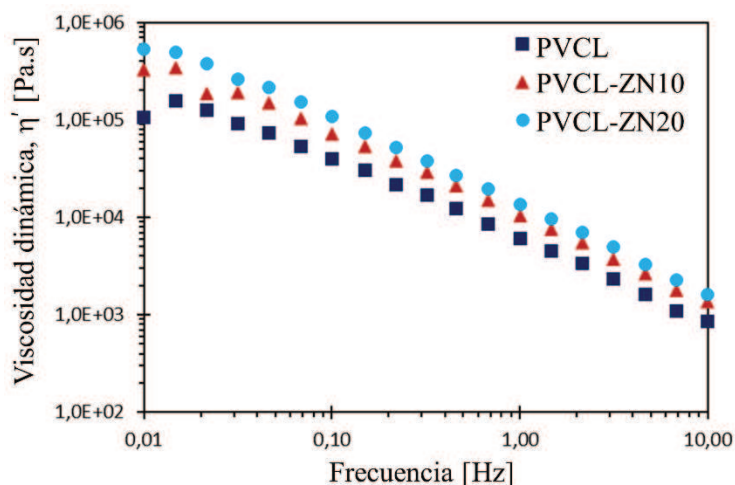


Figura 3.8. Viscosidad dinámica de una solución de PVCL lineal, y su mezcla física con diferentes cantidades de zeína nativa.

Análisis termogravimétrico

La Figura 3.9 muestra los termogramas derivados de TGA obtenidos para los xerogeles basados en ZF, junto a los termogramas del xerogel $V_{30}B_4$ y la ZF pura. Como se puede observar, el xerogel sin zeína ($V_{30}B_4$) presenta una $T_{d,máx}$ cercana a los 434 °C, correspondiente a la descomposición de las cadenas de PVCL.¹⁵⁶ Mientras que los tres xerogeles sintetizados con zeína metacrilada ($V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$ y $V_{40}ZF_{10}$) exhibieron dos picos de degradación, el primero a 325 °C con una fracción de peso perdido baja, que revela la presencia de zeína en la estructura del hidrogel, y una segunda temperatura de degradación térmica con la mayor fracción de pérdida de peso ($T_{d,máx}$ a 434 °C), correspondiente a la degradación de la fase PVCL.

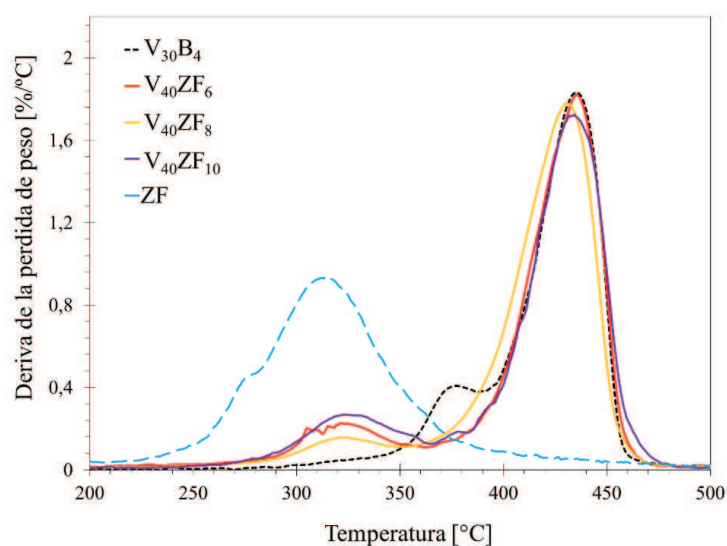


Figura 3.9. Curvas de la derivada de la pérdida de peso de los xerogeles basados en zeína ($V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$, $V_{40}ZF_{10}$), el xerogel sin zeína ($V_{30}B_4$) y la ZF.

Respuesta térmica de los hidrogeles

La respuesta térmica de los hidrogeles está relacionada con la capacidad del material para incorporar y proteger una determinada molécula de carga y luego entregarla mediante una liberación controlada térmicamente. Como es sabido, la PVCL lineal presenta un comportamiento de respuesta térmica de tipo I, donde la temperatura crítica depende del peso molecular del polímero.¹⁵⁷ Esta respuesta térmica se mantiene en los hidrogeles basados en PVCL y debido a la distribución de peso molecular entre los puntos de reticulación presentan un cambio de volumen reversible entre 31 y 38 °C (temperaturas de transición), cercanas a la temperatura fisiológica.^{145,146} La incorporación de zeína metacrilada como macro-entrecruzante de base biológica en la estructura del hidrogel de PVCL no afectó su respuesta térmica, ya que todos los hidrogeles mostraron un cambio en el grado de hinchamiento con la temperatura y un valor de VPTT cercano a 32 °C (Figura 3.10). Los hidrogeles basados en zeína ($V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$ y $V_{40}ZF_{10}$) mostraron una notable capacidad de hinchamiento (indicado por el factor de hinchamiento en peso, ϕ , definido por la ecuación 3.1). Los hidrogeles mostraron su mayor capacidad de hinchamiento por debajo de su VPTT, que disminuyó a medida que aumentaba el contenido de zeína metacrilada. Esto se debe a que un incremento en la densidad de reticulación de la matriz

reduce la capacidad de hinchamiento del hidrogel. Además, el aumento del contenido de ZF aumentó el contenido del carácter hidrófobo del material final, lo que también podría afectar la capacidad de absorción de agua de la matriz. La mayor diferencia se alcanzó a temperatura ambiente (25°C), donde los valores de \emptyset registrados para V₄₀ZF₆, V₄₀ZF₈ y V₄₀ZF₁₀, fueron 957, 658 y 460 %, respectivamente.

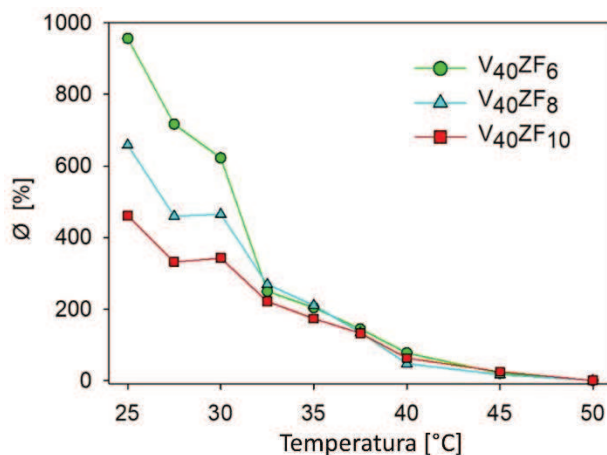


Figura 3.10. Factor de hinchamiento (\emptyset) en función de la temperatura para hidrogeles con diferente contenido de zeína metacrilada como macro-entrecruzante.

Degradación enzimática de los hidrogeles

La degradación del hidrogel con mayor contenido de zeína (V₄₀ZF₁₀) se evaluó a diferentes temperaturas (4, 25 y 37 °C) en soluciones conocidas como fluido intestinal simulado (pH 6.8) con y sin pancreatina (enzimas). Como puede verse en la Figura 3.11, la degradación del hidrogel aumentó significativamente por la presencia de enzimas, evidenciando que la zeína funcionalizada es una parte esencial de la matriz de hidrogel, como agente macro-reticulante. Si bien los hidrogeles mostraron una degradación en ausencia de pancreatina, esta resultó lenta y en ningún caso superó el 30% del peso perdido después de 4 días (pudiendo deberse al ataque microbiano sobre la proteína), la presencia de enzimas promovió una degradación más rápida. Además, a temperaturas por debajo de la VPTT del hidrogel (32 °C), es decir, a 4 y 25°C los hidrogeles se encuentran más hinchados, por lo que se promueve la degradación de la zeína alcanzando la desintegración completa del hidrogel. Por lo contrario, a 37 °C, la degradación es

más lenta debido al colapso del hidrogel, alcanzando bajos valores de degradación incluso en presencia de enzimas. En la Figura 3.11 se agregaron las imágenes de hidrogel (al comienzo del experimento y después de 4 días de degradación), ensayados a 4 °C.

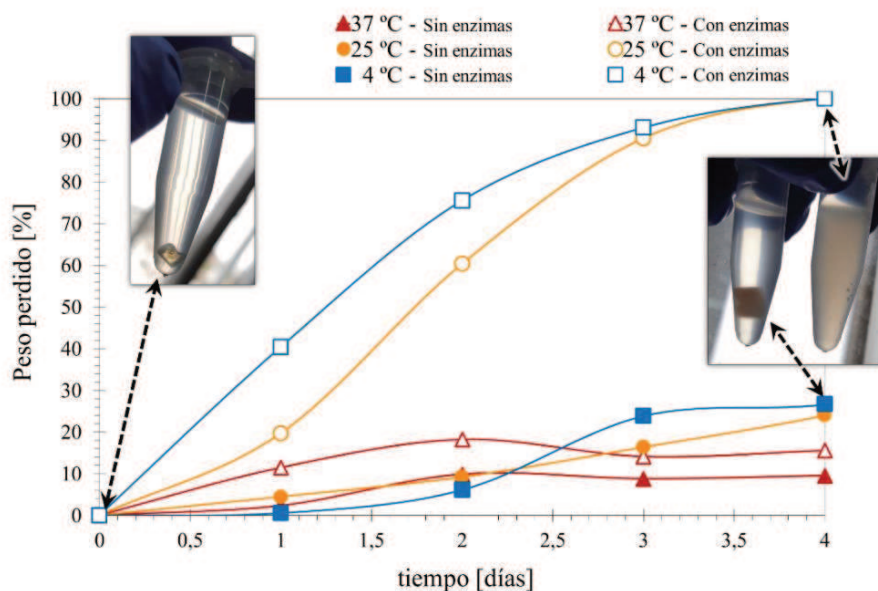


Figura 3.11. Degradación del $V_{40}ZF_{10}$ en fluido intestinal simulado (pH 6.8) con y sin pancreatina, 4, 25 y 37 °C.

Hidrogeles como plataformas de liberación controlada

Se eligió MB como un modelo de fármaco hidrofílico para analizar la eficiencia de carga y liberación de los hidrogeles de zeína-PVCL. Se encontró que la eficiencia de carga disminuyó con el aumento del contenido de ZF, lo que resultó en una carga inicial de 0.46, 0.28 y 0.22 mg MB/mg para $V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$, $V_{40}ZF_{10}$, respectivamente. Estos resultados pueden estar relacionados con la reducción de la capacidad de hinchamiento a medida que aumenta el contenido de ZF (Figura 3.12), ya que la carga del MB se realizó a temperatura ambiente (25 °C).

La Figura 3.12 muestra los perfiles de liberación de MB para los tres sistemas investigados. Como se puede observar, ninguna de las curvas presentó al comienzo una liberación instantánea, debido a las condiciones en las que se realizó el experimento, ya que generalmente este efecto está relacionado con la liberación del fármaco adsorbido sobre la superficie del gel.¹⁵⁸ Los perfiles de liberación para $V_{40}ZF_6$ y $V_{40}ZF_8$ fueron similares a pesar de sus diferencias estructurales,

mientras que $V_{40}ZF_{10}$ mostró una liberación de MB más lenta. En el caso de $V_{40}ZF_{10}$ la mayor concentración de ZF generó un hidrogel con mayor densidad de reticulación (como se mostró en la Figura 3.6), donde el MB (una molécula pequeña) podría ser retenido por la red polimérica con una ruta de difusión más tortuosa, retardando la elución del fármaco y por consiguiente su liberación al medio. Otro factor que podría explicar la lenta liberación de MB, podrían ser las interacciones que probablemente ocurren entre la molécula de carga y la ZF. En la literatura se ha reportado que el MB es capaz de formar interacciones electrostáticas con matrices de hidrogel que contienen grupos carboxílicos.^{159,160} Si bien la zeína contiene este grupo funcional a lo largo de su estructura pudiendo darse esta interacción, presenta una mayor cantidad de grupos hidrófobos en su estructura, por lo que también se esperaría que las interacciones hidrófobas con el MB fueran predominantes.¹⁶¹ Esta hipótesis podría apoyarse con el hecho de que el hidrogel con mayor cantidad de zeína ($V_{40}Z_{10}$) presentó la cinética de liberación más lenta.

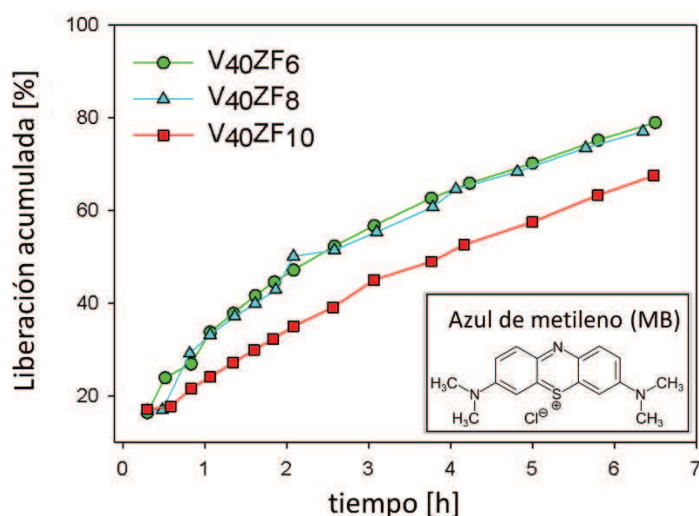


Figura 3.12. Perfil de liberación acumulada de MB para hidrogeles $V_{40}ZF_6$, $V_{40}ZF_8$ y $V_{40}ZF_{10}$.

3.3.2 Comparación del desempeño de los hidrogeles sintetizados con ZF como bio-macro-entrecruzante, respecto a un reticulante de bajo peso molecular

Dado que la zeína metacrilada mostró un excelente desempeño como bio-macro-reticulante, en la siguiente sección de este Capítulo se compara con un reticulante tradicional de bajo peso molecular como la BIS. Para lograr obtener materiales comparables entre sí, se intentó la síntesis de hidrogeles con BIS que presenten el mismo grado de reticulación que los hidrogeles obtenidos

Capítulo 3: Utilización de la zeína metacrilada como macro-entrecruzante, en la síntesis de hidrogeles de con ZF. Para ello, se llevaron a cabo dos polimerizaciones de VCL con BIS, donde el contenido de grupos vinílicos (respecto al contenido de VCL) aportados por la BIS sean iguales a los aportados por la ZF en los experimentos $V_{40}ZF_6$ y $V_{40}ZF_{10}$, respectivamente. Estos materiales se identificaron como $V_{40}B_{0.08}$ y $V_{40}B_{0.13}$, con un contenido de BIS de 0.08 y 0.13% wbv, respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 3.13, en ninguno de estos dos casos se produce la gelificación, lo que indica que el grado de reticulación alcanzado con estas concentraciones de grupos vinílicos no fue suficiente para producir una red polimérica lo suficientemente fuerte como para convertirse en un material estructurado (es decir, un gel). Por lo tanto, este resultado estaría indicando que el macro-entrecruzante de zeína metacrilada contribuye a la estructura de la red por 2 mecanismos. Es decir, además de los entrecruzamientos covalentes producidos por la polimerización de los grupos metacrílicos colgantes de la ZF, también el macro-entrecruzante contribuye con los entrelazamientos físicos e interacciones secundarias, como los enlaces H o interacciones hidrofóbicas a la estructura de la red (Figura 3.14).

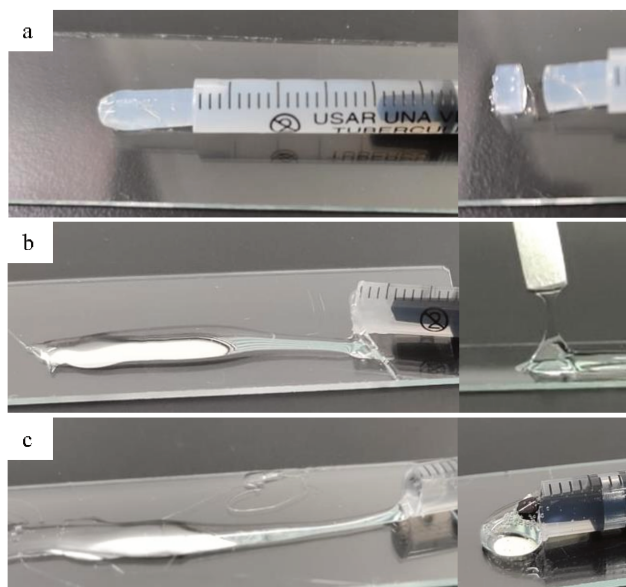


Figura 3.13. Fotos de las mezclas de reacción $V_{30}B_4$ (a), $V_{40}B_{0.08}$ (b) y $V_{40}B_{0.13}$ (c), después de la polimerización.

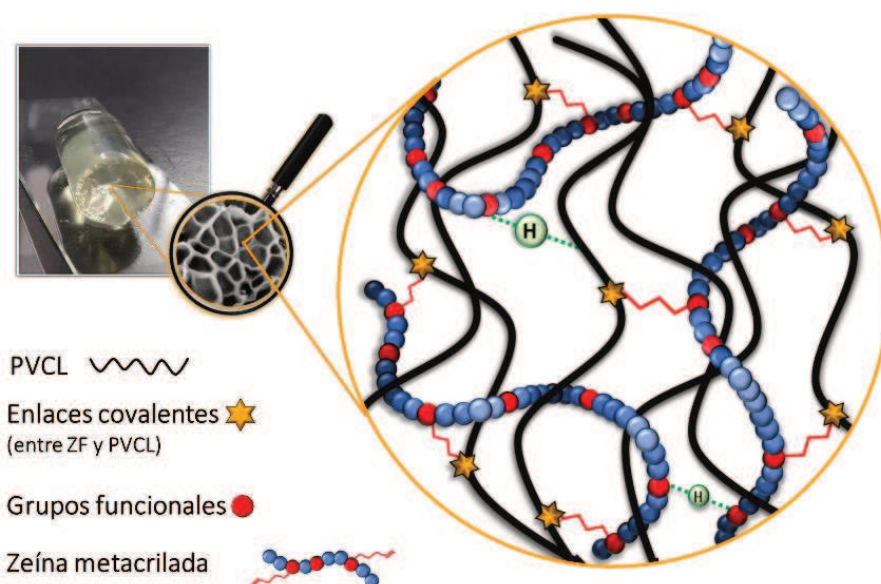


Figura 3.14. Representación esquemática de los hidrogeles basados en ZF como macro-entrecruzante, donde además de los enlaces covalentes PVCL-ZF, podría haber presencia de entrelazamientos físicos e interacciones secundarias PVCL-ZF o ZF-ZF.

En base a los resultados anteriores, en esta sección se presenta una comparación entre los hidrogeles $V_{40}ZF_6$ y $V_{30}B_4$. Aunque la naturaleza de ambos reticulantes es muy diferente y, por tanto, la comparación de los hidrogeles es difícil, se encontraron algunas similitudes en sus desempeños. La Figura 3.15 resume las principales propiedades de los hidrogeles $V_{40}ZF_6$ y $V_{30}B_4$, incluida la morfología, la liberación de MB, la respuesta térmica, la cinética de contracción y las propiedades mecánicas. Como se muestra en la Figura 3.15a, el hidrogel $V_{30}B_4$ presenta una estructura más densa y uniforme, con un tamaño de poro más pequeño ($8.6 \mu\text{m}$), atribuido al alto grado de reticulación, en comparación con el hidrogel $V_{40}ZF_6$ ($45.5 \mu\text{m}$). Como consecuencia de estas diferencias estructurales, la matriz de hidrogel basada en ZF se puede expandir fácilmente, promoviendo tanto el hinchamiento como el colapso del hidrogel. Aunque ambos hidrogeles muestran VPTT cercano a $33 \text{ }^\circ\text{C}$, el hidrogel $V_{40}ZF_6$ presenta una mayor capacidad de absorción de agua que el $V_{30}B_4$ a temperatura ambiente (Figura 3.15b). El hidrogel $V_{40}ZF_6$ mostró una mayor diferencia entre los estados hinchado (25°C) y colapsado (55°C), con un valor del factor de hinchamiento en peso de 957% , en contraste con el hidrogel $V_{30}B_4$ que apenas alcanzó un

valor de 333%. Además, la velocidad de respuesta térmica o cinética de contracción de ambos hidrogeles hidratados se evaluó mediante DSC a diferentes velocidades de calentamiento (0.5, 1, 3 y 5 °C/min) desde 20 °C hasta 70 °C. Los termogramas obtenidos en cada medición se muestran en la Figura 3.16, donde se puede observar como el VPTT se desplaza a valores más altos de temperatura al incrementar la velocidad de calentamiento. La aparición de este pico endotérmico durante la transición de fase volumétrica de las redes, se debe a la ruptura de los puentes de hidrógeno formados entre la PVCL y el agua atrapada en la matriz del hidrogel.¹⁶² Empleando DSC, se obtuvieron las gráficas de VPTT en función de la velocidad de calentamiento (Figura 3.15c y Figura 3.16), que permitieron observar que $V_{30}B_4$ presenta una menor sensibilidad térmica, con un valor de pendiente de 1.19 min, respecto a los 0.83 min para $V_{40}ZF_6$. Estos resultados sugieren que $V_{40}ZF_6$ muestra una respuesta a los cambios de temperatura más rápida que $V_{30}B_4$, lo que podría estar asociado con las diferencias estructurales entre ambos hidrogeles.

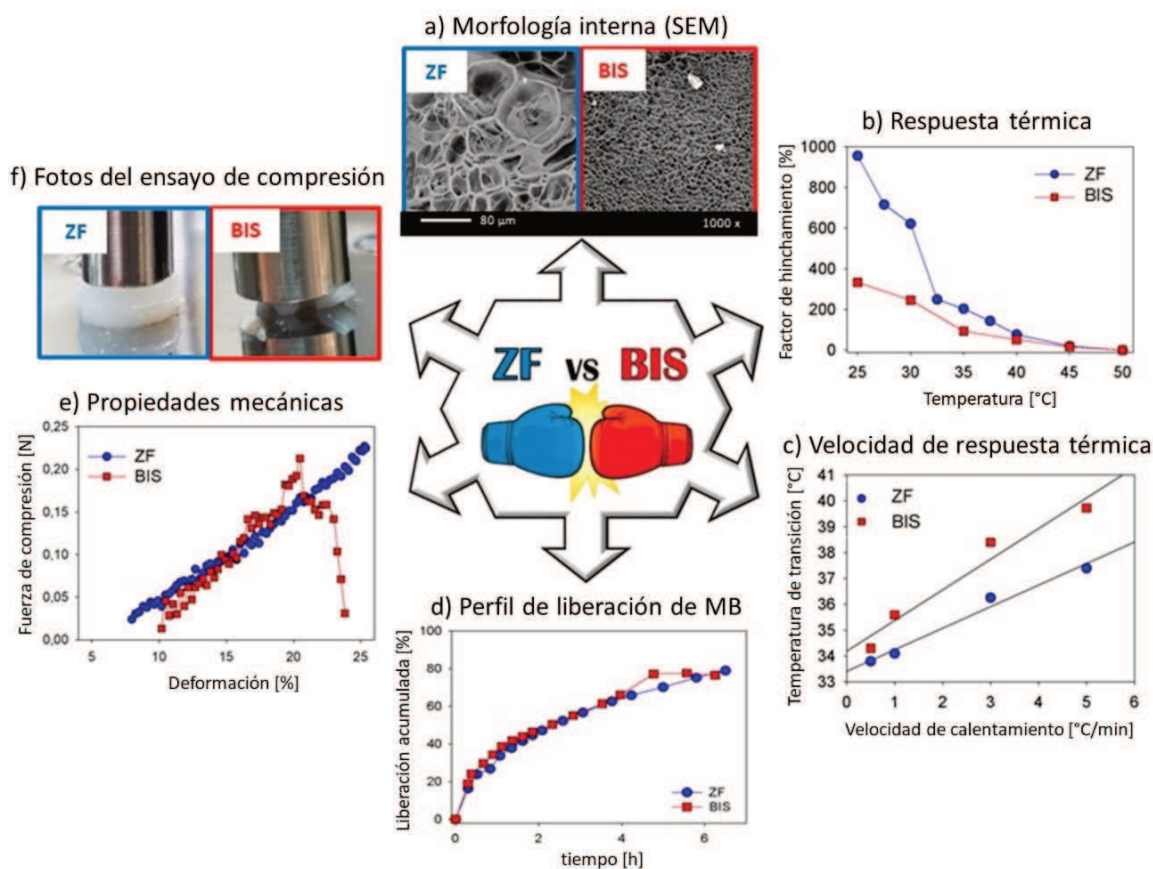


Figura 3.15. Desempeño de los hidrogeles de PVCL con ZF como macro-entrecruzante de base biológica ($V_{40}ZF_6$) y BIS como reticulante de bajo peso molecular ($V_{30}B_4$).

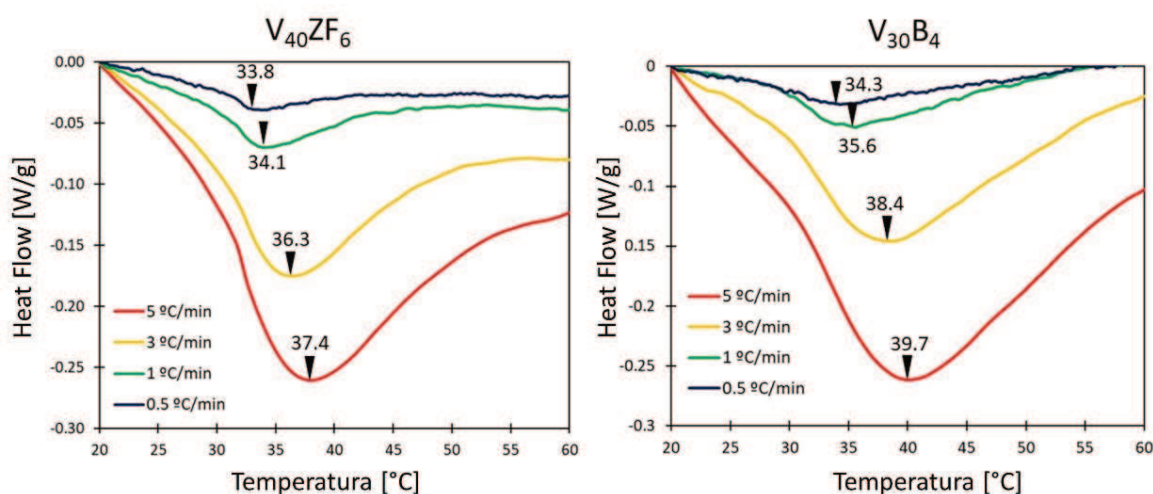


Figura 3.16. Termogramas de DSC obtenidos al aplicar diferentes velocidades de calentamiento (0.5, 1, 3 y 5 °C/min), para los hidrogeles V₄₀ZF₆ y V₃₀B₄.

La Figura 3.15d muestra los perfiles de liberación de MB para ambos sistemas a 37 °C. Contrario a lo esperado, ambos hidrogeles mostraron un comportamiento similar tanto en la eficiencia de carga del fármaco (0.47 mg MB/mg para V₄₀ZF₆ y 0.46 mg MB/mg para V₃₀B₄) como en el perfil de liberación de MB, a pesar de la notable diferencia que existe en su capacidad de hinchamiento. Una posible explicación de este comportamiento podría ser que las interacciones hidrófobas de MB con los diferentes grupos hidrófobos presentes en los aminoácidos que conforman la estructura de la zeína, retardan la elución del fármaco y por lo tanto, su liberación al medio.

Por otro lado, la contribución de las interacciones físicas ZF-ZF y ZF-PVCL (diferentes a los enlaces covalentes), también se observa en las propiedades mecánicas de los hidrogeles de ZF-VCL. Como se puede ver en las Figuras 3.15e, ambos hidrogeles presentan curvas de compresión similares; sin embargo, bajo las condiciones ensayadas, el hidrogel sintetizado con el reticulante de bajo peso molecular (V₃₀B₄) falla antes de alcanzar el 25% de deformación (Figura 3.15f), en contraste con el hidrogel V₄₀ZF₆, que se deforma elásticamente sin daños estructurales y recuperando sus dimensiones iniciales una vez suprimido el esfuerzo de compresión. Las interacciones no covalentes reversibles (como los entrelazamientos físicos, puente H,

interacciones electrostáticas o hidrofóbicas) presentada en hidrogeles con macro-entrecruzante a base de zeína pueden contribuir dinámicamente absorbiendo y distribuyendo la energía de deformación, mejorando su resistencia mecánica.¹⁶³

3.4. CONCLUSIONES

La zeína metacrilada obtenida por funcionalización con GMA resultó ser un producto con características que permiten su incorporación en la síntesis de diferentes materiales, como *films* de proteína pura curados por UV, y compuestos híbridos como los hidrogeles ZF-PVCL.

En una primera etapa se demostró que fue posible obtener hidrogeles basados en zeína metacrilada como macro-entrecruzante y se encontraron las mejores condiciones para la obtención de los hidrogeles, descartando la posibilidad de sintetizar geles a partir de zeína nativa. Es importante destacar que el uso de ZF como bio-macro-entrecruzante no afectó la respuesta térmica de los hidrogeles de PVCL, presentando temperaturas de transición cercanas a la temperatura fisiológica (32 °C), lo cual hace de este un material interesante para su aplicación biomédica.

Además, con el incremento del contenido de ZF se obtuvieron hidrogeles que presentaron diferentes morfologías internas, variando tanto el tamaño, distribución y estructura de los poros. De esta manera, se puede obtener un hidrogel de bajo grado de entrecruzamiento con una morfología irregular y un tamaño medio de poro de 45 μm para $V_{40}\text{ZF}_6$, o un hidrogel de estructura interna compacta y homogénea con un tamaño medio de poro de 12 μm para $V_{40}\text{ZF}_{10}$. Esta diferencia en la morfología interna, le otorga al material diferentes propiedades; así por ejemplo incrementando el grado de entrecruzamiento (incorporando más zeína, como en $V_{40}\text{ZF}_{10}$) se obtiene un hidrogel más resistente a la deformación y con un perfil de liberación de MB más lento y controlado, que los hidrogeles con menor contenido de zeína.

Por último, se demostró los beneficios del empleo de macro-reticulantes basados en zeína metacrilada. Bajo las mismas condiciones (14.5×10^{-4} moles de grupos vinílicos aportados por el

agente entrecruzante por mol de VCL) el uso de ZF permitió sintetizar un hidrogel; mientras que con un entrecruzante de baja masa molar, la cantidad de interacciones covalentes no fue suficiente para formar una red estructural que dé lugar a un gel. Esto demuestra la importancia de las interacciones secundarias (no covalentes) que se generan entre la ZF-PVCL y ZF-ZF a través de los múltiples grupos químicos presentes en la estructura natural de la proteína. Además, el uso de un macro-entrecruzante como la ZF, mejora ampliamente el grado de hinchamiento alcanzado y la resistencia mecánica del hidrogel, a la vez que incrementa la velocidad de respuesta térmica (cinética de contracción) del material.

El desempeño distinguido mostrado por los hidrogeles a base de zeína metacrilada aquí sintetizados, los convierte en un material prometedor para la administración oral de elementos dietéticos, donde su carga está protegida de la posible degradación hasta su liberación.

CAPÍTULO 4: INCORPORACIÓN DE MONÓMEROS BIODERIVADOS EN LA SÍNTESIS DE LÁTEX BASADOS EN CASEÍNA^d

4.1. INTRODUCCIÓN

Las crecientes preocupaciones por la salud y el medio ambiente dentro de la industria de los polímeros han obligado a los sectores académico e industrial a cambiar hacia sistemas más sustentables, ecológicos y energéticamente eficientes.¹ Si bien los procesos a base de agua, como la polimerización en emulsión, permiten producir materiales poliméricos con baja emisión de solventes, para reducir la huella de carbono de los productos poliméricos, aún sigue siendo necesario reemplazar las materias primas derivadas del petróleo por reactivos de base natural.^{3,4,164}

En este contexto, la síntesis de materiales híbridos a base de proteínas, como caseína, zeína, y colágeno, brindan varias ventajas como excelente biodegradabilidad y baja toxicidad, y en ocasiones se pueden obtener como subproducto de otras industrias, lo que favorece la economía circular.^{1,24} Además, debido a la presencia de diferentes aminoácidos en la estructura de las proteínas, que presentan diferentes grupos funcionales como -NH₃, -NH₂, -SH y -COOH, las proteínas son fácilmente modificadas químicamente, para mejorar sus propiedades u obtener un “bloque de construcción” reactivo.^{1-3,112}

Más específicamente, la caseína (proteína de la leche), ha sido ampliamente estudiada para la obtención de recubrimientos a base de agua, mediante la síntesis de partículas híbridas acrílicas/caseína. Para ello, se ha combinado caseína nativa (CN) con diferentes monómeros acrílicos derivados del petróleo, como ácido acrílico, metacrilato de metilo y acrilato de butilo.^{22,36,165} La presencia de lisina en la estructura de la caseína, le otorga a la misma grupos

^d Los resultados presentados en este capítulo fueron obtenidos en el marco de una estancia de investigación en el instituto POLYMAT de la Universidad del País Vasco (San Sebastián, España) y en colaboración con el Prof. Jose Ramon Leiza. Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en Allasia *et al.*, *Progress in Organic Coatings* (2022)

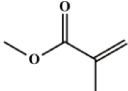
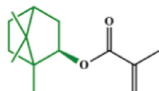
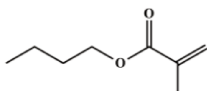
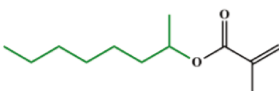
amino, a través de los cuales es posible su modificación química de manera sencilla, posibilitando la incorporación de enlaces vinílicos. La metacrilación de la caseína ha permitido obtener una proteína que actúa como un emulsificante (debido a su carácter anfifílico) y que es capaz de polimerizar radicalariamente (comportándose como un *surfmer*). Debido a esto, es posible sintetizar látex híbridos libres de emulsificantes convencionales, y que posean una alta compatibilización entre las fases acrílica y proteica, las que permanecen unidas covalentemente.⁴⁰ En este contexto, la caseína funcionalizada (CF) le proporciona ventajas al polímero híbrido, como buenas propiedades mecánicas, dureza y biodegradabilidad parcial, aunque la resistencia al agua de estos materiales sigue siendo una limitación para su aplicación como recubrimiento. En consecuencia, el contenido óptimo de proteína resulta bajo en comparación con el contenido de acrílico, alcanzando valores entre 20-33% de biomaterial en el polímero final.^{39,40} Por lo tanto, una alternativa prometedora para aumentar el contenido de biomateriales, sería el uso de monómeros provenientes de fuentes renovables o monómeros bioderivados.

Si bien en la última década la mayoría de los monómeros de base natural se han utilizado para producir polímeros termoendurecibles (poliepóxidos o poliuretanos) o termoplásticos (poliésteres o poliamidas), donde su principal método de reacción se basaba en la polimerización en masa o en solución,^{12,166,167} en la actualidad existen nuevos monómeros biobasados, diseñados para polimerizar radicalariamente en medio disperso acuoso (suspensión, emulsión y miniemulsión).^{12,168} En este sentido, los monómeros bioderivados más empleados, se obtienen a través de la acrilación o metacrilación de aceites vegetales (como aceite de ricino, de soja, de oliva), ácidos grasos (ácido oleico, linoleico, erúcico, etc), resina de pino (metacrilato de isobornilo) o glucosa (monometacrilato de isosorbida), entre otros. Estos monómeros se han propuesto como alternativa para reemplazar los monómeros a base de petróleo, tales como el estireno, ésteres de ácido (met)acrílico (por ejemplo, acrilato de 2-etilhexilo, acrilato de butilo, metacrilato de metilo), en la síntesis de recubrimientos (recubrimientos de interior, acabados en madera) y adhesivos sensibles a la presión.^{12,84,85,93,164,168,172,173} Además, en la literatura existen

múltiples monómeros bioderivados reportados, empleados en el desarrollo de materiales biomédicos.^{79,81,174}

En el presente Capítulo se estudió la síntesis de látex híbridos basados en caseína funcionalizada, mediante una polimerización en emulsión batch, incrementando el contenido final de materiales de origen natural, al sustituir los monómeros obtenidos del petróleo por monómeros bioderivados. De esta manera, se investigó la sustitución del metacrilato de metilo (MMA) y del acrilato de n-butilo (BA), empleando dos monómeros biobasados, el metacrilato de isobornilo (IBOMA) y el acrilato de 2-octilo (OA), derivados de la resina de pino y del aceite de ricino, respectivamente.⁷ En la Tabla 4.1 se resumen las características principales de los 4 monómeros empleados. En función de ellas, la sustitución se llevó a cabo de acuerdo a la similitud de las Tg de los homopolímeros, de manera que para reemplazar el BA se empleó OA, y para sustituir el MMA se utilizó el IBOMA. Los látex híbridos basados en caseína se sintetizaron empleando diferentes mezclas de estos monómeros persiguiendo maximizar el contenido final de biomaterial.

Tabla 4.1. Comparación de los monómeros convencionales y de los monómeros derivados de fuentes naturales.

	Monómeros convencionales	Monómeros derivados de fuentes naturales
Nombre	metacrilato de metilo (MMA)	metacrilato de isobornilo (IBOMA)
Origen	petróleo	resina de pino
Fracción natural	0 %	71 %
Estructura molecular		
Peso molecular	100.1 g/mol	222.3 g/mol
Tg del homopolímero	105 °C	150 °C
Solubilidad en agua	1.53 x 10 ⁻¹ mol/L (25 °C)	2.45 x 10 ⁻⁵ mol/L (20 °C)
Nombre	acrilato de n-butilo (BA)	acrilato de 2-octilo (OA)
Origen	petróleo	aceite de ricino
Fracción natural	0 %	73 %
Estructura molecular		
Peso molecular	128.17 g/mol	194.3 g/mol
Tg del homopolímero	-54 °C	-44 °C
Solubilidad en agua	1.09 x 10 ⁻² mol/L (20 °C)	5.15 x 10 ⁻³ mol/L (20 °C)

Se evaluó el efecto de la formulación de monómeros sobre la cinética de polimerización y el mecanismo de nucleación de partículas, y sobre las propiedades más relevantes de las películas formadas, como la resistencia al agua, la biodegradabilidad y las propiedades mecánicas.

4.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

La descripción detallada de los materiales, la especificación de los equipos, y los métodos de síntesis y caracterización empleados a lo largo del trabajo experimental de esta Tesis, se presenta en el Anexo. Por esta razón, a continuación, se hará referencia sólo a los aspectos del trabajo experimental que se aplican específicamente a este capítulo.

Debido a que estos monómeros tienen características y solubilidades en las fases diferentes a los convencionalmente empleados (MMA y BA), se comenzó este trabajo con una primera etapa donde se estudió la síntesis de látex híbridos incorporando únicamente los monómeros biobasados y empleando caseína nativa (CN) o funcionalizada (CF) como emulsificante. Se evaluó la conversión y el mecanismo de nucleación, durante la polimerización en emulsión. En una etapa posterior, se estudió la síntesis de látex híbridos obtenidos con diferentes mezclas de OA, IBOMA, BA y MMA, con el propósito de maximizar la fracción de origen natural en el látex final, a elevadas velocidades de reacción y conversiones finales. Finalmente, se caracterizaron los principales materiales obtenidos.

Los códigos de los látex presentados, contienen la información de su composición mediante las abreviaciones empleadas para cada monómero (OA, IBOMA, BA y MMA) y “CN o CF”, para indicar caseína nativa o funcionalizada, respectivamente. Por ejemplo, CN-OA/IBOMA se refiere a un látex basado en caseína nativa y que contiene ambos monómeros bioderivados.

4.2.1. Síntesis de látex híbridos acrílico/proteínas

Los látex híbridos se sintetizaron por polimerización en emulsión batch, incorporando un 25% wbm (peso respecto a los monómeros) de caseína metacrilada, obtenida previamente de acuerdo

a la técnica mencionada en la sección 1.2.1 del Capítulo 1 de esta Tesis,³⁶ excepto para el látex CN-OA/IBOMA para el cual se utilizó caseína nativa, y el látex OA/IBOMA sintetizado sin proteínas (utilizado como látex de referencia). Para este último caso, se adicionó 1% de Dowfax 2A1 como emulsificante para reemplazar la caseína, y TBHP-FF7 como par iniciador redox, para reemplazar el TBHP/NH₃-caseína. En todos los casos, la mezcla de monómeros fue preparada para obtener una Tg teórica de la fase acrílica de los nanocompuestos igual a -10°C, de acuerdo a la clásica ecuación de Fox (1956)¹⁷⁵. La Tabla 4.2 muestra la composición de la mezcla de monómeros para cada experimento y el emulsificante utilizado.

Tabla 4.2. Composición general de la mezcla de monómeros ($T_g \approx -10$ °C) y emulsificante empleado en cada experimento.

Experimentos	Emulsificante	Composición monomérica (%)				
		OA	IBOMA	MMA	BA	
OA/IBOMA	Dowfax 2A1	72	28	-	-	
CN-OA/IBOMA	CN	72	28	-	-	
CF-OA/IBOMA	CF	72	28	-	-	
CF-OA/MMA	CF	67	-	33	-	
CF-BA/IBOMA	CF	-	35	-	65	
CF-BA/MMA	CF	-	-	40	60	
CF-OA/IBOMA/...	MMA_0	CF	72	28	0	-
	MMA_1	CF	72	27	1	-
	MMA_3	CF	72	25	3	-
	MMA_4	CF	72	24	4	-
	MMA_5	CF	72	23	5	-

Las polimerizaciones batch se llevaron a cabo en un reactor encamisado de 500 ml equipado con baño termostático, agitador mecánico, condensador de reflujo, termómetro digital, entrada de N₂ y acceso para el muestreo. Para esto, se cargó la solución de la caseína metacrilada, se elevó su temperatura hasta los 80 °C, y se purgó con N₂ durante 30 minutos. Luego, se añadió la mezcla de monómeros y se esperó a que llegara nuevamente a la temperatura de reacción antes de inyectar el TBHP. La Tabla 4.3 presenta una receta general para la síntesis de un látex híbrido.

Tabla 4.3. Receta general para la síntesis de los látex híbridos mediante la polimerización en emulsión batch

Reactivos	Cantidades (% wbm ^a)
Mezcla de monómeros	100
Caseína	25
TBHP	0.17
Na ₂ CO ₃	0.9
H ₂ O	225

^a wbm: peso en base a la mezcla de monómeros

4.2.2. Caracterización de los látex híbridos Acrílico/Proteínas

La conversión de monómeros en el tiempo (x) se determinó gravimétricamente y se calculó como la relación en peso entre el polímero acrílico y la cantidad inicial de monómeros en la receta. El diámetro medio de las partículas (Dp) se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) a 25 °C, utilizando un equipo Nanosizer de Malvern. La fracción de proteína libre (FP) se determinó por espectroscopía UV en un espectrofotómetro UV-Visible Lambda 25 de Perkin-Elmer, combinando el área del pico a 280 nm obtenido para las muestras, con una curva de calibración preparada con diferentes concentraciones de caseína. El procedimiento de separación de la proteína libre está detallado en la sección A.4.3 del Anexo.³⁶ Brevemente, este método involucra ciclos de centrifugación y redispersión del látex con agua desionizada y luego con una solución SLS, con el objetivo de separar la caseína que permanece soluble o adsorbida sobre las partículas (proteína no injertada, es decir, la caseína que no forma parte de las partículas híbridas).

4.2.3. Caracterización de las películas

Las películas híbridas se obtuvieron secando los látex en molde de silicona, a 22 °C y 55% de HR durante una semana.

La temperatura mínima de formación de *film* (MFFT) de los látex se midió con el método óptico⁹⁸ previamente empleado. Para ello, se aplica una delgada capa de látex (120 μm de espesor húmedo) sobre una placa metálica en la que se aplica un gradiente de temperatura (2-40 °C).

Luego, se deja secar para obtener el *film*, determinando el valor MFFT como la temperatura a la cual se observa la transición en la transparencia del *film*.

La determinación de las transiciones vítreas (T_g) de los materiales híbridos, se obtuvo mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando el equipo Q2000 (TA Instruments). Los DSC se llevaron a cabo desde -80 a 130 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. A cada muestra se le aplicó tres ciclos de temperatura (calentamiento-enfriamiento-calentamiento) y se determinó su T_g durante el segundo ciclo de calentamiento, adoptando la temperatura del punto máximo en la derivada del cambio de capacidad calorífica.

La fracción insoluble (IF) contenida en los materiales híbridos se determinó mediante extracción soxhlet con THF durante 24 h. Cabe señalar que el IF podría estar constituida por el gel acrílico, el copolímero acrílico-proteína injertada y la proteína libre, que también es insoluble en THF.

Los ensayos mecánicos de tracción se realizaron sobre 5 muestras cortadas en forma de mancuerna, según lo especificado en la norma ASTM D882. La prueba se llevó a cabo en una máquina universal de ensayos (INSTRON 3344), a 23 °C y 50% de HR, aplicando una velocidad de deformación constante de 25 mm/min.

Además, se llevaron a cabo pruebas de resistencia al agua y al disolvente orgánico (metiletil cetona, MEK) sobre muestras de *films* de 1 mm de espesor y 10 mm de diámetro. Las muestras se sumergieron en los distintos solventes (agua o MEK) a temperatura ambiente durante 8 horas. A lo largo de la prueba, las muestras se retiraron del solvente, se secaron cuidadosamente, se pesaron e inmediatamente se sumergieron nuevamente. La absorción de agua y MEK (A_w y A_s , respectivamente) se reportó como el porcentaje de la masa de solvente absorbido, respecto al peso inicial del *film* seco. Además, se midió el ángulo de contacto estático (CA) del agua sobre las superficies de la película. A tal efecto, se formaron *films* de 120 μm (espesor húmedo) sobre una placa de vidrio y se secaron a temperatura ambiente durante la noche. Luego, se depositaron gotas de agua destilada (23 μl) sobre la superficie de las películas. Los CA se obtuvieron mediante el

método LBADSA implementado en un software de ImageJ.¹⁷⁶ Para cada muestra, el CA promedio se informó a partir de diez mediciones.

Por último, se investigó la capacidad de biodegradación de los materiales híbridos en condiciones de compostaje. Para esto, los *films* (10 mm de diámetro y 1 mm de espesor) fueron enterrados en un compost orgánico comercial con un 55% de humedad, y se mantuvieron a 30 °C durante 30 y 60 días. Transcurrido el tiempo, las muestras se retiraron, se limpiaron cuidadosamente y se secaron en estufa a 70 °C. La biodegradabilidad se reportó como la pérdida de peso registrada, respecto al contenido inicial de proteína en el *film* seco (parte degradable de las películas).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las diferentes polimerizaciones batch exploradas. La investigación involucra la síntesis de látex híbridos libres de emulsificantes convencionales y con un alto contenido de materiales provenientes de fuentes naturales. En este sentido, se sintetizaron látex con 25% de caseína, incorporando OA e IBOMA para incrementar el contenido total de origen natural en el material final. En una primera etapa del trabajo, se estudió la síntesis del látex de acrílico puro empleando únicamente los monómeros bioderivados; y los correspondientes látex híbridos empleando caseína nativa o funcionalizada como emulsificantes, con el objetivo de evaluar el mecanismo de nucleación en la polimerización en emulsión. En una etapa posterior, se estudió la síntesis de látex híbridos obtenidos empleando diferentes mezclas de monómeros bioderivados con los monómeros derivados del petróleo, intentando obtener el mayor contenido de base natural en el látex final, a una conversión elevada. Finalmente, se caracterizaron los principales materiales obtenidos.

4.3.1. Copolimerización en emulsión de OA y IBOMA, empleando caseína nativa o funcionalizada como emulsificante.

En la Tabla 4.4 se muestran la fracción de base natural para cada látex, junto a los resultados de x , Dp y FP de las polimerizaciones en emulsión investigadas, mientras que en la Figura 4.1 se representa la evolución de la conversión a lo largo de las polimerizaciones.

Tabla 4.4. Resultados de las polimerizaciones en emulsión de los monómeros bioderivados (OA/IBOMA = 72/28) en presencia de caseína nativa o funcionalizada.

Experimentos	Caseína	Fracción natural ^a (%)	x (%)	Dp (nm)	FP (%)
OA/IBOMA	-	72.4	90	142	-
CN-OA/IBOMA	Nativa	78.0	96	126	74.3 ±0.8
CF-OA/IBOMA	Funcionalizada	78.0	3	-	-

^a Calculado a partir de la receta teórica.

Como se puede ver en la Figura 4.1, existe una gran diferencia cuando se emplea caseína nativa o funcionalizada. Si bien la polimerización batch en emulsión de OA e IBOMA ocurrió cuando se utilizó Dowfax 2A1 y caseína nativa (experimentos OA/IBOMA y CN-OA/IBOMA, respectivamente) alcanzando altas conversiones (90 y 96%, respectivamente), cuando se utilizó caseína funcionalizada como emulsificante la polimerización no procedió.

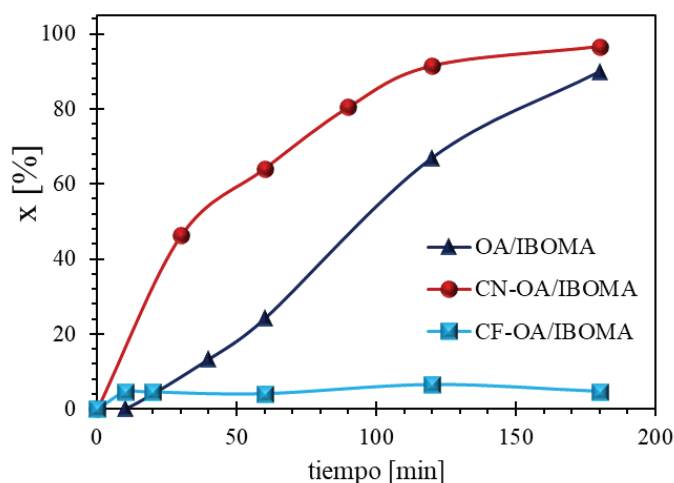


Figura 4.1. Conversión de monómeros obtenida en la polimerización en emulsión de monómeros bioderivados (OA/IBOMA = 72/28) en presencia de caseína nativa o funcionalizada, en comparación con el experimento libre de proteína.

Para comprender a que puede deberse esta diferencia, es necesario entender como es el mecanismo de nucleación de las partículas híbridas, durante la polimerización en emulsión. De acuerdo al mecanismo de nucleación sugerido por Li *et al.*³⁵ y extendido por Picchio *et al.*¹⁶⁵ (detallado en la sección 1.2 del Capítulo 1), antes de iniciar la polimerización, el sistema de reacción está compuesto por caseína (disuelta en la fase acuosa y formando micelas) y monómeros (en forma de gotas, parcialmente solubilizado en la fase acuosa e hinchando el interior hidrófobo de las micelas de caseína). Una vez incorporado el iniciador (TBHP) al sistema, se produce la reacción redox con los grupos amino de la caseína, formando dos especies propagantes (radicales amino y tert-butoxi), que darán comienzo a la nucleación de las partículas. Los autores proponen tres posibles mecanismos de nucleación (Figura 1.2 del Capítulo 1), dos de los cuales implican la reacción de los radicales con el monómero disponible el agua (mecanismos I y II de la Figura 1.2, Capítulo 1), mientras que el último implica la migración del radical hidrófobo tert-butoxi dentro de las micelas de proteínas hinchadas en monómero (mecanismo III, Figura 1.2, Capítulo 1), concluyendo que los principales mecanismos de nucleación para obtener partículas híbridas son el I y II, los cuales dependen de la concentración de la caseína utilizada. Sin embargo, es importante considerar que este estudio se llevó a cabo para un sistema basado en caseína nativa y MMA (monómero una solubilidad en agua superior a las de los monómeros bioderivados, Tabla 4.1), por lo que la incorporación de caseína metacrilada o de monómeros con menor solubilidad en agua podría afectar el mecanismo de nucleación seguido. Por lo tanto, debido a que las solubilidades en agua del OA y del IBOMA son varios ordenes de magnitud inferiores a la del MMA (Tabla 4.1), es de esperar que los mecanismos de nucleación I y II ocurran en menor medida, quedando la nucleación micelar (mecanismo III) como la vía más probable para la nucleación de las partículas en los látex OA/IBOMA y CN-OA/IBOMA.

Contrario a lo esperado, para el caso donde se empleó caseína funcionalizada (CF-OA/IBOMA), la polimerización no prospero (Figura 4.1). Esto podría estar indicando que la metacrilación de la proteína afecta su capacidad emulsificante; sin embargo, como se demuestra

en la Figura 1.3 y en la Tabla 1.2 (sección 1.2.1, del Capítulo 1), la adición de 8 grupos vinílicos por mol de caseína afectó levemente su capacidad emulsificante, reduciendo la concentración micelar crítica (CMC) de 0.083 a 0.059 mg/ml cuando se pasa de CN a CF. Es decir, tanto la caseína nativa como la funcionalizada se encuentran formando micelas en las emulsiones empleadas para la polimerización. En este contexto, la principal diferencia entre la CN y la CF son los grupos vinílicos que esta última posee en su estructura, los cuales podrían estar actuando como sumideros de radicales, impidiendo que el radical tert-butoxi (hidrófobo) ingrese dentro de las micelas. Además, la concentración de los radicales tert-butoxi (8.13×10^{-3} mol/L agua) es notablemente inferior en comparación con los grupos vinílicos aportados por la caseína metacrilada (2.87×10^{-2} mol/L de agua, de los cuales aproximadamente 1.57×10^{-5} se encuentran en la fase acuosa y el resto en las micelas o estabilizando las gotas de monómeros).

Si bien se logró sintetizar un látex híbrido con un alto contenido de material biológico (78%), al copolimerizar OA e IBOMA empleando CN como estabilizante, es necesario aclarar que el material resultante presentó muy baja resistencia al agua (Figura 4.2) como consecuencia de la gran cantidad de proteína libre remanente en la fase acuosa (FP = 74 %, Tabla 4.3), indicando un bajo grado de injerto entre la fase proteica y la fase acrílica.¹⁶⁵ Por lo tanto, el reemplazo de la CN por la CF es necesario para mejorar la compatibilidad entre las fases y obtener películas más resistentes al agua.^{22,38} En base a esto, se estudiaron diferentes formulaciones en la mezcla de monómeros, que permitan la incorporación de CF junto a los monómeros bioderivados.



Figura 4.2. Fotografías de la película de CN-OA/IBOMA, durante el ensayo de resistencia a la inmersión en agua.

4.3.2. Síntesis de látex híbridos basados en caseína funcionalizada, empleando monómeros bioderivados y monómeros derivados del petróleo en la formulación.

En esta sección, se prepararon 3 látex, uno se realizó como referencia sin emplear monómeros biobasados en la formulación (en este caso, la fracción natural solo viene dada por la caseína), y los dos restantes se sintetizaron reemplazando uno de los monómeros biobasados, por sus homólogos derivados del petróleo (manteniendo la Tg del copolímero acrílico en $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$). En la Tabla 4.5 se compara la composición, la fracción natural y la disponibilidad de enlaces vinílicos de estos látex con la formulación que contiene la máxima fracción natural (CF-OA/IBOMA).

Tabla 4.5. Formulación de las mezclas monoméricas empleadas. Fracción natural obtenida y disponibilidad de dobles enlaces en la fase acuosa, aportados por los monómeros.

Experimentos	Mezcla de monómeros (%) ^b				Fracción natural (%) ^c	Enlaces vinílicos en la fase acuosa (mol/L de agua) ^d
	OA	IBOMA	BA	MMA		
CF-OA/IBOMA ^a	72	28	-	-	78.0	0.005
CF-OA/MMA	67	-	-	33	59.1	0.158
CF-BA/IBOMA	-	35	65	-	39.9	0.016
CF-BA/MMA	-	-	60	40	20.0	0.164

^a No polimeriza en emulsión batch. ^b Tg de la mezcla $\approx -10\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^c Calculado a partir de la receta teórica.

^d Estimados a partir de la concentración y la solubilidad de cada uno de los monómeros que conforman la emulsión a temperatura ambiente (Se espera que la disponibilidad sea mayor a la temperatura de reacción).

Si bien la estrategia de reemplazar uno de los monómeros biobasados por su homólogo derivado del petróleo reduce la fracción natural del polímero final, la incorporación de monómeros con mayor solubilidad en agua podría favorecer la nucleación de partículas por los mecanismos I y II. En otras palabras, la incorporación de un monómero con mayor solubilidad en agua, como el MMA o el BA, incrementó considerablemente la disponibilidad de dobles enlaces en la fase acuosa, en comparación a la mezcla de OA/IBOMA (0.005 mol/L de agua). Es importante considerar que, en todos los casos, la concentración de los monómeros en la emulsión se encuentra por encima de la concentración de saturación, por lo que su disponibilidad en la fase acuosa (estimada teóricamente, a temperatura ambiente) podría mantenerse a lo largo de la

polimerización, mientras las gotas de monómero estén presentes en la emulsión. Una vez que desaparecen las gotas de monómero, la concentración de monómero en la fase acuosa disminuiría continuamente a medida que avanza la reacción. Esta hipótesis es cierta si los monómeros que componen la mezcla presentan una relación de reactividad similar, pero cuando son muy diferentes la distribución del monómero entre las fases se ve afectada.

Tabla 4.6. Resultados de las polimerizaciones en emulsión batch en presencia de caseína funcionalizada. Efecto de la sustitución de los monómeros bioderivados por su monómero análogo derivado del petróleo.

Experimentos	x (%)	Dp (nm)	FP (%)
CF-OA/MMA	92	144	34.3 ±5.1
CF-BA/IBOMA	93	130	45.8 ±0.6
CF-BA/MMA	90	154	40.3 ±8.8

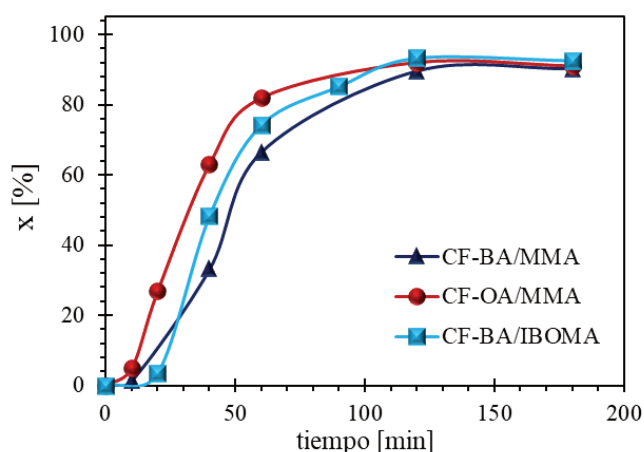


Figura 4.3. Conversión de los monómeros obtenida a lo largo de las polimerizaciones en emulsión descritas en la Tabla 5.4, empleando BA, MMA y los monómeros bioderivados (OA e IBOMA) en la formulación.

La aplicación de esta estrategia permitió la polimerización exitosa en presencia de caseína funcionalizada de las 3 emulsiones consideradas (CF-OA/MMA, CF-BA/IBOMA y CF-BA/MMA), alcanzando conversiones superiores al 90% y tamaños medios próximos a los 140 ±10 nm (Figura 4.3 y Tabla 4.6). Este resultado confirma que el mecanismo de nucleación de las partículas I y II (Figura 1.3, sección 1.2.1, del Capítulo 1), depende fuertemente de la solubilidad

de los monómeros, es decir, de la disponibilidad de grupos vinílicos en la fase acuosa del medio de reacción, para que la reacción proceda.

Estos resultados sugieren que se requiere la presencia de una cantidad mínima de algún monómero soluble en agua para que la polimerización proceda a través de los dos mecanismos de nucleación principales que actúan en la fase acuosa: I) el injerto del monómero sobre la caseína mediante la propagación del radical $-NH^\bullet$ o del doble enlace incorporado durante la metacrilación de la proteína, o II) la propagación de radicales tert-butoxi con los monómeros disponibles en la fase acuosa.

Por otro lado, como se puede observar en la Tabla 4.5, el empleo de CF mejoró la compatibilización entre las fases acrílica y proteicas, obteniendo una reducción significativa de la proteína libre o no injertada ($FP < 50\%$, para los tres casos), comparado con el 74% obtenido para el sistema CN-OA/IBOMA, donde se empleó caseína nativa en lugar de CF. Este resultado demuestra la importancia de incorporar la CF para la síntesis de los látex híbridos y están de acuerdo con los valores obtenidos para sistemas basados en monómeros derivados del petróleo.³⁹ Debido a este alto grado de injerto, los tres materiales obtenidos resistieron la inmersión en agua sin desintegrarse después de 6 h de inmersión (estos resultados se discutirán más adelante, en la sección 4.3.4). En base a esto, se estudiaron a continuación diferentes formulaciones en la mezcla de monómeros, para maximizar la fracción natural en el polímero final.

4.3.3. Optimización de la fracción de origen natural.

Como se mostró en la sección anterior, para asegurar la polimerización en presencia de CF, es necesaria la incorporación de una fracción de monómero con un grado de solubilidad en agua que promueva el mecanismo de nucleación I y II. A este efecto, se sintetizaron látex basados en CF y OA/IBOMA, añadiendo diferentes concentraciones de MMA (el monómero más soluble en agua) a la formulación de monómeros, con el fin de determinar el contenido mínimo de MMA requerido

para que la polimerización en emulsión batch ocurra exitosamente, optimizando el contenido biobasado.

En la Tabla 4.7 se detallan las formulaciones evaluadas, junto a la fracción natural alcanzada y la cantidad estimada de enlaces vinílicos (mol/L de agua) aportados por los monómeros, disponibles en la fase acuosa, estimados a partir de la concentración y la solubilidad a temperatura ambiente de cada uno de los monómeros que conforman la emulsión (se espera que la disponibilidad sea mayor a la temperatura de polimerización). Como se puede observar, la fracción de OA (polímero blando) se mantuvo constante en la mezcla de monómeros, mientras que una pequeña cantidad de IBOMA (polímero duro) se reemplazó por MMA. De esta manera, la fracción natural del material final se redujo mínimamente pasando de un 78% para OA/IBOMA, al 75% cuando se incorporó 5% de MMA. Esta estrategia permitió incrementar la fracción natural final respecto a los alcanzados en la sección anterior.

Tabla 4.7. Resultados de las polimerizaciones en emulsión batch en presencia de caseína funcionalizada. Efecto de la incorporación de una pequeña cantidad de MMA como monómero soluble en agua.

Experimentos CF-OA/IBOMA/...	Mezcla de monómeros (%)			Fracción natural (%) ^a	Enlaces vinílicos en la fase acuosa (mol/L de agua) ^b
	OA	IBOMA	MMA		
MMA_0	72	28	0	78.0	0.005
MMA_1	72	27	1	77.4	0.032
MMA_3	72	25	3	76.2	0.085
MMA_4	72	24	4	75.7	0.112
MMA_5	72	23	5	75.1	0.138

^a Calculado a partir de la receta teórica. ^b Estimados a partir de la concentración y la solubilidad de cada uno de los monómeros que conforman la emulsión, a temperatura ambiente.

Es importante resaltar que la concentración del MMA en las emulsiones se mantuvo por debajo de su concentración de saturación en agua (0.153 mol/L de agua a 25 °C), y que su disponibilidad en la fase acuosa aumenta a medida que se incrementa la cantidad de MMA en la mezcla de monómeros, favoreciendo la polimerización en fase acuosa.

Como se puede observar en la Tabla 4.8 y en la Figura 4.4, sustituir el IBOMA con un 1% de MMA (MMA_1) no es suficiente para que ocurra la polimerización, presentando una curva de conversión similar al látex de referencia sintetizado con monómeros biobasados sin MMA (MMA_0). Esto podría deberse a que la cantidad de grupos vinílicos disponibles en la fase acuosa, proporcionados por los monómeros (0.032 mol/L de agua), está en el orden de la cantidad total de grupos vinílicos en agua proporcionados por la caseína funcionalizada (0.0287 mol/L de agua). En este caso, primero se consume el monómero soluble en agua dando lugar a la formación de una cantidad muy baja de partículas y luego los radicales tert-butoxi que se siguen formando en agua, en ausencia de monómero soluble, propagan o terminan con la caseína funcionalizada.

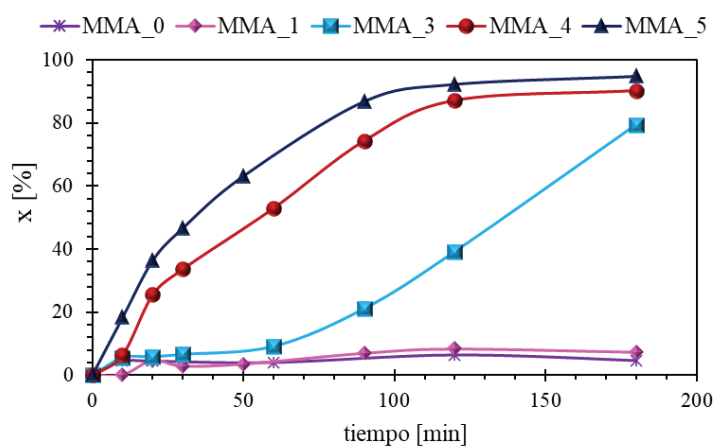


Figura 4.4. Conversión de los monómeros obtenida en la polimerización batch en emulsión de CF-OA/IBOMA incorporando diferentes cantidades de MMA.

Tabla 4.8. Resultados de las reacciones de polimerización de OA/IBOMA/MMA.

Experimentos CF-OA/IBOMA/...	x (%)	Dp (nm)	FP (%)
MMA_0	3	-	-
MMA_1	7	-	-
MMA_3	79	125	43.7 ±4.9
MMA_4	90	126	32.1 ±3.6
MMA_5	95	127	36.5 ±1.5

Por otro lado, incluir un 3% de MMA (MMA_3) fue suficiente para que la polimerización comenzara, lográndose una polimerización lenta hasta alcanzar una conversión de 79% después

de 3 horas de reacción. Por el contrario, el incremento del contenido de MMA hasta 4 y 5% (MMA_4 y MMA_5), permitió que la polimerización ocurriera rápidamente, alcanzando altas conversiones (> 90%) y un Dp medio de aproximadamente 126 ± 1 nm en 3 horas de reacción. Es decir que se requirió de una concentración de 0.106 moles de MMA/litro de agua para que la nucleación de las partículas fuera efectiva y la polimerización alcanzara una conversión aceptable. Como se puede ver en la Tabla 4.8, tanto MMA_4 como MMA_5, alcanzaron un alto grado de compatibilización entre las fase acrílica y proteica (FP \approx 35%).

En base a estos resultados se puede concluir que, para que la polimerización en emulsión batch ocurra exitosamente en presencia de CF, fue necesario que el mecanismo predominante de nucleación de las partículas no fuera micelar, sino mediante la propagación de los radicales amino y tert-botoxi en la fase acuosa. Para que esto sea posible, se requirió de la incorporación de una fracción de monómero soluble en agua, que garantice como mínimo una disponibilidad en la fase acuosa de 0.112 moles de grupos vinílicos/litro de agua (4% MMA). Con esta estrategia, se logró obtener un material híbrido con una alta compatibilidad entre las fases y con un elevado contenido de componentes de origen natural (75.7 %).

4.3.4. Propiedades de aplicación de los materiales híbridos obtenidos

En esta sección se muestran los resultados de las caracterizaciones realizadas sobre las películas obtenidas a partir de los látex híbridos CF-BA/MMA; CF-OA/MMA, CF-BA/IBOMA, y CF-OA/IBOMA/ MMA_4 y MMA_5, sintetizados en las secciones anteriores. Los resultados correspondientes a MMA_0 y MMA_1 no se incluyeron, debido a que la conversión de monómero obtenida fue casi nula, mientras que en el caso de MMA_3, la conversión de monómero obtenida después de 3 h de reacción fue relativamente baja (80%), resultando en una película que posee una mayor relación proteína/polímero, afectando de esa forma sus propiedades finales y por lo tanto dificultando su comparación con los *films* obtenidos a partir de los látex MMA_4 y MMA_5.

Tg de la fase acrílica y MFFT del látex

Se sabe que las partículas híbridas a base de caseína, independientemente del grado de injerto de la proteína, presentan dos fases bien definidas (una coraza proteica y una núcleo acrílico), resultando en dos Tg diferentes correspondientes a cada fase.¹² De acuerdo con esto, como se puede apreciar en la Figura 4.5 (donde se muestran los termogramas de DSC derivados), todas las muestras ensayadas presentan un pico (valor asumido como Tg), con un valor cercano al calculado teóricamente como la Tg de la fase acrílica (-10 °C). Sin embargo, para los casos CF-BA/MMA, CF-OA/MMA y CF-BA/IBOMA, el pico de la curva del flujo de calor derivado resultó ancho (Figura 4.5a) lo cual podría estar indicando la existencia de copolímeros con una variación en la composición, obtenidos a raíz de una diferencia en las reactividades y disponibilidades de los monómeros durante la polimerización. Por otro lado, la alta Tg de la fase proteica (183 °C)¹², afecta positivamente las propiedades de los *films*, reduciendo la adhesividad de los materiales híbridos, y mejorando la capacidad antibloqueo del recubrimiento, obteniéndose un muy buen desempeño.⁴⁰ La Tabla 4.9 resume los valores de antibloqueo obtenido para todas las muestras híbridas, y para un látex acrílico puro OA/IBOMA, sin caseína y con una Tg = -10 °C.

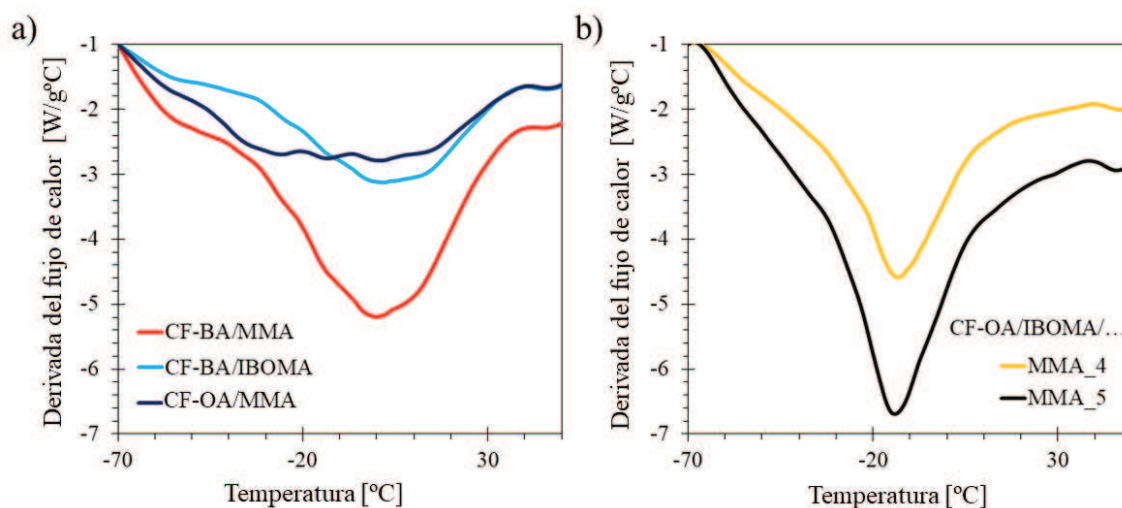


Figura 4.5. Derivadas del flujo de calor (medido por DSC), para películas híbridas obtenidas a partir de los látex sintetizados en la sección 4.3.2 (a) y 4.3.3 (b).

Tabla 4.9. Resultados de los ensayos de antibloqueo, para todos los látex híbridos.

Experimentos	Valores de antibloqueo ^b			Promedio	Performance
	I	II	III		
OA/IBOMA ^a	0	0	0	0	Muy pobre
CF-BA/MMA	9	8	9	9	Excelente
CF-OA/MMA	10	10	10	10	Perfecto
CF-BA/IBOMA	10	9	9	9	Excelente
MMA_4	9	10	10	10	Perfecto
MMA_5	10	10	10	10	Perfecto

^a Sin CF y una Tg = -10 °C. ^b Los resultados de resistencia al bloqueo de las películas se determinaron entre desempeño muy pobre y perfecto (0-10, respectivamente) según la norma ASTM D 4946-89. La prueba se realizó por triplicado para cada muestra.

La temperatura mínima de formación de película (MFFT) es una propiedad importante que define el rango de temperaturas de aplicación y permite evitar fallas en el recubrimiento. En ocasiones, para sistemas a base de agua, se requiere la adición de agentes de coalescencia para obtener látex con baja MFFT, sin una superficie pegajosa. Sin embargo, es conocido que los látex híbridos a base de caseína son capaces de formar películas a temperatura ambiente, debido a que el agua actúa como plastificante de la caseína, reduciendo su Tg durante el secado de la película y permitiendo la coalescencia de las partículas.^{177,178} Debido a esto, todos los látex híbridos obtenidos fueron capaces de formar películas homogéneas y transparentes, alcanzando una MFFT del orden de -0.8 °C (Figura 4.6), que es la temperatura mínima que se pudo registrar debido a la congelación del agua presente en el látex.

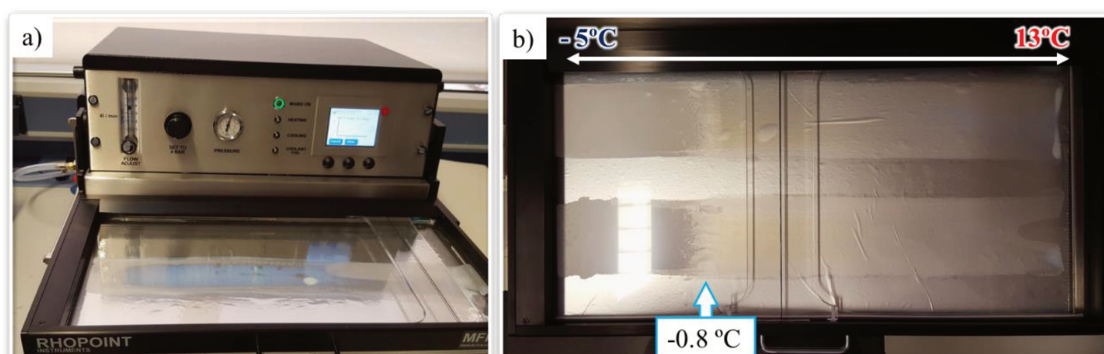


Figura 4.6. Foto del equipo (a), y de los films formados a partir de los látex híbridos MMA_4 (arriba) y MMA_5 (abajo) (b). Por debajo de los -0.8 °C se observa la congelación del agua.

Propiedades mecánicas

La fracción insoluble (IF) también juega un papel clave en las propiedades finales (físicas, mecánicas, térmicas), y en todas las muestras resultó superior al 90%, lo que concuerda con los valores obtenidos para materiales híbridos similares.¹⁷⁹ En la Tabla 4.10 se resumen los IF, junto con las propiedades mecánicas de todas las películas híbridas. Los *films* ensayados exhibieron un comportamiento mecánico similar, con un régimen elástico inicial a baja deformación, seguido de un período de deformación plástica (Figura 4.7). Si bien la incorporación de un componente duro y quebradizo, como la caseína, les proporciona a las películas híbridas una mayor resistencia tensil, les reduce la capacidad de deformación, fallando a menor elongación que las películas acrílicas puras.^{37,39,179}

Tabla 4.10. Fracción insoluble y propiedades mecánicas para todos los sistemas evaluados.

Experimento	IF %	Propiedades mecánicas		
		Resistencia tensil MPa	Elongación a la rotura %	Tenacidad MPa.%
CF-BA/MMA	95 ± 0.3	15.0 ± 2.1	184.7 ± 13.9	1964.1 ± 412.8
CF-OA/MMA	96 ± 1.2	15.3 ± 0.1	123.3 ± 8.3	1420.8 ± 84.1
CF-BA/IBOMA	99 ± 0.1	14.4 ± 1.9	136.6 ± 4.0	1436.3 ± 227.7
MMA_4	92 ± 0.2	10.1 ± 0.4	83.6 ± 6.3	686.5 ± 63.0
MMA_5	93 ± 0.2	12.1 ± 0.2	82.5 ± 5.3	800.0 ± 88.9

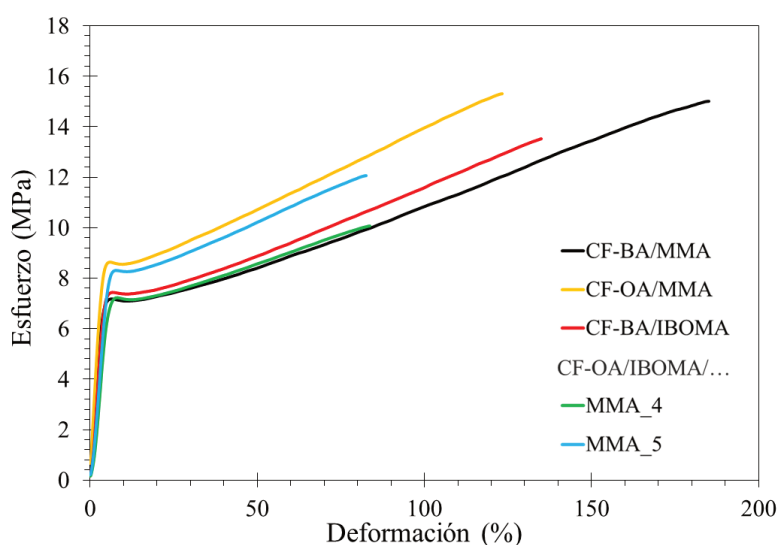


Figura 4.7. Curvas de tensión-deformación para películas híbridas.

La incorporación de monómeros bioderivados redujo la elongación a la rotura de las películas (Figura 4.7), coincidiendo con lo observado por Badia *et al.*⁹³, al emplear IBOMA para sustituir MMA para la síntesis de adhesivos sensibles a la presión. En este caso, el IBOMA aporta cohesión y dureza a las películas, por lo que es de esperar que los *films* posean menor elongación a la rotura. En este sentido, el *film* obtenido a partir del látex CF-BA/MMA alcanzó la máxima deformación ($184.7 \pm 13.9 \%$), seguida por los materiales híbridos obtenidos con un solo monómero biobasado (CF-OA/MMA y CF-BA/IBOMA), y finalmente las películas que contienen ambos monómeros de base natural (MMA_4 y MMA_5), los cuales alcanzaron menos de la mitad de la deformación máxima. Sin embargo, todos los materiales mostraron una resistencia a la tracción similar, con un rango entre 10.1 ± 0.4 a 15.3 ± 0.1 MPa. Estas pequeñas diferencias podrían estar relacionadas con la relación proteína/polímero final, la fracción de insoluble (levemente menor para MMA_4 y MMA_5), y el grado de injerto de la proteína (FP levemente inferior para MMA_4 y MMA_5), debido a que, una mayor cantidad de caseína libre (no injertada) produce un ligero aumento de la resistencia tensil. Estos resultados concuerdan con lo informado por Picchio *et al.*³⁸, quienes demostraron que un incremento en el grado de compatibilización entre las fases reduce la resistencia tensil e incrementa el alargamiento a la rotura.

Resistencia a los solventes

La resistencia a los solventes de las películas, principalmente con el agua, es una característica determinante para su aplicación como recubrimiento (Figura 4.8). La incorporación de caseína afecta directamente la absorción de agua de los materiales híbridos. Sin embargo, un alto grado de injerto de la proteína, es decir, una baja cantidad de proteína libre (FP), reduce el A_w alcanzado por el material.³⁸ En este contexto, se puede observar que las muestras que presentan menores niveles de FP, como las muestras CF-OA/MMA, MMA_4 y MMA_5 (FP = 44, 42 y 45%, respectivamente), obtuvieron valores de A_w próximos al 80 %, en comparación con la muestra CF-BA/MMA (FP = 40%) la cual alcanzó el máximo valor de hinchamiento (110%), después de

las 6 horas de inmersión en agua. Sin embargo, dado que la diferencia en la cantidad de proteína libre que presentan las muestras no supera el 5%, se podría atribuir parte del motivo de esta disminución de A_w , a la incorporación de monómeros bioderivados. Esto podría estar asociado a que los monómeros bioderivados son altamente insolubles en agua y hacen que el material híbrido tenga menos afinidad por el agua. Como se puede observar en la Figura 4.8a, el *film* obtenido del látex sintetizado completamente con MMA y BA, absorbe una mayor cantidad de agua que los *films* sintetizados con un monómero bioderivado en la formulación, seguido por los materiales basados en OA e IBOMA y una pequeña cantidad de MMA (MMA_4 y MMA_5).

Por otro lado, luego de la prueba de absorción los *films* hinchados se secaron y se pesaron para determinar la pérdida de peso que sufrieron las muestras durante el proceso de hinchamiento (Figura 4.8b). Se observó en todos los casos, que las películas híbridas a base de caseína funcionalizada, sufrieron una pérdida de peso que no superó el 6% del peso inicial de la muestra. Este resultado demuestra la buena resistencia que presentan estos materiales, en contraste con el *film* obtenido del látex CN-OA/IBOMA (donde se utilizó caseína nativa como emulsificante), el cual se desintegró completamente durante su inmersión en agua (Figura 4.2).

Por otro lado, como se puede observar en la Figura 4.8c, todos los materiales mostraron buena resistencia a los solventes orgánicos (MEK), con una pérdida de peso muy baja, cercana al 4% (Figura 4.8d), en comparación con la película acrílica pura (sin caseína) que tiende a disolverse en solventes orgánicos.¹⁷⁹ La baja pérdida de peso que muestran estos materiales, está de acuerdo a las altas fracciones de insoluble obtenidas (> 90%).³⁸ Es interesante remarcar, que durante la inmersión en MEK, se obtuvo la misma tendencia que en el ensayo en agua, es decir, los valores de absorción de MEK (A_s) se redujeron al aumentar el contenido de monómeros de base natural. De esta forma, la película sin monómeros biobasados alcanza un valor de A_s de 83.8%, mientras que al incorporar un monómero biobasado (CF-OA/MMA y CF-BA/IBOMA) se reduce hasta alcanzar 60 y 57%, respectivamente. Los valores más bajos ($A_s = 41$ y 31%) se alcanzaron para

las muestras que contenían mayor fracción natural en su composición (MMA_4 y MMA_5, respectivamente).

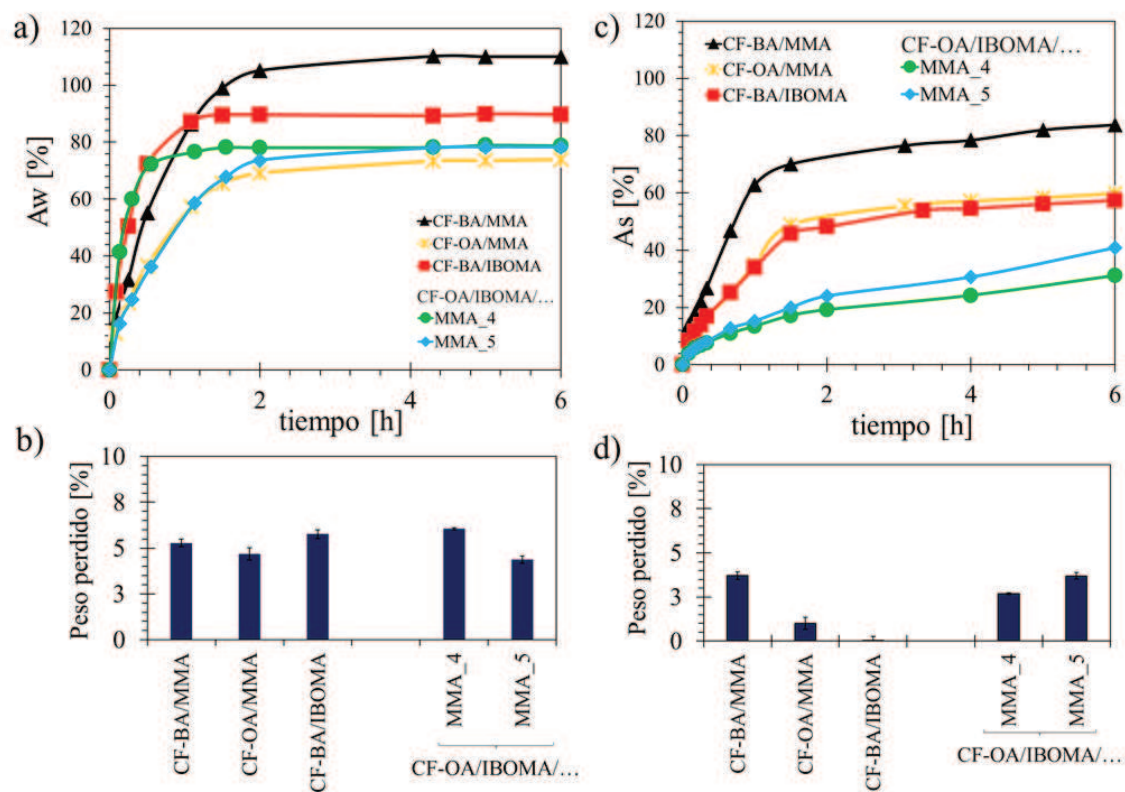


Figura 4.8. Absorción y pérdida de peso en agua (a y b, respectivamente) y en MEK (c y d, respectivamente), después de 6 horas de inmersión en cada solvente.

Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad de la superficie de una película, es la capacidad que posee el material para repeler el agua, y es normalmente un parámetro de aplicación interesante para los recubrimientos analizados en esta Tesis. Se puede medir por el ángulo de contacto (CA) formado por una gota de agua depositada sobre la superficie de la película. Un material tiene una superficie más hidrofóbica cuando el CA formado es mayor. En este sentido, el *film* acrílico puro de OA/IBOMA tiene un CA alto ($85.5 \pm 4.6^\circ$), luego de lavar su superficie para eliminar el exceso de emulsificante, en concordancia con los reportando para otros sistemas equivalentes.¹⁸⁰ Sin embargo, como se puede observar en la Figura 4.9, los materiales híbridos presentan valores de

CA más bajos, debido al carácter hidrofílico de la caseína, lo que aumenta la absorción de agua y reduce la hidrofobicidad superficial.

Como se muestra en la Figura 4.9, el CA aumenta ligeramente al aumentar la fracción de base natural de las películas. Este resultado concuerda con la mayor resistencia al agua que presentaron estos materiales.

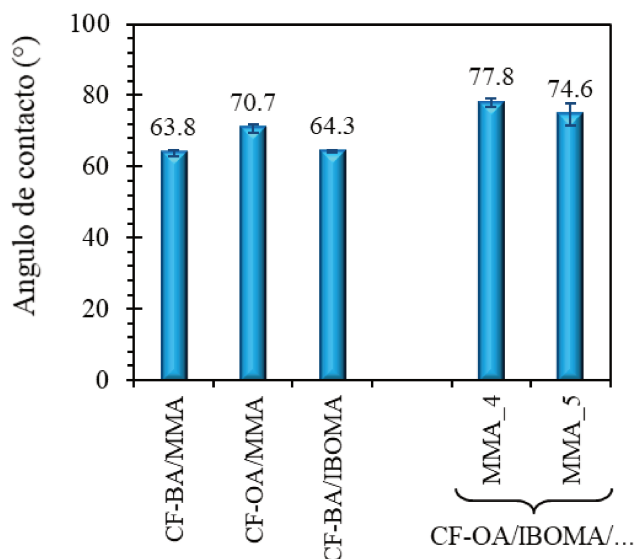


Figura 4.9. Hidrofobicidad superficial de las películas híbridas.

Biodegradabilidad de los films en compost orgánicos

La gran ventaja de los materiales híbridos a base de caseína, que los diferencia completamente de los materiales acrílicos puros, es su capacidad de biodegradarse parcialmente cuando se entierran en compost orgánico. Como se puede observar en la Figura 4.10, en un período de tiempo relativamente corto (dos meses) todos los materiales híbridos perdieron casi en 70% de su peso respecto a la proteína cargada (es decir, la fracción degradable de los *films*), equivalente al 15% del peso total del *film*. En cambio, la película híbrida CF-BA/MMA alcanzó una degradación menor (60%). Esto podría deberse a que la presencia de monómero de base natural en las películas híbridas produjo una ligera mejora en la biodegradabilidad de la fase de caseína. Además, estos resultados permiten mostrar que la modificación de la caseína no afecta significativamente su biodegradabilidad.⁴⁰

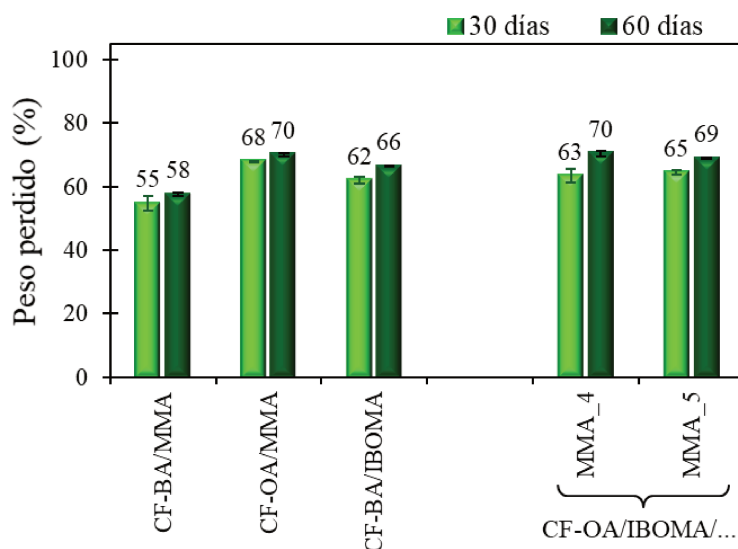


Figura 4.10. Biodegradabilidad en compost orgánico, basado en el contenido de proteína (fase degradable) del film.

4.4. CONCLUSIONES

Los látex híbridos basados en caseína, libres de emulsificantes convencionales y con un alto contenido final de biomateriales fueron sintetizados mediante polimerización batch en emulsión. Para ello, se utilizaron dos monómeros de base natural, metacrilato de isobornilo (IBOMA) y acrilato de 2-octilo (OA) como sustituyentes de los monómeros derivados del petróleo MMA y BA.

La metacrilación de la caseína (adición de grupos vinílicos sobre la molécula de la proteína) y la muy baja solubilidad de los monómeros bioderivados jugaron un papel determinante en el mecanismo de nucleación durante la polimerización. En este sentido, cuando se sintetizaron látex a partir de los monómeros bioderivados, empleando caseína metacrilada como estabilizante, la polimerización no ocurrió. Esto fue debido a que con bajo contenido de monómero disponible en agua, prevalece el mecanismo de nucleación micelar, implicando la migración de los radicales tert-butoxi (hidrófobos) hacia el interior de las micelas de caseína. En fase acuosa, estos radicales pueden reaccionar con los grupos vinílicos adicionados a la caseína, formando un radical soluble en agua que no puede proseguir con la polimerización, por la ausencia de monómero en esa fase.

Es decir, que la caseína metacrilada actúa como sumidero de radicales evitando que la polimerización progrese.

En este contexto, la incorporación de un monómero bioderivado, en combinación con un monómero más soluble en agua (CF-OA/MMA y CF-BA/IBOMA), permitió llevar a cabo la copolimerización en emulsión, en presencia de caseína metacrilada como emulsificante. Esto fue posible porque al incluir un monómero más soluble en agua, se incrementó la disponibilidad de grupos vinílicos en la fase acuosa de la emulsión, favoreciendo los mecanismos de nucleación de partículas que implican injerto sobre la caseína. Sin embargo, a través de esta estrategia, las películas híbridas presentaron un menor contenido de materiales de origen natural (39.9 y 59.1% para CF-BA/IBOMA y CF-OA/MMA, respectivamente).

Para optimizar y maximizar el contenido de materiales de origen natural, se sintetizaron nuevos látex OA/IBOMA (con caseína funcionalizada), reemplazando una pequeña fracción de IBOMA por un monómero más soluble en agua y de similar Tg (MMA). De esta manera, se encontró la cantidad mínima requerida de grupos vinílicos disponibles en agua (0.112 mol/L de agua) para que la polimerización ocurra exitosamente en presencia de caseína metacrilada. En este sentido, con el agregado de solo 4% de MMA se alcanzó 90% de conversión de los monómeros luego de 4 horas de polimerización, con una alta fracción natural (75.7%).

Finalmente, se demostró que los materiales híbridos presentaban buenas propiedades mecánicas, alta resistencia al agua (un 30 % menor de absorción que el material sintetizado a partir de los monómeros derivados del petróleo), y buena biodegradabilidad parcial en el compost (perdiendo aproximadamente el 70% del peso de su fracción degradable, en un corto período de tiempo). Si bien la fracción de material biodegradable (respecto al material final) es aún inferior a la exigida por la normativa medioambiental para materiales biodegradables (por ejemplo, la normativa de microplásticos de la UE), es destacable la importante mejora en términos de sostenibilidad que aportan los recubrimientos con alto contenido de base natural, como los aquí sintetizados.

CAPÍTULO 5: SÍNTESIS DE LÁTEX HÍBRIDOS ACRÍLICO/CASEÍNA CON INCORPORACIÓN DE ZEÍNA MEDIANTE POLIMERIZACIÓN EN MINIEMULSIÓN^e

5.1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, los materiales híbridos basados en proteínas han presentado un alto interés académico e industrial, principalmente en la sustitución parcial de polímeros derivados del petróleo.^{1,39,181,182} Esto se debe a que la incorporación de proteínas naturales, como materias primas renovables, permite sintetizar materiales ecológicos con funcionalidades especiales, propiedades mejoradas y carácter biodegradable.^{36,40,112,183,184}

En este sentido, la caseína (proteína natural presente en la leche) ha sido ampliamente estudiada en la síntesis de materiales híbridos acrílico/caseína, mediante polimerización en emulsión batch libre de emulsificantes, para su aplicación en recubrimientos.^{22,35,37,185} En este contexto, Li *et al.*³⁵ sintetizaron látex acrílico/caseína donde la compatibilidad (o injerto) entre las fases fue promovida a través de una iniciación redox, entre un hidroperóxido de alquilo y los grupos amino de la caseína (este mecanismo de reacción e injerto ha sido detallado en la sección 1.2 del Capítulo 1). Sin embargo, a partir de esta técnica la caseína nativa sólo se injerta al acrílico a través de los grupos amino, resultando en partículas acrílico/caseína con bajo grado de injerto (cuando se utiliza una concentración alta de caseína), afectando negativamente a las propiedades mecánicas y a la resistencia al agua del material final.^{22,37} Por este motivo, el reemplazo de la caseína nativa por una caseína metacrilada (es decir, caseína modificada químicamente para incorporar grupos vinílicos en su cadena, proceso mostrado en la sección 1.2.1 del Capítulo 1) apareció como una estrategia prometedora para producir látex híbridos con alto contenido de biomaterial y mayor grado de compatibilización entre ambos componentes.^{36,40} Sin embargo, se

^e Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en Allasia *et al.*, *Ind. Eng. Chem. Res.* (2019), 58, 46, 21070–21079.

requirieren altos grados de modificación de caseína para mejorar sustancialmente la resistencia al agua de los materiales finales, afectando negativamente sus propiedades mecánicas, entre otras cosas.³⁸

Por otro lado, la zeína (principal proteína del maíz) se caracteriza por ser una proteína insoluble en agua debido a su alto contenido de aminoácidos no polares (> 50%), como la leucina, la prolina, la alanina y la fenilalanina. Además, posee un bajo valor nutricional debido a que carece de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano,^{42,140} por lo que se está empleando en diferentes aplicaciones como ingeniería de tejidos, cosméticos y farmacéuticas.^{8,33,45,178} Las películas o *films* de zeína pura presentan características excepcionales como una alta dureza, brillo, resistencia al ataque microbiano y con una superficie hidrófoba y a prueba de grasa^{140,178,186} Sin embargo, suelen ser muy frágiles y requieren de aditivos plastificantes para mejorar su resistencia mecánica.^{183,187}

En el presente Capítulo se presenta la síntesis en base acuosa de nanocompuestos híbridos acrílico/proteicos, con un adecuado equilibrio entre la caseína (encargada de estabilizar las partículas acrílicas debido a su carácter anfifílico) y la zeína (que proporciona una característica repelente al agua debido a su carácter hidrofóbico). A tal efecto, se empleó la polimerización en miniemulsión para la obtención de látex acrílicos libres de emulsificantes convencionales que contienen ambas proteínas (caseína y zeína) como biomateriales naturales. La polimerización en miniemulsión aparece como una alternativa para la síntesis de látex híbridos, permitiendo la incorporación de componentes hidrofóbicos en las gotas de monómero (50-500 nm), que pueden transformarse directamente en las partículas de polímero.^{188,189} El desempeño de los materiales híbridos obtenidos, se evaluó en términos de las propiedades de la película, prestando especial atención a la resistencia al agua y a la hidrofobicidad superficial del material.

5.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

La descripción detallada de los materiales, la especificación de los equipos, y los métodos de síntesis y caracterización empleados a lo largo del trabajo experimental de esta Tesis, se presenta

en el Anexo. Por esta razón, a continuación, se hará referencia sólo a los aspectos del trabajo experimental que se aplican específicamente a este Capítulo.

Los códigos de los látex sintetizados y sus correspondientes películas, contienen la información de su composición mediante las abreviaturas “A”, para la fase acrílica, “CN o CF”, para caseína nativa o funcionalizada (modificada), respectivamente, y “Z”, para zeína nativa. Por ejemplo, A/CNZ se refiere a un látex que contiene acrílicos, caseína nativa y zeína.

5.2.1. Síntesis de látex híbridos Acrílico/Proteínas

Preparación de las miniemulsiones

Las miniemulsiones se prepararon de acuerdo al esquema presentado en la Figura 5.1. En una primera instancia (etapa 1) se prepara la fase acuosa (FA) a partir de la solución de caseína nativa o modificada (la funcionalización fue realizada según el proceso de metacrilación descrito en la sección 1.2.1 del Capítulo 1 de esta Tesis). Luego se adiciona la zeína en polvo (etapa 2), aplicando ultrasonido de forma constante para favorecer la dispersión y estabilización de la zeína con la caseína. Por último, en la etapa 3 se adiciona lentamente la fase orgánica (FO), que contiene los monómeros y el coestabilizante, sobre la dispersión de zeína-caseína durante 20 min, bajo la aplicación constante de ultrasonido. Para asegurar la formación y estabilización de la miniemulsión, la sonicación se mantuvo otros 20 min adicionales. En la Figura 5.1 se incluyeron fotos de los productos (soluciones y dispersiones) obtenidos al final de cada etapa.

En la Tabla 5.1 se muestra una receta general para la preparación de las miniemulsiones, detallándose el contenido de cada una de las fases. Todas las miniemulsiones tienen un contenido total de proteína que corresponde a 25 %wbm (en peso con relación al total de monómero acrílico), compuesta por caseína (95 %) y zeína (5 %). Se destaca que cuando no se utilizó caseína funcionalizada, se incorporó GMA en la formulación de los monómeros. Además, y como referencia, se preparó una miniemulsión acrílica pura, es decir en ausencia de proteínas (sin caseína ni zeína). En este caso, se preparó una fase acuosa con Dowfax 2EP como emulsificante,

a la que se le agregó la fase orgánica y se preparó la miniemulsión siguiendo la etapa 3 de la

Figura 5.1.

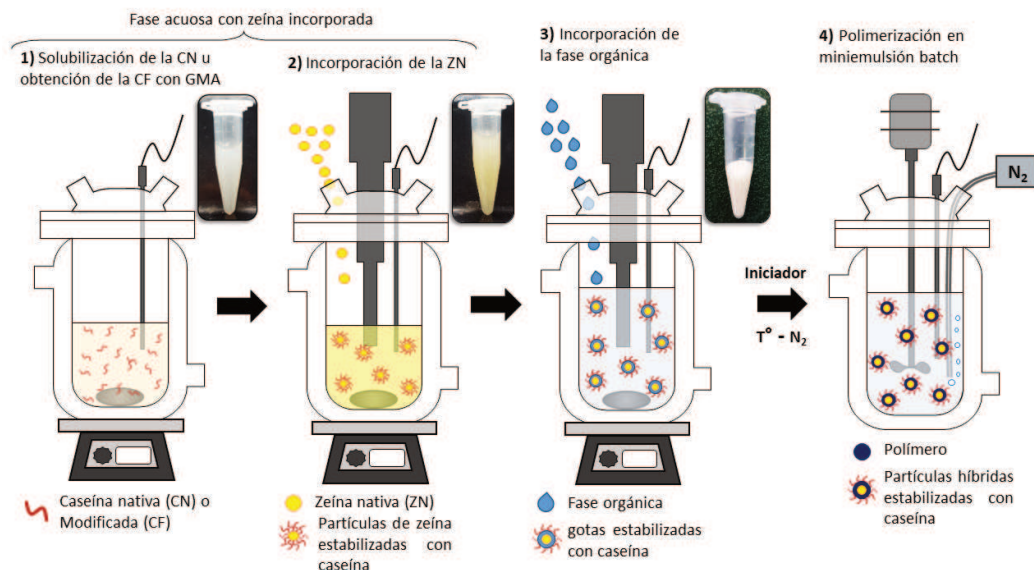


Figura 5.1. Esquema general para la síntesis de las nanopartículas híbridas acrílico/proteínas por polimerización en miniemulsión. Fotografías de las soluciones/dispersiones obtenidas al finalizar cada etapa.

Tabla 5.1. Receta general para la síntesis de los látex híbridos mediante polimerización en miniemulsión

		Total	100	%wbm ^b
Fase Orgánica (FO)	Monómeros (m)	BA	80	%wbm
		MMA	20	%wbm
	Coestabilizante	Acrilato de octilo	4	%wbm
	Ag. Funcionalizante	GMA ^a	0.9	%wbm
Proteína Hidrofóbica		Zeína	5	%wbTP ^c
Fase Acuosa (FA)	Proteína Anfifílica	Caseína (CF o CN)	95	%wbTP
	Sal	Na ₂ CO ₃	0.4	%wbFA ^d
	Agua		159	%wbFO ^e
Iniciador		KPS	0.51	%wbm
		TBHP	0.17	%wbm
Proteína total (TP)			25	%wbm
Contenido de sólidos total			35	%

^a El GMA (agente funcionalizante utilizado para modificar la caseína) sólo se adicionó en la fase orgánica cuando la receta se preparó con caseína nativa, empleando la misma relación GMA/caseína utilizada en la metacrilación de la caseína; ^b %wbm: peso en base al total de monómero acrílico; ^c %wbTP: peso en base al contenido de proteína total; ^d %wbFA: peso en base a la fase acuosa; ^e %wbFO: peso en base a la fase orgánica.

Las miniemulsificaciones se realizaron en un recipiente encamisado para mantener la temperatura por debajo de 30 °C y con agitación magnética permanente. Además, se utilizó un procesador ultrasónico, Sonics VC 750 (potencia 750 vatios), operado a una amplitud de 70% y con ciclos de 10 segundos encendido y 5 segundos apagado (Los detalles del equipo se encuentran en la sección A.2.2 del Anexo).

Polimerización batch de las miniemulsiones

Las polimerizaciones se llevaron a cabo en un reactor de vidrio de 100 mL equipado con un condensador de reflujo y con burbujeo de nitrógeno constante. La temperatura de reacción se mantuvo constante (80 °C), ajustando la temperatura del fluido en la camisa del reactor con un baño termostático. Se emplearon dos iniciadores: KPS (0.8% en peso) y TBHP (0.24% en peso). Nótese que ambos iniciadores producen radicales en la fase acuosa; sin embargo, el TBHP es parte de un sistema de iniciación redox que también involucra a los grupos amina de la proteína, según Li *et al.*³⁵ Además, se sintetizó un látex acrílico sin proteínas como punto de referencia (experimento A), empleando Dowfax 2EP como emulsionante (4% en peso respecto a la fase orgánica). La Tabla 5.2, resume las composiciones de los experimentos realizados. También, se preparó una mezcla física a partir de un látex de acrílico puro (A) con ambas proteínas (CN y Z), manteniendo la relación acrílico/proteína correspondiente al látex A/CFZ, con el objetivo de comparar su desempeño frente al de los látex híbridos.

Tabla 5.2. *Formulación de los látex híbridos sintetizados.*

Experimentos	Proteínas (% wbTP ^a)			Proteína total (% wbm ^b)	Iniciador	Emulsificante
	Caseína Nativa	Caseína Funcionalizada	Zeína Nativa			
A	0	0	0	0	KPS	Dowfax
A/CN	100	0	0	25	TBHP	-
A/CF	0	100	0	25	TBHP	-
A/CNZ	95	0	5	25	TBHP	-
A/CFZ	0	95	5	25	KPS	-

^a wbTP: peso en base al contenido de proteína total; ^b wbm: peso en base al total de monómero acrílico.

5.2.2. Caracterización de las miniemulsiones y de los látex

La conversión total de los monómeros (x) se midió gravimétricamente. Los diámetros medios de las gotas (D_d) y de las partículas (D_p) se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) empleando un fotómetro BI-9000 de Brookhaven. Para evitar la desestabilización de las gotas y la pérdida de monómeros en las gotas o partículas durante la caracterización por DLS, las muestras se diluyeron en una solución acuosa saturada con caseína (o Dowfax 2EP para el experimento A) y con los monómeros.

El porcentaje de proteína libre (FP) que se encuentra soluble en el agua o adsorbida sobre las partículas, es decir la proteína que no forma parte de las partículas híbridas, se cuantificó mediante espectroscopía UV utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Visible y se expresó como la relación (en masa) entre la proteína libre y la proteína cargada inicialmente. La proteína libre se separó de los látex mediante 3 etapas de lavado, recuperación por centrifugación y redispersión, empleando agua desionizada en la primera etapa y una solución de SLS (0.1%) en las últimas dos etapas.³⁶ A continuación, se cuantificó la concentración de proteína soluble (en los sobrenadantes) correlacionando el área del pico a 280 nm con una curva de calibración de concentración de la proteína.

La fracción insoluble (IF) contenida en los materiales híbridos se determinó mediante extracción soxhlet con THF durante 24 h. Cabe señalar que el IF podría estar constituido por el gel acrílico, el copolímero acrílico-proteína injertada y la proteína libre, que también es insoluble en THF.

La morfología de las partículas se investigó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), empleando un microscopio JEOL 100 CX (100 kV). Las muestras de TEM se prepararon colocando una gota de látex diluido (alrededor de 0.01% en peso de contenido de sólidos) en una rejilla de cobre revestida con Formvar®. Luego, se le añadió una gota de solución de UAc al 1% en peso, para teñir negativamente la superficie de las partículas.

5.2.3. Caracterización de las películas

Las películas híbridas se obtuvieron secando los látex en molde de siliconas, a 22 °C y 55% de HR durante una semana.

La temperatura mínima de formación de *film* (MFFT) de los látex se midió con un método óptico.⁹⁸ Para ello, se aplicó una delgada capa de látex (120 µm de espesor húmedo) sobre una placa metálica en la cual se aplicó un gradiente de temperatura (2-40 °C). Luego, se dejó secar para determinar el valor MFFT, como la temperatura a la cual se observa la transición en la transparencia del *film*.

La morfología superficial e interna de los *films* se estudió por microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo *tapping*, empleando el equipo comercial Nanotec Electronic. Para el estudio de la superficie, se preparó un *film* (120 µm de espesor en húmedo) sobre papel sellante y se secaron a temperatura ambiente durante la noche. Para el estudio interno del *film*, se cortaron transversalmente películas de aproximadamente 1 mm de espesor, después de congelarlas con nitrógeno líquido. La adquisición y el procesamiento de imágenes se realizó con un software libre WSxM25.

Se realizaron mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) con equipos Q2000 y Q500 (ambos de TA Instruments), respectivamente. Para el análisis de TGA, 5 mg de cada muestra fueron sometidos a una rampa de temperatura desde 25 a 600 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de descomposición máxima ($T_{d,max}$) se determinó como la correspondiente al máximo del pico principal obtenido en la curva de la derivada de la pérdida de peso en función de la temperatura. Debido a que ambas proteínas poseen transiciones vítreas (T_g) próximas al comienzo de su temperatura de degradación (alrededor de 170 °C), los estudios de DSC se llevaron a cabo desde -80 a 130 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. A cada muestra, de aproximadamente 5 mg, se le aplicó tres ciclos de temperatura (calentamiento-

enfriamiento-calentamiento) y se determinó su Tg durante el segundo calentamiento, adoptando la temperatura del punto medio del cambio de capacidad calorífica.

La resistencia al bloqueo se evaluó siguiendo la norma ASTM D 4946-89. A tal efecto, se aplicaron látex sobre papel sellante utilizando un aplicador de marco con un espesor en húmedo de 120 μm y se secaron durante dos días a temperatura ambiente. Luego, se cortaron seis cuadrados con un área de 38 mm x 38 mm y se colocaron enfrentando las superficies recubiertas bajo un peso que equivale a 12.45 kPa de presión a 60 °C durante 30 min. El grado de resistencia al bloqueo se determinó al intentar despegar ambos recortes, reportando el resultado en una escala de 0 a 10 (mínimo y máximo bloqueo, respectivamente).

Las muestras para ensayos de tracción se prepararon siguiendo la norma ASTM D882. Para esto, se cortaron 5 muestras con forma de mancuerna (9.53 mm de longitud y una sección transversal de 3.18 mm \times 1 mm), para cada material. Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a la norma ASTM D638, con una velocidad de estiramiento de 25 mm/min. Por otro lado, la dureza del material se determinó como la fuerza de compresión requerida para penetrar 1 mm de la muestra con una punta plana cilíndrica de 2 mm de diámetro. Ambas pruebas se realizaron en una máquina de ensayo universal (INSTRON 3344), a 23 °C y 50% de HR.

Se midió el ángulo de contacto estático (CA) del agua sobre las superficies de la película. A tal efecto, se formaron *films* de 120 μm (espesor húmedo) sobre una placa de vidrio y se secaron a temperatura ambiente durante la noche. Luego, se depositaron gotas de agua destilada (23 μl) sobre la superficie de las películas. El CA se obtuvo mediante el método LBADSA implementado en un software bajo ImageJ.¹⁷⁶ Para cada muestra, el CA promedio se informó a partir de 10 mediciones.

Se llevaron a cabo pruebas de resistencia al agua y al disolvente orgánico (metil etil cetona, MEK) sobre muestras de *films* de 1 mm de espesor y 10 mm de diámetro. Las muestras se sumergieron en los distintos solventes (agua o MEK) a temperatura ambiente durante 8 horas. A lo largo del ensayo, las muestras se retiraron del solvente, se secaron cuidadosamente, se pesaron

e inmediatamente se sumergieron nuevamente. La absorción de agua y MEK (A_W y A_{MEK} respectivamente) se reportó como el porcentaje de la masa de solvente absorbido, respecto al peso inicial del *film* seco.

Por último, se investigó la capacidad de biodegradación de los materiales híbridos en condiciones de compostaje. Para esto, los *films* (10 mm de diámetro y 1 mm de espesor) se enterraron en un compost orgánico comercial con un 55% de humedad, y se mantuvieron a 30 °C durante 7 y 14 días. Transcurrido el tiempo, las muestras se retiraron, se limpiaron cuidadosamente y se secaron en estufa a 70 °C. La biodegradabilidad se reportó como la pérdida de peso registrada, respecto al contenido inicial de proteína en el *film* seco (parte degradable de las películas).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las diferentes polimerizaciones exploradas. La investigación involucra la síntesis de látex híbridos, basados en proteínas, donde la caseína es el bio-componente principal, y la zeína se incorpora en menor proporción para mejorar la resistencia al agua de los materiales. En todos los casos se mantuvo constante la relación acrílico/proteína.

5.3.1. Caracterización de las miniemulsiones y de los látex híbridos

En la Tabla 5.3 se resumen los resultados de conversión, diámetros de gota y partícula, la relación entre N_p/N_d , la proteína libre y la fracción de insolubles de los materiales obtenidos en las polimerizaciones en miniemulsión investigadas.

Conversión de monómeros, diámetros de gotas y de partículas

Como se puede observar, en idénticas condiciones de miniemulsificación y después de 3 h de polimerización, cuando se utilizó KPS como iniciador (experimentos A y A/CFZ) la conversión final de monómeros fue de alrededor del 95%, mientras que cuando se empleó TBHP fue un poco

menor. Además, el uso de caseína metacrilada (CF) en los látex basados únicamente en caseína, produjo un descenso de la conversión final (A/CF) con respecto al caso en que la caseína nativa fue el biomaterial incorporado (A/CN). Esto puede deberse a que los grupos amino de la caseína se redujeron después de la metacrilación de la caseína (Tabla 1.2, Sección 1.2 del Capítulo 1) y, en consecuencia, la eficiencia del TBHP para iniciar la polimerización también disminuyó, debido a que dicha iniciación involucra a los grupos amino de la caseína.^{35,38}

Tabla 5.3. Resultados de polimerización finales para la obtención de los látex híbridos

Experimentos	x (%)	Dd (nm)	Dp (nm)	Np/Nd	FP (%)	IF (%)
A	94	189	130	3.1	-	3
A/CN	89	223	170	2.3	67	95
A/CF	86	178	177	1.1	60	90
A/CNZ	90	248	190	2.2	57	93
A/CFZ	95	209	168	1.9	25	91

Como se puede ver en la Tabla 5.3, todos los látex híbridos presentaron un Dp final menor que Dd, lo que resultó en relaciones Np/Nd entre 1.1 y 2.3. Este resultado indica la presencia de nucleación secundaria por mecanismos micelar u homogéneo, que habrían dado lugar a la formación de nuevas partículas no híbridas. La caseína nativa presenta un carácter anfifílico con una concentración micelar crítica de 0.83 mg/ml; sin embargo, la incorporación de grupos metacrílicos en la caseína funcionalizada afecta su capacidad emulsionante (sección 1.2.1, Capítulo 1) y promueve su polimerización a través de los grupos vinílicos adicionados (es decir, actúa como un emulsificante polimerizable, un *surfmer*).³⁸ La capacidad de la caseína funcionalizada para injertarse al acrílico evita su migración desde las partículas híbridas y, por lo tanto, su uso redujo la formación de nuevas partículas de polímero por nucleación secundaria, lo que resultó en un Np/Nd más bajo que cuando se empleó caseína nativa. Por otro lado, los valores finales de Dp de las nanopartículas híbridas fueron superiores a los de las nanopartículas de acrílico puro (A), debido a que en las primeras se incorporó una proteína natural como estabilizador en lugar de un emulsionante convencional de bajo peso molecular (Dowfax EP).

Además, en ausencia de proteínas (A) se observó una importante nucleación secundaria, con un N_p/N_d superior a 3, probablemente debido al exceso de emulsionante incorporado.

Microestructura molecular de las partículas híbridas (proteína libre y fracción insoluble)

Una cuestión importante a considerar en los materiales híbridos es su microestructura molecular. En este sentido, se analizó el grado de compatibilidad entre los biomateriales y el copolímero sintético. La compatibilidad entre los materiales se puede determinar cuantificando la proteína que se encuentra libre en el medio (FP), es decir aquella que no forma parte de las partículas híbridas. De acuerdo a esto, los látex híbridos basados en caseína sintetizados con caseína metacrilada (A/CF) mostraron valores de FP más bajos que los obtenidos cuando se incorporó caseína nativa (A/CN). La metacrilación previa de caseína con GMA aumentó significativamente el injerto de la misma, lo que produce una mejora en el grado de compatibilidad de las partículas de acrílico/caseína. Estos resultados concuerdan con lo observado por Picchio *et al.*³⁸, donde se demostró que el incremento del grado de modificación de la proteína mejoró el injerto proteína/acrílico. Sin embargo, A/CN mostró valores de FP superiores a los reportados por Picchio *et al.*³⁸ (~ 80%) cuando se usó caseína nativa. Esta diferencia podría deberse tanto a: i) el empleo de un proceso de polimerización diferente (Picchio *et al.*³⁸ utilizaron polimerización en emulsión, en lugar de polimerización en miniemulsión); y ii) que se añadió GMA a la fase orgánica durante la preparación de la miniemulsión, favoreciendo la modificación de la caseína resultando en la disminución del valor de FP (67%).

Además, se puede observar que cuando se incorporó zeína (A/CNZ y A/CFZ) los valores de FP fueron más bajos que en sus látex homólogos sin zeína. Este aumento de compatibilización de la fase proteína podría deberse probablemente a las altas interacciones reportadas entre ambas proteínas, que podrían favorecer la reducción de la proteína libre, al dificultar la desorción de la caseína de las partículas de polímero. Se ha informado que la caseína es un estabilizador ideal para las partículas de zeína debido a la adsorción de moléculas de proteína anfifílica (caseína) en

dominios de zeína mediante interacciones hidrófobas.^{183,190} (Este resultado y esta capacidad que se reporta, será la base para la preparación de biopartículas proteicas promotoras de la polimerización sembrada de monómeros acrílicos, que se tratará en el Capítulo 6 de esta Tesis).

Por otro lado, todas las muestras híbridas presentaron IF superior al 90%, independientemente de su composición proteica. Considerando que el IF de los materiales híbridos está compuesto por el gel acrílico, la proteína libre y el copolímero acrílico-injerto-proteína, un IF alto indica una contribución importante del contenido de proteína acrílica injertada, debido a que el IF atribuido al acrílico puro A es muy bajo (IF = 3%).

Morfología de las partículas híbridas

La Figura 5.2 muestra la morfología de las nanopartículas obtenidas a partir de los látex A/CF y A/CFZ, preparados a la misma dilución. El látex sintetizado solo con caseína como biomaterial (A/CF, Figura 5.2a) presentó partículas compatibilizadas con superficies lisas. Sin embargo, cuando se incorporó zeína (A/CFZ, Figura 5.2c), las partículas presentaron una superficie más rugosa. Es importante resaltar que no se observó la presencia de aglomerados de proteína separados, demostrando que la polimerización en miniemulsión permitió la síntesis de partículas acrílicas/proteicas compatibilizadas. Además, las imágenes de TEM obtenidas a una magnificación de 20000x (Figura 4.2.b y d) evidenciaron una amplia distribución del tamaño de partícula para ambos látex, A/CF y A/CFZ, respectivamente, con la presencia de partículas pequeñas, probablemente formadas por nucleación secundaria.

De la misma forma, mediante la técnica de DLS se obtuvo una amplia distribución del tamaño de partícula, confirmando la presencia de partículas pequeñas (Figura 5.3).

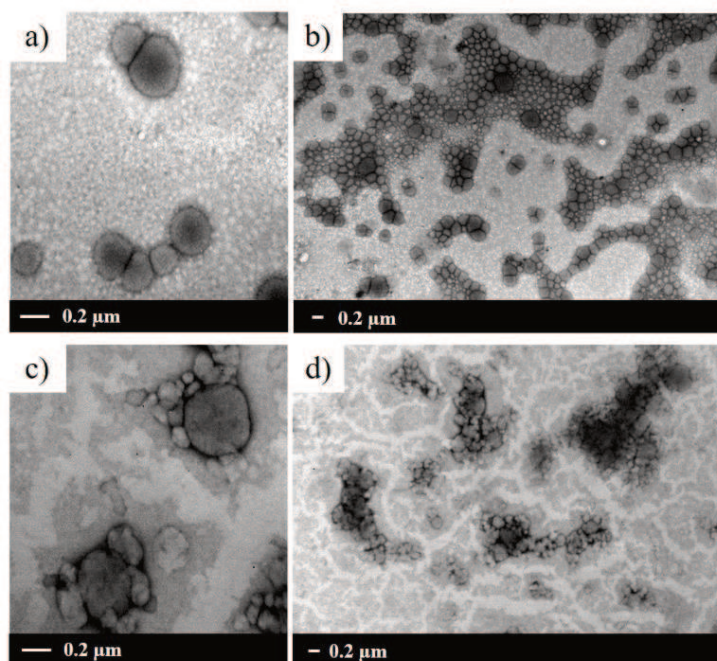


Figura 5.2. Morfología de las partículas de los látex híbridos A/CF (a-b) y A/CFZ (c-d) obtenidos por TEM.

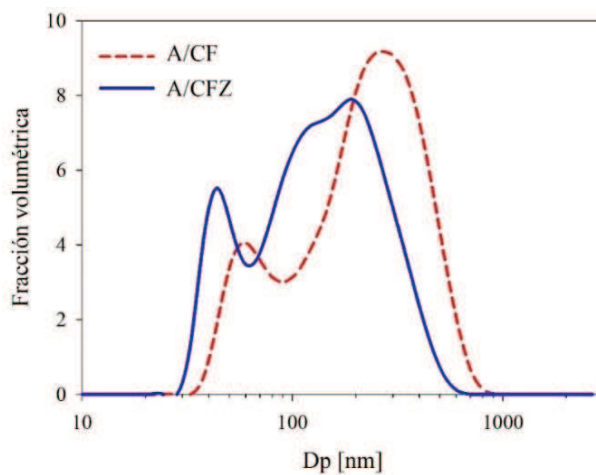


Figura 5.3. Distribución de partículas de látex híbridos A/CF y A/CFZ obtenidos por DLS.

5.3.2. Caracterización de las películas híbridas

Formación de films

Una propiedad importante de una dispersión polimérica es su capacidad para formar *films* lisos y homogéneos. Esta propiedad se caracteriza por la MFFT, que define el rango de temperatura de aplicación del látex. Como se puede observar en la Figura 5.4, todos los látex híbridos produjeron

films transparentes a temperatura ambiente, con una MFFT por debajo de 2 °C. Como es sabido, una película altamente transparente indica la ausencia de grandes fases segregadas.¹⁹¹ Por otro lado, como era esperado, la incorporación de zeína en la formulación del látex híbrido, torna los *films* de un color más amarillento, característico de esa proteína. Además, se puede apreciar que la transparencia de las películas obtenidas con CF es mayor que cuando se utiliza CN, indicando que el grado de compatibilidad entre las fases es mayor cuando se usa la proteína metacrilada.

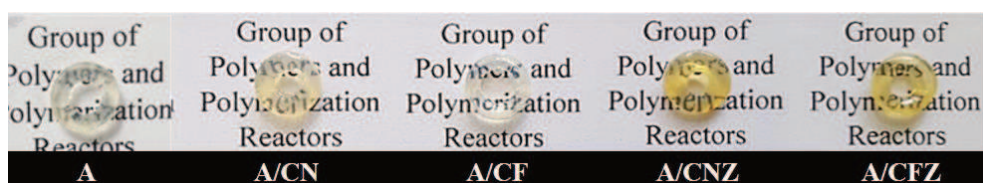


Figura 5.4. Imagen de las películas (con forma de disco hueco) obtenidas a partir de diferentes formulaciones.

Para comparar las propiedades de las películas híbridas, se preparó la mezcla física de látex acrílico puro (A) con caseína y zeína (PMix), manteniendo la misma relación acrílico/proteína de los látex híbridos A/CFZ. En contraste con las películas híbridas sintetizadas mediante la polimerización en miniemulsión, la película PMix es opaca, heterogénea y presentaba grandes segregaciones de zeína (Figura 5.5). Esta heterogeneidad es consecuencia del carácter hidrófobo de la zeína, que dificulta su incorporación y produce la segregación de la misma durante la formación del *film*. Esta incompatibilización entre las proteínas y el polímero acrílico se evidencia aún más al cuantificar la proteína libre de PMix, que alcanza un valor de 96%. Este valor tan alto de FP indica que la mayor parte de las proteínas permaneció soluble en la fase acuosa de la dispersión y/o se separó de las partículas de polímero acrílico.

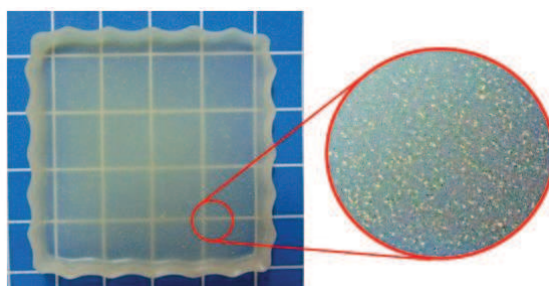


Figura 5.5. Imagen de la película obtenida a partir de PMix.

Por otro lado, es fundamental conocer la morfología de los *films* híbridos para comprender adecuadamente el comportamiento de los materiales. Por esta razón, se llevaron a cabo estudios de la morfología tanto de la superficie, como del corte transversal del *film*. La Figura 5.6 muestra imágenes en fase tomadas por AFM para la película libre de proteínas (A) y para dos *films* híbridos que contienen caseína metacrilada (A/CF y A/CFZ). Las imágenes de fase proporcionan un contraste entre la fase blanda (contraste oscuro) y la fase dura (contraste claro). De esta manera, se puede observar que la superficie y la sección transversal de la película acrílica pura (Figura 5.6a-b) presentan la formación de una película homogénea y continua, con una fase blanda única debido a la coalescencia completa de las partículas acrílicas. Por el contrario, las películas híbridas (Figura 5.6c-f), mostraron películas con una fase dura continua y coalescida (fase proteica) con pequeños dominios blandos (fase acrílica).

Cabe señalar que la técnica de AFM no permite diferenciar las proteínas (caseína y zeína), debido a que ambas poseen temperaturas de transición vítrea similares ($\sim 170^\circ\text{C}$) y, por lo tanto, dureza similar. A pesar de su alta T_g , la morfología de la película mostró que las partículas híbridas de acrílico/proteína estaban completamente coalescidas, principalmente a través de la fase proteica. Esto se debe a que la caseína (encargada de estabilizar las partículas) se encuentra en la superficie de las partículas (coraza), y posee la capacidad de coalescer debido a que el agua actúa como plastificante.^{177,178} Más específicamente, durante el proceso de secado de la película, el agua presente plastifica la fase proteica favoreciendo la coalescencia de las partículas a través de la coraza de caseína. Una vez evaporada el agua en la película, la fase proteica recupera su T_g resultando una fase dura que contiene los núcleos acrílicos blandos ocluidos, como se observa en la Figura 5.6.

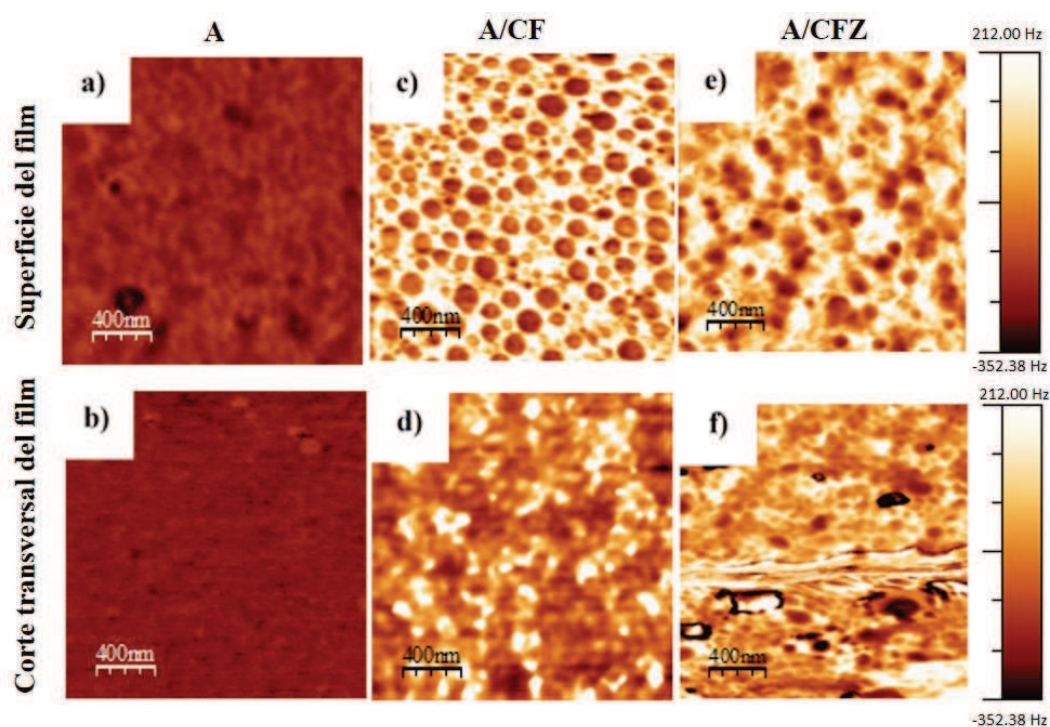


Figura 5.6. Imágenes de AFM en fase ($2000\text{ nm} \times 2000\text{ nm}$) de la película acrílica pura (a, b); la película A/CF (c, d) y la película A/CFZ (e, f).

Como se puede observar, para ambos materiales híbridos (con y sin zeína) la fase proteica se distribuyó uniformemente alrededor de la fase acrílica blanda, sin la aparición de grandes segregaciones de fase, lo que indica que los componentes lograron una alta compatibilización y una movilidad restringida de la proteína durante la formación de la película.^{37,38,108} Esta observación está de acuerdo con la alta compatibilidad indicada por los bajos valores de FP (Tabla 5.3). En contraste, las imágenes AFM para la superficie de los *films* obtenidas a partir de la mezcla física PMix mostraron una fase continua dura con presencia de grandes e irregulares agregados de partículas acrílicas (Figura 5.7a), debido a la falta de compatibilización entre proteínas y polímero acrílico. Además, para facilitar la comparación en la Figura 5.7b se muestra, en la misma escala de fase, el homólogo híbrido (A/CFZ) el cual presenta un grado de distribución de las fases a escala nanométrica.

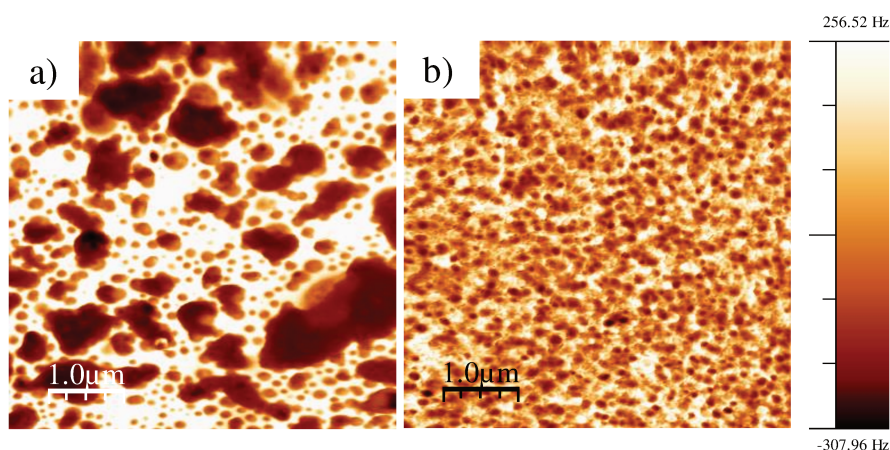


Figura 5.7. Imágenes de AFM en fase ($5000 \text{ nm} \times 5000 \text{ nm}$) de la superficie de películas de PMix (a) y A/CFZ (b).

Propiedades térmicas de los films

La Tabla 5.4 resume los resultados de T_g y $T_{d,max}$ para las películas híbridas, así como para cada una de las proteínas puras y las películas acrílicas.

Tabla 5.4. T_g y $T_{d,max}$ de los materiales híbridos. Comparación con sus componentes

Experimentos	T_g (°C)	$T_{d,max}$ (°C)
A	-35.03	385.9
Caseína	183.0 ³⁷	351.8
Zeína	154.1 ⁵³	356.8
A/CN	-36.29	386.5
A/CF	-35.34	387.8
A/CNZ	-37.43	381.9
A/CFZ	-33.82	382.5

Todos los polímeros híbridos presentaron una T_g similar, aproximadamente a $-35 \text{ }^\circ\text{C}$, coincidiendo con lo observado para A, debido a que todos poseen la misma composición de monómero acrílico (BA/MMA = 80/20). Estos materiales deberían evidenciar al menos dos T_g , una correspondiente al polímero acrílico y la otra a la fase proteica.³⁷ Sin embargo, debido a que la transición vítrea de ambas proteínas coincide con el inicio de su descomposición térmica ($\sim 170 \text{ }^\circ\text{C}$),^{53,192} los ensayos de DSC se realizaron hasta $130 \text{ }^\circ\text{C}$. Es por esta razón que no se informan los valores de T_g más altos y correspondiente a la fase proteica.

En la Figura 5.8 se observan los resultados de TGA para las proteínas, el acrílico puro y los materiales híbridos. De estos resultados se desprende que la degradación térmica fue más evidente para la caseína, la cual perdió aproximadamente el 10% de su peso antes de alcanzar los 200 °C (Figura 5.8b). Las proteínas nativas presentaron un amplio rango de descomposición con una $T_{d,máx}$ próxima a los 350 °C, mientras que la película de acrílico puro (A) exhibió un solo paso de pérdida de peso con una $T_{d,máx}$ cercano a los 386 °C. Por otro lado, los materiales híbridos mostraron una $T_{d,máx}$ de alrededor de 386 °C, sin variación significativa respecto a la muestra A. Este resultado coincide con lo reportado para materiales similares (basados en caseína/acrílico), donde un alto grado de injerto de la proteína no afectó significativamente la temperatura de degradación de los nanocompuestos.⁴⁰ Sin embargo, las películas híbridas comienzan a degradarse a una temperatura más baja que las películas de acrílico puro, coincidiendo con la degradación de las proteínas puras (caseína y zeína), lo cual es consistente con los reportes anteriores.^{27,53}

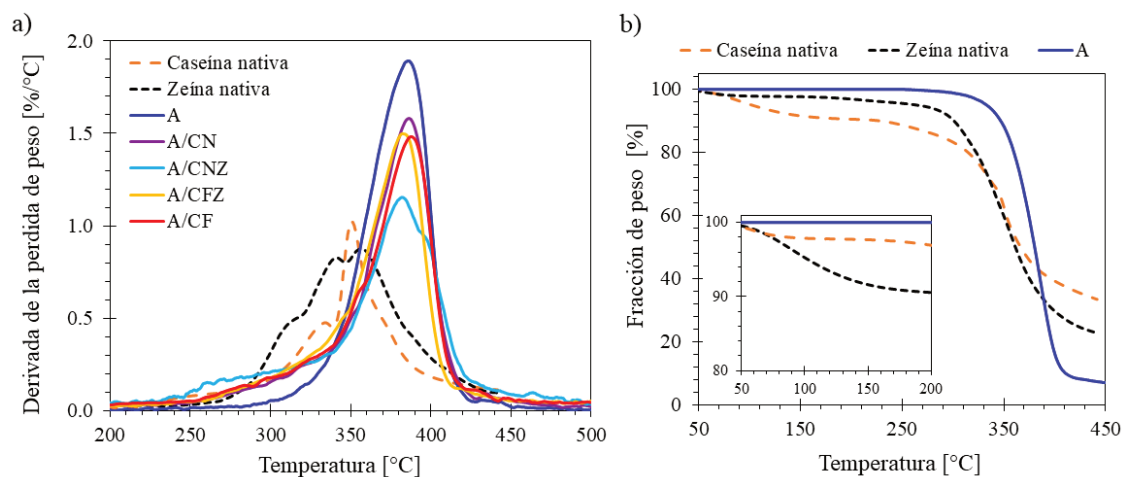


Figura 5.8. Derivada de la pérdida de peso para componentes puros y películas híbridas (a), y pérdida de peso para las proteínas nativas y el film de acrílico puro (b)

Comportamiento mecánico

La resistencia al bloqueo es un parámetro clave de los materiales poliméricos para su aplicación como recubrimientos, ya que permite determinar la capacidad del material a no

adherirse a sí mismos cuando dos superficies recubiertas entran en contacto. La Figura 5.9 muestra el valor de índice de antibloqueo promedio para las películas híbridas y las acrílicas puras. Como era de esperar, la película acrílica (A) presentó poca capacidad antibloqueo debido a su baja Tg, con una adherencia total entre superficies (Figura 5.9b), mientras que, las películas híbridas mostraron una buena resistencia al bloqueo. Esto se debe a que la incorporación de un material con alta Tg (como las proteínas) a una formulación acrílica blanda (con baja Tg) mejora la resistencia al bloqueo, al reducir la energía de adherencia y aumentar el módulo de almacenamiento.^{37,39,193} El aumento en el módulo de la película, hace que la misma no se deforme ante la compresión, ofreciendo mayor resistencia a la deformación y desfavoreciendo el contacto perfecto entre las superficies. Como se puede observar en la Figura 5.9a, cuando se empleó caseína modificada (A/CF y A/CFZ) resultaron valores más altos de resistencia al bloqueo con respecto a aquellos con caseína nativa, indicando que la mejora en la compatibilidad promueve la sinergia entre las fases (es decir, una fase blanda y adhesiva, con otra dura y sin adhesividad). Por otro lado, A/CFZ dio como resultado una película completamente sin bloqueo (el grado máximo de antibloqueo) sin rastros de adherencia en la superficie (Figura 5.9b).

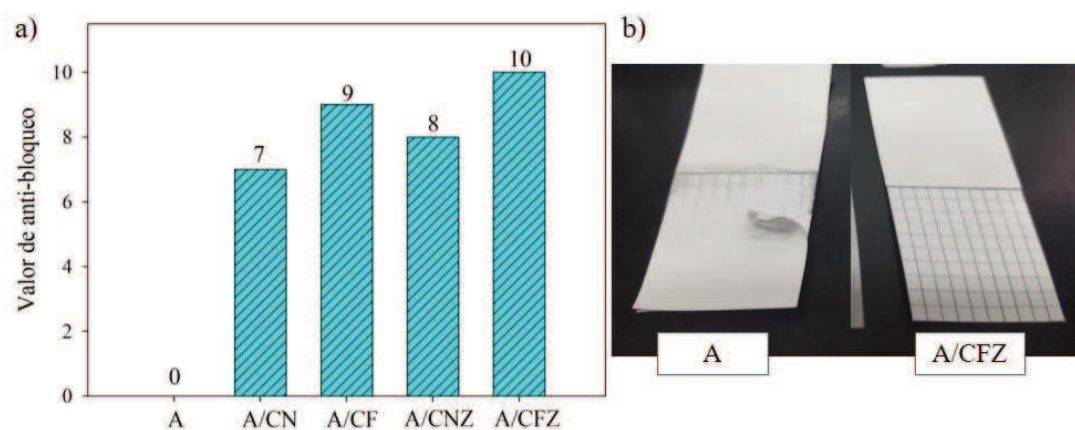


Figura 5.9. Resistencia al bloqueo de películas híbridas y acrílicas puras.

Los resultados de los ensayos de tracción y de dureza de las películas híbridas y de la película acrílica pura se muestran en la Tabla 5.5. Como se conoce, las películas de proteínas puras son muy frágiles, mientras que el *film* de acrílico puro (A) es un material muy blando que se deforma

fácilmente, alcanzando elevadas deformaciones (elongación a la rotura cercana al 3400 %) sin recuperación elástica (Figura 5.10.a). Esto se debe a que el copolímero BA/MMA puro posee una Tg por debajo de la temperatura del ensayo (23 °C) y, por lo tanto, se encuentra en un estado gomoso (Tabla 5.4).

La incorporación de proteínas, como componente rígido de alta Tg, generó películas híbridas con menor capacidad de deformación que las películas acrílicas puras (A). Sin embargo, estas películas soportaron deformaciones importantes (> 300%) y presentaron una mayor dureza (> 39 N). Estos resultados concuerdan con los reportados para materiales similares, donde la incorporación de una fase de proteína dura mejoró las propiedades mecánicas.^{22,194} Además, al emplear la caseína funcionalizada (A/CF y A/CFZ), los materiales se fortalecieron, disminuyendo su alargamiento a la rotura, aumentando tanto la resistencia a la tracción como la dureza, en comparación con sus análogos obtenidos a partir de caseína nativa (A/CN y A/CNZ, respectivamente). Este comportamiento está directamente relacionado con los valores de FP, debido a que la incorporación de caseína metacrilada redujo la cantidad de proteína libre, lo que contribuyó a producir una red reticulada, afectando así el rendimiento mecánico.

Tabla 5.5. Rendimiento mecánico de películas híbridas acrílicas/proteicas. Comparación con una película acrílica

Experimento	Resistencia tensil (MPa)	Elongación a la rotura (%)	Dureza (N)
A	0.2 ±0.01	3395.7 ±135.82	1.0 ±0.04
A/CN	6.9 ±0.49	561.0 ±10.46	40.5 ±1.57
A/CF	8.6 ±0.15	387.8 ±24.93	44.7 ±1.58
A/CNZ	6.6 ±0.32	487.6 ±12.36	39.3 ±3.83
A/CFZ	6.8 ±0.18	305.8 ±10.05	50.8 ±1.64

Además, el contenido de zeína de las películas híbridas no afectó significativamente su comportamiento de tracción con respecto a las películas híbridas sin zeína. Esto se debe a que todas las películas híbridas tienen el mismo contenido de proteína total (25%) y ambas proteínas tienen Tg similar, por lo que la relación entre la fase dura (proteica) y la fase blanda (acrílica) se

mantuvo constante. A pesar de esto, la presencia de zeína produjo una pequeña reducción en la resistencia a la tracción y en la capacidad de alargamiento. Por otro lado, el efecto de la falta de compatibilidad en un material híbrido sobre las propiedades mecánicas se puede observar en la Figura 5.10.b, donde se compara la película obtenida por mezcla física (PMix) con el híbrido homólogo (A/CFZ). Claramente, el *film* PMix presentó menor resistencia a la tracción y capacidad de alargamiento, como consecuencia de la falta de compatibilidad entre ambas fases.

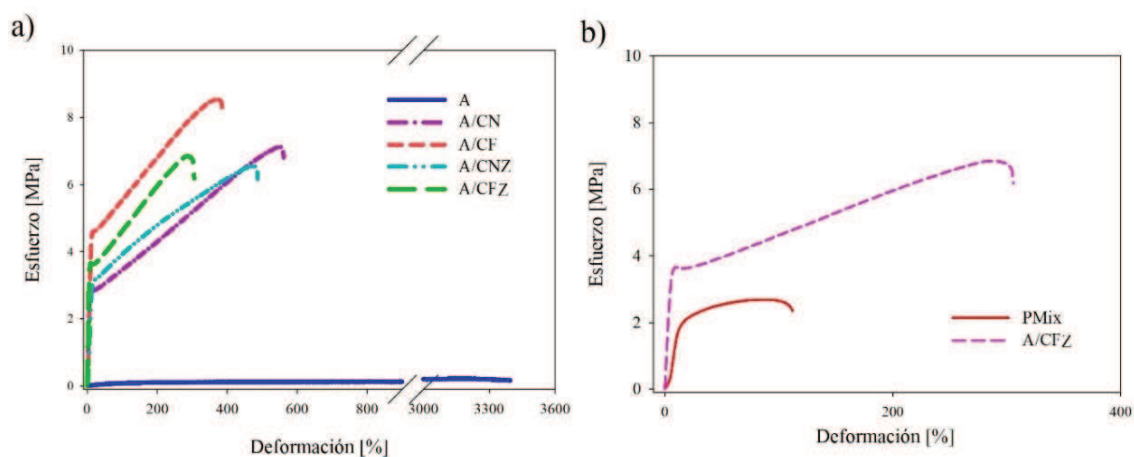


Figura 5.10. Resultados de la prueba de tracción para películas híbridas de acrílico/proteína y para la película acrílica pura (a), y su comparación con la mezcla física PMix (b).

Resistencia a los solventes

La resistencia a los disolventes es un requisito de rendimiento esencial para la mayoría de las aplicaciones de látex para recubrimientos. Mientras que los *films* de acrílico puro (A) tienen una alta resistencia al agua (8.5% de absorción de agua después de 8 horas de inmersión), su resistencia a los solventes orgánicos es pobre y se disuelve completamente luego de estar en contacto con MEK. Por este motivo, las películas híbridas acrílico/proteínas se evaluaron midiendo el ángulo de contacto estático (CA) y la resistencia a los disolventes por inmersión en agua y MEK (como disolvente orgánico).

Las mediciones del ángulo de contacto se emplean ampliamente para evaluar la hidrofobicidad de la superficie de la película.¹⁹⁵ La Figura 5.11a resume los valores de CA medidos en las

superficies de las películas de acrílico puro y de los *films* híbridos. Las películas híbridas basadas sólo en caseína (A/CN y A/CF) mostraron un CA menor que la película acrílica pura, debido a la naturaleza hidrófila de la caseína, exhibiendo en ambos casos valores similares ($\sim 75^\circ$), debido a que ambos látex tenían el mismo contenido de caseína (25% en peso) y FP similar (entre 60-67 %).

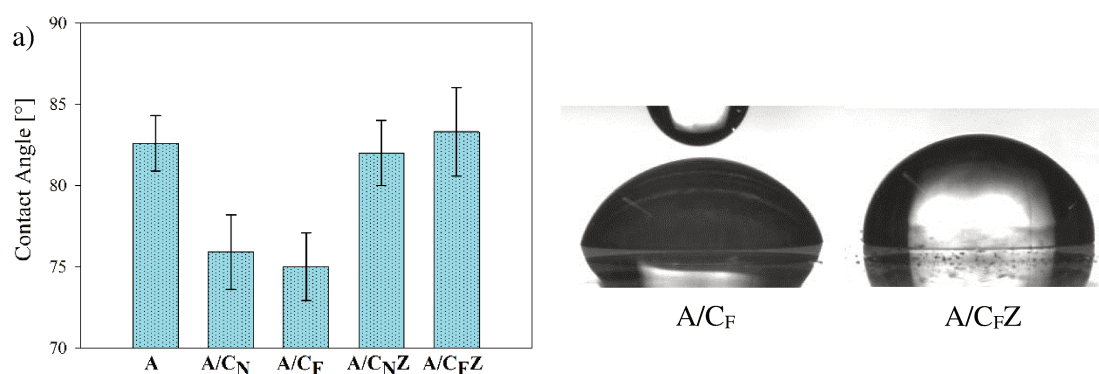


Figura 5.11. Ángulos de contacto estático de una gota de agua sobre la superficie de las películas híbridas y de acrílico puro (a); Imagen de una gota de agua sobre la superficie de películas híbridas con y sin zeína (b).

Sin embargo, la incorporación de zeína (A/CNZ y A/CFZ) incrementó el CA obtenido, como consecuencia del aumento de la hidrofobicidad superficial de estos materiales, en comparación con la de las películas a base de caseína (Figura 5.11b). La naturaleza hidrofóbica de la zeína contrarresta la hidrofiliidad de la caseína, alcanzando un CA similar al obtenido en la película acrílica pura ($\approx 82^\circ$).

Un resultado similar se espera al analizar la resistencia de estos materiales frente a los solventes. La Figura 5.12 muestra la absorción de agua destilada y MEK (A_w y A_{MEK} , respectivamente) de los *films* híbridos, durante 8 horas de inmersión a temperatura ambiente. El fenómeno de absorción en agua se debe principalmente a la presencia de componentes polares o cargados iónicamente que se encuentran en los látex, los cuales permanecen atrapados en las áreas intersticiales de las películas, y se convierten en una fuerza impulsora para la migración de agua

desde el medio hacia estas áreas intersticiales de las películas. Además, las películas híbridas basadas sólo en caseína presentan un inconveniente importante debido principalmente a la naturaleza altamente hidrófila de dicha proteína y su alto contenido en estas. Por lo tanto, los dominios de caseína no injertados (es decir, proteína libre) presentes en los *films*, podrían hincharse con agua. En este escenario, el valor de A_w estará fuertemente relacionado con el grado de injerto de la caseína, que modifica el carácter hidrofílico de la misma,⁴⁰ y de la presencia de un componente hidrofóbico compatibilizado, como podría ser la zeína. La Figura 5.12a muestra que la resistencia al agua de las películas híbridas mejoró cuando se redujo la cantidad de proteína libre (aumentó el grado de injerto) al incorporar CF en lugar de CN, resultando en valores más bajos de A_w . Además, las películas híbridas a base de caseína que contienen zeína (A/CNZ y A/CFZ) mostraron una mejor resistencia al agua (valores finales de A_w iguales a 232% y 117%, respectivamente), con respecto a aquellos materiales que contienen caseína como único biomaterial (valores finales de A_w para A/CN y A/CF iguales a 312% y 282%, respectivamente).

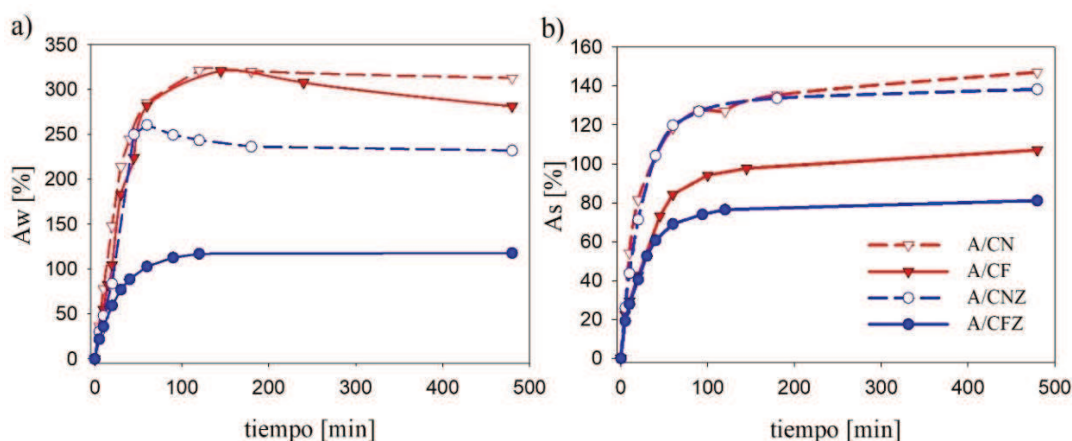


Figura 5.12. Absorción de agua (a) y de disolvente orgánico (b) para películas de acrílico puro y acrílico-proteínas.

Es importante resaltar que la película A/CNZ presentó una mayor resistencia al agua (con A_w menores) que las películas a base de caseína sin zeína (A/CN y A/CF), a pesar de poseer valores de FP (57%) similares. Este resultado demuestra que, aún con una compatibilidad media entre las

fases, la resistencia al agua de los materiales podría mejorarse notablemente, simplemente sustituyendo el 5% del contenido de caseína por una proteína hidrofóbica como la zeína. Este resultado se hizo aún más evidente cuando se incorporó caseína matacrilada y zeína (A/CFZ), alcanzando valores notablemente inferiores de A_w (~2.5 veces menos absorción de agua que su homólogo sin zeína A/CF), lo que se atribuyó a la presencia de la proteína hidrofóbica, y a que este material alcanzó el valor más bajo de FP (indicando que las proteínas están mayormente injertadas o formando parte de la partícula híbrida).

Por otro lado, como se mostró anteriormente en la Tabla 5.3, los materiales híbridos presentaron una fracción de material insoluble (IF) más alto que los *films* de acrílico puro, por lo que es de esperar que la incorporación de proteínas naturales en los látex acrílicos también mejore considerablemente la resistencia de estos materiales a la inmersión en disolventes orgánicos. De acuerdo con esto, mientras que la película A se disolvió completamente después de unos minutos de inmersión en MEK, las películas híbridas resistieron la prueba sin desintegrarse (Figura 5.12b). Este resultado es también una evidencia del efecto sinérgico entre ambos componentes, donde la presencia de proteínas proporciona una barrera suficiente al solvente orgánico.³⁷ En este caso, se observa que al disminuir FP se mejora la resistencia al solvente.

Por último, se comparó el rendimiento de la película obtenida a partir de la simple mezcla física del látex acrílico puro con ambas proteínas (PMix), la cual no posee un efecto sinérgico entre los caracteres hidrófilos e hidrófobos de los materiales combinados. Debido a que PMix mostró una rápida degradación del *film*, dificultando su manipulación durante el ensayo de absorción, la resistencia a los solventes se reportó como la pérdida de peso de material (W_{loss}) comparado con el peso inicial de la película, luego de su inmersión en los solventes durante 8 hr. La Figura 5.13 demostró que la película PMix presenta una baja resistencia a la inmersión en solventes (agua y MEK), con una gran pérdida de masa durante la prueba, en contraste con el *film* híbrido homólogo (A/CFZ).

Estos últimos resultados demuestran que la estrategia de síntesis propuesta permitió obtener películas híbridas con una importante fracción de componentes renovables en la formulación, mejorando la hidrofobicidad del material y su resistencia a los solventes, al reemplazar una pequeña fracción de caseína (la proteína hidrófila) por zeína (la proteína hidrófoba).

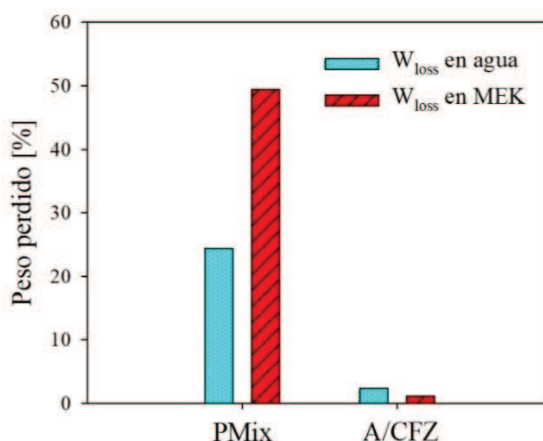


Figura 5.13. Comparación de la resistencia a disolventes de PMix con sus películas homólogas A/CFZ.

Biodegradabilidad de las películas en compost orgánico

Los resultados de biodegradación en compost para películas acrílicas puras (A) y para los *films* basados en caseína metacrilada (con y sin zeína) se presentan en la Figura 5.14. Estos se reportaron como la pérdida de peso de las películas después de permanecer enterrados durante 7 y 14 días en abono orgánico. Es importante aclarar que la fracción degradable de estos materiales sólo corresponde a la fase proteica que conforma el *film*, dado que las proteínas naturales tienden a degradarse en condiciones de compostaje. En este sentido, en apenas 14 días, los materiales híbridos perdieron casi el 80% del peso de la fracción degradable del material (correspondiente a aproximadamente el 15% del peso inicial del *film* completo). A pesar de que la fase acrílica no se degradó, la incorporación de proteínas naturales mejoró la biodegradabilidad final del material. Además, para la película A/CFZ la velocidad de descomposición fue un poco más lenta al inicio, comparada con las películas a base de caseína A/CF. Esto podría deberse a que la zeína posee

propiedades repelentes al agua y, por lo tanto, los materiales a base de zeína son más resistentes a la acción de los microorganismos.¹⁹⁶

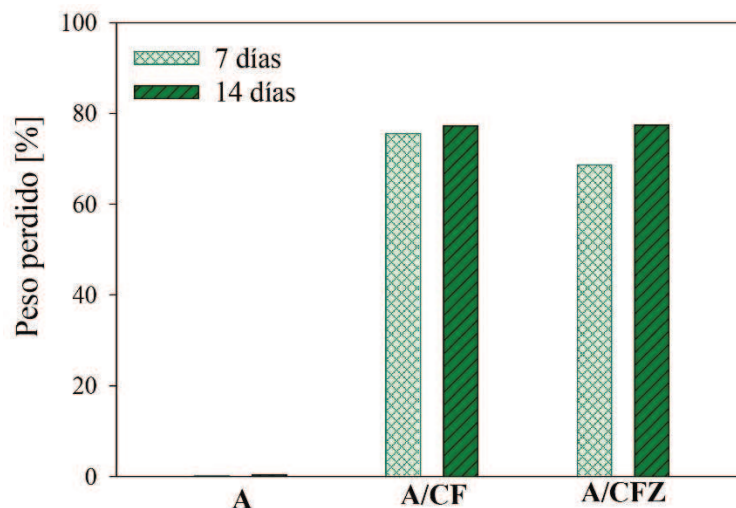


Figura 5.14. Biodegradación de películas híbridas tras 7 y 14 días de enterramiento en compost orgánico.

5.4. CONCLUSIONES

Se ha logrado sintetizar nanopartículas híbridas que contienen dos proteínas (caseína y zeína) como biopolímeros mediante un proceso en base acuosa, como es la polimerización en miniemulsión y en ausencia de emulsificantes convencionales. Este proceso demostró ser adecuado para incorporar pequeñas cantidades de zeína (una proteína hidrófoba) en nanopartículas híbridas altamente compatibilizadas. Por el contrario, el producto obtenido por la mezcla física de un látex acrílico con ambas proteínas presentó separación de fases tanto en la dispersión (látex) como en la película, debido a la falta de compatibilidad entre sus componentes.

Las películas híbridas obtenidas a partir de látex basados únicamente en caseína mostraron propiedades mecánicas mejoradas (con un alargamiento máximo de casi 500%), propiedades anti-bloqueo y biodegradación del suelo (cerca del 15%), manteniendo baja MFFT y $T_{d,max}$ similar a las de su homóloga acrílica pura. Además, en comparación con la caseína nativa, la incorporación de caseína previamente metacrilada redujo la cantidad de proteína libre remanente en

los látex, mejorando la compatibilización de las nanopartículas de acrílico/proteínas y consecuentemente sus propiedades finales. Sin embargo, se observó que un inconveniente importante de las películas basadas únicamente en caseína es su susceptibilidad al agua, lo que reduce tanto su resistencia a los solventes, como la hidrofobicidad de la superficie del material (ángulo de contacto cercano a 75°), debido al carácter hidrofílico de la caseína. Pero pudo observarse que la incorporación de una pequeña fracción de zeína (5%) mejoró significativamente la resistencia al agua de las películas híbridas y aumentó su hidrofobicidad superficial (ángulo de contacto igual a 83°), sin modificar significativamente sus propiedades mecánicas y térmicas. Estas películas híbridas son materiales atractivos, con un alto potencial para aplicaciones industriales como recubrimientos.

Estos resultados alientan a desarrollar un proceso de polimerización capaz de producir nanopartículas híbridas con una mayor cantidad de zeína incorporada, que mejore el aporte de este componente hidrofóbico sobre el comportamiento global del material híbrido. Es por ello que en el Capítulo 6 se muestran los primeros resultados de la investigación de una nueva alternativa de síntesis para producir materiales con alto contenido de proteínas y una mayor fracción de zeína.

CAPÍTULO 6: LÁTEX HÍBRIDOS BASADOS EN ZEÍNA-CASEÍNA SINTETIZADOS POR POLIMERIZACIÓN EN EMULSIÓN SEMI-BATCH SEMBRADA, PARA SU APLICACIÓN COMO RECUBRIMIENTO ENTÉRICO^f

6.1. INTRODUCCIÓN

La administración oral es reconocida como la ruta de preferencia para el tratamiento de diversas enfermedades, por ser un método de mayor complacencia para el paciente. Actualmente los comprimidos sólidos representan el 80 % de todas las formas de dosificación disponibles o administradas al hombre, ya que además presenta otras ventajas como, la facilidad de fabricación y una mayor estabilidad en comparación con las formas farmacéuticas líquidas o semisólidas.¹⁰⁴

Sin embargo, la incorporación de fármacos por esta vía muchas veces requiere de la protección eficiente del principio activo contra el ambiente hostil del estómago (altamente ácido), para mantener la actividad biológica del fármaco y asegurar su correcta acción.¹⁰⁰ En este contexto, de acuerdo con la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y la Farmacopea de Estados Unidos (USP), las formas de dosificación oral sólidas protegidas (de liberación modificada), se pueden clasificar en recubrimientos para liberación retardada (recubrimiento entérico) o para la liberación prolongada (o sostenida) de los productos farmacéuticos (Figura 6.1).¹⁹⁷ Sin embargo, existen otros tipos de productos orales de liberación modificada más recientes, que incluyen la liberación por pulsos, la administración dirigida (por ejemplo, específicamente a la mucosa oral, estómago, intestino proximal, intestino distal y/o colon), o combinaciones de estas.¹⁹⁷

Particularmente, los recubrimientos entéricos, son generalmente una capa delgada de polímero que recubre uniformemente comprimidos, cápsulas, pellets, o incluso los propios cristales del principio activo.¹⁹⁸ Esta capa de polímero se caracteriza principalmente por retardar la liberación del fármaco hasta que este se encuentra en el intestino delgado (a pH 6.8). Los materiales

^f Los resultados presentados en este capítulo forman parte de la solicitud de patente nro. 20200103676 Allasia *et al.*, “Composición de polímeros orgánicos sintéticos y biopartículas” (2020).

comúnmente más empleados son los derivados de la celulosa (CAP, ECD, HPMCP, entre otros) y los derivados de ácidos acrílicos como Eudragit® (producido por Evonik Industries AG).¹⁰⁰ Estos últimos presentan ventajas frente a los derivados de la celulosa, porque al ser obtenidos a partir de polímeros sintéticos (derivados de acrilatos y metacrilatos), es posible producir materiales más reproducibles, y sus propiedades (como el pH al que se solubilizan o la permeabilidad al vapor de agua) pueden ajustarse fácilmente modificando la formulación acrílica, las condiciones y estrategias de síntesis, dando lugar a los diferentes grados comerciales de Eudragit®.¹⁹⁸ La Figura 6.2 representa la estructura básica de los polímeros de Eudragit®, con las variantes que dan lugar a los diferentes subtipos de la marca.¹⁹⁸

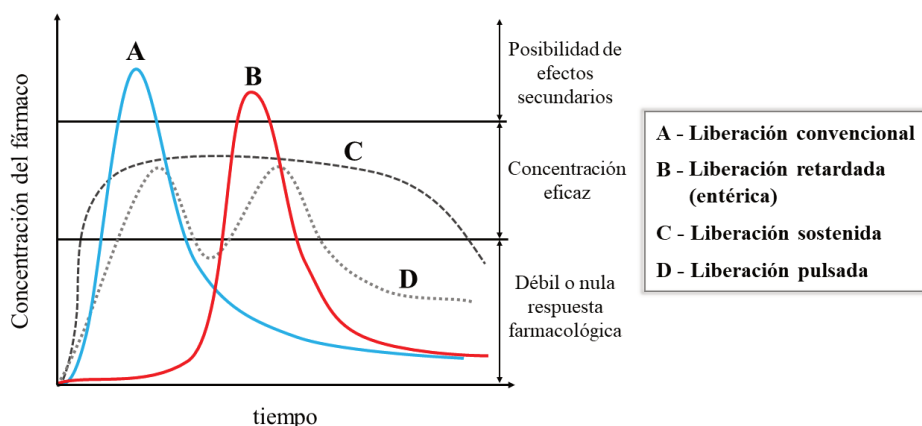


Figura 6.1. Representación genérica del perfil de concentración del fármaco, para los diferentes tipos de liberación

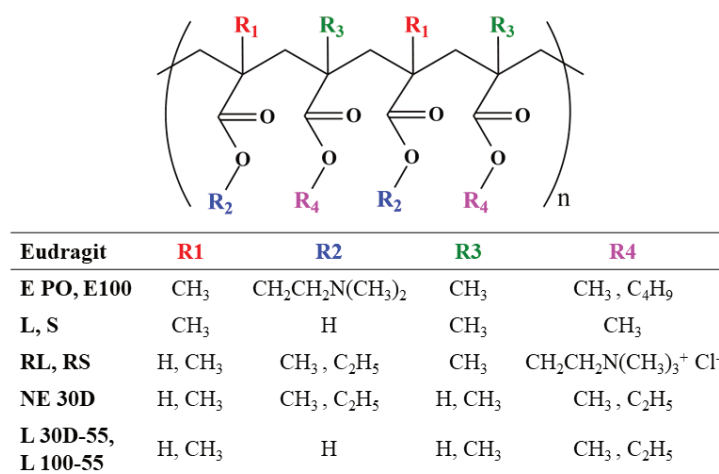


Figura 6.2. Estructura básica del Eudragit®, y sus derivados

Específicamente, estos copolímeros se sintetizan mediante polimerización radicalaria, y los polímeros resultantes son no tóxicos, amorfos, con una Tg entre 9 y >150 °C (por lo que, en algunos casos requieren de la adición de plastificantes para su aplicación), solubles a diferentes pH (por ejemplo, pH > 6 para una liberación entérica, pH > 7 para una liberación dirigida al colon), o no solubles (hinchables y permeables) para la liberación sostenida. El recubrimiento se lleva a cabo a partir de una solución de estos polímeros (en solventes orgánicos, como isopropanol o acetona, o en agua), empleando la técnica de atomización.^{197,199}

En este contexto, el empleo de biomateriales para sintetizar polímeros híbridos, podría resultar una alternativa prometedora y más amigable con el medio ambiente, para sustituir parcialmente los monómeros acrílicos. A tal efecto, las proteínas surgen como posibles candidatas, debido a que poseen múltiples ventajas debido principalmente a su estructura aminoácida, que le confiere a la proteína excelentes propiedades funcionales, sensibilidad al cambio de acidez del medio en el que se encuentra, y degradabilidad por acción enzimática en condiciones fisiológicas. Además, otras características relevantes de las proteínas es su no toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta estabilidad térmica y capacidad de formar películas.²⁰⁰⁻²⁰⁴

Particularmente, el interés en la zeína (proteína de maíz) ha crecido últimamente, debido a su potencial aplicación en el área biomédica, tanto en la ingeniería de tejidos como en sistemas para la administración de fármacos.^{202,203} Esto se debe a que, además de las ventajas antes mencionadas, la zeína se caracteriza por ser insoluble en agua y soluble en mezclas alcohólicas, lo cual resulta favorable para la encapsulación y protección de fármacos hidrofóbicos,²⁰² y no se ha revelado ninguna posible reacción alérgica debido a su uso.²⁰³ Además, a diferencia de otras proteínas, la baja digestibilidad de la zeína debido a su limitada degradación enzimática, pueden aprovecharse para desarrollar sistemas de administración, en los cuales la protección y liberación de las moléculas bioactivas esté controlado por la lenta digestión de la proteína.¹⁹⁰

En este contexto, dentro de los sistemas de liberación de fármacos, el principal enfoque se centra en la microencapsulación, a partir de obtención de nanopartículas de zeína estabilizadas

con diferentes biomateriales (Ver Tabla 1.3, sección 1.2.2 del Capítulo 1), empleando una técnica sencilla y escalable a nivel industrial, como lo es la precipitación por antisolvente.

En el presente Capítulo se investiga la síntesis de un polímero híbrido acrílico/caseína/zeína, que contenga un aporte balanceado de ambas proteínas con la fase acrílica. Tomando como base el estudio realizado en el Capítulo 5 de esta Tesis, donde se sintetizó un sistema híbrido acrílico/caseína/zeína, con una pequeña fracción de zeína, se propone en este Capítulo una estrategia de síntesis que permita utilizar biopartículas zeína/caseína como siembra en la polimerización en emulsión sembrada de monómero acrílicos. Con esta estrategia, se obtendrán látex híbridos, libres de plastificantes y emulsificantes convencionales, que sea capaz de formar *film* a temperatura ambiente, resistir a los medios ácidos y presentar sensibilidad al cambio de pH (atribuido a la presencia de proteínas en su estructura), para su potencial aplicación como recubrimiento entérico. Es por ello que en este Capítulo se evaluará la potencialidad de los látex y películas producidos para su aplicación como recubrimiento entérico.

6.2. TRABAJO EXPERIMENTAL

La descripción detallada de los materiales, la especificación de los equipos, y los métodos de síntesis y caracterización empleados a lo largo del trabajo experimental de esta Tesis, se presenta en el Anexo. Por esta razón, a continuación, se hará referencia sólo a los aspectos del trabajo experimental que se aplican específicamente a este Capítulo.

En una primera etapa del trabajo, se estudió la síntesis de las biopartículas zeína-caseína, empleando la técnica de antisolvente de precipitación adaptada a las condiciones de esta Tesis, con el objetivo de obtener dispersiones estables y optimizar el proceso para incrementar el rendimiento de partículas. En una segunda etapa, se utilizaron las biopartículas previamente obtenidas como siembra en la polimerización en emulsión sembrada y semicontinua para producir partículas híbridas acrílicos/proteínas. Se evaluó el efecto del caudal de adición de la mezcla de monómeros sobre la cinética de polimerización y la formación de las partículas híbridas. Por

último, se caracterizaron los *films* obtenidos por casting de estos látex, haciendo principal hincapié en la sensibilidad al cambio de pH y la resistencia a los medios ácidos de los mismos.

6.2.1. Síntesis de biopartículas zeína-caseína. Optimización del proceso

Como se mencionó anteriormente, las biopartículas zeína-caseína se preparan a través de la técnica antisolvente de precipitación. Para esto, se prepara una solución alcohólica de zeína (denominada ‘solvente’) y una solución acuosa de caseína (denominada ‘antisolvente’). Si bien esta técnica ha sido ampliamente estudiada, se reportan diferencias sobre la forma correcta de poner en contacto dichas soluciones (alimentación lenta ‘gota a gota’ o rápida, del antisolvente sobre el solvente, o viceversa), y esto afecta la estabilidad de la dispersión final y el diámetro de las partículas.^{66,183,190,205} Otras variables de operación que afectan el tamaño de partícula son la concentración de zeína en el solvente, la concentración de caseína en el antisolvente, la relación zeína:caseína, y la relación solvente:antisolvente.⁶⁶ A partir del análisis de los datos reportados, se adoptó una relación zeína:caseína 1:1, debido a que con ella se ha reportado la máxima estabilidad de las biopartículas y una correcta redispersión en agua (que se realiza en un punto posterior del proceso).

El procedimiento propuesto y utilizado para la preparación de las biopartículas que se empleó en la Tesis se esquematiza en la Figura 6.3, mientras que la Tabla 6.1 muestra un ejemplo de la receta empleada para la preparación de cada una de las soluciones. El procedimiento implica la alimentación lenta y constante (≈ 0.66 g/min) de una de las soluciones sobre la otra solución, mientras esta última se mantiene bajo agitación magnética constante y con aplicación de ultrasonido. Para ello, se empleó una bomba de jeringa que permitió controlar adecuadamente el caudal de la dosificación y un vaso encamisado conectado a un baño refrigerante para mantener la temperatura de la dispersión por debajo de 50°C. Las condiciones de ultrasonido fueron 70% de amplitud, con ciclos de 10 segundos de encendido y 5 de apagado, empleando un equipo Sonics VC 750 (potencia de 750 vatios). Una vez terminada la alimentación de la solución que fue

cargada en la jeringa, se mantiene la sonicación por 10 minutos adicionales para asegurar la homogeneidad de la dispersión.

Una vez formada la dispersión de proteínas, se procede a secarla en moldes de silicona a 50 °C, hasta eliminar completamente el agua y el etanol, obteniéndose una película que contiene las partículas de proteína (Foto de la Figura 6.3). Por último, este *film* se redispersa en agua a temperatura ambiente (3.2 % de sólidos), y se centrifuga para eliminar los agregados de gran tamaño. Si bien se logra la redispersión completa en agua a temperatura ambiente, al terminar la redispersión es conveniente sonicar durante 5 minutos para homogeneizar la muestra. Esto permite romper pequeños agregados, reduciendo el Dp medio y mejorando el rendimiento final del proceso.

Tabla 6.1. Ejemplo de una receta para sintetizar las nanopartículas de zeína/caseína.

Soluciones	Reactivos	Cantidades (g)
Antisolvente (pH = 11)	Caseína	0.5-1
	Na ₂ CO ₃	0.2
	Agua	49
Solvente (80 %v/v)	Zeína	0.5-1
	Etanol (96%)	13.4
	Agua	4

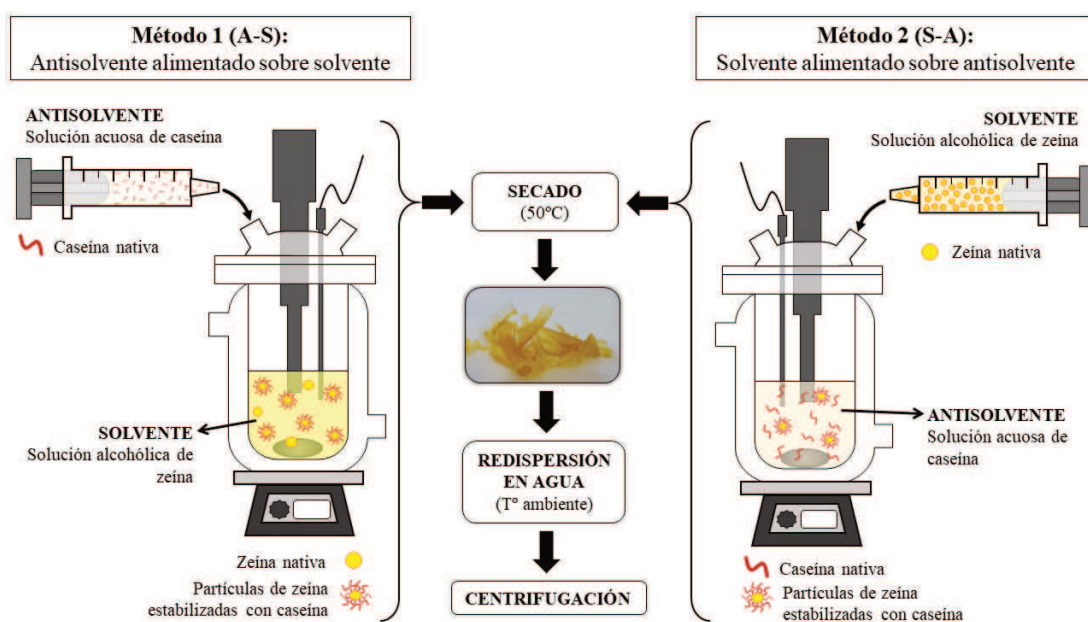


Figura 6.3. Esquema de síntesis de las biopartículas empleando la técnica antisolvente de precipitación. Las partículas estabilizadas aparecen una vez comenzada la alimentación.

La Tabla 6.2 resume los experimentos realizados para la obtención de las dispersiones de biopartículas zeína-caseína. Para esto, se emplearon dos concentraciones diferentes de zeína (2.5 y 5 %p/v) y caseína (1 y 2 %p/v), manteniendo constante la relación másica 1:1 entre las proteínas. Además, se emplearon 3 velocidades diferentes de centrifugación en la etapa final del proceso, para la recuperación de la dispersión de partículas (sobrenadante). Los códigos de las dispersiones obtenidas, contienen la información del método empleado para su síntesis mediante las abreviaciones ‘A’ (para el antisolvente) y ‘S’ (para el solvente), incluyendo entre paréntesis la concentración de la zeína, y como subíndice la velocidad de centrifugación. De esta manera, S-A(5)₂₅₀₀ estaría indicando que se empleó el método 2, es decir, se alimentó el solvente sobre el antisolvente, usando 5% de zeína en el solvente y la recuperación final de la redispersión de las partículas se realizó a 2500 rpm.

Tabla 6.2. Experimentos realizados para la optimización de la obtención de las biopartículas.

Experimentos	Concentración de la proteína en la solución (%p/v)	Método empleado para poner en contacto las soluciones		Velocidad de centrifugación (rpm)
		Método 1 (A-S)	Método 2 (S-A)	
S-A(2.5) ₂₅₀₀	2.5 % de Zn 1.0 % de Cas			2500
S-A(2.5) ₄₀₀₀			X	4000
S-A(2.5) ₁₀₀₀₀				10000
A-S(2.5) ₂₅₀₀	2.5 % de Zn 1.0 % de Cas			2500
A-S(2.5) ₄₀₀₀		X		4000
A-S(2.5) ₁₀₀₀₀				10000
S-A(5) ₂₅₀₀	5.0 % de Zn 2.0 % de Cas			2500
S-A(5) ₄₀₀₀			X	4000
S-A(5) ₁₀₀₀₀				10000
A-S(5) ₂₅₀₀	5.0 % de Zn 2.0 % de Cas			2500
A-S(5) ₄₀₀₀		X		4000
A-S(5) ₁₀₀₀₀				10000

6.2.2. Síntesis de látex híbridos Acrílico/Proteínas

Los látex híbridos libres de emulsificantes convencionales, se sintetizaron por polimerización semi-batch en emulsión, empleando las biopartículas de proteínas obtenida anteriormente, como siembra inicial. Para esto, la redispersión de las biopartículas se cargó en el reactor de

polimerización, se burbujeo N₂ durante 20 minutos y se calentó hasta los 70 °C. Una vez alcanzada la temperatura de reacción deseada, se adicionó el iniciador (KPS), y se mantuvo bajo agitación durante 10 minutos antes de la adición de los monómeros. Esta estrategia permitió mejorar la conversión final y reducir los coágulos formados. (Por razones de extensión, estos resultados no se incluyen en la Tesis). Por último, se adicionó el/los monómeros de forma continua empleando una bomba peristáltica para mantener un caudal lento y constante, próximo a 0.06 g/min. En la Tabla 6.3 se muestra una receta modelo, para la polimerización en emulsión con una relación proteína/acrílico 20/100, empleando una mezcla de monómeros de BA/MMA (80/20) con una T_g teórica del copolímero acrílico de -35 °C.

Tabla 6.3. Receta modelo para obtener 50 g de látex híbrido.

Reactivos	Cantidades	
Dispersión de proteínas (2.38 % de sólidos)	42.83 g	
Relación proteínas/monómeros	20/100	
	Total	5.09 g
Monómeros	BA (80%)	4.07 g
	MMA (20%)	1.02 g
KPS ^a	0.08 g	
Látex total	50.00 g	
Contenido de sólidos	12.23 %	

^aEl iniciador se disolvió previamente en 2 g de agua

En esta segunda etapa del trabajo, se estudió el efecto sobre la cinética de polimerización y formación de partículas, en dos reacciones semi-batch en emulsión, de la aplicación de 2 caudales de alimentación diferentes de la mezcla de monómeros (0.037 y 0.056 g/min). Además, se realizó una polimerización batch, en la cual la mezcla de monómeros se adicionó inicialmente en el reactor, junto a la dispersión de biopartículas. En esta segunda etapa del proceso, los códigos empleados contienen información sobre el caudal empleado durante la polimerización; así por ejemplo P(0.037) indica que la mezcla de monómeros se alimentó con una velocidad de 0.037 g/min. En el caso de la polimerización batch el código empleado fue P(0), indicando que los

monómeros no se alimentaron a caudal constante, sino que fueron cargados inicialmente (en modo batch).

6.2.3. Caracterización de la dispersión de biopartículas zeína-caseína y los látex híbridos

El diámetro medio de las partículas (D_p) se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) a 90° y a una temperatura de 25°C , empleando un fotómetro BI-9000 de Brookhaven. En el caso de las biopartículas zeína-caseína, se determinó su estabilidad a partir de la variación del D_p a través del tiempo (a lo largo de 6 días), como así también, mediante la determinación del potencial zeta (utilizando un equipo zetasizer nano ZS de Malvern), y a partir de la observación de precipitados. La distribución del tamaño de las biopartículas se determinó por fotesedimentometría centrífuga de disco (DCP), utilizando un equipo BI-DCP de Brookhaven Instruments.

La morfología de las biopartículas y de las partículas híbridas, se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), empleando un microscopio JEOL modelo JEM-2100 plus. Las muestras fueron diluidas hasta un 0.01% en peso de contenido de sólidos. Se depositó una gota de la muestra sobre una rejilla de cobre revestida con Formvar®. Luego, se le añadió una gota de solución de UAc al 1% en peso, para teñir negativamente la superficie de las partículas.

El rendimiento del proceso de producción de las biopartículas se evaluó gravimétricamente, a partir de la determinación del peso de proteína perdida después de la centrifugación (y depositada en el fondo de los tubos de centrifugación), comparada con la cantidad de proteína de la formulación. Para esto, se centrifugó la redispersión, se recuperó el fondo, se secó en estufa a 70°C y se registró su peso. Con estos datos, se estimó el rendimiento del método de preparación de las biopartículas.

En cuanto a los látex híbridos, la conversión global de los monómeros acrílicos (x), se determinó gravimétricamente utilizando la relación en peso entre el polímero acrílico y la cantidad

de monómeros alimentada. Mientras que el porcentaje de proteína libre (FP) que se encuentra soluble en el agua o adsorbida sobre las partículas, es decir la proteína que no forma parte de las partículas híbridas, se cuantificó mediante espectroscopia UV utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Visible. El FP se expresó como la relación en masa entre la proteína libre y la proteína sembrada inicialmente en forma de biopartículas. La proteína libre se separó de los látex mediante 3 etapas de lavado, recuperación por centrifugación y redispersión, empleando una solución de SLS (0.1%). A continuación, se cuantificó la concentración de proteína soluble (en los sobrenadantes) correlacionando el área del pico a 280 nm, con una curva de calibración de la concentración de la proteína.

6.2.4. Caracterización de las películas

Las películas híbridas se obtuvieron secando los látex en molde de siliconas, a 22 ° C y 55% de HR durante una semana.

La morfología superficial e interna de los *films* se estudió por microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo *tapping*, empleando un equipo comercial Nanotec Electronic. Para el estudio de la superficie, se preparó el *film* sobre papel sellante (120 µm de espesor en húmedo) y se lo secó a temperatura ambiente durante la noche.

Se llevaron a cabo pruebas de resistencia al medio ácido (pH 1.2) y alcalino (pH 6.8) empleando fluido gástrico e intestinal simulado sin enzimas, preparado según lo establecido por farmacopea. Los discos (1 mm de espesor y 10 mm de diámetro) de las muestras de los *films*, se sumergieron en los distintos medios a temperatura ambiente durante 5 horas. A lo largo del ensayo, las muestras se retiraron, se secaron cuidadosamente, se pesaron e inmediatamente se sumergieron nuevamente. La absorción de agua (%) se reportó como el porcentaje de la masa de solvente absorbido, respecto al peso inicial del *film* seco.

El ángulo de contacto estático (CA) del agua sobre las superficies de la película fueron medidos empleando un goniómetro construido en el Grupo. A tal efecto, se formaron *films* de 120

μm (espesor húmedo) sobre una placa de vidrio y se secaron a temperatura ambiente durante la noche. Luego, se depositaron gotas de agua destilada ($23 \mu\text{l}$) sobre la superficie de las películas.

Las propiedades viscoelásticas de los *films* se las estudió utilizando un reómetro Haake (RheoStress RS80) equipado con geometría de plato-plato de 20 mm de diámetro. A las muestras se les realizó un barrido de amplitud desde 0.1 a 20 %, aplicando una frecuencia angular constante de 10 Hz, a 20 °C para determinar la región viscoelástica lineal (RVL) de las películas secas (10 mm de diámetro) e hinchadas en diferentes buffers (pH 1.2 y 6.8). Luego, se realizó sobre las muestras un barrido de frecuencia de 0.1 a 100 Hz en la RVL, aplicando una deformación constante de 0.5% y a 20 °C.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las diferentes estrategias de síntesis de biopartículas y de las polimerizaciones semi-batch exploradas, como así también de la evaluación del desempeño de las películas como recubrimiento entérico.

6.3.1. Obtención de las biopartículas zeína/caseína. Selección y optimización del proceso.

Estabilidad de las dispersiones

Uno de los parámetros que define la estabilidad de las biopartículas, es la forma de poner en contacto las soluciones, ya que afecta como y donde se produce la saturación y precipitación de la zeína. Es por ello que primero se comparan los métodos de preparación de las biopartículas. Las alternativas analizadas (Figura 6.3) son el método 1, donde el antisolvente (solución acuosa de caseína) se dosifica gota a gota sobre el solvente (solución alcohólica de zeína), y el método 2, donde el solvente se dosifica sobre el antisolvente. En la Figura 6.4 se muestran las redispersiones obtenidas antes y después de centrifugar, empleando los métodos 1 y 2, y utilizando 5 % de zeína en el solvente (A-S(5) y S-A(5)). Como se puede observar, alimentar el antisolvente sobre el

solvente (método 1) produce dispersiones inestables, con grandes agregados de partículas que precipitan rápidamente, incluso antes de ser centrifugadas. Por el contrario, alimentar el solvente sobre el antisolvente (método 2) produce dispersiones muy estables que muestran poca o nula precipitación (antes de ser centrifugadas). En ambos casos, antes de centrifugar las dispersiones se observan de un color blanquecino y opaco, y al centrifugarlas se tornan más transparentes, debido a la disminución de la concentración de biopartículas de proteínas.

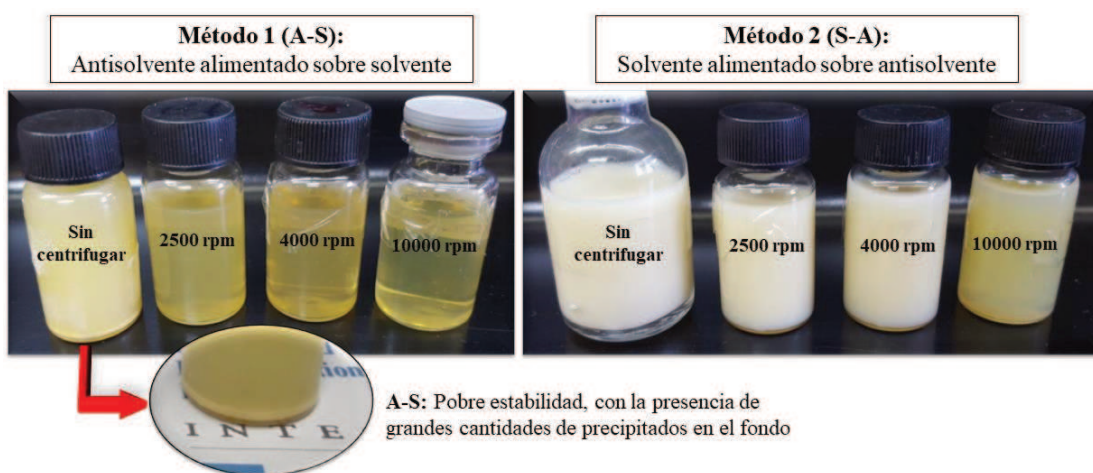


Figura 6.4. Fotografías de todas las redispersiones de biopartículas obtenidas por las técnicas A-S y S-A sintetizadas con 5% de zeína, antes y después de centrifugar.

La mayor estabilidad obtenida cuando se emplea el método 2 puede deberse a que, el contacto de la gota de solvente con el medio acuoso (antisolvente) promueve la dilución del alcohol y a su vez la precipitación de la zeína en este medio altamente hidrofílico. En estas condiciones, el precipitado de zeína puede ser estabilizado absorbiendo caseína que se encuentra en una alta concentración en este medio. Siguiendo este razonamiento, la concentración de agua en el antisolvente será máxima al inicio del proceso de preparación de biopartículas y disminuirá a medida que se continúa adicionando la solución solvente (Figura 6.5). Por lo tanto, este método favorece la rápida precipitación y estabilización de la zeína con caseína. Por el contrario, al aplicar el método 1, una pequeña gota de agua con caseína (estabilizante) entra en contacto con el medio en el cual la zeína permanece soluble (solución de etanol al 80%). En este caso, si bien en la

proximidad de la gota de agua se produce la saturación de la proteína y por ende la precipitación de la misma, es posible que la proteína precipitada vuelva a solubilizarse debido a que la solución final sigue siendo alta en contenido alcohólico (la zeína es soluble en un rango de etanol entre 70 y 90% v/v).

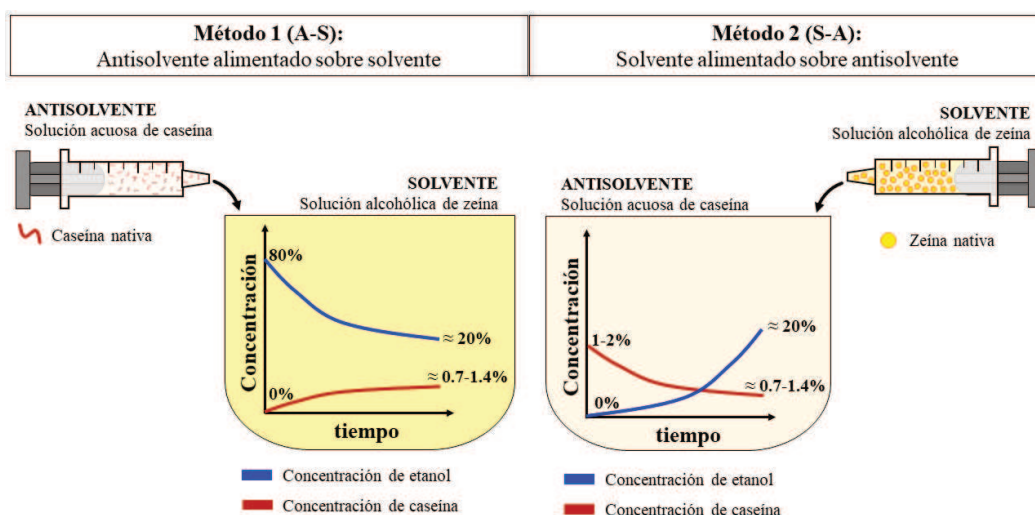


Figura 6.5. Esquema representativo de la variación de la caseína (estabilizante) y del etanol en la solución receptora, durante los métodos aplicados para producir las biopartículas.

Sobre la base de estos resultados, se trabajará con las dos dispersiones sintetizadas con el método 2, S-A(2.5) y S-A(5), evaluando la estabilidad mediante el seguimiento del Dp en el tiempo, la distribución de tamaño y el rendimiento durante el proceso de centrifugación.

Se evaluó la variación del tamaño de partículas a lo largo de 6 días, como indicativo de la estabilidad de la dispersión de biopartículas luego de haber sido centrifugadas con diferentes velocidades (2500, 4000, y 10000 rpm). Las muestras fueron preparadas el día 1 y centrifugadas. Luego, se mantuvieron guardadas refrigeradas y teniendo la precaución de no agitar las muestras durante los días en que se realizaron las mediciones de Dp. Como se puede observar en la Figura 6.6, el Dp disminuye levemente a lo largo del tiempo. Esta disminución se reduce para las muestras centrifugadas a una velocidad mayor, indicando una mayor estabilidad de la muestra. Es importante resaltar que esta mayor estabilidad de las dispersiones de biopartículas centrifugadas a mayor velocidad está asociada a que se produce una mayor precipitación de las

partículas más grandes o microagregados. Aun así, todas las dispersiones de biopartículas son muy estables, con cambios mínimos en el Dp después de 7 días. Este resultado está de acuerdo a lo observado por Li *et al.*²⁰⁵, quienes reportaron que las dispersiones de biopartículas zeína-caseína resultaban estables durante 8 meses, reportando cambios mínimos en el Dp y en el potencial zeta de las dispersiones.

Por otro lado, como era de esperar, el Dp de las partículas fue menor cuando se empleó una concentración menor de zeína en el solvente,⁶⁶ pasando de 240 nm para S-A(5)₂₅₀₀ a 208 nm para S-A(2.5)₂₅₀₀.

Como se puede observar en la Figura 6.7, la distribución del tamaño de partícula determinado por DCP sobre la dispersión S-A(5), muestra una distribución ancha, la cual disminuye al incrementar la velocidad de centrifugación. La existencia de partículas de variados tamaños también se observa por TEM (Figura 6.8). Las biopartículas son esféricas, con una estructura núcleo-coraza, con el núcleo formado por la zeína (hidrofóbica) y la coraza por caseína (hidrofílica).^{190,204,205}

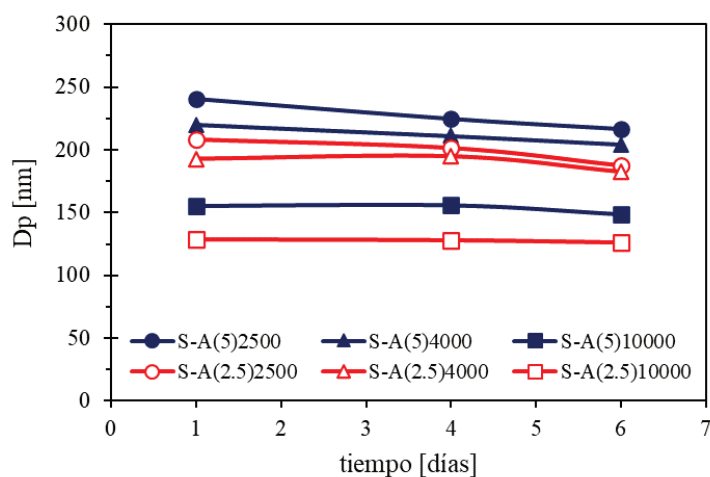


Figura 6.6. Estabilidad de las dispersiones de biopartículas. Variación del Dp en el tiempo, para las dispersiones S-A(5) y S-A(2.5) centrifugadas a 2500, 4000 y 10000 rpm.

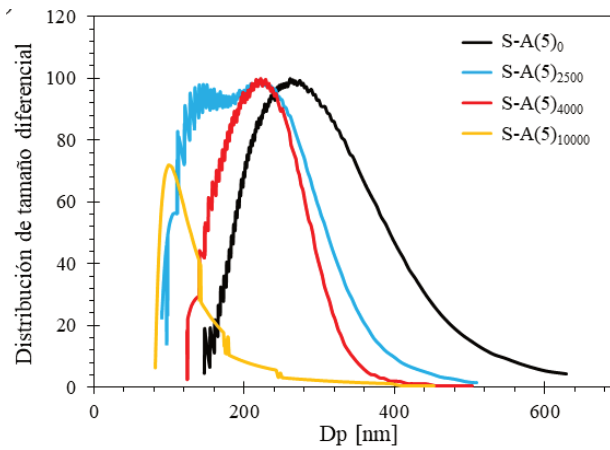


Figura 6.7. Distribución del tamaño de partícula determinado por DCP, de las dispersiones S-A(5) después de ser centrifugadas a 2500, 4000 y 10000 rpm. Además, se agregó la dispersión antes de centrifugar S-A(5)₀

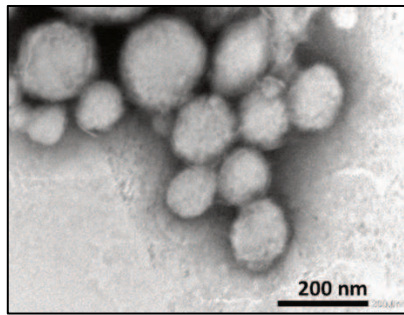


Figura 6.8. Imagen de las biopartículas zeína/caseína para la dispersión S-A(5)₂₅₀₀, obtenida por TEM.

En la Tabla 6.4, se presenta para las dispersiones S-A(5) y S-A(2.5), los Dp medios (medidos el primer día, Figura 6.6), el potencial zeta y el rendimiento de partícula, calculado a partir de la ecuación 6.1, según.

$$\text{Rendimiento de partícula, } RP [\%] = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \quad [6.1]$$

donde, P_i es peso de las biopartículas de proteínas obtenido después de secar la dispersión original (*film*) y P_f es el peso de la proteína perdida después de la centrifugación (fondo del tubo). En este

sentido, y como es esperable, el rendimiento de biopartículas se incrementa al reducir la velocidad de centrifugación.

Como se puede observar en la Tabla 6.4, todas las dispersiones presentaron un valor de potencial zeta bajo, entre -34 y -45 mV, indicando una buena estabilidad coloidal de las partículas. Este resultado, está de acuerdo con los valores reportados para biopartículas zeína-caseína con una proporción 1:1.¹⁹⁰

Además, al reducir la concentración de las proteínas en las soluciones, se incrementó el rendimiento final alcanzado.

Tabla 6.4. Resultados de diámetro, potencial zeta y rendimiento de partícula, para las dispersiones A-S(5) y A-S(2.5)

Experimento	Dp [nm]	Potencial zeta [mV]	Rendimiento de partícula [%]
S-A(5) ₀	272.5	-56.0	- ^a
S-A(5) ₂₅₀₀	240.4	-45.0	92.2
S-A(5) ₄₀₀₀	220.2	-43.3	87.0
S-A(5) ₁₀₀₀₀	155.4	-39.6	73.8
S-A(2.5) ₀	223.9	-46.1	- ^a
S-A(2.5) ₂₅₀₀	208.2	-39.4	96.6
S-A(2.5) ₄₀₀₀	192.8	-34.7	94.6
S-A(2.5) ₁₀₀₀₀	128.4	-37.4	87.5

^a Los rendimientos antes de centrifugar no se pueden reportar, ya que corresponden a la cantidad de biopartículas recuperadas luego de la etapa de centrifugación.

Si bien reducir la concentración de la zeína en el solvente de 5 a 2.5 %p/v, parece una alternativa prometedora para la producción de las biopartículas, porque permite obtener Dp menores, con una distribución más angosta y mayor rendimiento, es importante destacar que al comparar el rendimiento en masa de partículas finales obtenidas, resulta más conveniente emplear el método A-S(5)₂₅₀₀, porque requiere un menor consumo final de recursos. Es decir, para obtener 10 g de dispersión final, lista para emplear como siembra en el proceso de polimerización (0.033 g proteína/g dispersión), cuando se emplea el proceso S-A(5)₂₅₀₀ se requiere 12.64 g de dispersión inicial (equivalentes a 9.5 g de agua y 2.4 g de etanol), mientras que el proceso S-A(2.5)₂₅₀₀ se requiere 23.60 g de dispersión inicial (aproximadamente equivalente a 18.3 g de agua y 4.6 g de

etanol). Es por ello que en la polimerización en emulsión se empleará la dispersión S-A(5)₂₅₀₀ como siembra

6.3.2. Polimerización en emulsión semi-batch, empleando diferentes velocidades de alimentación de los monómeros.

La polimerización se llevó a cabo mediante un proceso en emulsión semi-batch con una siembra inicial de biopartículas, sintetizadas con el método S-A(5)₂₅₀₀. En todos los casos, se empleó una formulación de BA y MMA (80/20) como monómeros, manteniendo una proporción proteína/acrílico de 20/100, y utilizando dos velocidades de dosificación diferentes (0.056 g/min, 0.038 g/min, Tabla 6.5). Además, se realizó una polimerización batch, donde todo el monómero se cargó antes de comenzar la reacción. El contenido de sólidos de los látex se mantuvo entre 13 y 15%.

Conversión de los monómeros y el Dp

Como se puede observar en la Tabla 6.5, los diámetros iniciales de las biopartículas sembradas fueron similares para los tres casos, debido a que se utilizó el mismo método S-A(5)₂₅₀₀ y corresponden a diferentes preparaciones. Este resultado evidencia la repetitividad de la técnica de preparación de las biopartículas.

Tabla 6.5. Resultados de x , D_p , FP , y coágulos obtenidos para los látex híbridos

	Experimentos		
	P(0)	P(0.056)	P(0.037)
Tiempo de alimentación del monómero (h)	0 (Batch)	2	3
Caudal de alimentación de los monómeros (g/min)	-	0.056	0.037
Dp inicial de las biopartículas sembradas (nm)	249.2	251.3	243.1
Dp final de las partículas (nm) ^b	482.3	323.1	433.6
Conversión final (%)	98	89	96
Coágulos (% wbSC ^a)	3.0	1.9	2.7
% SC del látex	14.9	13.3	13.1
FP (%)	17.9	23.6	8.7

^a Peso en base a el contenido de sólidos (SC). ^b Última muestra medida registrada, debido a problemas con la presencia de coágulos en las muestras.

Como se puede observar en la Figura 6.9a, Cuando se adicionaron los monómeros inicialmente (modo batch), la polimerización alcanzó rápidamente 98% de conversión y un Dp final del látex acrílico/proteínas de 482 nm, mientras que, la adición semicontinua de los monómeros (modo semi-batch), resultó en el aumento lento y progresivo de la conversión y los Dp de partículas, a lo largo de la polimerización (Figura 6.9b-c). Además, la reducción de la velocidad de alimentación de los monómeros de 0.056 a 0.037 g/min, incrementó la conversión final. Sin embargo, es importante notar que aún con la menor velocidad de alimentación de monómero [P(0.037)], la curva de conversión global quedó por debajo de la curva de alimentación de monómero (representada por la línea de trazo en la Figura 6.9b-c), indicando que durante el proceso de polimerización se produjo una acumulación de monómero, es decir, no se alcanzó la condición de inanición o “*starved*”, en la cual el monómero que se alimenta se convierte de manera instantánea en polímero. Por otro lado, los tres látex presentaron un alto contenido de coágulo ($\approx 3\%$), lo cual trajo inconvenientes al momento de medir los diámetros finales de las partículas híbridas. En el caso de P(0.056), la coagulación fue menor debido a la menor conversión alcanzada.

La cuantificación de la proteína libre que permanece remanente en la fase acuosa de los látex (o adsorbidas sobre las partículas híbridas), permite estimar por diferencia la cantidad de proteína que forma parte de una partícula híbrida. Debido a que ambas proteínas (zeína y caseína) poseen una absorción en UV similar (con un máximo a 280 nm), es muy difícil diferenciar cada una de las proteínas; sin embargo, se utilizó la técnica para FP por UV con una solución de SLS como diluyente (detallada en la sección A.4.3 del Anexo), aún está siendo estudiada y optimizada para este tipo de sistemas compuestos que contienen dos proteínas. Si bien los resultados tienen cierto grado de incertidumbre, los mismos se discuten en este Capítulo con el propósito de comparar las tendencias.

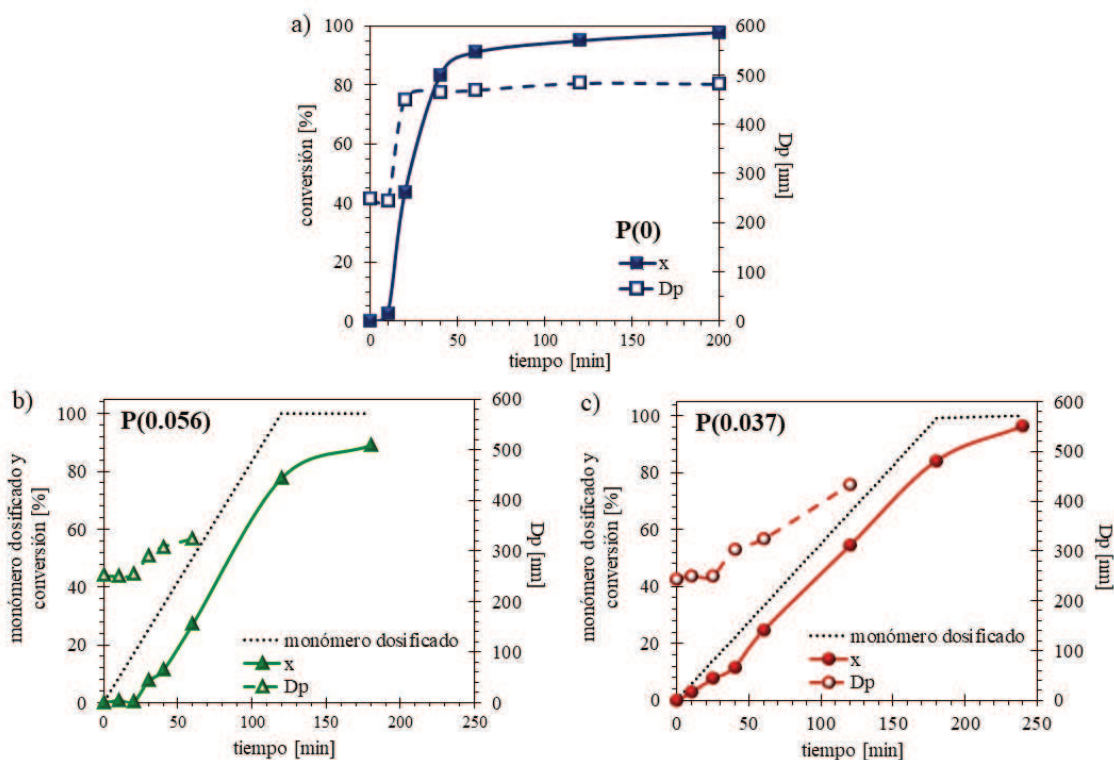


Figura 6.9. Evolución de la conversión y del D_p de las polimerizaciones $P(0)$ o batch (a), $P(0.056)$ (b), y $P(0.037)$ (c). En el caso de las polimerizaciones semi-batch se agregó la curva de dosificación porcentual del monómero, a lo largo de la polimerización. La masa total de monómero incorporado se considera el 100% del monómero dosificado.

Como se puede observar en la Tabla 6.5, a pesar de que $P(0)$ y $P(0.037)$ alcanzaron conversiones finales similares, el contenido de FP remanente en el agua al realizar la polimerización de forma batch $P(0)$ fue aproximadamente el doble que el obtenido mediante la polimerización semi-batch $P(0.037)$. Este resultado muestra que, alimentar los monómeros lentamente permite incrementar la incorporación de las biopartículas dentro de las partículas híbridas, mejorando ampliamente el grado de compatibilidad entre las fases acrílica y proteica. Para el caso de $P(0.056)$, el contenido de FP fue mayor (23.6 %) que para las demás reacciones, y esto posiblemente se puede deber a la baja conversión alcanzada durante la síntesis de este látex, lo cual se traduce en una mayor proporción proteína/acrílico.

Morfología de las partículas híbridas acrílico/proteínas

En la Figura 6.10 se muestran imágenes de TEM de los tres látex sintetizados. Las muestras se trataron con una solución acuosa de acetato de uranilo, para lograr una tinción positiva de las proteínas. En las imágenes se puede observar que las partículas híbridas acrílico/proteína poseen una morfología lobular compuesta por dos fases, una clara (formada por los lóbulos acrílicos) y otra más oscura (formada por las proteínas).

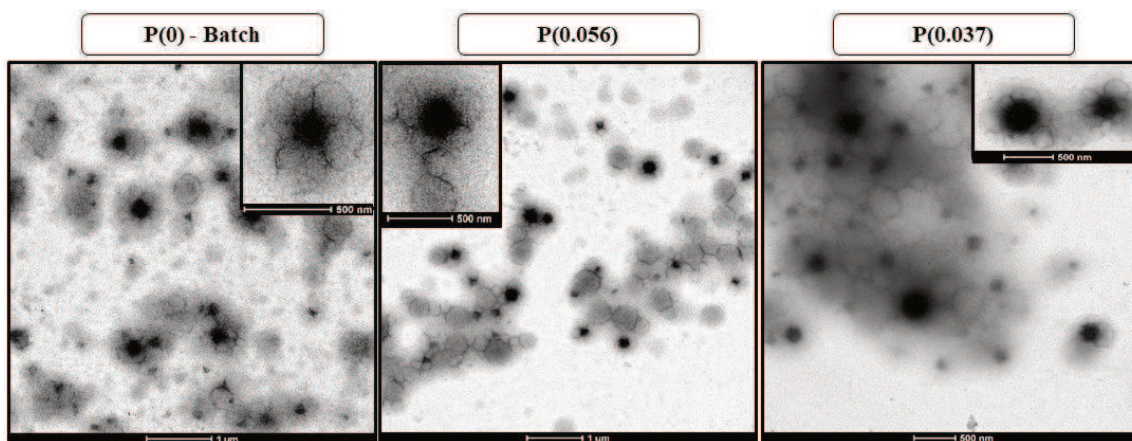


Figura 6.10. Morfología de las partículas obtenidas por TEM, de los tres látex sintetizados.

Blenner *et al.*²⁰⁶ investigaron las condiciones experimentales para producir esta morfología de no equilibrio, que involucra dos fases con diferentes grados de hidrofobicidad. Las morfologías de no equilibrio se forman cuando una siembra más hidrofílica no permite la penetración de oligorradicales hidrófobos en crecimiento producidos en agua durante la etapa de polimerización en emulsión. Por lo tanto, el nuevo polímero está necesariamente restringido a la superficie de la partícula de la siembra. La aparición de diferentes morfologías depende de la T_g de la siembra ($T_{g,seed}$) y del polímero de segunda etapa ($T_{g,2nd\ stage}$) en relación con la temperatura de reacción ($T_{reaction}$). En la Figura 6.11 se presenta el diagrama propuesto por Blenner *et al.*²⁰⁶ y las posibles morfologías de no equilibrio obtenidas en una polimerización en emulsión sembrada y semicontinua. Cuando el polímero de la segunda etapa tiene una T_g muy por debajo de la temperatura de reacción (cuadrantes superior e inferior izquierdos de la Figura 6.11), la morfología multilobular ocurre debido a la alta movilidad de las cadenas de polímero que pueden

difundir para minimizar la energía libre interfacial de la partícula bifásica. Cuando la $T_{g,seed}$ es mucho más alta que la $T_{reaction}$, el polímero de la segunda etapa no puede penetrar la semilla y, por lo tanto, se forman lóbulos en la superficie de la partícula de la semilla (cuadrante superior izquierdo). Pero, cuando la $T_{g,seed}$ está por debajo de la $T_{reaction}$, la semilla de la partícula es lo suficientemente blanda como para promover la formación de lóbulos parcialmente interpenetrados. Las nanopartículas híbridas producidas en este Capítulo presentaron una morfología multilobular consistente con el modelo reportado por Blenner *et al.*, donde el polímero de la segunda etapa (copolímero BA/MMA en este trabajo) tiene una T_g baja ($-35\text{ }^{\circ}\text{C}$), lo que permitió la formación de lóbulos. Además, la $T_{g,seed}$ es bastante más alta ($\approx 180\text{ }^{\circ}\text{C}$) que la $T_{reaction}$ ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$), haciendo a la fase proteica impenetrable y restringiendo la localización de los lóbulos en la superficie de las biopartículas. Si bien esta morfología multilobular es esperable en una polimerización semicontinua, también se observó en condiciones batch (Figura 6.10a). Esto se debe a la incompatibilidad de la zeína con los monómeros acrílicos, los cuales no tiene la capacidad de hinchar la zeína para desarrollar un efecto plastificante y reducir suficientemente la $T_{g,seed}$ durante la polimerización, como para promover la penetración del polímero creciente.

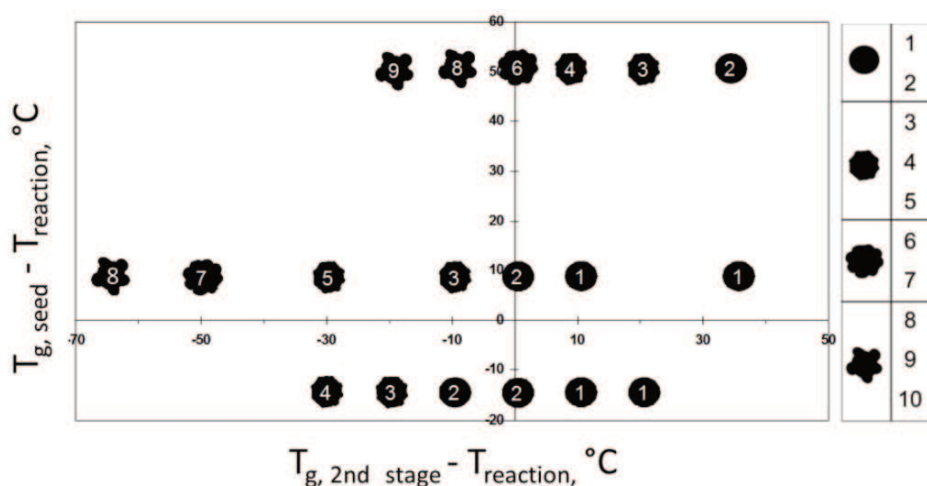


Figura 6.11. Diagrama de morfologías propuesto por Blenner *et al.*²⁰⁶ El rango 1-10 asignado a las partículas, es una clasificación visual, en términos del grado en el que las partículas se desvían de la esfericidad (1) hacia una naturaleza multilobular, o no esférica (10).

Las imágenes TEM, también muestran que en los tres casos existe una amplia distribución de tamaño, lo cual era de esperar debido a que se parte de una dispersión de biopartículas que presentan una distribución ancha. Además, se observa un gran número de partículas no híbridas (de acrílico puro), que presentan una morfología esférica. La formación de las partículas no híbridas podría estar favorecida por la presencia de micelas de caseína en la dispersión inicial de biopartículas sembradas. La presencia de caseína libre en el agua puede controlarse mediante la relación zeína-caseína empleada durante la síntesis de las biopartículas. En este sentido, se ha reportado que la cantidad mínima de caseína requerida para estabilizar las partículas de zeína es de 1:0.3 (zeína:caseína).¹⁹⁰ Sin embargo, para lograr una buena redispersión en agua de las biopartículas secas (*film*) se requiere una mayor cantidad de caseína (zeína:caseína 1:0.75), obteniéndose los mejores resultados con la proporción 1:1.25.^{190,205} Es por ello que en esta Tesis se empleó una relación 1:1, que permite la correcta estabilización de la zeína durante la formación de las biopartículas y una buena redispersión en agua de los *films* de biopartículas, para la obtención de la dispersión utilizada como siembra, tal como se ha demostrado.

Formación de film híbrido y su morfología

A partir de los látex obtenidos, se formaron películas por casting en moldes de silicona a temperatura ambiente durante 7 días. El espesor de las películas fue en todos los casos de alrededor de 1 mm. En la Figura 6.12, se muestran fotografías de cada uno de los *films* obtenidos y las imágenes de fase obtenidas por AFM de la superficie de las mismas. Como se observa, todas las películas presentan una coloración amarilla intensa, debido al alto contenido de zeína que presentan en su formulación.

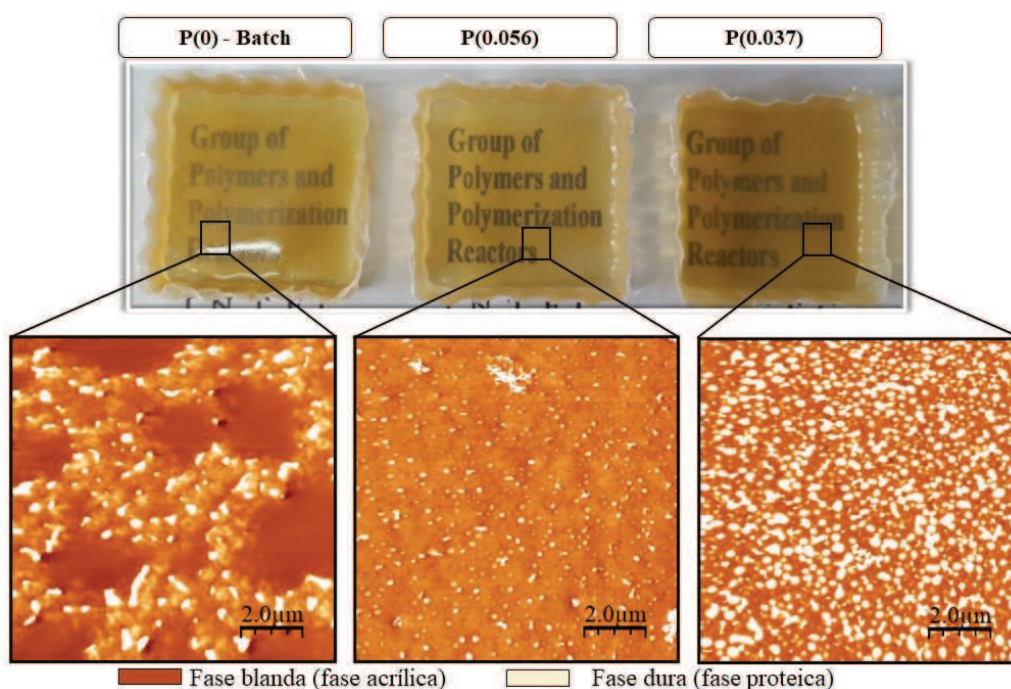


Figura 6.12. Fotografía de las películas formadas a partir de los látex híbridos sintetizados de forma batch y semi-batch, junto a la morfología superficial de las mismas obtenida por AFM.

Por otro lado, las imágenes de fase obtenidas por AFM permiten observar, a escala nanométrica, la diferencia en el comportamiento viscoelástico de cada fase que compone el material híbrido. En los tres casos se puede observar claramente una fase continua blanda, formada por la coalescencia de las partículas a través de los lóbulos acrílicos, con microdominios duros (fase proteica) distribuidos a lo largo de la misma. Para el caso P(0.037) se observa una distribución homogénea de las partículas de proteínas en el film, con una forma aproximadamente esférica, mientras que la superficie de las películas P(0) y P(0.056) presenta una distribución poco uniforme, con una menor presencia de la fase proteica en forma de pequeños agregados y con grandes zonas blandas. Estos resultados concuerdan con los valores de FP obtenidos, los cuales indicaban una baja sinergia entre las fases acrílica y proteica para el P(0) (FP = 17.9 %), en comparación con los látex sintetizados en forma semi-batch.

Sensibilidad de las películas híbridas a variaciones del pH

La respuesta que presentan los materiales al cambio de pH, es una propiedad importante para su aplicación. En el caso de recubrimientos entéricos se espera que el material tenga la posibilidad de cambiar significativamente su afinidad con el agua en función del pH. Para este tipo de aplicaciones, se utilizan diferentes soluciones ácidas y neutras (Tabla 6.6),²⁰⁷ en las cuales se sumergen las muestras y se determina el grado de hinchamiento o absorción (masa de fluido absorbido) en función del tiempo. En esta Tesis usaremos las soluciones denominadas fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS), sin enzimas, preparado según lo indicado por farmacopea.

Tabla 6.6. Resumen de las soluciones comúnmente empleadas para la caracterización de recubrimientos entéricos.

pH del medio	Comentarios
1-3	Ácido hidroclorehídrico (0.1 – 0.001N)
1.2	Fluido gástrico simulado (con o sin enzima pepsina)
4.1 - 5.5	Buffer acetato (50 mM)
5.8 - 8.0	Buffer fosfato de sodio o potasio (50 mM)
6.8	Fluido intestinal simulado (con o sin enzimas pancreatina o tripsina)

En la Figura 6.13, se muestra la absorción alcanzada (% en masa) para P(0), P(0.056) y P(0.037), al sumergirlas por 5 horas en FGS (pH 1.2) y FIS (6.8), junto con la pérdida de peso (% en masa) registrada para cada muestra al finalizar el ensayo de hinchamiento. Además, se presenta el ensayo realizado para un *film* puro de biopartículas (BP), y las fotos de los *films* antes y después de la inmersión para P(0.037) y BP.

La Figura 6.13a muestra que los materiales híbridos presentan diferentes respuestas al ser sumergidos en medios con diferentes pH. Este resultado está de acuerdo a lo observado para materiales híbridos acrílicos/caseína, donde la fase acrílica no afecta la respuesta al cambio de pH de la caseína.²⁰⁰ En este caso, los tres *films* híbridos presentaron altos valores de hinchamiento al ser expuestos al medio alcalino (FIS), alcanzando valores finales de absorción que se incrementan con los materiales obtenidos al reducir la velocidad de alimentación de los monómeros, desde un

23% para P(0) o batch, hasta 27 y 31 % para P(0.056) y P(0.037) respectivamente, debido al aumento de la sinergia alcanzada entre las fases acrílica y proteica. Bajo estas condiciones (pH 6.8), ambas proteínas se encuentran por encima de su punto isoeléctrico (5.9 y 4.5 para la zeína y la caseína, respectivamente)¹⁹⁰, donde sus grupos carboxílicos y hidroxilo se encuentran ionizados. Esto favorece la absorción de agua de la red polimérica, como resultado del incremento de la repulsión electrostática entre los grupos ionizados.²⁰⁰

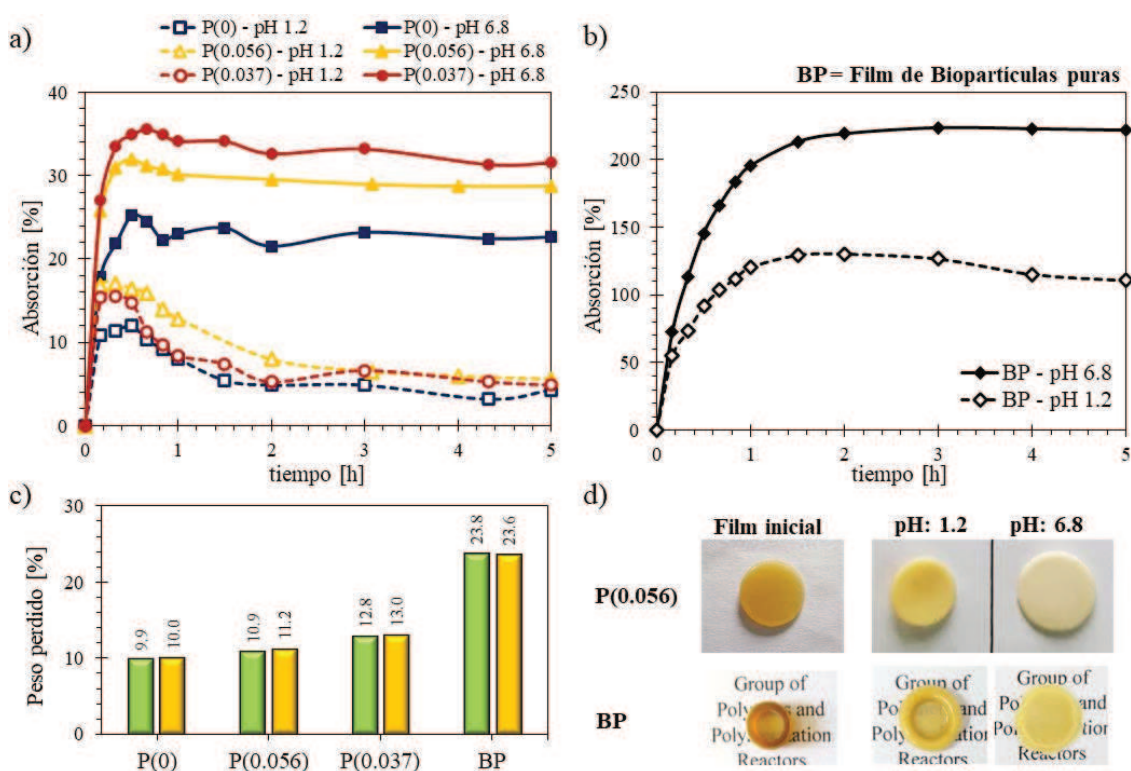


Figura 6.13. Sensibilidad de los materiales con el pH. Curvas de absorción para las películas híbridas (a) y para el film de biopartículas puras (b), y pérdida de peso (c) registrada para los materiales después de 5 horas de inmersión en fluidos gástrico e intestinal simulados. Foto de los films P(0.056) y BP antes y después del ensayo (d).

Por el contrario, los tres materiales presentaron una alta resistencia a los medios ácidos (FGS), alcanzando grados de hinchamiento finales muy bajos ($\approx 4\%$), en comparación con el *film* de BP puras que muestra una absorción de 119 % (Figura 6.13b). Esto se debe a que en condiciones

ácidas (pH 1.2), por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas se favorecen las interacciones puentes de hidrogeno entre los grupos carboxílicos y hidroxilos de las proteínas.²⁰⁰

En este sentido, si se define la sensibilidad como la relación entre los valores de absorción alcanzados por el material en FIS y en el FGS (Sensibilidad = absorción FIS/absorción FGS), se obtiene para los materiales híbridos un valor de 5.3 para P(0) y de 6.5 para P(0.037), en contraste con BP que presenta una mala resistencia a los medios ácidos y una sensibilidad muy baja (≈ 2). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la proteína le aporta a los materiales híbridos sensibilidad al cambio de pH, y que esta sensibilidad se ve afectada por el grado de sinergia entre las fases. Estas interacciones promueven la reorganización de la estructura hacia una red más compacta y con menor capacidad de expansión.²⁰⁰

Sin embargo, si bien la sensibilidad al cambio de pH del medio, puede dar un indicio del potencial que el material posee para su aplicación como recubrimiento entérico, es importante resaltar que existe una limitación en la cantidad permitida de liberación del fármaco protegido durante la etapa ácida, y este no debe sobrepasar el 10%.²⁰⁷ Por lo que resulta necesario a futuro, profundizar los estudios, abarcando ensayos de recubrimiento y liberación, para determinar el efecto que pueda tener el “*overshooting*” que presentan estos materiales en medios ácidos.

Por otro lado, bajo estas condiciones las películas no se disolvieron o desintegraron completamente, y presentaron una baja pérdida de peso (Figura 6.13c). Por ello, se podría esperar que un comprimido recubierto con estas películas híbridas presente una liberación sostenida en el tiempo (durante el hinchamiento podría estar cambiando la permeabilidad de la estructura), en lugar de una liberación retardada.¹⁹⁷ Sin embargo, un aspecto a evaluar de estos recubrimientos debería involucrar la liberación en presencia de enzimas. Además, otro punto importante a considerar, es que los recubrimientos clásicos obtenidos por evaporación en una paila grageadora o en un lecho fluidizado suelen ser muy delgados, representando solo el 2-3 % del peso del comprimido.¹⁰⁰

Ángulo de contacto

Como se ha dicho antes, el ángulo de contacto formado por una gota de agua sobre la superficie de un recubrimiento, permite determinar la hidrofobicidad del material. En este caso, si bien no se busca que el recubrimiento sea hidrofóbico, la determinación del ángulo de contacto puede reforzar los resultados obtenidos por AFM. En este sentido, como se puede observar en la Figura 6.14, el ángulo de contacto para la muestra P(0) resultó similar al que presentaría un *film* puro de acrílicos con la proporción 80/20 de BA/MMA (85°), coincidiendo con la baja cantidad de proteína observada sobre la superficie de este material en las imágenes de fase obtenidas por AFM. Por otro lado, es sabido que la presencia de proteínas en la superficie puede reducir el ángulo de contacto (principalmente si esta es de carácter hidrofílico, como la caseína), como lo que sucede para los materiales P(0.056) y P(0.037), los cuales presentaron un mayor contenido de proteínas en la superficie.

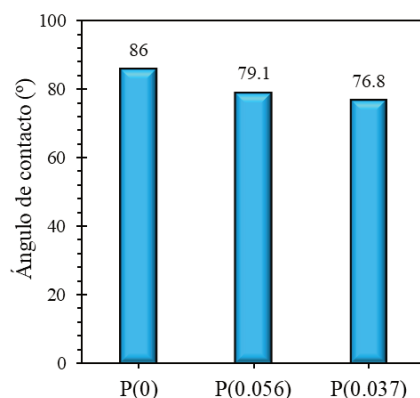


Figura 6.14. *Ángulo de contacto de una gota de agua depositada sobre la superficie de las películas híbridas.*

Ensayos de reología

A continuación se presenta el estudio de las propiedades viscoelásticas de los *films* formados a partir de los látex obtenidos por el proceso semi-batch de polimerización P(0.056) y P(0.037). Para ello se analizaron, en ensayos de corte, discos de 10 mm de diámetro secos e hinchados en los medios FGS y FIS.

En una primera instancia se determinó la región viscoelástica lineal (RVL) de las películas, realizando un barrido de amplitud desde 0.1 a 20% a una frecuencia constante de 10 Hz, y luego se estudió el comportamiento de los materiales al realizar un barrido de frecuencia (dentro de la RVL), desde 0.1 a 100 Hz. Por razones de brevedad, solo se presentan los resultados de G' (módulo de almacenamiento), ya que para todos los casos G'' (módulo de pérdida) fue menor que G' en el rango de frecuencia analizado, lo cual está indicando que el material se comporta como un sólido viscoelástico.

- **Determinación de la RVL**

En la Figura 6.15 se muestran los resultados del ensayo de barrido de amplitud, para la muestra P(0.037) seca e hinchada a pH 1.2 y 6.8. En base a estos ensayos se determina la zona viscoelástica lineal del material en la cual G' permanece constante y no depende de la deformación. A partir de este resultado, se define la amplitud de la deformación (γ_0) que se utiliza en las mediciones de barrido de frecuencia para el resto de los experimentos.

Un punto importante a considerar, es que para todos los casos se trabajó con un valor de gama constante, aunque el valor real de deformación es diferente según el diámetro de la muestra. Si bien todos los *films* secos se cortan con un diámetro de 10 mm, este diámetro cambia según el grado de hinchamiento que las películas alcanzan en los distintos medios. Debido a esto, el γ_0 real puede variar levemente de una muestra a otra, manteniéndose siempre en la RVL del material. En la Figura 6.15 se ha marcado una zona de trabajo para γ_0 real entre 0.25-0.3%, calculados para los diámetros de los discos de muestras hinchadas.

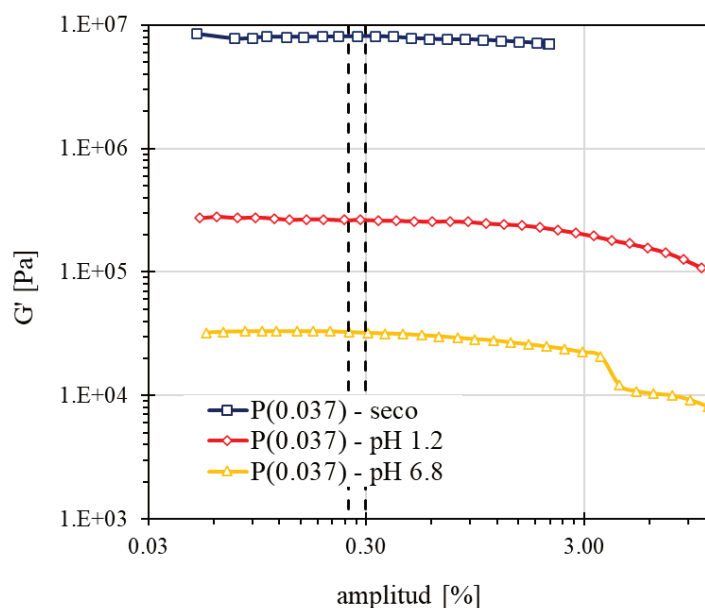


Figura 6.15. Barrido de amplitud. Determinación de la RVL del film P(0.037) seco, e hinchado en los distintos fluidos (pH 1.2 y pH 6.8). En líneas de trazos verticales se indican los valores de amplitud empleados en los estudios de barrido de frecuencia.

- **Propiedades viscoelásticas de las películas P(0.056) y P(0.037)**

La Figura 6.16 muestra las curvas del módulo de almacenamiento, obtenidas para los *films* secos e hinchados en los fluidos FGS (pH 1.2) y FIS (pH 6.8). Como se puede observar, independientemente del caudal empleado para la alimentación de los monómeros en el proceso de polimerización semi-batch para la producción de las películas híbridas, las mismas presentaron un comportamiento viscoelástico muy similar, donde los módulos G' aumentaron ligeramente con la frecuencia de oscilación (comportamiento típico de los polímeros de alto peso molecular en su región gomosa)²⁰⁰. Las películas secas, presentaron altos valores de G' , indicando una alta rigidez en comparación con las películas hinchadas, para las cuales G' cae en un orden de magnitud, disminuyendo a medida que se incrementa el grado de hinchamiento. Por ejemplo, a 1 Hz, el *film* seco P(0.037) deshidratado presentó el mayor valor de $G' = 2.75 \times 10^6$ Pa, seguido por el *film* expuesto a pH 1.2 con un valor de hinchamiento de 4.86 % y un $G' = 2.06 \times 10^5$ Pa, y por último el *film* expuesto a un pH 6.8 con un valor de hinchamiento de 31.54 % con un $G' = 5.42 \times 10^4$ Pa.

Este último comportamiento se debe a que la expansión de la red polimérica, causada por la repulsión de los grupos carboxílicos ionizados de la proteína cuando el pH del medio supera el punto isoelectrico de las proteínas, permite el ingreso de los fluidos en el interior de la red polimérica. En estas condiciones, el *film* presenta una mayor flexibilidad y como consecuencia una reducción del valor de G' .

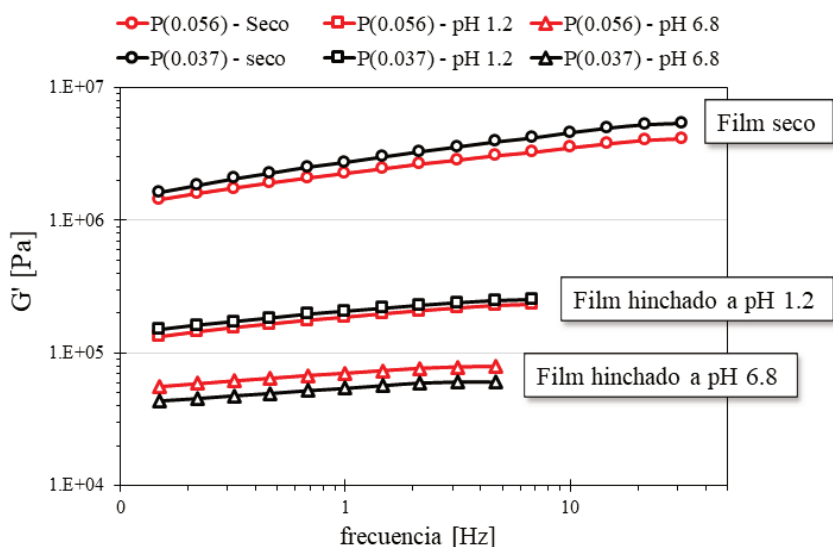


Figura 6.16. Variación del módulo de almacenamiento (G') para los films P(0.056) y (0.037), secos e hinchados en diferentes fluidos (pH 1.2 y 6.8)

La rigidez de las películas secas es necesaria para proteger el comprimido que contiene el fármaco, del estrés y las tensiones a las cuales son sometidos durante su procesamiento y aplicación. Mientras que el incremento en la flexibilidad alcanzada en el FIS, puede favorecer la liberación del fármaco. Estos resultados, están de acuerdo a lo observado para películas híbridas acrílico-caseína y hacen a estos materiales excelentes candidatos para su aplicación como recubrimiento entérico.

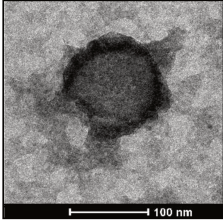
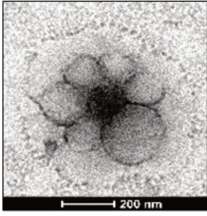
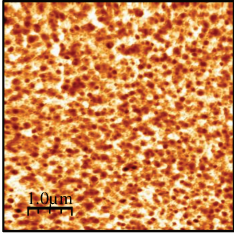
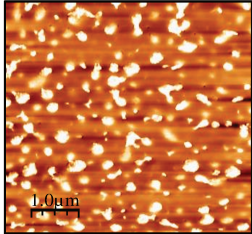
6.4. COMPARACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LAS DIFERENTES PELÍCULAS HÍBRIDAS QUE CONTIENEN ZEÍNA-CASEÍNA

En dos de los Capítulos de la Tesis, se han desarrollado materiales basados en las proteínas zeína y caseína, empleando dos procesos distintos de polimerización. Debido al carácter hidrofóbico de la zeína, el primer método empleado para su incorporación en la síntesis de los materiales híbridos, fue la polimerización batch en miniemulsión. Como se demostró en el Capítulo 5, este método permitió obtener materiales híbridos con un alto grado de compatibilización entre las fases y una resistencia al agua superior, en comparación con los *films* híbridos basados sólo en caseína. Sin embargo, los esfuerzos realizados para incrementar el contenido de zeína no resultaron como se esperaba, ya que pequeños aumentos en dicho contenido produjeron látex inestables, que presentaron un precipitado amarillo (atribuido a la hidrofobicidad de la zeína). En este contexto, la estabilización de nanopartículas de zeína con caseína empleando la técnica antisolvente de precipitación, surge como una alternativa prometedora a este problema, ya que permite obtener dispersiones de nanopartículas formadas con un alto contenido de zeína, que permanecen estables en base acuosa. Como se mostró en este Capítulo, esta dispersión pudo ser empleada como siembra inicial de partículas, sobre la cual se polimerizó una fase acrílica mediante polimerización semi-batch en emulsión, obteniéndose partículas con morfología multilobular.

A continuación, en la Tabla 6.7 se muestra de forma resumida las diferencias entre las técnicas de polimerización y los resultados más relevantes, planteando la posible aplicación de los materiales como recubrimientos entéricos. Como se puede observar, la incorporación de zeína a partir de nanopartículas preformadas y estabilizadas, permite incrementar fuertemente el contenido de esta proteína hidrofóbica, dentro de la matriz polimérica. Es importante resaltar que, si bien se emplean las mismas proteínas y los mismos monómeros, al cambiar el método de polimerización se obtienen materiales completamente diferentes, con una morfología de *film* opuesta, donde la fase continua (donde ocurre la coalescencia de las partículas) es la fase que se

encuentra en la parte exterior de las partículas (directamente relacionada a la morfología de las partículas).

Tabla 6.7. Comparación de los materiales híbridos basados en zeína-caseína, obtenidos en los Capítulos 5 y 6 de esta Tesis.

Polimerizaciones de dispersiones en BASE ACUOSA		
Tipo de polimerización	Miniemulsión batch	Emulsión semi-batch, con siembra inicial de biopartículas
Número de etapas requeridas para la síntesis de las partículas híbridas	2 ETAPAS: 1) Obtención de la miniemulsión por ultrasonido; 2) polimerización en miniemulsion batch.	3 ETAPAS: 1) Síntesis de las biopartículas; 2) preparación de las biopartículas para la polimerización (eliminación del etanol, redispersión); 3) polimerización en emulsión sembrada.
Máxima cantidad de zeína incorporada	< 1.25 g (por cada 100 g de monómeros)	< 10 g ^(a) (por cada 100 g de monómeros)
Máximo contenido de proteína total (caseína + zeína)	25 g (por cada 100 g de monómeros)	20 g ^(a) (por cada 100 g de monómeros)
Morfología de las partículas (por TEM)	Partículas core-shell (núcleo: acrílico, coraza: proteica) 	Partículas multilobulares (núcleo: proteico, lóbulos acrílicos) 
Morfología de las películas (por AFM)	Film con microdominios blandos (marrón) en una fase continua dura (blanco) 	Film con microdominios duros (blanco) en una fase continua blanda (marrón) 
Hinchamiento a pH 1.2 (FGS)	Aprox. 26%	Aprox. 5%
Sensibilidad al cambio de pH (Relación de hinchamiento pH6.8/pH1.2)	1.5 - 2	6 - 7

^(a) En base a lo mostrado en esta Tesis

Por otro lado, e independientemente del método empleado para la síntesis de las partículas híbridas, los materiales resultantes presentaron una sensibilidad al cambio de pH; sin embargo, incorporar una mayor cantidad de zeína mejora la resistencia a los medios ácidos, alcanzando valores más bajos de hinchamiento, y aumenta la sensibilidad de los *films* al cambio de pH. Por último, este resultado, se puede comparar con los valores de hinchamiento y sensibilidad reportados para un *film* híbrido sintetizado con los mismos monómeros, pero que sólo contiene caseína funcionalizada como biopolímero. En este caso, a las 5 hr del ensayo, el hinchamiento alcanzado en medio ácido es aproximadamente 30% y la sensibilidad 4-4.5.²⁰⁰

6.5. CONCLUSIONES

Empleando una variante de la técnica antisolvente de precipitación, fue posible sintetizar las biopartículas basadas en zeína, y estabilizadas con caseína. Para esto, se debe alimentar el solvente (que contiene soluble a la zeína) lentamente sobre el antisolvente (que contiene soluble a la caseína) aplicando ultrasonido y agitación magnética constante. De esta manera, fue posible obtener una dispersión estable en el tiempo, con Dp medio entre 200 nm y 250 nm, y un potencial Z negativo entre -45 y -39 mV, lo que hace a estas biopartículas muy estables. Sin embargo, el rendimiento de partícula, es decir, la cantidad de biopartículas recuperadas luego del proceso de centrifugación, depende de la concentración de las proteínas en las soluciones correspondientes. En este sentido, se adoptó la concentración más alta de la zeína en el solvente (5 %p/v), la que permitió obtener un rendimiento de 92.2 % cuando se aplicó una etapa de separación por centrifugación de 2500 rpm y una mayor cantidad de biopartículas final en relación a la cantidad de los recursos utilizados (agua y etanol).

Por otro lado, fue posible sintetizar partículas híbridas acrílico/proteínas con morfología multilobular mediante polimerización en emulsión, empleando la dispersión de biopartículas como siembra inicial. En este sentido, la alimentación lenta de los monómeros a un caudal contante, permitió controlar la velocidad de reacción y la formación de las partículas,

favoreciendo la sinergia entre las fases, al reducir la concentración de las proteínas libres (remanentes en la fase acuosa). Las películas híbridas obtenidas a partir de los látex sintetizados por emulsión semi-batch presentaron dos fases: i) una fase acrílica continua, y ii) una fase proteica discontinua distribuida homogéneamente. Esto le otorgó a los materiales sensibilidad al pH, con baja capacidad de hinchamiento (absorción de fluido) en medios ácidos (pH 1.2), y permitiendo el hinchamiento en medios básicos (pH 6.8). Estas características, resultan prometedoras para la aplicación de estos látex como recubrimiento entérico, para una liberación retardada o sostenida en el tiempo.

Sin embargo, aún restan muchos aspectos a ser investigados (principalmente, optimizar la formulación y reconsiderar la síntesis de las dispersiones de biopartículas y de partículas híbridas; y completar las caracterizaciones y ensayos de aplicación) para determinar correctamente la potencialidad de la propuesta y su verdadero impacto tecnológico.

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Los materiales poliméricos surgieron a principios del siglo XIX como materiales que revolucionaron el mercado, debido a sus propiedades y precios económicos, y se estima que su producción crecerá hasta 1000 millones de toneladas para 2050.¹⁶⁸ La mayoría de los polímeros sintéticos actuales involucran la utilización de productos petroquímicos (solventes y monómeros), y no son biodegradables, por lo que generan importantes fuentes de contaminación ambiental y dañan la vida silvestre cuando se encuentran dispersos en la naturaleza. Debido a esto, en los últimos años la conciencia social sobre el impacto ambiental ha aumentado significativamente y con ello las regulaciones ambientales, forzando al desarrollo de procesos y productos más sustentables y amigables con el medio ambiente. En consecuencia, en la última década se ha incrementado sustancialmente el número de trabajos científicos relacionados con: i) la eliminación del uso de solventes orgánicos en el proceso de polimerización, ii) la reducción de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), iii) la reducción de la huella de carbono de estos materiales, iv) la sustitución completa o parcial de los monómeros derivados del petróleo, por reactivos provenientes de fuentes naturales, y v) el estudio del tratamiento de los residuos poliméricos.

En este contexto, la combinación de biopolímeros y polímeros derivados de la petroquímica permite obtener materiales híbridos con una alta sinergia entre las fases, que resultan en materiales que poseen propiedades atribuidas a cada una de las fases. Con este fin, se han empleado como materia prima diferentes fuentes de biomasa, como los aceites vegetales, terpenos, proteínas, derivados de la lignina, y carbohidratos. Entre estos, las proteínas representan un grupo de biopolímeros muy empleado para una variedad de aplicaciones (recubrimientos, adhesivos, tintas, liberación de fármacos, ingeniería de tejidos, etc.), debido a las características inherentes de las proteínas como alta funcionalidad, biodegradabilidad, propiedades anfifílicas, entre otras. Por otro lado, los monómeros bioderivados, han tomado mayor importancia en los últimos años, a

partir de la obtención de diversos monómeros capaces de polimerizar radicalariamente en fase acuosa. Sin embargo, muchos de estos monómeros bioderivados, aunque proceden de fuentes naturales, producen polímeros que no son biodegradables. Es por ello que resulta imperativo el desarrollo de nuevas estrategias tendientes a mejorar la síntesis de nuevos materiales sustentables, para que sean biodegradables y amigables con el medio ambiente, pero que posean un desempeño similar (o mejor) al del producto sintético que se desea sustituir.

En esta Tesis se investigó la modificación química de la zeína para mejorar su reactividad y otorgarle un mayor valor agregado a dicha proteína. Además, se estudió la obtención de nanopartículas híbridas de acrílico/proteínas, incorporando caseína, zeína y/o monómeros bioderivados como fuente de materiales naturales, mediante diferentes procesos y estrategias de polimerización (emulsión batch/semi batch y miniemulsion batch) para su potencial aplicación como recubrimientos parcialmente biodegradables.

A continuación, se resaltan los resultados más importantes del presente trabajo de Tesis, y se sugieren futuras tareas de investigación.

7.1 CONCLUSIONES GENERALES

La gran proporción de aminoácidos no polares presentes en la estructura de zeína, le otorgan a la misma un carácter hidrofóbico, por lo que resulta de gran interés en múltiples aplicaciones. Sin embargo, esta proteína carece de grupos amino, que facilitan la modificación en el caso de otras proteínas como la caseína, la proteína de suero lácteo, y la proteína de soja. Esto representó un desafío para su funcionalización; sin embargo, fue posible modificarla a partir de los grupos oxidrilos, carboxilos y sulfhidrilos que posee en su molécula, a través de agentes modificadores que poseen en su estructura grupos funcionales como cloruros y anillos epóxidos. La modificación mediante la apertura de un anillo epóxido, resultó la de mayor interés debido a su sencillez, ya que no genera subproductos y el proceso de purificación de la proteína modificada requiere un reducido número de etapas. En este sentido, el metacrilato de glicidilo (GMA) resultó ser un

excelente agente modificador para la zeína, cuando se emplea etanol-agua como solvente de reacción. También se demostró, que se puede controlar el grado de modificación de la proteína, al variar la concentración alcohólica del solvente, debido a la reestructuración de la zeína en este medio. En este sentido, la solución alcohólica con bajo contenido de etanol (70 %v/v) favoreció la reacción entre la proteína y el GMA, logrando incorporar alrededor de 3.5 dobles enlaces por molécula de zeína. Esta proteína hidrofóbica fue capaz de polimerizar radicalariamente, permitiendo la obtención de films fotocurables de zeína pura que, a diferencia de los films de zeína nativa, resisten la inmersión en etanol-agua como resultado del entrecruzamiento producido.

Con la intención de estudiar el desempeño de la zeína metacrilada, en la síntesis de compuestos híbridos, se la empleó en la preparación de hidrogeles de poli(N-vinilcaprolactama) (PVCL). Para ello, se sintetizaron hidrogeles en los cuales la zeína funcionalizada (ZF) fue utilizada como bio-macro-entrecruzante. Además, la proteína no afectó la respuesta térmica de los hidrogeles de PVCL, manteniendo una temperatura de transición próxima a la temperatura fisiológica (alrededor de 32 °C), lo cual hace de este un material interesante para su aplicación biomédica. Se observó que un incremento en la concentración de la ZF produjo un mayor grado de entrecruzamiento y con ello un gel más firme, con menor tamaño de poro y una distribución más angosta. Por otro lado, la estructura de la proteína aportó a la estructura otras interacciones químicas o físicas ZF-ZF o ZF-PVCL, que mejoran el desempeño mecánico, haciéndolo más resistente que un hidrogel convencional puramente covalente. Además, estos hidrogeles pudieron degradarse completamente en presencia de enzimas. El potencial de estos materiales para la carga y liberación de algún componente, fue probado empleando el colorante azul de metileno (compuesto hidrofílico), demostrando que los hidrogeles a base de ZF tienen un perfil de liberación similar al que presentan los hidrogeles obtenidos con *N,N*-metileno-bis-acrilamida como entrecruzante convencional, y que dicha liberación se hace más lenta al incrementar el contenido de ZF, debido a las interacciones electrostáticas e hidrofóbidas entre el azul de metileno y la proteína.

Por otro lado, y con referencia a los materiales híbridos para su aplicación como recubrimientos, se ha avanzado en la síntesis de látex que contienen sólo una proteína (caseína), o la combinación de dos proteínas (caseína y zeína), empleando diferentes procesos y estrategias de polimerización en medio disperso acuoso.

La síntesis y aplicación de látex híbridos acrílico/caseína obtenidos por polimerización en emulsión batch, han sido ampliamente estudiados en el Grupo donde se desarrolló la Tesis. Si bien se han alcanzado avances importantes en el tema, obteniéndose materiales con alto grado de compatibilización entre la fase acrílica y proteica, gracias al empleo de caseína metacrilada en lugar de caseína nativa, aún hay puntos que deben mejorarse. Entre ellos, se encuentra la relativamente baja sustitución de monómeros derivados de la petroquímica, y la susceptibilidad de estos materiales al agua.

Como una primera alternativa a este inconveniente, en esta Tesis se planteó el desarrollo de látex sintetizados mediante polimerización en emulsión batch basados en caseína, con un alto contenido de fracción de origen natural. Para ello, se utilizaron dos monómeros de base biológica, metacrilato de isobornilo (IBOMA) y acrilato de 2-octilo (OA), como sustituyentes de los monómeros derivados del petróleo, metacrilato de metilo (MMA) y acrilato de n-butilo (BA). Se estudió el mecanismo de nucleación de partículas, observando que la extremadamente baja solubilidad en agua que presentan estos monómeros bioderivados y la funcionalización de la caseína, jugaron un papel determinante en el mecanismo de nucleación durante la polimerización. En este sentido, se observó que el uso de monómeros con baja solubilidad en agua favorece la nucleación micelar; sin embargo, esta progresa cuando se emplea caseína nativa como macroemulsificante, en lugar de caseína funcionalizada, debido a que esta última actúa como un receptor de radicales impidiendo que estos ingresen dentro de las micelas hinchadas con los monómeros. Por este motivo, fue necesario emplear una nueva estrategia de polimerización, que favorezca la nucleación de partículas y permita emplear caseína funcionalizada como macroemulsificante polimerizable (*macro-surfmer*). Así, se propuso sustituir parcialmente los

monómeros biobasados, con un monómero más soluble en agua, como el BA o el MMA. Si bien esta estrategia permitió que la nucleación en la fase acuosa progresara exitosamente, el contenido de materiales de origen natural disminuyó notablemente. Para optimizar la fracción de origen natural, se planteó entonces la síntesis de un látex híbrido a través de una terpolimerización, empleando OA/IBOMA y una fracción de MMA, encontrando la concentración mínima requerida (4 % de MMA, equivalentes a 0.11 moles de grupos vinílicos disponibles por litro de agua) para que la nucleación de las partículas ocurra y la propagación de la polimerización sea exitosa en presencia de caseína metacrilada. Esta estrategia permitió obtener materiales con un alto contenido 'bio' (de aproximadamente 75.7 %), sin resignar la resistencia al agua de los mismos y manteniendo su biodegradabilidad parcial en compostaje orgánico.

Para mejorar la resistencia al agua de los films híbridos basados en caseína, en esta Tesis se propuso incorporar una proteína hidrofóbica, como la zeína, para contrarrestar el carácter hidrofílico de la caseína. En este sentido, se sintetizaron látex híbridos con ambas proteínas.

En una primera instancia, se investigó la polimerización batch en miniemulsión, como una alternativa para introducir la zeína, debido a que es el proceso más empleado para incorporar materiales hidrofóbicos. Mediante el mismo, se logró sintetizar con éxito un látex híbrido conteniendo una combinación de zeína-caseína (como biomateriales) y acrílicos, obteniendo partículas con una morfología núcleo-coraza, que poseen una alta sinergia entre las fases acrílica (núcleo) y la proteica (coraza). Así, la hidrofobicidad de la zeína contribuyó significativamente a la resistencia al agua de las películas híbridas, reduciendo un 59% la absorción de agua respecto de los films basados sólo en caseína, y aumentando su hidrofobicidad superficial (ángulo de contacto = 83°), sin modificar significativamente las propiedades mecánicas y térmicas de las películas. Si bien esta técnica permitió desarrollar materiales menos susceptibles al agua con un gran potencial para su aplicación como recubrimiento, no fue posible incrementar el contenido de zeína por encima del 5% (respecto al total de proteína). Este resultado, motivó el desarrollo de una nueva estrategia de polimerización que fuera capaz de incorporar mayor cantidad de zeína.

Con este propósito, se implementó la polimerización presenbrada en emulsión bajo operación semi-batch, empleando como siembra inicial biopartículas conteniendo ambas proteínas (caseína y zeína).

En una primera etapa, se optimizó la síntesis de las biopartículas a partir de la técnica antisolvente de precipitación, obteniéndose así nanopartículas estables y con un alto rendimiento de producción, resultando como mejor opción la alimentación del solvente sobre el antisolvente. Luego, se estudió la polimerización de una mezcla de monómeros acrílicos sobre la siembra de estas biopartículas, La adición lenta y constante de los monómeros, permitió la copolimerización de los monómeros que componen la fase acrílica sobre la superficie de las biopartículas, formando partículas híbridas con una morfología multilobular. Los films obtenidos a partir de estos látex, presentaron una alta resistencia a las soluciones ácidas y una gran sensibilidad al pH (superiores a los obtenidos por los films de proteína pura), por lo que estos materiales híbridos presentan propiedades prometedoras para su aplicación como recubrimiento entérico.

7.2 SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Como trabajos a futuro se plantea el estudio de nuevas estrategias que permitan mejorar las propiedades de las películas híbridas de acrílico/proteína, posibilitando su aplicación tecnológica e industrial. Las actividades que se sugieren son:

- Investigar la incorporación de la zeína metacrilada con GMA, en combinación con caseína funcionalizada, en sistemas híbridos para su aplicación como recubrimiento, a través de la síntesis de látex mediante polimerización en miniemulsión (o en emulsión) semi-batch. Se espera que al emplear ambas proteínas funcionalizadas, se logre mejorar el injerto de las mismas con la fase acrílica, permitiendo incorporar una mayor fracción de zeína para obtener materiales menos susceptibles al agua.

- Analizar nuevas estrategias para incrementar la resistencia al agua de los materiales basados en caseína. Para ello, se propone la formulación y síntesis de látex híbridos auto-curables, es decir que tengan la posibilidad de reticular la fase proteica y acrílica durante la formación de película. Se propone por ejemplo considerar la adición en la fase acrílica de diacetona acrilamida (DAAM), y dihidrazida del ácido adípico (ADH) como agente entrecruzante. De esta forma, el entrecruzamiento se produciría a temperatura ambiente, entre los grupos cetona de la DAAM y los grupos hidrazida del ADH, con la liberación de una molécula de agua. Esto implicaría que el sistema reaccionara durante la aplicación, en la etapa de secado del látex para la formación de película. De esta forma, se prevé que este sistema auto-curado tendrá una mayor resistencia al hinchamiento en agua.

Considerando este mecanismo de auto-curado, también se propone analizar nuevas estrategias para modificar químicamente la caseína, con el propósito de dotar a la proteína de grupos cetonas, utilizando, por ejemplo, el éster de NHS de ácido levulínico como agente modificante. Así, la funcionalización de la proteína se lograría a través de los grupos amino, los cuales son muy reactivos frente al grupo NHS. Esto permitiría sintetizar látex híbridos por polimerización en emulsión con capacidad de reticular la fase proteína en presencia de ADH, durante la formación de película. Como es conocido, mediante esta técnica de polimerización se obtienen partículas con una morfología núcleo-coraza, donde la fase acrílica forma el núcleo, y la caseína recubre y estabiliza dichas partículas. Por lo tanto, al incorporar caseína modificada que contenga grupos cetonas en su estructura, se lograría un entrecruzamiento de las partículas a través de la propia proteína, con lo cual se podría reducir su susceptibilidad al agua, sin afectar su biodegradabilidad. En esta dirección, también se propone sintetizar proteínas polifuncionales (con funcionalidades específicas), que contengan grupos vinílicos y grupos cetonas en su estructura, para que sean capaces de polimerizar radicalariamente e injertarse a la fase acrílica, a la vez que tenga la capacidad de autocurado a temperatura ambiente durante la formación de film. En esta propuesta, ya se cuenta con algunos resultados preliminares obtenidos durante la ejecución de la Tesis.

- Avanzar en la síntesis de recubrimientos entéricos basados en zeína-caseína a través de la polimerización en emulsión semi-batch, implementando nuevas estrategias que permitan mejorar la estabilidad del sistema, reducir la formación de coágulos durante la polimerización, optimizar el contenido proteico para mejorar la estabilidad de los sistemas y reducir la formación de partículas no híbridas producidas por nucleación homogénea en la fase acuosa. Se explorará el incremento de la relación biopartículas/acrílico, y la variación de la relación caseína-zeína que conforman las biopartículas.

Asimismo, se propone estudiar nuevas formulaciones monoméricas, incrementando la Tg de la fase acrílica, para comprender su efecto sobre la morfología de las partículas híbridas, basados en el sistema propuesto por Blenner, y correlacionar la microestructura con las propiedades de aplicación. En esta dirección, también se pretende incorporar en la formulación monómeros que presenten sensibilidad al cambio de pH, como los ácidos (meta)acrílicos, para incrementar la respuesta de los materiales híbridos.

Por último, se pretende continuar con la caracterización de estos materiales haciendo hincapié en su resistencia a los medios ácidos y la sensibilidad al cambio de pH, la permeabilidad al vapor de agua, su capacidad de liberación (retardada o sostenida) en presencia de enzimas digestivas como la pepsina y la pancreatina, presentes en los fluidos gástricos e intestinales, respectivamente. Además, se plantea considerar el recubrimiento de algunos sustratos por aspersión mediante un lecho fluidizado, estudiando las condiciones para optimizar el proceso, y evitar los problemas típicos de la técnica, como la permanencia de humedad de los núcleos, la formación del defecto conocido como ‘piel de naranja’ del recubrimiento, o la aparición de grietas (cracking) sobre el film, entre otras. Esto último se propone llevarlo a cabo en colaboración con el Dr. Santiago Palma (UNITEFA CONICET, FCQ, Universidad Nacional de Córdoba). El proceso de recubrimiento se prevé llevar a cabo en un secador de lecho fluido escala de laboratorio (CALEVA®), empleando esferas de azúcar (SUGLETS®, de la empresa COLORCON®), como núcleo de soporte (plataforma), sobre la cual se aplicará el látex por aspersión. Debido a que las esferas de azúcar

son inertes, pueden adsorber principios activos en fase acuosa, previo a la etapa de recubrimiento, por lo que una vez determinadas las condiciones óptimas para el recubrimiento de las esferas con los látex híbridos, se investigará la carga y liberación de algunos principios activos. En este sentido se propone iniciar con un colorante de fácil detección, como el azul de metileno.

ANEXO

En este Anexo, se detallan la lista de materiales, caracterizaciones y procesos, y el equipamiento utilizado a lo largo de toda la Tesis.

A.1. MATERIALES

La Tabla A.1, contiene la descripción de los reactivos que se emplearon a lo largo del trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral. Todos los reactivos se utilizaron como fueron recibidos, sin ninguna purificación adicional. El agua empleada a lo largo de todo el trabajo fue destilada y desmineralizada.

Tabla A.1. Descripción de los reactivos empleados durante el trabajo experimental.

Reactivos	Función	Proveedor	Pureza
Zeína	Biopolímero	Sigma-Aldrich	Grado técnico
Caseína	Biopolímero	Sigma-Aldrich o Tecnicom	Grado técnico
<i>N</i> -vinil caprolactama	Monómero	Aldrich	98%
Acrilato de <i>n</i> -butilo	Monómero	Aldrich	99%
		Quimidroga	Grado técnico
Metacrilato de metilo	Monómero	Aldrich	99%
		Quimidroga	Grado técnico
Acrilato de 2-octilo	Monómero bioderivado	Arkema	Grado técnico
Metacrilato de isobornilo	Monómero bioderivado	Visiomer Terra	Grado técnico
Metacrilato de glicidilo (GMA)	Agente funcionalizante	Sigma-Aldrich	97%
<i>N,N</i> -metilen bisacrilamida	Entrecruzante	Genbiotech	99.9%
Irgacure 2959 (2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona)	Fotoiniciador	Ciba®	99%
2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN)	Iniciador	Aldrich	98%

Tabla A.1. Continuación

Reactivos	Función	Proveedor	Pureza
Persulfato de potasio (KPS)	Iniciador	Mallinckrodt	99%
Hidroperóxido de tert-butilo (TBHP)	Iniciador	Aldrich	70/30 TBHP/agua
Bruggolite 7 (FF7)	Iniciador (Agente reductor)	Brügemann Chemical	99%
n-Isopropil hidroxilamina (IPHA)	Inhibidor de radicales libres	Donado por Petrobras SA	Grado técnico
Hidroquinona (HQ)	Inhibidor de radicales libres	Fluka	> 99%
Lauril sulfato de sodio (SLS)	Emulsificante	Cicarelli	95.0 %
Dowfax 2EP (o Dowfax 2A1; dodecil difenil-eter disulfonato de sodio)	Emulsificante	Dow	45.0 %
Trietilamina	Base	Sigma-Aldrich	99.0 %
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	Regulador de pH	Cicarelli	Pro-análisis
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Regulador de pH	Cicarelli	Pro-análisis
Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	Regulador de pH	Cicarelli	Pro-análisis
Cloruro de sodio (NaCl)	Regulador de pH	Cicarelli	Pro-análisis
Hidróxido de sodio (NaOH)	Regulador de pH	Cicarelli	Pro-análisis
Ácido clorhídrico (HCl)	Regulador de pH	Anedra	37.0 %
Azida de sodio (NaN ₃)	Agente antimicrobiano	Anedra	Grado analítico
Agua deuterada (D ₂ O)	Utilizado en ¹ H-RMN	Aldrich	> 99.0 %
Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d ₆)	Utilizado en ¹ H-RMN	Aldrich	> 99.0 %
Polivinil formal (formvar®)	Recubrimiento para grillas de microscopía	Fluka	Grado microscopía
Ácido fosfotúngstico (PTA)	Agente de tinción	Fluka	Grado microscopía
Acetato de uranilo (UAc)	Agente de tinción	EMS	Grado microscopía
O-ftalaldehído (OPA)	Marcador fluorescente	Sigma	99.0 %
Sodio tetraborato decahidratado (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O)	Regulador de pH	Anedra	Grado analítico
β-mercaptoetanol	Reactivo para el ensayo OPA	Fluka	> 99.0 %
Etanol anhidro	Solvente para OPA	Cicarelli	99.9 %

Tabla A.1. Continuación

Reactivos	Función	Proveedor	Pureza
Etanol	Solvente para solubilizar la zeína	Porta	96.0 %v/v
DMSO	Solvente para solubilizar la zeína	Anedra	99.9 %
Dimetilformamida (DMF)	Solvente para solubilizar la zeína	Anedra	99.9 %
Ácido acético	Solvente para solubilizar la zeína	Anedra	99.5 %
Metil etil cetona (MEK)	Solvente empleado en determinación de resistencia química	Anedra	99.0 %
Tetrahidrofurano (THF)	Solvente empleado en determinación de la fracción insoluble	Cicarelli	Pro-análisis

A.2. EQUIPAMIENTO E INSTALACIONES UTILIZADAS PARA LA SÍNTESIS DE LOS MATERIALES EN ESTA TESIS

A.2.1. Sistema de modificación química de la zeína

La modificación química de la zeína se llevó a cabo en los laboratorios del Grupo de Química Orgánica Aplicada (INTEC), con la colaboración de los investigadores Victoria Vaillard y Santiago Vaillard. La Figura A.1 muestra los equipos empleados para dos de las modificaciones realizadas a la zeína, la modificación con miristato de NHS (matraz) y el cloruro de acrililo (tubo schlenk). Como se puede observar, el equipo utilizado depende del tipo de modificación. Así, cuando se requirió una atmósfera inerte se emplearon tubos schlenk con una atmósfera de N₂ administrada a través de un globo; y de lo contrario se utilizaron matraces simples. En todos los casos, la agitación se realizó con agitadores magnéticos, y el control de la temperatura se realizó con baños de aceite o hielo (cuando es necesario una temperatura superior o inferior a la temperatura ambiente, respectivamente).

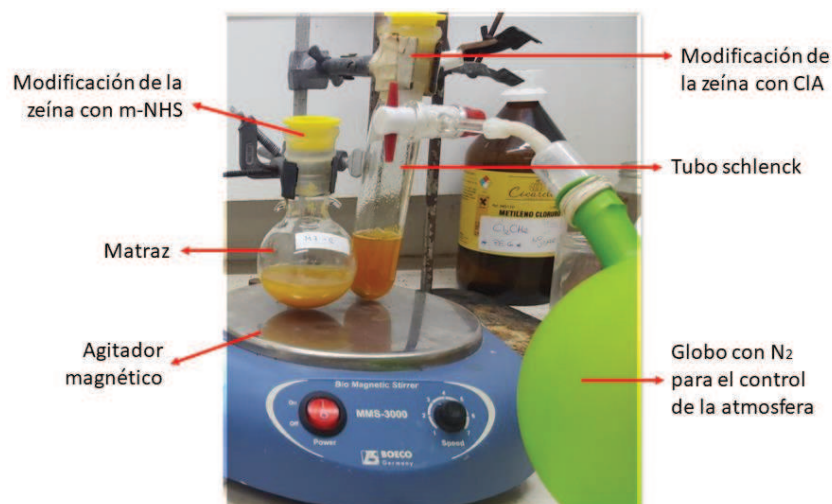


Figura A.1. Equipos utilizados para la modificación química de la zeína con miristato de NHS (*m*-NHS) y el cloruro de acrililo (CIA)

Las condiciones de reacción fueron especificadas en el Capítulo 2, al igual que el procedimiento para la purificación de la zeína modificada, debido a que depende del agente modificante empleado.

A.2.2. Sonicador empleado en la preparación de las miniemulsiones y en la síntesis de las biopartículas

El sonicador es un dispositivo que produce ondas de ultrasonido (US) y consta de tres componentes principales, el “generador” que transforma la línea de corriente alterna en energía eléctrica de alta frecuencia, el “convertidor” que es un dispositivo cilíndrico conectado al generador que transforma la energía eléctrica en vibraciones mecánicas, y la “sonda” que está conectada al convertidor y transmite y amplifica la vibración. En la Figura A.2 se muestra el sonicador Sonic VC 750 (750 watts de potencia) utilizado en los sistemas estudiados.

Durante la operación de sonicación, la sonda se sumerge en el líquido y la punta de la sonda se expande y se contrae una distancia que depende de la configuración de amplitud definida por el usuario. El US generado por la sonda, causa la oscilación de las moléculas del líquido respecto a su posición en la medida que la onda se propaga. Durante los ciclos de compresión la distancia entre las moléculas decrece, mientras la misma aumenta durante los ciclos de

rarefacción. La rarefacción resulta en una presión negativa que puede causar la formación de cavidades (burbujas) que van creciendo. En el ciclo de compresión subsiguiente de la onda, las burbujas se ven obligadas a contraerse y pueden incluso desaparecer totalmente. Las ondas de choque producidas en el colapso total de las burbujas causan la ruptura de las gotas de monómero o micro-agregados de los alrededores. Estas gotas (o partículas) más pequeñas que se generan deben ser estabilizadas por adsorción de un emulsificante (presente en el medio acuoso) sobre su superficie.

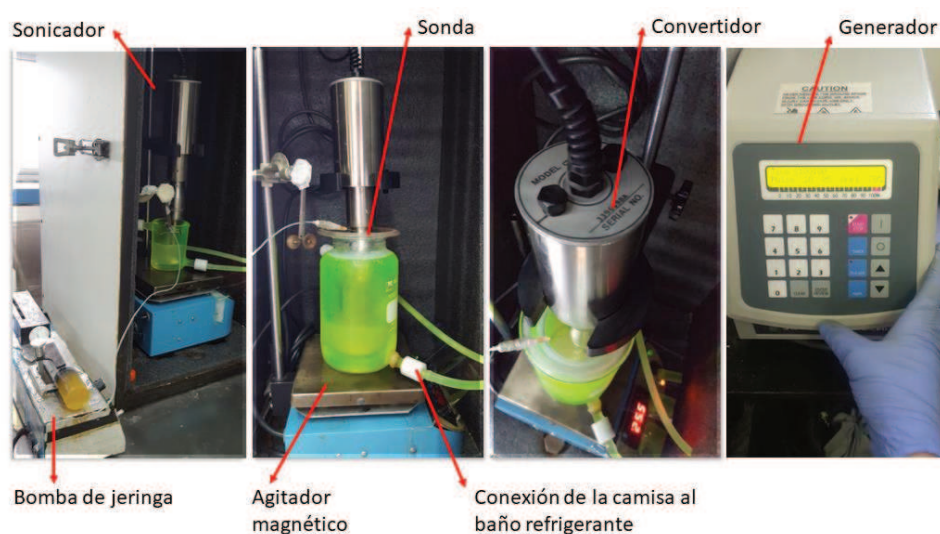


Figura A.2. Equipo sonicador Sonic VC 750. La bomba de jeringa sólo se utilizó durante la síntesis de las biopartículas zeína-caseína, y no en la preparación de miniemulsiones.

Para un sistema determinado, la reducción del tamaño de las gotas/micro-agregados durante la sonicación, depende de la energía que se le entrega por unidad de volumen. La energía total entregada a un volumen determinado, depende de la potencia y el tiempo efectivo de sonicación. El tiempo total de homogenización está comprendido por pulsos definidos por períodos donde el equipo aplica ultrasonido (denominado como período “on”) a una potencia dada, seguido de un período donde la sonicación es suprimida (denominado como período “off”), que favorece el control de la temperatura de la muestra a tratar. Por ejemplo, un pulso con 20 s on y 5 s off significa que el equipo funciona durante 20 s y espera 5 s para aplicar el siguiente pulso. Durante el proceso

de homogenización se genera calor, el cual debe ser removido para evitar la evaporación de los solventes y los monómeros. Por tal motivo, la sonicación se realizó en un recipiente de vidrio encamisado y con agitación magnética, por cuya camisa circula agua con refrigerante a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.2.3. Reactores de polimerización y bombas de dosificación

En las Figuras A.3 y A.4 se muestran imágenes del sistema completo de reacción utilizado y una ampliación con el detalle de las conexiones del reactor, respectivamente. El sistema consta de un reactor encamisado de vidrio con una capacidad de 300 ml o 70 ml, con agitación mecánica (IKA-WERK RW20) o magnética, respectivamente. Los reactores están provistos de un condensador de reflujo, y múltiples entradas para carga del reactor, dosificaciones, toma de muestra y burbujeo de nitrógeno. La temperatura del medio de reacción se registra mediante una termoresistencia (Pt100) conectada a un controlador digital. Por la camisa del reactor circula agua proveniente de un baño termostático (Lauda E100), con el objeto de controlar la temperatura de reacción.

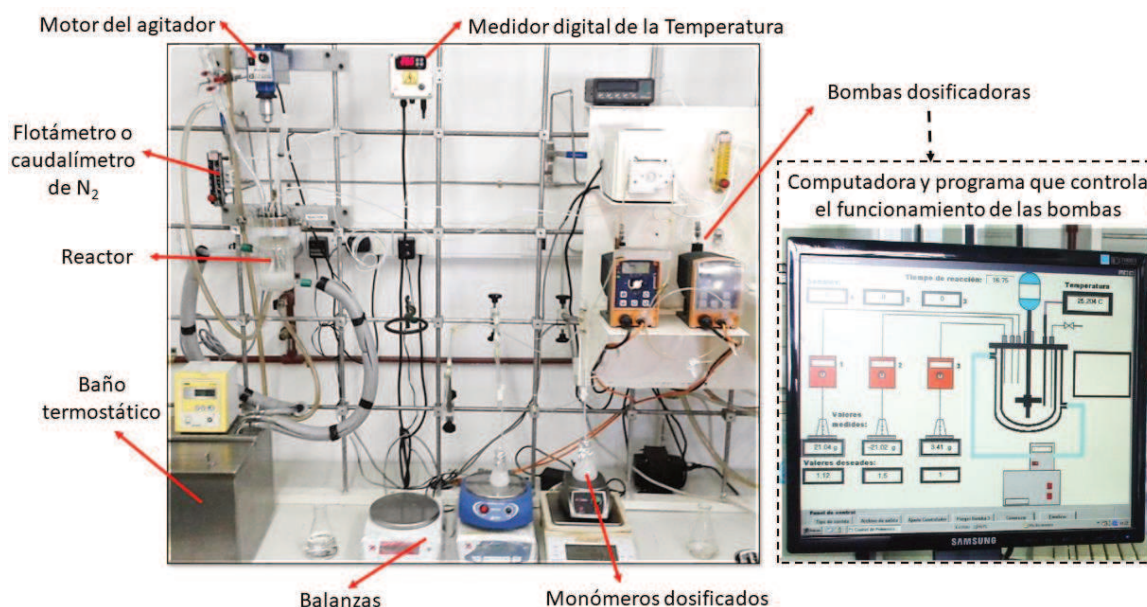


Figura A.3. Sistema completo de reacción utilizado. La bomba de dosificación sólo se emplea cuando las polimerizaciones son semi-batch.

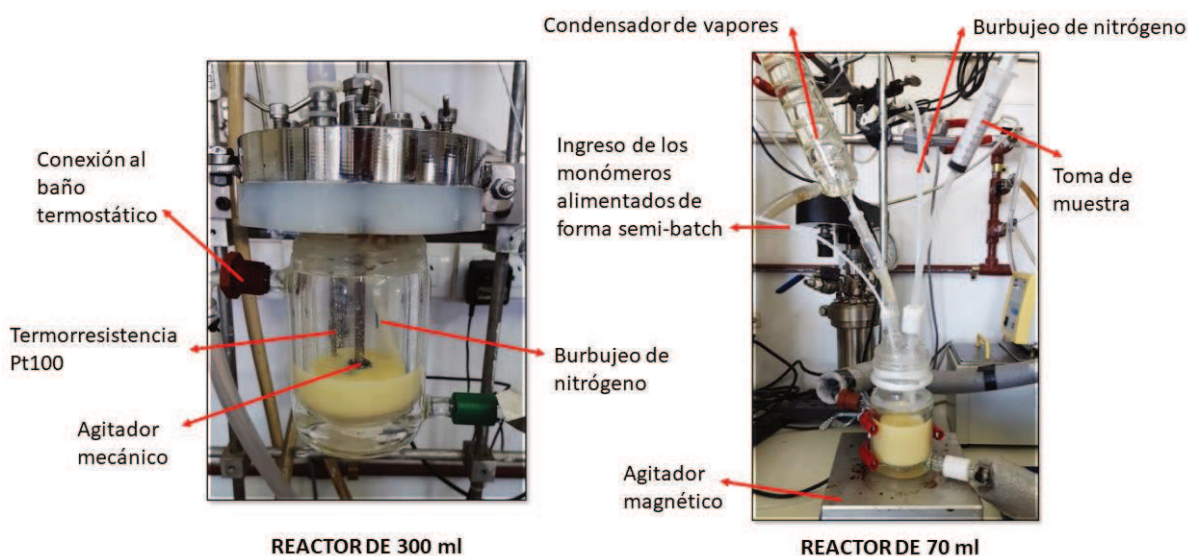


Figura A.4. Detalle de las conexiones de los reactores de 300 y 70 ml. La diferencia entre los sistemas es la forma de agitación.

El proceso de polimerización varía según sea un sistema batch o semibatch, y se ha detallado en los Capítulos correspondientes.

Para el caso de las polimerizaciones semi-batch, el sistema de dosificación utilizado consta de 2 bombas dosificadoras (Prominent Gamma/L) y una bomba peristáltica BT100-2J (Longerpump®) conectadas en circuito cerrado a balanzas digitales (Ohaus) mediante una PC para el control automático del caudal de alimentación. Si bien el sistema tiene capacidad para 3 dosificaciones en simultáneo, en esta Tesis se utilizó una sola corriente de alimentación compuesta por una mezcla de monómeros. Esta mezcla que se desea alimentar se coloca sobre la balanza en un recipiente de vidrio, desde el cual es dosificada hacia el reactor. El programa controlador (Figura A.2), registra el peso de los monómeros y el tiempo de reacción, controlando el funcionamiento de la bomba dosificadora para obtener el caudal de alimentación deseado.

A.3. CARACTERIZACIONES DE LAS PROTEÍNAS MODIFICADAS

La ocurrencia de la modificación de las proteínas fue analizada por 1H -RMN, análisis elemental y por el método de determinación de grupos amino basado en el o-ftalaldehido (OPA).

A.3.1. Resonancia magnética nuclear de protones (1H -RMN)

La espectroscopia de RMN permite determinar las estructuras de los compuestos orgánicos, mediante el estudio de núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos), como por ejemplo los átomos de 1H , entre otros. Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen un espín, y un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar; sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β . Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial, emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad. En cualquier molécula, la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo y actúa como un apantallamiento de la señal detectada. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades δ ó ppm), y es única para cada tipo de molécula.

Los espectros de 1H -RMN fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker de 300 MHz. En el caso de la caseína se utilizó la secuencia *watergate* para suprimir la señal del agua. Para esto, se preparó una solución de las proteínas modificadas y nativas (10 mg/ml) en 0.7 ml de solventes deuterados (D₂O para la caseína, y DMSO-*d*₆ para la zeína), y posteriormente colocados en tubos

RMN asegurando que la misma alcance una altura entre los 4-4.5 cm. En todos los casos, antes de realizar la medición, la proteína fue debidamente purificada para asegurar la eliminación del agente modificante y otros contaminantes presentes en las muestras, como subproductos de reacción.

A.3.2. Método del o-ftalaldehido (OPA): Determinación del porcentaje efectivo de dobles enlaces incorporados a la caseína metacrilada

El método del OPA consiste en la reacción de este compuesto con los grupos amino primarios de la caseína para formar 1-alquiltio-2-alquil isoindoles sustituidos, los cuales resultan altamente fluorescentes, mostrando una banda de absorción a 340 nm.^{208,209} Para esto, se prepara una solución de OPA, a partir de 5 mg de dicho reactivo, 100 μ L de etanol puro, 5 μ l de β -2-mercaptoetanol y 10 ml de un buffer carbonato (50 mM, pH 10.5). Es importante considerar que dicha solución reactiva debe ser protegida de la luz y utilizada dentro de las dos horas desde su preparación. El análisis de las muestras se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando 100 μ l de muestra (1% p/p de proteína), mezclados con 1 ml del reactivo OPA previamente preparado. Se midió la absorbancia de la caseína nativa y funcionalizada, a 340 nm, mediante espectroscopía UV. Además, se realizó un blanco empleando 100 μ l de agua, en lugar de la muestra proteica. Los grupos amino disponibles se determinaron como la relación entre la absorbancia obtenida para la caseína metacrilada (A_{CF}) y la absorbancia de la caseína nativa (A_{CN}), restando en cada caso el valor del blanco (A_B), de acuerdo con la ecuación A.1. El valor de $A_{CN}-A_B$ se asume como el 100% de grupos amino presentes en la caseína, el cual se ve reducido al modificarla químicamente a través de dicho grupo.

$$\text{Grupos amino disponibles (\%)} = \frac{A_{CF} - A_B}{A_{CN} - A_B} \times 100 \quad [A. 1]$$

A.3.3. Tensión superficial de la solución de caseína, para la determinación de la CMC

Es conocido el hecho que la caseína en solución acuosa forma agregados micelares, debido a su carácter anfifílico. Una forma de determinar la presencia de estas micelas es a través de la tensión superficial (γ) de la solución de la proteína, y de su concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual habrá micelas de la proteína en la fase acuosa. La Figura A.5 muestra una curva típica de γ de una solución acuosa de un emulsificante convencional, en función del logaritmo de la concentración del mismo.

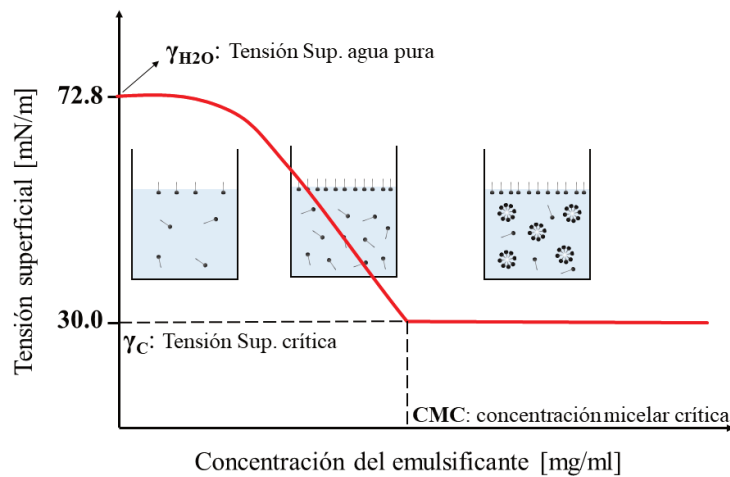


Figura A.5. Esquema representativo de la variación de la tensión superficial respecto a la concentración, para una solución de un emulsificante convencional.

Como se puede observar, la tensión superficial del agua pura (γ_{H_2O}) es 72.8 mN/m, y a medida que se aumenta la concentración de emulsificante o de una proteína, γ disminuye hasta alcanzar un valor constante conocido como tensión superficial crítica (γ_C), correspondiente a la concentración micelar crítica (CMC). Una vez que la solución alcanza la CMC, el emulsificante adicional formará micelas, motivo por el cual γ no continúa descendiendo. Por lo tanto, midiendo γ de una solución de un dado emulsificante y conociendo los valores de γ_C y CMC específicos para el mismo, se puede determinar si existe o no la presencia de micelas.

Las mediciones se realizaron a 25 °C, empleando un tensiómetro de anillo Krüss K8. El método involucra un anillo de platino que se sumerge en el líquido; luego se lleva cuidadosamente hacia la superficie del mismo, y desde allí se eleva lentamente hasta que se produce la separación del anillo y el líquido. La fuerza (F) necesaria para elevar el anillo desde la superficie hasta su separación, se registra y se relaciona con γ del líquido, de acuerdo a la ecuación A.2.

$$F = 2\pi(r_i + r_e)\gamma \quad [A. 2]$$

donde, r_i y r_e son los radios interno y externo del anillo.

Antes de medir la tensión superficial del látex, el anillo fue lavado con alcohol etílico y quemado hasta su incandescencia con un mechero, para eliminar todo tipo de impurezas que puedan interferir sobre la medición. Además, previo a cualquier medición, se comprobó el estado del anillo midiendo la tensión superficial de agua desmineralizada.

De este modo, se confeccionó la curva de γ para las soluciones de caseína nativa y modificada, variando la concentración de la proteína en solución acuosa, a fin de determinar su CMC. Los valores de CMC y γ_c para la caseína nativa resultaron próximos a 0.08 mg/ml y 44.3 mN/m respectivamente, en comparación a 0.33 mg/ml y 35.0 mN/m de un típico surfactante empleado a nivel industrial, como el Dowfax 2EP (también empleado en esta Tesis), indicando un menor poder emulsificante por parte de la proteína.

A.3.4. Análisis elemental, para la determinación del grado de modificación de la zeína

El análisis elemental CHON, también conocido como análisis elemental orgánico o microanálisis elemental, determina las cantidades de carbono (C), hidrógeno (H), nitrógeno (N), y oxígeno (O) presentes en una muestra. Es una técnica usada para evaluar la pureza de compuestos o la composición química de diferentes muestras, incluidas sustancias sólidas, líquidas, y volátiles. Conocer la composición química de los elementos, permite entre otras cosas determinar la estructura de las sustancias, permitiendo en nuestro caso diferenciar la composición

de una proteína nativa, de una modificada. La técnica se basa en la combustión (oxidación) completa y rápida de la muestra, a una temperatura aproximada de 1000 °C.

Para la determinación elemental de carbono, hidrógeno y nitrógeno en matrices orgánicas, se empleó en esta Tesis el determinador elemental CHN628 (LECO). El instrumento utiliza una técnica de combustión. Para ello, 100 mg de muestra previamente pesada y encapsulada se coloca en el cargador del instrumento, se purga para eliminar los gases atmosféricos, y luego, se introduce en el horno principal que contiene solo oxígeno puro. Tras la combustión completa, el carbono, el hidrógeno y el nitrógeno presentes en la muestra se oxidan a dióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O) y NO_x respectivamente. Estos gases son barridos en alícuotas de 10 cm³ empleando un gas portador (Helio) hasta los detectores. En el caso de C y H, se utilizan celdas infrarrojas no dispersivas optimizadas (NDIR) separadas para la detección de H₂O y CO₂. Por otro lado, los gases de NO_x pasan a través de un tubo de reducción (relleno de cobre), para reducir gases a N₂ y eliminar cualquier exceso de oxígeno presente en el proceso de combustión, antes de llegar a la celda de conductividad térmica, utilizada para detectar el N₂. Si bien, los valores de C, H, y N pueden determinarse simultáneamente, la del O suele analizarse en un segundo paso mediante pirólisis (determinación no empleada en esta Tesis).

El análisis se hace por duplicado y los resultados finales generalmente se muestran en porcentaje de peso respecto al peso de la muestra, o en partes por millón. En la Tabla A.2 se detallan los rangos de detección del determinador elemental CHN628 y la precisión de las mediciones.

Tabla A.2. Rangos de detección y de sensibilidad del equipo

Elemento	Rango de detección del equipo (mg)	Rango de precisión (mg)
C	0.02-175	0.01
H	0.1-12	0.05
N	0.04-50	0.02

A.4. CARACTERIZACIONES DE LOS LÁTEX Y DE LAS PARTÍCULAS

A.4.1. Conversión de monómeros por gravimetría

La conversión global de los monómeros acrílicos (x) durante las polimerizaciones, se determinó por gravimetría. Para ello, se tomaron muestras de látex a distintos tiempos durante la polimerización, se pesaron y secaron en estufa a 70 °C hasta alcanzar un peso constante. A cada muestra (de aproximadamente 2 g), se le adicionó unas gotas de solución de IPHA al 1% para detener la reacción. El cálculo de la conversión global se realizó de acuerdo a la ecuación A.3, considerando que el peso de la muestra seca no sólo contiene la masa de polímero formado durante la reacción, sino también la de otros sólidos no volátiles (como las proteínas, sales del buffer, e iniciador, entre otros).

$$x = \frac{\text{peso muestra seca} - \text{peso de sólidos no volátiles (y no polimerizables)}}{\text{peso de los monómeros acrílicos cargados}} \quad [A. 3]$$

El término “peso de los monómeros acrílicos cargados” hace referencia a la masa de monómeros acrílicos al comienzo de la polimerización, cuando la polimerización es batch, o a la masa de monómeros cargada al finalizar la dosificación, cuando la polimerización es semi-batch.

A.4.2. Tamaño medio de gotas o de partículas por dispersión de luz dinámica

Los diámetros medios de partícula del látex (D_p) y los diámetros medios de gotas (D_d , en el caso de las miniemulsiones) se midieron por dispersión de luz dinámica (DLS) a 30°C y a un ángulo de detección de 90°, empleando un fotómetro de dispersión de luz marca Brookhaven con un láser de He-Ne (632.8 nm) polarizado verticalmente, y un correlador digital (Modelo BI-2000 AT), tal como se observa en la Figura A.6. Para evitar la dispersión múltiple, la concentración de las partículas/gotas se ajustó con agua desionizada hasta obtener alrededor de $1-2 \times 10^5$ cuentas/s. El cálculo de D_p y D_d se realizó a través del método de los cumulantes cuadrático (Koppel, 1972), a partir de las funciones de autocorrelación medidas. Es importante aclarar que, para la

determinación del tamaño de gotas, la dilución de la muestra se realizó con una solución saturada en monómeros para evitar la difusión de los monómeros desde las gotas al agua.

En el caso de las polimerizaciones en miniemulsión, el número de partículas o gotas por litro de látex (N_p o N_d , respectivamente) se calculó sobre la base de los datos de la conversión y del diámetro medio (nm), a partir de la ecuación A.4. Asumiendo que la diferencia entre la densidad del monómero y la del polímero no es significativa, se aproximó la relación N_p/N_d como Dd^3/Dp^3 , para determinar el mecanismo de nucleación de las partículas.

$$N_p = \left(\frac{m_x}{W}\right) \left(\frac{\rho_w}{\rho_p}\right) \left(\frac{6 \times 10^{24}}{\pi D p^3}\right) \quad [A. 4]$$

donde m es la masa de monómero en la receta (g), W es la masa de látex (g), ρ_w es la densidad estimada del látex (g/cm^3) y ρ_p es la densidad del polímero (g/cm^3).

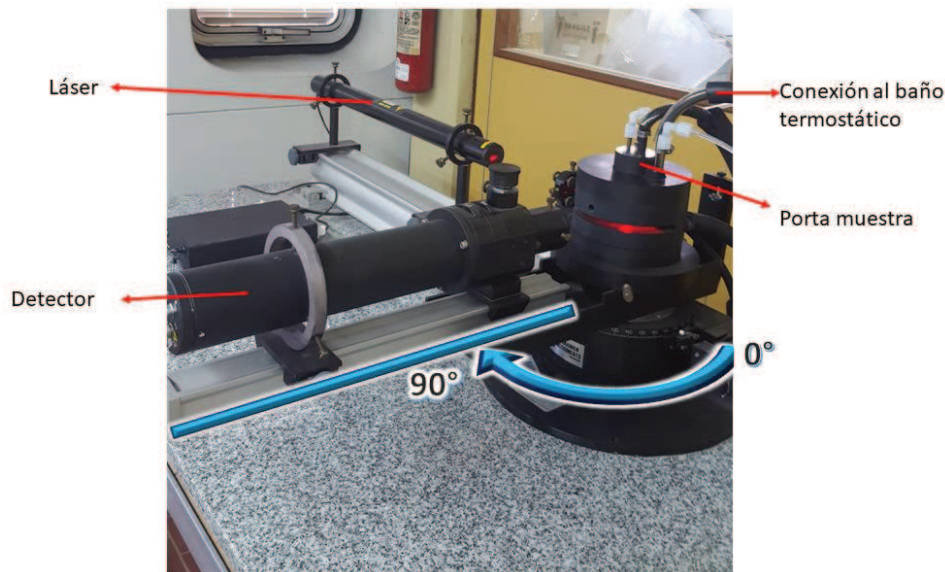


Figura A.6. Fotómetro de dispersión de luz Brookhaven

A.4.3. Proteína libre (FP)

La proteína libre (FP), se define como la fracción de proteína que no se encuentra formando parte de las partículas híbridas, quedando remanentes en la fase acuosa o adsorbidas sobre la

superficie de las partículas. La cuantificación de la FP, permite calcular indirectamente la cantidad de proteína unida químicamente al polímero acrílico, es decir, permite estimar el grado de compatibilización de las fases acrílicas y proteicas. Cabe destacar que en el Grupo donde se realizó la presente Tesis, se ha desarrollado una técnica ad-hoc que permite cuantificar el grado de injerto de caseína en látex híbridos.³⁶ En la Figura A.7 se esquematiza el método desarrollado durante la Tesis Doctoral de M. Picchio.²¹⁰

El método para determinar la FP involucró la separación de la caseína no injertada, aplicando un procedimiento de múltiples centrifugaciones y redispersiones, como sigue: i) el látex se diluyó con agua ultrapura al 1% de sólidos (sc) y fue centrifugado con una fuerza relativa de centrifugación de 25000g durante 4 h (15000 rpm); y ii) el sobrenadante que contiene la caseína soluble se separó y el “pellet” se redispersó en una solución de SLS al 0.5% p/p bajo agitación por 24 h, para promover la desorción de la caseína no injertada de la partícula. Luego, este procedimiento de centrifugación/separación/redispersión con solución de SLS se repitió varias veces, hasta no detectar caseína en el sobrenadante.

A) Esquema de la composición de un látex híbrido basado en caseína

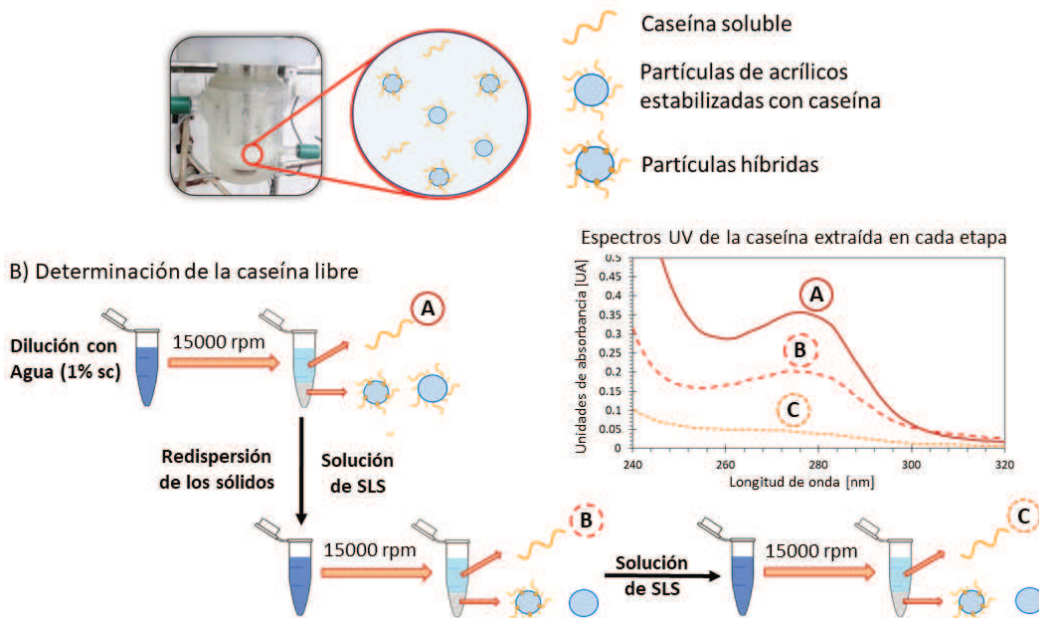


Figura A.7. Representación de la caseína en un látex híbrido (A), y etapas para la determinación de la caseína libre a través de espectroscopia de absorbancia UV.

Todos los sobrenadantes obtenidos luego de cada paso de centrifugación, se analizaron por espectroscopia de absorbancia UV y la concentración de caseína sin injertar se obtuvo combinando el área de su pico característico a 280 nm, con una calibración de concentración de la caseína. En la Figura A.8 se muestra las calibraciones de concentración obtenidas en H₂O (utilizada para procesar los sobrenadantes de los látex) y en una solución al 0.5% de SLS (utilizada en el análisis de los sobrenadantes obtenidos de las desorciones).

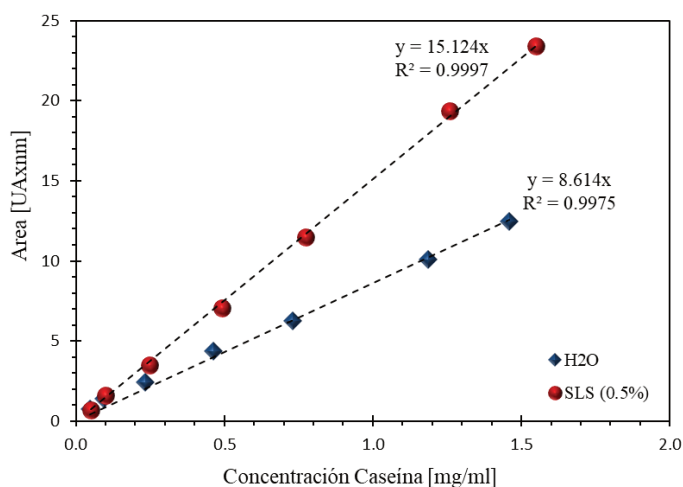


Figura A.8. Curva de calibración para la determinación de la concentración de la caseína soluble en agua y en solución de SLS (0.5%)

Finalmente, la fracción de FP se obtuvo como la relación entre la caseína cargada y la no injertada determinada a partir del análisis de los sobrenadantes de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$FP (\%) = \frac{\text{masa de caseína libre}}{\text{masa de caseína cargada}} \times 100 \quad [A. 5]$$

donde la masa de caseína libre se obtiene como la suma de la masa de caseína recuperada en cada etapa de centrifugación-redispersión. El estudio se realiza por triplicado y se reporta el promedio obtenido. Además, vale la pena destacar que la incorporación de grupos vinílicos en la cadena de caseína no afecta el espectro característico de absorción de la proteína, por lo que no se encontraron diferencias entre los espectros UV realizados con caseína nativa o funcionalizada.

Para el caso de los materiales que contienen ambas proteínas (zeína y caseína), se aplicó una variación de la técnica, en la cual se utilizó la solución de SLS (0.5%) para realizar tanto la dilución del látex, como las posteriores redispersiones de los pellets. Esto se debe a que la zeína resulta insoluble en agua, pero es soluble en solución de SLS. En este sentido, se realizó un estudio para determinar las curvas de absorbancia UV de cada proteína en este medio, y la curva de calibración que se debe utilizar.

En la Figura A.9 se muestran los espectros UV obtenidos para 3 soluciones de caseína (CasA-SLS) y zeína (Zn-SLS), con 3 concentraciones diferentes de proteína 0.25, 0.49, 0.77 mg/ml (C5, C4 y C3, respectivamente). Como se puede observar, ambas proteínas presentan un máximo de absorción a 280 nm; sin embargo, la zeína presenta una segunda señal a 330 nm. En base a este resultado, para el caso de la zeína se analizó el cociente entre el área del pico a 330 nm y el área del pico a 280 nm (Figura A.9b), para determinar si existe una relación constante entre dichas áreas, de manera que permita diferenciar el aporte producido por la caseína y la zeína, sobre el área total de un espectro obtenido a partir una mezcla de ambas proteínas (de concentración desconocida).

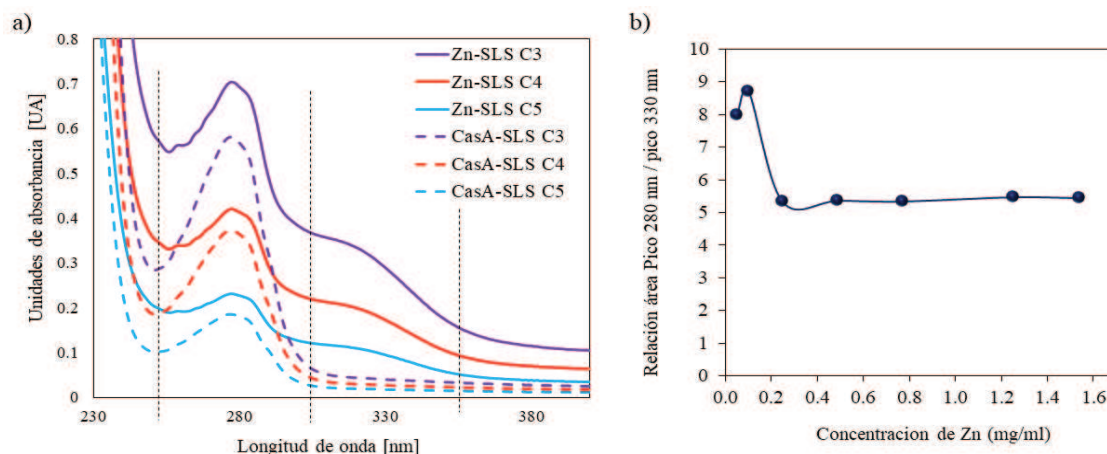


Figura A.9. Espectros UV para 3 concentraciones de zeína y caseína, en una solución de SLS (a), y variación de la relación entre las dos señales que presenta la zeína, para soluciones con diferentes concentraciones de proteína (b).

Sin embargo, como se observa en la Figura 6.Ab, la relación entre las señales de la zeína no es constante cuando la concentración de la misma es menor a 0.25 mg/ml (valores coincidentes con las concentraciones generalmente observadas durante la determinación de FP), por lo que no fue posible diferenciar entre ambas proteínas empleando solamente UV como técnica de detección.

En la Figura A.10 se muestra las curvas de área vs concentración, obtenidas para la caseína y las dos señales de la zeína, en las soluciones de SLS. Es importante notar que, si se emplea como curva de calibración a la obtenida para la caseína, se estará reduciendo el valor real de la concentración de proteína en la muestra; mientras que al emplear la zeína se estará sobredimensionando este valor.

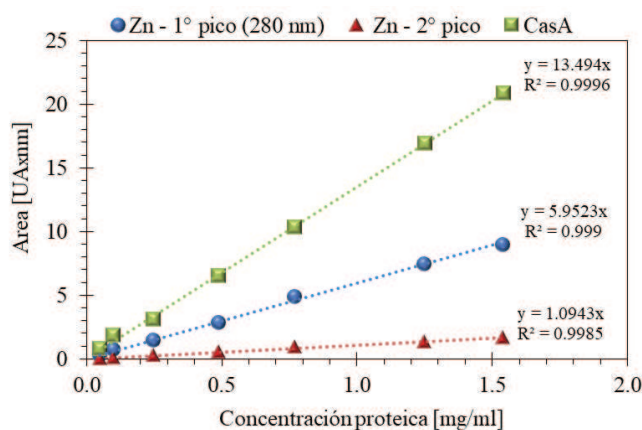


Figura A.10. Curvas de calibración en solución de SLS, obtenidas para la caseína y para la zeína.

Sin embargo, tanto en el caso de las polimerizaciones en miniemulsión batch como en las polimerizaciones en emulsión semi-batch realizadas a lo largo de esta Tesis, se esperaba que la mayor cantidad de proteína libre fuera aportada por la caseína. Específicamente, en el primer caso de la polimerización en miniemulsión se empleó un mayor contenido de caseína respecto al de zeína (80:20 caseína:zeína), mientras que en el caso de las polimerizaciones semi-batch en emulsión con biopartículas como siembra, la cantidad de caseína utilizada para estabilizar las biopartículas fue mayor a la mínima cantidad necesaria.¹⁹⁰ Además, se asume que la zeína está mayormente retenida en la fase hidrofóbica de las partículas. Es por eso, que se empleó la curva de calibración de la caseína, porque se espera que sea más cercano al valor real de FP. Si bien

esta técnica permite aproximar la cantidad de proteína libre en los sistemas, aún se encuentra en estudio para mejorar la precisión de su determinación.

A.4.4. Morfología de las partículas por TEM

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) consiste en la irradiación de un haz de electrones sobre una muestra delgada (de un grosor no muy superior a 100 nm). El haz de electrones posee la naturaleza de una “onda”, y se genera a partir de un filamento de tungsteno o una fuente de hexaboruro de lantano, en una atmósfera de vacío. La longitud de dicha onda puede variar según el voltaje de aceleración empleado (100 a 200 kV, correspondientes a longitudes de onda de 0.0037nm a 0.0025nm, respectivamente). Parte de esos electrones son transmitidos o dispersados, y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios, y rayos X. El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra.

Para determinar la morfología de las partículas de los látex y las biopartículas, se emplearon los siguientes microscopios:

- TECNAI G2 20 TWIN (200kV, LaB6) de la Universidad del País Vasco, San Sebastián (España).
- JEOL JEM-2100 plus (200 kV) del servicio centralizado de grandes instrumentos (SECEGRIN) del CCT-Santa Fe (Figura A.11)
- JEOL 100 CX (100 kV) del Laboratorio de Microscopía del CCT-Bahía Blanca

Para la observación de las partículas de los látex híbridos, 10 µl de las muestras diluidas (0.01 %sc), fueron depositadas sobre una rejilla de cobre cubierta con polivinil formal (Formvar®) y dejándola secar a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron teñidas positivamente con una solución al 1% en peso de ácido fosfotúngstico (PTA) o acetato de uranilo

(UAc). Ambos agentes reaccionan con los grupos amino de las proteínas, y durante la observación, la fase proteica aparece de color oscuro porque el tungsteno y/o el uranio bloquean el paso del haz de electrones (Smith y Bryg, 2006; McMahon et. al, 2008). Las micrograffías se tomaron en distintas zonas de la rejilla y a diferentes magnificaciones, dependiendo del tamaño de partícula.

En todos los casos, los látex fueron previamente tratados para eliminar el exceso de proteína libre, siguiendo la misma técnica de dilución-centrifugación-redispersión empleada para la caracterización de PF.



Figura A.11. Equipo JEOL JEM-2100 plus perteneciente al SECEGRIN del CCT-Santa Fe empleado en la determinación de la morfología de las partículas.

A.4.5. Distribución de tamaño por DCP

La fotosedimentometría centrífuga de disco (DCP), es un método de sedimentación, que permite determinar la distribución del tamaño de partículas coloidales, a partir de las diferentes velocidades de sedimentación que presentan las partículas de distinto tamaño en un campo centrífugo. El equipo (Figura A.12) consiste esencialmente de un disco hueco transparente (de vidrio o PMMA) que contiene un fluido conocido como "fluido de espín", a través del cual se mueven las partículas. El disco gira alrededor de su centro, la muestra coloidal se introduce en el punto de rotación central, y el tamaño de las partículas se detecta por turbidimetría. El detector

(lámpara de tungsteno/halógeno) detecta la intensidad de luz transmitida, la cual disminuye cuando las partículas pasan a través de ella, debido a la dispersión/absorción que producen las mismas. Como se puede observar en la Figura A.13, la fuerza centrífuga hace que las partículas sean empujadas desde el sitio de la inyección hacia la periferia del disco, produciéndose el fraccionamiento por tamaños, en el que las partículas más grandes viajan a mayor velocidad, siendo las primeras en ser detectadas. A pesar de la existencia de una relación teórica entre el tiempo de sedimentación y el diámetro de partícula, es importante resaltar que esta se basa en la ley de Stokes, que considera que las partículas son esféricas, homogéneas y rígidas, debiéndose conocer la densidad de las mismas. En sistemas complejos, como el que involucra a partículas heterogéneas con morfología núcleo-coraza, estas pueden presentar diferentes densidades en cada fase, por lo que existirán variaciones en los tiempos de sedimentación y en los D_p respecto del caso homogéneo.¹⁶

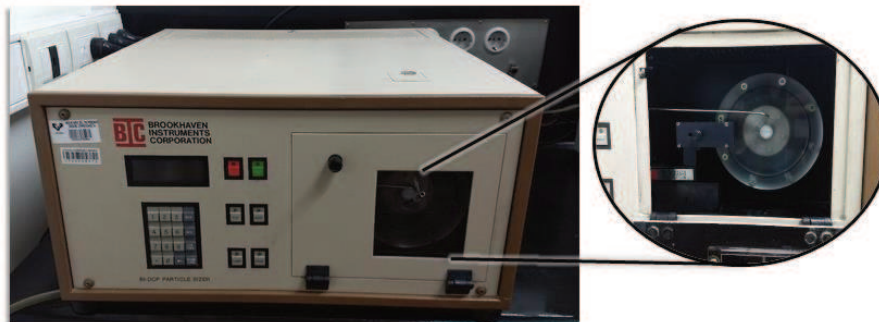


Figura A.12. Equipo empleado para la determinación de la distribución de tamaño de las biopartículas zeína-caseína

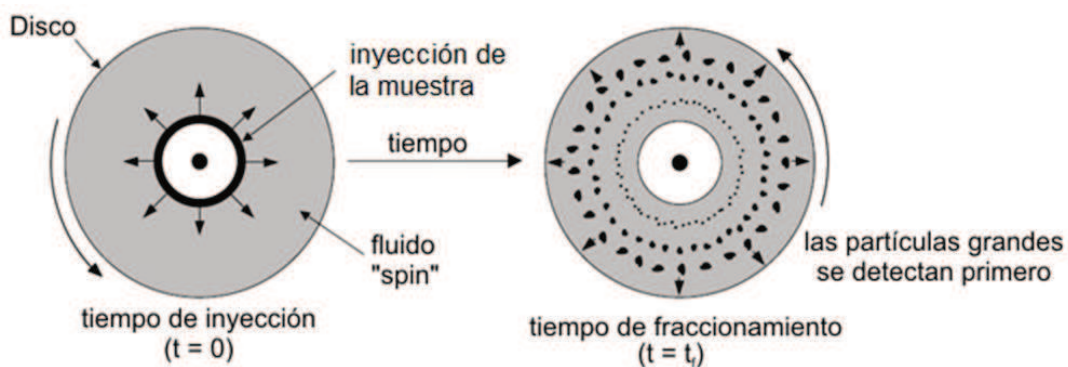


Figura A.13. Principio de funcionamiento del equipo DCP

La determinación de la distribución de los tamaños de las biopartículas de zeína-caseína se llevó a cabo empleando el equipo BI-DCP Particle Sizer de Brookhaven Instruments corporation, con un disco de 5.10 cm de radio y en el cual el detector se encuentra a 4.84 cm del centro de inyección. Con el equipo parado, se carga entre los discos 0.2 ml de metanol (buffer fluid, que permite obtener un gradiente de densidad y viscosidad en el fluido), luego se enciende el motor del equipo a 11998 rpm, y se inyectan 15 ml de agua como spin fluid (densidad = 0.996 g/ml, viscosidad = 0.842 cp a 27.5 °C), y por último 0.2 ml de dodecano. Se espera 10 minutos para permitir la formación del gradiente de partículas, y se inyecta 0.2 ml de la muestra. La muestra se prepara diluyendo el látex al 0.1% de sólidos, utilizando una solución con la misma proporción de agua y metanol.

A.5. CARACTERIZACIONES DE LOS MATERIALES FINALES

A.5.1. Morfología de los hidrogeles por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de un microscopio electrónico se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. La imagen ampliada se obtiene a partir de las señales emitidas por la muestra, que se va formando a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie. Este barrido (*scanning*) se realiza línea por línea sobre una pequeña zona de forma rectangular (*raster*), que es la que se visualiza en la imagen final.

La morfología de los hidrogeles, es decir la forma, tamaño y distribución del tamaño de los poros, se estudiaron por SEM, utilizando el equipo Phenom World ProX (Figura A.14), del Programa de Electroquímica Aplicada e Ingeniería Electroquímica (PRELINE) de la Facultad de Ingeniería Química de la UNL (Santa Fe). Para la distribución de los poros, las imágenes fueron procesadas empleando el programa Image-Pro plus 6.0, a partir del cual se mide el tamaño de 500-1000 poros, los cuales se grafican para obtener los histogramas que representan la distribución de tamaños.

Todos los xerogeles se hidrataron con agua ultrapura hasta el equilibrio, luego se cortaron delgados discos de aproximadamente 2 mm de espesor y se liofilizaron. Las secciones transversales de las muestras liofilizadas se observaron con diferentes aumentos (380 × y 4400 ×).

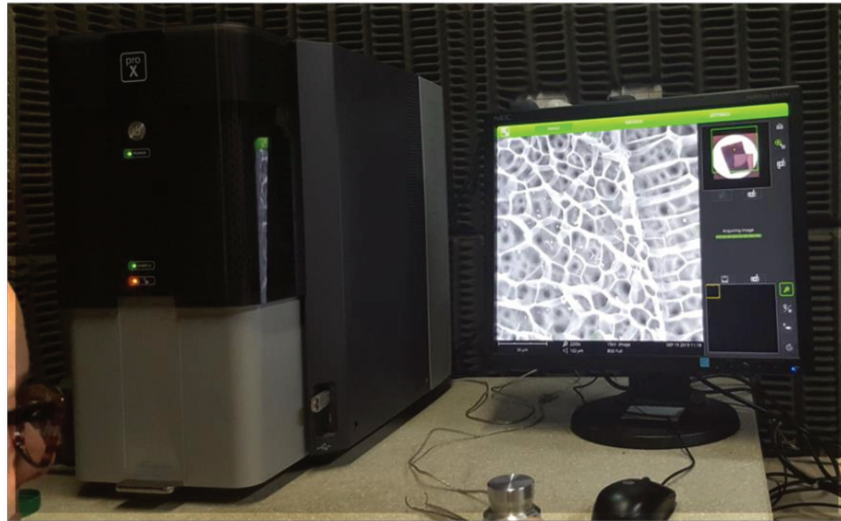


Figura A.14. Imagen del equipo empleado para el estudio de la morfología de los hidrogeles.

A.5.2. Morfología de las películas por microscopía de fuerza atómica (AFM)

La morfología de las películas se caracterizó mediante AFM en modo contacto intermitente o “*tapping*”. En esta técnica, una palanca flexible de silicio o nitrito de silicio (“*cantilever*”) con una punta de 10-30 nm de radio en su extremo (“*tip*”), se emplea para barrer la superficie de la película. El *cantiléver* recibe una excitación de oscilación por parte de un componente piezoeléctrico, sobre el cual se apunta un láser con el objetivo de determinar la oscilación real del *cantilever* mediante la detección de su reflejo. (La Figura A.15 muestra el equipo empleado, como así también una imagen del *cantiléver* y el *tip*.) El barrido de la superficie da información de la topografía de la muestra. Además, puede dar información de su composición. Esta última se obtiene como consecuencia de la modificación que sufre la oscilación de la punta sobre la amplitud, fase y frecuencia de resonancia como consecuencia de la interacción que tiene el *tip* con la superficie. Esos cambios en la oscilación real, con respecto a la oscilación de excitación, proveen información acerca de las características del material, ya que dichas variaciones están

parcialmente relacionadas con las propiedades viscoelásticas de la superficie. Este tipo de información se muestra en un modo secundario, que deriva del modo *tapping*, y que se denomina imagen de fase, que da una idea de las propiedades del material o de su composición.

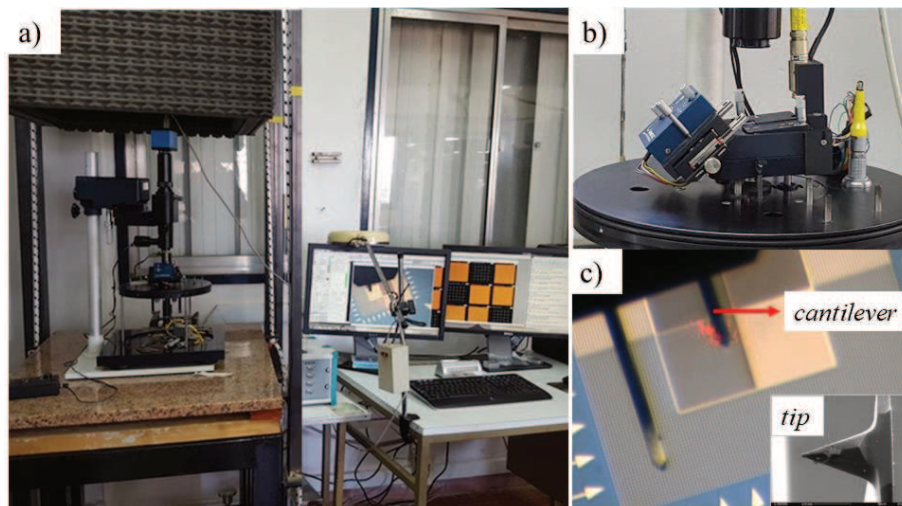


Figura A.15. Equipo de AFM (a), con la correspondiente ampliación del cabezal del microscopio (b), y una imagen tomada por microscopio óptico del cantiléver y del tip (c).

Las mediciones de AFM se llevaron a cabo en un sistema comercial Nanotec Electronic equipado con puntas All-In-One-Al (Budget Sensors) del Instituto de Física del litoral (IFIS-Litoral, CONICET-UNL) de Santa Fe. Se utilizó *cantilevers* contruidos de silicio y recubiertos por una capa de Al de 30 nm, con radio de punta < 10 nm. La frecuencia de resonancia y la constante de resorte (k) utilizadas para los distintos modos, fue 350 kHz, $k = 40$ N/m, respectivamente. Todas las mediciones de AFM se realizaron en aire a temperatura ambiente. Se empleó una velocidad de escaneo de 0.6-1 Hz, obteniéndose imágenes de fase para las superficies de los materiales. Para la adquisición y el procesamiento de las imágenes se utilizó el software libre WSxM.²¹¹

A.5.3. Temperatura mínima de formación de film (MFFT)

La MFFT de los látex se determinó empleando un método óptico,⁹⁸ el cual involucra la evaluación del cambio en la transparencia de la película formada a partir de un látex, luego de ser

aplicado sobre una placa de acero inoxidable que posee un gradiente de temperatura. La temperatura a la cual se observó una transición en la transparencia de la película, indicando la ausencia de coalescencia de las partículas, fue considerada como la MFFT. En la Figura A.16a se muestra una imagen del equipo utilizado para tal medición. El mismo consta de una placa de acero inoxidable de superficie rectificada, presentando en uno de sus extremos una resistencia eléctrica, mientras que en el otro extremo se dispone de un intercambiador de calor de aluminio por el que circula un fluido refrigerante, permitiendo establecer un gradiente de temperatura entre ambos extremos. El perfil de temperatura es adquirido mediante 16 termorresistencias (Pt100) colocadas en el cuerpo de placa equidistantes a pocos milímetros de la superficie de aplicación. Antes de realizar las determinaciones, se aseguró la estabilización del equipo, de modo que el gradiente de temperatura fuera lineal e invariante en el tiempo (Figura A.16b).

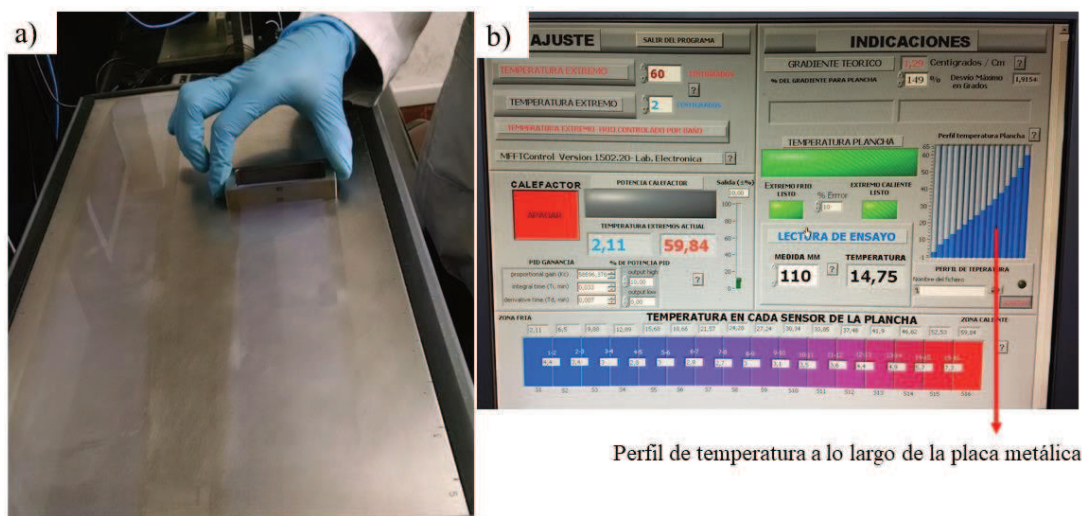


Figura A.16. Ejemplo de aplicación del látex sobre el equipo empleado para la determinación de la MFFT (a), y el programa de control del funcionamiento del mismo (b)

A.5.4. Hinchamiento o absorción de los materiales en solventes, por gravimetría

La interacción de los materiales sintetizados a lo largo de la Tesis, con diferentes solventes, se llevó a cabo involucrando: i) la determinación del grado de hinchamiento de los hidrogeles, empleando agua como solvente, y para la degradación de los hidrogeles, empleando soluciones que simulan el fluido intestinal con y sin enzimas (pancreatina), y diferentes temperaturas; ii) la

determinación de la resistencia al agua y a los solventes orgánicos (MEK) aplicados a las películas obtenidas de los látex híbridos sintetizados en los Capítulos 4 y 5; y iii) la determinación de la resistencia a los medios ácidos de los films obtenidos a partir de los látex híbridos expuestos en el Capítulo 6, como así también la sensibilidad al cambio de pH. Para esto último, se emplearon dos soluciones que simulan los fluidos gástrico e intestinal, sin la presencia de enzimas.

El procedimiento consiste en la inmersión de una muestra seca y previamente pesada, la cual se sumerge en el fluido correspondiente para cada caso. La muestra fue removida del medio a tiempos regulares, secada cuidadosamente con papel absorbente, e inmediatamente regresada al medio de inmersión. De forma genérica, la masa relativa absorbida a cada tiempo y el peso perdido al final del ensayo se calculan según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Masa relativa absorbida (\%)} = \frac{M_t - M_i}{M_i} \times 100 \quad [A. 5]$$

$$\text{Peso perdido (\%)} = \frac{M_i - M_{fs}}{M_i} \times 100 \quad [A. 6]$$

donde M_i , M_t y M_{fs} representan la masa de la muestra seca inicial, la masa de la muestra hinchada en un tiempo t , y la masa final de la muestra seca, respectivamente. La M_{fs} se obtiene al secar la muestra hinchada hasta alcanzar un peso constante en estufa a 70 °C. Generalmente las muestras presentan una humedad inicial, la cual se resta del peso M_i , previo al cálculo del peso perdido (ecuación A.6). La humedad inicial de la muestra se obtiene al secar una porción de la muestra inicial hasta peso constante, en estufa a 70 °C.

A.5.5. Fracción insoluble (IF) del material

La fracción insoluble del polímero se puede medir empleando una técnica de fraccionamiento que permita extraer selectivamente con algún solvente los polímeros de bajo peso molecular, o la fracción no injertada o no entrecruzada de un material polimérico.

Para el caso de los films fotocurados obtenidos a partir de la zeína metacrilada y la zeína nativa, se empleó una solución alcohólica con una concentración de 90 % v/v de etanol. Esto se debe a

que, a esta concentración, la zeína es fácilmente solubilizada. El test se realizó sumergiendo una muestra de peso conocido de los films obtenidos, en 10 ml de la solución alcohólica a temperatura ambiente durante 1 hora (superando el tiempo en el cual el film de zeína nativa fue completamente solubilizado). Posteriormente, se recuperó la fracción del film no solubilizada (correspondiente a la IF) por centrifugación, y se secó en estufa a 70 °C hasta peso constante.

La IF de los látex híbridos, fue determinada mediante extracción por Soxhlet, empleando THF como solvente. Esta técnica se basa en el hecho de que el copolímero híbrido y la caseína resultan insolubles en THF, mientras que el homopolímero acrílico (no entrecruzado ni formando gel) es completamente soluble en dicho solvente. Para ello, aproximadamente 0.5 g de polímero seco (film) se colocó en un cartucho construido con papel de filtro de peso conocido y previamente secado en estufa a 70 °C. La extracción por Soxhlet se realizó durante 24 h bajo recirculación continua del solvente. Después de este período, el cartucho que contiene la fracción insoluble, se retiró del Soxhlet, se secó en estufa a 70 °C y se registró su peso.

La IF se calcula de acuerdo a la ecuación A.7.

$$IF (\%) = \frac{Mfs - cv}{Mi} \times 100 \quad [A. 7]$$

donde Mi es el peso inicial de la muestra seca, y el Mfs es el peso final de la muestra seca (que incluye el peso del recipiente contenedor), y cv representa el peso del contenedor vacío (ependorf, tubo o cartucho de filtro de papel, según corresponda).

A.5.6. Propiedades mecánicas

Para los ensayos de tracción y dureza se empleó una máquina universal de ensayos INSTRON 3344, con una celda de carga de 1000 N. Todas las mediciones se realizaron en condiciones controladas de temperatura (23 °C) y humedad (50%). En la Figura A.17 se muestra una imagen de una probeta y el ensayo de tracción (a) y de dureza (b).

Para los test de tracción, se cortaron probetas de las películas con forma de hueso, de acuerdo a la norma ASTM D882, siendo las dimensiones de la zona de elongación de 9.53 mm de longitud con una sección transversal de 3.18 mm x 1 mm². Las pruebas se realizaron siguiendo la norma ASTM D882, a una velocidad de elongación de 25 mm/min. Se ensayaron al menos 5 probetas por cada muestra, y reportándose los resultados como la media aritmética, junto a la desviación estándar.

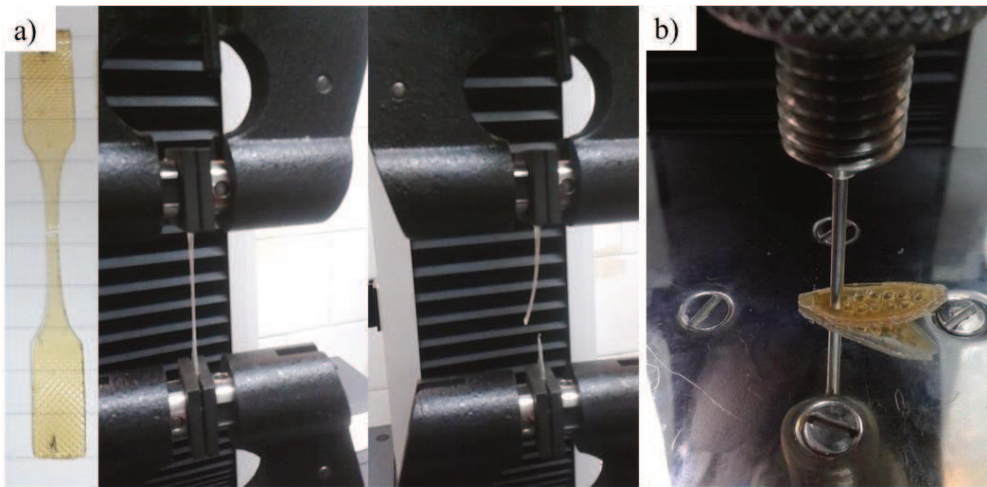


Figura A.17. Imagen de una probeta y del ensayo de tracción (a), e imagen del ensayo de dureza por penetración (b).

El análisis de dureza por penetración, se llevó a cabo utilizando un indentador cilíndrico de punta plana de 10 mm de diámetro. El valor de dureza fue medido como la fuerza máxima en compresión requerida para penetrar la muestra con el indentador hasta alcanzar 1 mm de profundidad. El inicio de la penetración se tomó cuando se detectó sobre la superficie de la muestra una fuerza de 0.05 N.

A.5.7. Ensayos térmicos

El análisis térmico ha sido definido como un grupo de técnicas en las cuales una propiedad de una muestra es monitoreada con relación al tiempo o temperatura, en una atmósfera específica, a un régimen programado de temperatura.

Por un lado, el análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que mide la variación de la masa de una muestra mientras se la calienta, o se la mantiene isotérmicamente en una atmósfera definida. Esta técnica permite observar los pasos de pérdida de masa relacionados con la pérdida de componentes volátiles (humedad, solventes, monómeros), la descomposición del polímero, la combustión de negro de carbón y residuos finales (ceniza, cargas). Los ensayos de TGA se realizaron con el equipo Q500 (TA Instruments) del Laboratorio de Análisis Térmico (LAT) de INTEC. Para ello, aproximadamente 5 mg de la muestra fue sometida a una rampa de temperatura desde 25 a 600 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de descomposición máxima ($T_{d,max}$) se determinó como la temperatura correspondiente al máximo del pico principal obtenido en la curva de la derivada de la pérdida de peso.

Por otro lado, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) mide los cambios del flujo calórico que surge cuando una muestra absorbe o libera calor a causa de efectos térmicos como la fusión, la cristalización, reacciones químicas, la vaporización, y la transición vítrea de los polímeros, como una función del tiempo o la temperatura. Las mediciones de DSC se llevaron a cabo con el equipo Q2000 y (TA Instruments), del LAT. A cada muestra, de aproximadamente 5 mg, se le aplicó tres ciclos de temperatura (calentamiento-enfriamiento-calentamiento) y se determinó su T_g durante el segundo calentamiento, adoptando la temperatura correspondiente al máximo de la derivada de la curva de capacidad calorífica durante dicha transición. En todos los casos, debido a que la caseína y la zeína poseen transiciones vítreas (T_g) próximas al comienzo de su temperatura de degradación (alrededor de 170 °C), los estudios de DSC se llevaron a cabo desde -80 a 130 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

A.5.8. Hidrofobicidad superficial, mediante el análisis del ángulo de contacto

La determinación del ángulo de contacto (CA) es un método ampliamente utilizado para caracterizar la hidrofobicidad/hidrofilicidad de las superficies. El método consiste en medir el

ángulo formado entre la superficie del sustrato (film formado a partir del látex) y la gota de agua depositada sobre la misma. Si el líquido es fuertemente atraído por la superficie sólida (material hidrofílico), la gota se extenderá completamente sobre la superficie sólida (alta mojabilidad) y el CA será cercano a 0-30°. Al incrementarse la hidrofobicidad de la superficie, el CA aumenta. Un material hidrofóbico supera los 90°, mientras que uno altamente hidrofóbico puede alcanzar un CA próximo a los 150°. ²¹²

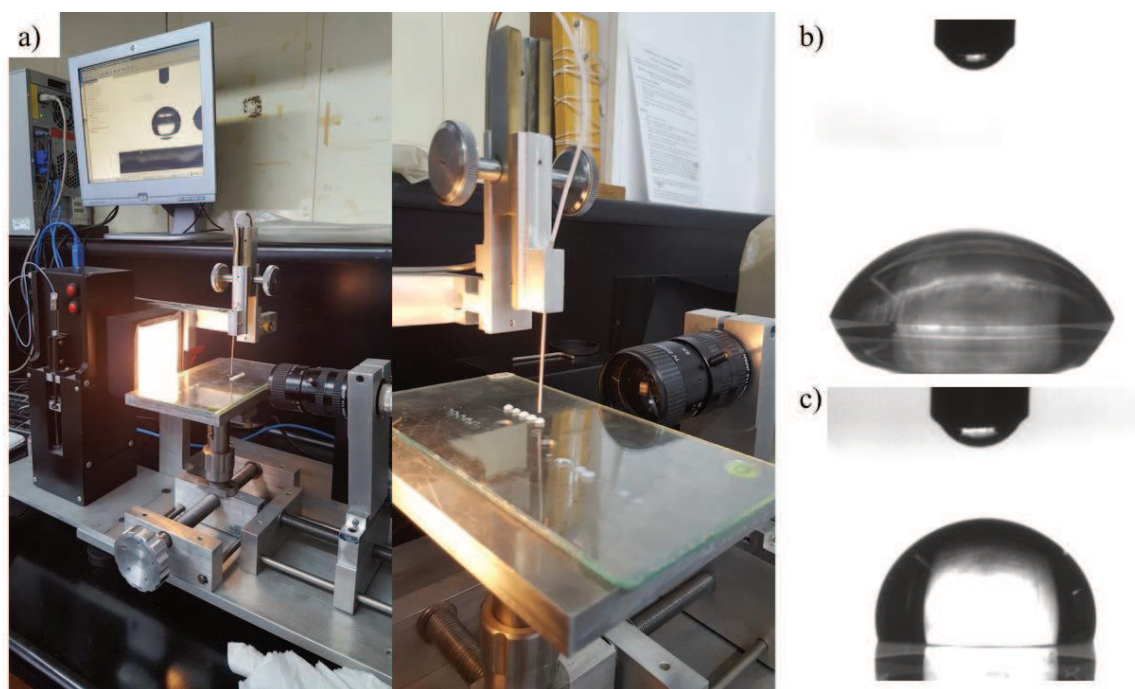


Figura A.18. Foto del equipo empleado para medir el CA (a), y muestra de un material con la superficie hidrofílica (b) e hidrofóbica (c).

El CA de la superficie de las películas fue determinado utilizando un goniómetro construido por el Grupo donde se realizó la presente Tesis Doctoral (Figura A.18a). El equipo consta de una cámara Point Grey modelo BFLY-PGE-05S2M-CS, con una lente macro Edmund Optics #68-678 con una magnificación de 6X. A tal efecto, se aplicó una película de 120 μm sobre una placa de vidrio, se la dejó secar por 24 h y posteriormente se depositaron gotas de agua de 32 μl a lo largo de la película. Las gotas fueron analizadas utilizando el método LB-ADSA ¹⁷⁶ y el software gratuito “ImageJ”. Se realizaron al menos 20 mediciones para cada muestra, reportándose un valor

promedio. En la Figura A.18b-c, se puede observar el ejemplo de dos materiales diferentes, uno con una superficie hidrofílica y otra más hidrofóbica, respectivamente.

A.5.9. Propiedades reológicas

Las propiedades reológicas de los materiales se analizaron empleando el reómetro de Haake (RheoStress RS80), del Laboratorio de Reología de INTEC. Las condiciones de medición dependen del tipo de análisis realizado y de las características propias de las muestras. En la Figura A.19, se muestra una imagen del equipo empleado (a) y del ensayo realizado sobre un film hinchado (b).

HIDROGELES: Los estudios reocinéticos de la formación de gel se realizaron usando el reómetro equipado con geometría de cono y placa (ángulo de cono de 1° , diámetro de 60 mm y espacio de 0.05 mm). Los experimentos se realizaron a una frecuencia y amplitud de deformación de 0.1 Hz y 0.1%, respectivamente. Para la determinación del punto de gelificación, se aplicó una rampa de temperatura de 40 a 70 °C con una velocidad de calentamiento de 2.25 °C/min y luego la temperatura se mantuvo constante durante 10 min adicionales. El punto de gelificación corresponde a aquel en el cual las curvas del módulo de almacenamiento (G') y del módulo de pérdida (G'') se cruzan, es decir cuando $G' = G''$. Eso se debe a que cuando G' es mayor que G'' , el material se comportará como un sólido viscoelástico; es decir, las deformaciones serán esencialmente elásticas o recuperables, mientras que, si G'' es mayor que G' , la energía utilizada para deformar el material se disipa principalmente en forma viscosa, por lo que el comportamiento del material es el de un líquido viscoelástico.

PELÍCULAS HÍBRIDAS: Las propiedades viscoelásticas de los films híbridos obtenidos a partir de los látex basados en zeína-caseína, se caracterizaron con una geometría de plato-plato de 20 mm de diámetro en el mismo reómetro anteriormente mencionado. A las muestras se les realizó un barrido de amplitud desde 0.1 a 20 %, aplicando una frecuencia angular constante de 10 Hz, a 20 °C para determinar la región viscoelástica lineal (RVL) de las películas secas (10 mm de

diámetro) e hinchadas en diferentes buffers (pH 1.2 y 6.8). Luego se realizó sobre las muestras un barrido de frecuencia de 0.1 a 100 Hz en la RVL, aplicando una deformación constante de 0.5% y a 20 °C.

Durante los ensayos de barrido de frecuencia, si bien se aplicó un valor de γ_0 constante, el valor real de deformación difiere levemente para cada muestra. Esto se debe a que, a pesar que todos los films secos se cortan con un diámetro de 10 mm, este diámetro cambia según el grado de hinchamiento que las películas alcanzan en los distintos medios. De acuerdo con esto, se realizaron las correspondientes correcciones de las variables dependientes del radio de la muestra, obteniendo así los valores reales de γ_0 y de los módulos, a través de las ecuaciones A.8-9, considerando r como el radio de la muestra y R el radio del plato:

$$\gamma_{0\text{corregida}} = \gamma_{0\text{medido}} \frac{r}{R} \quad [A. 8]$$

$$G'_{\text{corregida}} = G'_{\text{medido}} \frac{R^4}{r^4} \quad [A. 9]$$

Aunque el γ_0 real puede variar levemente de una muestra a otra, en todos los casos se mantuvo en la RVL del material.

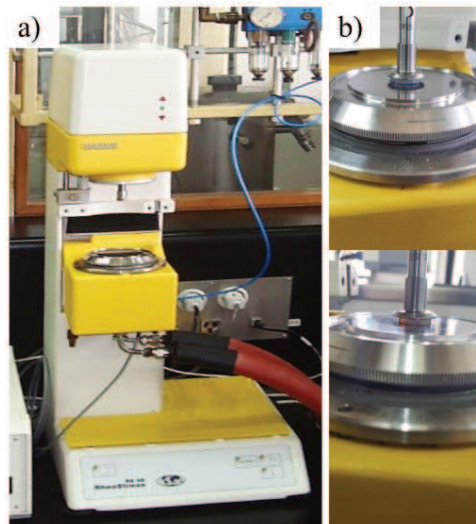


Figura A.19. Imagen del reómetro empleado (a), y foto de unas muestras hinchadas ubicadas entre los dos platos del equipo (b).

A.5.10. Resistencia al bloqueo (*Anti-blocking*) de las películas

Para evaluar la resistencia al bloqueo de las películas se siguió la norma ASTM D4946-89. Para ello, los látex fueron aplicados sobre papel sellante (una capa de 120 μm de espesor húmedo) y secados a temperatura ambiente por 48 h. Luego del secado, el papel sellante se cortó en secciones de 38 mm \times 38 mm y fueron colocadas cara a cara, ejerciéndose una presión de 127 g/cm^2 a una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos para provocar el bloqueo entre ambas superficies. Las muestras se dejaron enfriar por 30 minutos a temperatura ambiente, y se procedió a la separación de las secciones. La dificultad con que las secciones son separadas resulta un indicativo de la capacidad de *anti-blocking* de las películas. El test fue realizado por triplicado para cada muestra y los resultados fueron correlacionados a una escala de 0-10 como se define en la norma (Tabla A.3).

Tabla A.3. Escala para la determinación de la resistencia al bloqueo, según la norma ASTM D4946-89

Escala numérica	Tipo de separación	Desempeño
10	No pegajoso	Perfecto
9	Trazas de pegajosidad	Excelente
8	Muy ligeramente pegajoso	Muy bueno
7	Muy ligeramente a ligeramente pegajoso	Entre bueno y muy bueno
6	Ligeramente pegajoso	Bueno
5	Moderadamente pegajoso	Aceptable
4	Muy pegajoso, no sellante	Entre pobre y aceptable
3	5 a 25 % sellante	Pobre
2	25 a 50 % sellante	Pobre
1	50 a 75 % sellante	Muy pobre
0	75 a 100 % sellante	Muy pobre

A.5.11. Biodegradabilidad en compost de las películas híbridas

Para determinar la capacidad de los materiales para ser biodegradados en condiciones de compostaje, se llevaron a cabo experimentos de enterramiento, utilizando un compost comercial derivado de residuos vegetales. Para ello, se cortaron películas de 10 mm de diámetro y se las enterró en un recipiente conteniendo compost humedecido (Figura A.20a), con las siguientes

características: sólido seco total = 45% en base húmeda; contenido de sólidos no volátiles = 40% en base húmeda; pH 6.5. Antes de la prueba, el compost fue cernido con un tamiz de malla 3 ½, con una abertura de 5.6 mm (Figura A.20b), para eliminar la presencia de grandes piedras y agregados, asegurando el contacto entre la muestra y el compost. El ensayo se realizó en condiciones controladas de temperatura (30 °C) y humedad relativa del compost de 55%. Las muestras se removieron a diferentes tiempos, fueron cuidadosamente higienizadas para detener la degradación y posteriormente secadas a 70 °C hasta peso constante. El peso perdido por biodegradación se determinó como el porcentaje de la masa perdida de la fracción degradable de la película inicial (fracción proteica del film), según la siguiente ecuación:

$$\text{Peso perdido (\%)} = \frac{P_0 - (M_i - M_{fs})}{P_0} \times 100 \quad [A.10]$$

donde P_0 es la masa inicial de proteína presente en la muestra (calculado considerando la conversión del monómero, el contenido de sólido y la proporción acrílico/proteína de cada muestra), M_i representa la masa inicial de la muestra seca, y M_{fs} la masa final de la muestra degradada, limpia y secada en estufa.

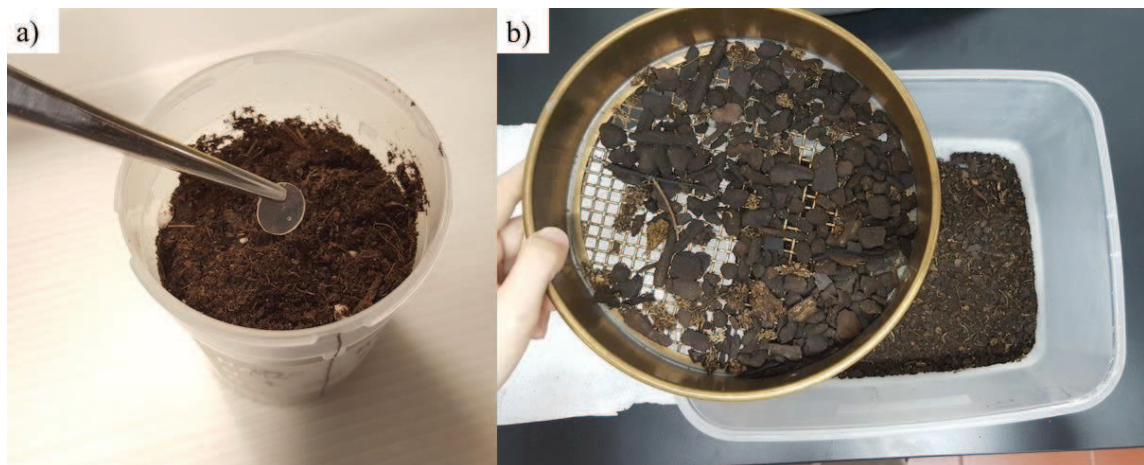


Figura A.20. Foto de la muestra antes de ser enterrada en el compost (a), e imagen del compost después del cernido (b).

REFERENCIAS

1. Cenchá LG, Allasia M, Ronco LI, et al. Proteins as promising biobased building blocks for preparing functional hybrid protein/synthetic polymer nanoparticles. *Ind Eng Chem Res.* 2021;60(13):4745-4765. doi:10.1021/acs.iecr.0c05958
 2. Baslé E, Joubert N, Pucheault M. Protein Chemical Modification on Endogenous Amino Acids. *Chem Biol.* 2010;17(3):213-227. doi:10.1016/j.chembiol.2010.02.008
 3. Fan Q, Ma J, Xu Q, et al. Animal-derived natural products review: Focus on novel modifications y applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2015;128:181-190. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.02.033
 4. Abascal NC, Regan L. The past, present y future of protein-based materials. *Open Biol.* 2018;8(10). doi:10.1098/rsob.180113
 5. Richey B, Burch M. Applications for Decorative y Protective Coatings. Vol 7.; 2002. doi:10.1002/3527600582.ch6
 6. Bouman J, Belton P, Venema P, Van Der Linden E, De Vries R, Qi S. Controlled Release from Zein Matrices: Interplay of Drug Hydrophobicity y pH. *Pharm Res.* 2016;33(3):673-685. doi:10.1007/s11095-015-1818-8
 7. Wan ZL, Guo J, Yang XQ. Plant protein-based delivery systems for bioactive ingredients in foods. *Food Funct.* 2015;6(9):2876-2889. doi:10.1039/c5fo00050e
 8. Dong J, Sun Q, Wang JY. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology y biocompatibility. *Biomaterials.* 2004;25(19):4691-4697. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.084
 9. De Frates K, Markiewicz T, Gallo P, et al. Protein polymer-based nanoparticles: Fabrication y medical applications. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1-20. doi:10.3390/ijms19061717
 10. Martínez-López AL, Pangua C, Reboredo C, Campión R, Morales-Gracia J, Irache JM. Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. *Int J Pharm.*
-

- 2020;581(March):119289. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119289
11. Luo Y, Wang T. *Pharmaceutical y Cosmetic Applications of Protein By-Products*. Elsevier Inc.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802391-4.00009-4
 12. Molina-Gutiérrez S, Ladmiral V, Bongiovanni R, Caillol S, Lacroix-Desmazes P. Radical polymerization of biobased monomers in aqueous dispersed media. *Green Chem.* 2019;21(1):36-53. doi:10.1039/c8gc02277a
 13. Minari RJ, Vega JR, González-Sierra M, Meira GR, Gugliotta LM. Emulsion polymerization of styrene with Iso-octyl-3-mercaptopropionate as chain transfer agent. *J Appl Polym Sci.* 2008;109(6):3944-3952. doi:10.1002/app.28490
 14. Minari RJ, Rodriguez VI, Estenoz DA, Vega JR, Meira GR, Gugliotta LM. Emulsion polymerization of isoprene. Estimation of the branching exponent with the help of a mathematical model. *J Appl Polym Sci.* Published online 2009;. doi:10.1002/app.31580
 15. El-Aasser MS, Miller CM. Preparation of Latexes Using Miniemulsions. In: *Polymeric Dispersions: Principles y Applications*. Springer Netherlands; 1997:109-126. doi:10.1007/978-94-011-5512-0_8
 16. Meira GR, Gugliotta LM. *Polímeros. Introducción a Su Caracterización y a La Ingeniería de Polimerización*.(2019) Editorial: UNL, Santa Fe, Argentina
 17. Somanathan N, Jeevan RG, Sanjeevi R. Synthesis of casein graft poly (acrylonitrile). *Polym J.* 1993;25(9):937-946.
 18. Mohan D, Radhakrishnan G, Rajadurai S. Synthesis of Casein-g-Poly(n-butyl Methacrylate). *J Macromol Sci Part A - Chem.* 1985;22(1):75-83. doi:10.1080/00222338508063298
 19. Dong Q, Gu L. Synthesis of AN-g-casein copolymer in concentrated aqueous solution of sodium thiocyanate y AN-g-casein fiber's structure y property. *Eur Polym J.* 2002;38(3):511-519. doi:10.1016/S0014-3057(01)00214-2
 20. Dong Q, Hsieh Y Lo. Acrylonitrile graft copolymerization of casein proteins for enhanced
-

- solubility y thermal properties. *J Appl Polym Sci.* 2000;77(11):2543-2551. doi:10.1002/1097-4628(20000912)77:11<2543::AID-APP23>3.0.CO;2-B
21. Li YD, Chen SC, Zeng JB, Wang YZ. Novel biodegradable poly(1,4-dioxan-2-one) grafted soy protein copolymer: Synthesis y characterization. *Ind Eng Chem Res.* 2008;47(21):8233-8238. doi:10.1021/ie800994s
 22. Picchio ML, Minari RJ, Gonzalez VDG, Barandiaran MJ, Gugliotta LM. New strategy to improve acrylic/casein compatibilization in waterborne hybrid nanoparticles. *J Appl Polym Sci.* 2015;132(34):1-11. doi:10.1002/app.42421
 23. Zhang L, Zeng M. Monomers, Polymers y Composites from Renewable Resources. *Monomers, Polym Compos from Renew Resour.* Published online 2008:479-493. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453163000235>
 24. Guilbert S, Cuq B. 11. Material formed from proteins. In: *Handbook of Biodegradable Polymers.* De Gruyter; 2020:299-338. doi:10.1515/9781501511967-011
 25. Wusigale, Liang L, Luo Y. Casein y pectin: Structures, interactions, y applications. *Trends Food Sci Technol.* 2020;97(January):391-403. doi:10.1016/j.tifs.2020.01.027
 26. Cenchá LG, Allasia M, Passeggi MCG, Gugliotta LM, Minari RJ. Formulation of self-crosslinkable hybrid acrylic/casein latex by tannic acid. *Prog Org Coatings.* 2021;159(June):106413. doi:10.1016/j.porgcoat.2021.106413
 27. Ma J, Xu Q, Zhou J, Gao D, Zhang J, Chen L. Nano-scale core-shell structural casein based coating latex: Synthesis, characterization y its biodegradability. *Prog Org Coatings.* 2013;76(10):1346-1355. doi:10.1016/j.porgcoat.2013.04.006
 28. Schloss AC, Williams DM, Regan LJ. *Protein-Based Engineered Nanostructures.* Vol 940. (Cortajarena AL, Grove TZ, eds.). Springer International Publishing; 2016. doi:10.1007/978-3-319-39196-0
 29. Narayanan S, Pavithran M, Viswanath A, et al. Sequentially releasing dual-drug-loaded PLGA-casein core/shell nanomedicine: Design, synthesis, biocompatibility y
-

- pharmacokinetics. *Acta Biomater.* 2014;10(5):2112-2124.
doi:10.1016/j.actbio.2013.12.041
30. Picchio ML, Cuggino JC, Nagel G, et al. Crosslinked casein-based micelles as a dually responsive drug delivery system. *Polym Chem.* 2018;9(25):3499-3510.
doi:10.1039/c8py00600h
31. Yu X, Wu H, Hu H, et al. Zein nanoparticles as nontoxic delivery system for maytansine in the treatment of non-small cell lung cancer. *Drug Deliv.* 2020;27(1):100-109.
doi:10.1080/10717544.2019.1704942
32. Marta Elena Díaz García Dra Rosana Badía Laíño D. Encapsulación De Antioxidantes En Nanopartículas De Zeína. Published online 2016.
33. Luo Y, Wang Q. Zein-based micro- y nano-particles for drug y nutrient delivery: A review. *J Appl Polym Sci.* 2014;131(16):1-12. doi:10.1002/app.40696
34. Zein-Based Composites in Biomedical Applications Merve Demir.
35. Li P, Zhu J, Sunintaboon P, Harris FW. New route to amphiphilic core-shell polymer nanospheres: Graft copolymerization of methyl methacrylate from water-soluble polymer chains containing amino groups. *Langmuir.* 2002;18(22):8641-8646.
doi:10.1021/la0261343
36. Picchio ML, Minari RJ, Gonzalez VDG, et al. Waterborne acrylic-casein nanoparticles. Nucleation y grafting. *Macromol Symp.* 2014;344(1):76-85.
doi:10.1002/masy.201400013
37. Picchio ML, Passeggi MCG, Barandiaran MJ, Gugliotta LM, Minari RJ. Waterborne acrylic-casein latexes as eco-friendly binders for coatings. *Prog Org Coatings.* 2015;88:8-16. doi:10.1016/j.porgcoat.2015.06.012
38. Picchio ML, Passeggi MCG, Barandiaran MJ, Gugliotta LM, Minari RJ. Acrylic/casein latexes with controlled degree of grafting y improved coating performance. *Prog Org Coatings.* 2016;101:587-596. doi:10.1016/j.porgcoat.2016.10.002
-

39. Picchio ML, Bohórquez SJ, van den Berg PGCA, Barandiaran MJ, Gugliotta LM, Minari RJ. Waterborne Casein-Based Latexes with High Solids Content y Their High-Throughput Coating Optimization. *Ind Eng Chem Res.* 2016;55(39):10271-10277. doi:10.1021/acs.iecr.6b02105
 40. Picchio ML, Minari RJ, Gugliotta LM. Enhancing the coating properties of acrylic/casein latexes with high protein content. *J Coatings Technol Res.* 2017;14(3):543-553. doi:10.1007/s11998-016-9877-2
 41. Nonthanum P, Lee Y, Padua GW. Effect of pH y ethanol content of solvent on rheology of zein solutions. *J Cereal Sci.* 2013;58(1):76-81. doi:10.1016/j.jcs.2013.04.001
 42. Anderson TJ, Lamsa BP. Zein extraction from corn, corn products, y coproducts y modifications for various applications: A review. *Cereal Chem.* 2011;88(2):159-173. doi:10.1094/CCHEM-06-10-0091
 43. Nonthanum P, Lee Y, Padua GW. Effect of γ -zein on the rheological behavior of concentrated zein solutions. *J Agric Food Chem.* 2012;60(7):1742-1747. doi:10.1021/jf2035302
 44. Demir M, Ramos-Rivera L, Silva R, Nazhat SN, Boccaccini AR. Zein-based composites in biomedical applications. *J Biomed Mater Res Part A.* 2017;105(6):1656-1665. doi:10.1002/jbm.a.36040
 45. Weissmueller NT, Lu HD, Hurley A, Prud'Homme RK. Nanocarriers from GRAS Zein Proteins to Encapsulate Hydrophobic Actives. *Biomacromolecules.* 2016;17(11):3828-3837. doi:10.1021/acs.biomac.6b01440
 46. Martínez-López AL, Pangua C, Reboredo C, Campión R, Morales-Gracia J, Irache JM. Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. *Int J Pharm.* 2020;581(February). doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119289
 47. Luo Y, Teng Z, Wang Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation y controlled release of vitamin D3. *J Agric Food Chem.*
-

- 2012;60(3):836-843. doi:10.1021/jf204194z
48. Davidov-Pardo G, Joye IJ, McClements DJ. *Food-Grade Protein-Based Nanoparticles y Microparticles for Bioactive Delivery: Fabrication, Characterization, y Utilization*. Vol 98. 1st ed. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/bs.apcsb.2014.11.004
49. Paliwal R, Palakurthi S. Zein in controlled drug delivery y tissue engineering. *J Control Release*. 2014;189:108-122. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.036
50. Chen H, Wang J, Cheng Y, et al. Application of protein-based films y coatings for food packaging: A review. *Polymers (Basel)*. 2019;11(12):1-32. doi:10.3390/polym11122039
51. Kasaai MR. Zein y zein -based nano-materials for food y nutrition applications: A review. *Trends Food Sci Technol*. 2018;79:184-197. doi:10.1016/j.tifs.2018.07.015
52. Lee H, Xu G, Kharaghani D, et al. Electrospun tri-layered zein/PVP-GO/zein nanofiber mats for providing biphasic drug release profiles. *Int J Pharm*. 2017;531(1):101-107. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.081
53. Ali S, Khatri Z, Oh KW, Kim IS, Kim SH. Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning y characterization. *Macromol Res*. 2014;22(9):971-977. doi:10.1007/s13233-014-2136-4
54. Deng L, Zhang X, Li Y, et al. Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. *Food Hydrocoll*. 2018;75:72-80. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.09.011
55. Ansari AQ, Ansari SJ, Khan MQ, et al. Electrospun Zein nanofibers as drug carriers for controlled delivery of Levodopa in Parkinson syndrome. *Mater Res Express*. 2019;6(7). doi:10.1088/2053-1591/ab16bf
56. Joye IJ, McClements DJ. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends Food Sci Technol*. 2013;34(2):109-123. doi:10.1016/j.tifs.2013.10.002
57. Whitehead CB, Özkar S, Finke RG. LaMer's 1950 Model for Particle Formation of Instantaneous Nucleation y Diffusion-Controlled Growth: A Historical Look at the
-

- Model's Origins, Assumptions, Equations, y Underlying Sulfur Sol Formation Kinetics Data. *Chem Mater.* 2019;31(18):7116-7132. doi:10.1021/acs.chemmater.9b01273
58. LaMer VK, Dinegar RH. Theory, Production y mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J Am Chem Soc.* 1950;72(11):4847-4854.
59. Lyczko N, Espitalier F, Louisnard O, Schwartzentruber J. Effect of ultrasound on the induction time y the metastable zone widths of potassium sulphate. *Chem Eng J.* 2002;86(3):233-241. doi:10.1016/S1385-8947(01)00164-4
60. Sugimoto T. Formation of modoispersed nano- y micro-particles controlled in size, shape, y internal structure. *Chem Eng Technol.* 2003;26(3):313-321. doi:10.1002/ceat.200390048
61. Joye IJ, Nelis VA, McClements DJ. Gliadin-based nanoparticles: Stabilization by post-production polysaccharide coating. *Food Hydrocoll.* 2015;43:236-242. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.05.021
62. Matteucci ME, Hotze MA, Johnston KP, Williams RO. Drug nanoparticles by antisolvent precipitation: Mixing energy versus surfactant stabilization. *Langmuir.* 2006;22(21):8951-8959. doi:10.1021/la061122t
63. Chang C, Wang T, Hu Q, Zhou M, Xue J, Luo Y. Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocoll.* 2017;70:143-151. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.03.033
64. Patel AR, Bouwens ECM, Velikov KP. Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *J Agric Food Chem.* 2010;58(23):12497-12503. doi:10.1021/jf102959b
65. Li S, Wang X, Li W, Yuan G, Pan Y, Chen H. Preparation y characterization of a novel conformed bipolymer paclitaxel-nanoparticle using tea polysaccharides y zein. *Carbohydr Polym.* 2016;146:52-57. doi:10.1016/j.carbpol.2016.03.042
66. Li KK, Zhang X, Huang Q, et al. Continuous preparation of zein colloidal particles by Flash NanoPrecipitation (FNP). *J Food Eng.* 2014;127:103-110.
-

- doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.12.001
67. Hu K, Huang X, Gao Y, Huang X, Xiao H, McClements DJ. Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis y characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food Chem.* 2015;182:275-281. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.009
 68. Ji N, Hong Y, Gu Z, Cheng L, Li Z, Li C. Preparation y Characterization of Insulin-Loaded Zein/Carboxymethylated Short-Chain Amylose Complex Nanoparticles. *J Agric Food Chem.* 2018;66(35). doi:10.1021/acs.jafc.8b02630
 69. Hu K, McClements DJ. Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation y electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. *Food Hydrocoll.* 2015;44:101-108. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.09.015
 70. Li F, Chen Y, Liu S, et al. Size-controlled fabrication of zein nano/microparticles by modified anti-solvent precipitation with/without sodium caseinate. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:8197-8209. doi:10.2147/IJN.S143733
 71. Li H, Xu Y, Sun X, et al. Stability, bioactivity, y bioaccessibility of fucoxanthin in zein-caseinate composite nanoparticles fabricated at neutral pH by antisolvent precipitation. *Food Hydrocoll.* 2018;84:379-388. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.06.032
 72. Li K, Yin S, Yang X, Tang C, Wei Z. Fabrication y Characterization of Novel Antimicrobial Films Derived from Thymol-Loaded Zein – Sodium Caseinate (SC) Nanoparticles. Published online 2012. doi:10.1021/jf302752v
 73. Luo Y, Zhang B, Whent M, Yu LL, Wang Q. Preparation y characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, y its in vitro controlled release study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;85(2):145-152. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.02.020
 74. Bao X, Qian K, Yao P. Oral delivery of exenatide-loaded hybrid zein nanoparticles for stable blood glucose control y β -cell repair of type 2 diabetes mice. *J Nanobiotechnology.*
-

- 2020;18(1):1-15. doi:10.1186/s12951-020-00619-0
75. Li S, Huang L, Zhang B, Chen C, Fu X, Huang Q. Fabrication y characterization of starch/zein nanocomposites with pH-responsive emulsion behavior. *Food Hydrocoll.* 2021;112(July 2020):106341. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106341
76. Zou Y, Guo J, Yin SW, Wang JM, Yang XQ. Pickering emulsion gels prepared by hydrogen-bonded zein/tannic acid complex colloidal particles. *J Agric Food Chem.* 2015;63(33):7405-7414. doi:10.1021/acs.jafc.5b03113
77. Ebert S, Koo CKW, Weiss J, McClements DJ. Continuous production of core-shell protein nanoparticles by antisolvent precipitation using dual-channel microfluidization: Caseinate-coated zein nanoparticles. *Food Res Int.* 2017;92:48-55. doi:10.1016/j.foodres.2016.12.020
78. Feng J, Zhang Y, McManus SA, et al. Amorphous nanoparticles by self-assembly: processing for controlled release of hydrophobic molecules. *Soft Matter.* 2019;15(11):2400-2410. doi:10.1039/C8SM02418A
79. Chung H, Yang JE, Ha JY, et al. Bio-based production of monomers y polymers by metabolically engineered microorganisms. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;36:73-84. doi:10.1016/j.copbio.2015.07.003
80. Fujisawa S, Kadoma Y. Action of eugenol as a retarder against polymerization of methyl methacrylate by benzoyl peroxide. *Biomaterials.* 1997;18(9):701-703. doi:10.1016/S0142-9612(96)00196-2
81. Montero De Espinosa L, Meier MAR. Plant oils: The perfect renewable resource for polymer science?! *Eur Polym J.* 2011;47(5):837-852. doi:10.1016/j.eurpolymj.2010.11.020
82. Vendamme R, Schüwer N, Eevers W. Recent synthetic approaches y emerging bio-inspired strategies for the development of sustainable pressure-sensitive adhesives derived from renewable building blocks. *J Appl Polym Sci.* 2014;131(17):8379-8394.
-

- doi:10.1002/app.40669
83. Molina-gutiérrez S, Ladmiral V, Bongiovanni R, et al. y Isoeugenol-Derived Methacrylates HAL Id : hal-02343297 Emulsion polymerization of dihydroeugenol , eugenol y isoeugenol derived methacrylates. Published online 2020.
 84. Badía A, Movellan J, Barandiaran MJ, Leiza JR. High Biobased Content Latexes for Development of Sustainable Pressure Sensitive Adhesives. *Ind Eng Chem Res.* 2018;57(43):14509-14516. doi:10.1021/acs.iecr.8b03354
 85. Badía A, Santos JI, Agirre A, Barandiaran MJ, Leiza JR. UV-Tunable Biobased Pressure-Sensitive Adhesives Containing Piperonyl Methacrylate. *ACS Sustain Chem Eng.* 2019;7(23):19122-19130. doi:10.1021/acssuschemeng.9b05067
 86. Medeiros AMMS, Machado F, Rubim JC, McKenna TFL. Bio-based copolymers obtained through miniemulsion copolymerization of methyl esters of acrylated fatty acids y styrene. *J Polym Sci Part A Polym Chem.* 2017;55(8):1422-1432. doi:10.1002/pola.28511
 87. Tarnavchuk I, Popadyuk A, Popadyuk N, Voronov A. Synthesis y Free Radical Copolymerization of a Vinyl Monomer from Soybean Oil. *ACS Sustain Chem Eng.* 2015;3(7):1618-1622. doi:10.1021/acssuschemeng.5b00312
 88. Maaßen W, Oelmann S, Peter D, Oswald W, Willenbacher N, Meier MAR. Novel Insights into Pressure-Sensitive Adhesives Based on Plant Oils. *Macromol Chem Phys.* 2015;216(15):1609-1618. doi:10.1002/macp.201500136
 89. Laurentino LS, Medeiros AMMS, Machado F, Costa C, Araújo PHH, Sayer C. Synthesis of a biobased monomer derived from castor oil y copolymerization in aqueous medium. *Chem Eng Res Des.* 2018;137:213-220. doi:10.1016/j.cherd.2018.07.014
 90. Maassen W, Meier MAR, Willenbacher N. Unique adhesive properties of pressure sensitive adhesives from plant oils. *Int J Adhes Adhes.* 2016;64:65-71. doi:10.1016/j.ijadhadh.2015.10.004
 91. Li WSJ, Negrell C, Ladmiral V, et al. Cardanol-based polymer latex by radical aqueous
-

- miniemulsion polymerization. *Polym Chem.* 2018;9(18):2468-2477. doi:10.1039/c8py00167g
92. Ladmiral V, Jeannin R, Fernandes Lizarazu K, et al. Aromatic biobased polymer latex from cardanol. *Eur Polym J.* 2017;93:785-794. doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.04.003
93. Badía A, Agirre A, Barandiaran MJ, Leiza JR. Removable Biobased Waterborne Pressure-Sensitive Adhesives Containing Mixtures of Isosorbide Methacrylate Monomers. *Biomacromolecules.* 2020;21(11):4522-4531. doi:10.1021/acs.biomac.0c00474
94. Yu D, Zhao J, Wang W, Qi J, Hu Y. Mono-acrylated isosorbide as a bio-based monomer for the improvement of thermal y mechanical properties of poly(methyl methacrylate). *RSC Adv.* 2019;9(61):35532-35538. doi:10.1039/c9ra07548h
95. Overbeek A, Bückmann F, Martin E, Steenwinkel P, Annable T. New generation decorative paint technology. *Prog Org Coatings.* 2003;48(2-4):125-139. doi:10.1016/S0300-9440(03)00101-2
96. Huang H, Zhang H, Hu F, et al. Miniemulsion copolymerization of styrene y butyl acrylate initiated by redox system at lower temperature: Reaction kinetics y evolution of particle-size distribution. *J Appl Polym Sci.* 1999;73(3):315-322. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19990718)73:3<315::AID-APP2>3.0.CO;2-4
97. Lopez A, Degrandi-Contraires E, Canetta E, Creton C, Keddie JL, Asua JM. Waterborne polyurethane-acrylic hybrid nanoparticles by miniemulsion polymerization: Applications in pressure-sensitive adhesives. *Langmuir.* 2011;27(7):3878-3888. doi:10.1021/la104830u
98. Keddie JL. Reports : A Review Journal Film formation of latex. *Mater Sci Eng.* 1997;21(97):101-170. doi:10.1016/S0927-796X(97)00011-9
99. Díez-Peña E, Quijada-Garrido I, Barrales-Rienda JM. Analysis of the swelling dynamics of cross-linked P(N-iPAAm-co-MAA) copolymers y their homopolymers under acidic medium. A kinetics interpretation of the overshooting effect. *Macromolecules.*
-

- 2003;36(7):2475-2483. doi:10.1021/ma021469c
100. Maderuelo C, Lanao JM, Zarzuelo A. Enteric coating of oral solid dosage forms as a tool to improve drug bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2019;138(May):105019. doi:10.1016/j.ejps.2019.105019
101. Hua S. Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological y Pharmaceutical Factors. *Front Pharmacol.* 2020;11(April):1-22. doi:10.3389/fphar.2020.00524
102. Jones D, Caballero S, Davidov-Pardo G. *Bioavailability of Nanotechnology-Based Bioactives y Nutraceuticals.* Vol 88. 1st ed. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.014
103. McClements DJ, Li Y. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct.* 2010;1(1):32-59. doi:10.1039/c0fo00111b
104. Shokri J, Adibki K. Application of Cellulose y Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. *Cellul - Medical, Pharm Electron Appl.* Published online 2013. doi:10.5772/55178
105. Porter S, Sackett G, Liu L. Development, Optimization, y Scale-up of Process Parameters: Pan Coating. *Dev Solid Oral Dos Forms.* Published online 2009:761-805. doi:10.1016/B978-0-444-53242-8.00033-3
106. Kapoor D, Maheshwari R, Verma K, Sharma S, Ghode P, Tekade RK. *Coating Technologies in Pharmaceutical Product Development.* Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-814487-9.00014-4
107. Ahmed AR, Mota JP, Shahba AA-W, Irfan M. *Aqueous Polymeric Coatings: New Opportunities in Drug Delivery Systems.* Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/b978-0-12-821222-6.00003-8
108. Picchio ML, Paredes AJ, Palma SD, et al. pH-responsive casein-based films y their application as functional coatings in solid dosage formulations. *Colloids Surfaces A*
-

- Physicochem Eng Asp.* 2018;541(November 2017):1-9.
doi:10.1016/j.colsurfa.2018.01.012
109. Shukla R, Cheryan M. Zein: The industrial protein from corn. *Ind Crops Prod.* 2001;13(3):171-192. doi:10.1016/S0926-6690(00)00064-9
110. Xu Q, Zhang F, Ma J, et al. Facile synthesis of casein-based silica hybrid nano-composite for coatings: Effects of silane coupling agent. *Prog Org Coatings.* 2015;88:1-7. doi:10.1016/j.porgcoat.2015.06.011
111. Kim U-J, Park J, Li C, Jin H-J, Valluzzi R, Kaplan DL. Structure y Properties of Silk Hydrogels. *Biomacromolecules.* 2004;5(3):786-792. doi:10.1021/bm0345460
112. Zink J, Wyrobnik T, Prinz T, Schmid M. *Physical, Chemical y Biochemical Modifications of Protein-Based Films y Coatings: An Extensive Review.* Vol 17.; 2016. doi:10.3390/ijms17091376
113. Shi K, Huang Y, Yu H, Lee TC, Huang Q. Reducing the brittleness of zein films through chemical modification. *J Agric Food Chem.* 2011;59(1):56-61. doi:10.1021/jf103164r
114. Casella MLA, Whitaker JR. Enzymatically y Chemically Modified Zein for Improvement of Functional Properties. *J Food Biochem.* 1990;14(6):453-475. doi:10.1111/j.1745-4514.1990.tb00806.x
115. Wheelwright WVK, Eastal AJ, Ray S, Nieuwoudt MK. A one-step approach for esterification of zein with methanol. *J Appl Polym Sci.* 2013;127(5):3500-3505. doi:10.1002/app.37631
116. Wu Q, Yoshino T, Sakabe H, Zhang H, Isobe S. Chemical modification of zein by bifunctional polycaprolactone (PCL). *Polymer (Guildf).* 2003;44(14):3909-3919. doi:10.1016/S0032-3861(03)00314-8
117. Soliman EA, Khalil AA, Deraz SF, El-Fawal G, Elrahman SA. Synthesis, characterization y antibacterial activity of biodegradable films prepared from Schiff bases of zein. *J Food Sci Technol.* 2014;51(10):2425-2434. doi:10.1007/s13197-012-0792-y
-

118. Verdolotti L, Lavorgna M, Oliviero M, et al. Functional Zein – Siloxane Bio-Hybrids. Published online 2014.
119. Zhang J-F, Wang Y, Liao S, Lallier T, T. Wen Z, Xu X. Photo-cross-linked Antibacterial Zein Nanofibers Fabricated by Reactive Electrospinning y its Effects against *Streptococcus mutans*. *Oral Heal Dent Stud.* 2017;1(1). doi:10.31532/OralHealthDentStud.1.1.001
120. Bräuer S, Meister F, Gottlöber RP, Nechwatal A. Preparation y thermoplastic processing of modified plant proteins. *Macromol Mater Eng.* 2007;292(2):176-183. doi:10.1002/mame.200600364
121. Coates JB, Medeiros JS, Thanh VH, Nielsen NC. Characterization of the subunits of β -conglycinin. *Arch Biochem Biophys.* 1985;243(1):184-194. doi:10.1016/0003-9861(85)90787-8
122. Gordon BYWG, Semmett WF. Acid composition. 1949;V(3).
123. Stein H. Amino acid composition of b-lactoglobulin y bovine serum albumin. 1948;(3).
124. Boland M, Zealand N. *Whey Protein*. Vol 13. Woodhead Publishing Limited; 2008. doi:10.1533/9780857093639.30
125. Rombouts I, Lamberts L, Celus I, Lagrain B, Brijs K, Delcour JA. Wheat gluten amino acid composition analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *J Chromatogr A.* 2009;1216(29):5557-5562. doi:10.1016/j.chroma.2009.05.066
126. Chaudhary N, Dangi P, Khatkar BS. Assessment of molecular weight distribution of wheat gluten proteins for chapatti quality. *Food Chem.* 2016;199:28-35. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.106
127. Barré A, Țințaș ML, Levacher V, Papamicael C, Gembus V. An Overview of the Synthesis of Highly Versatile N-Hydroxysuccinimide Esters. *Synth.* 2017;49(3):472-483. doi:10.1055/s-0036-1588607
-

128. Sonntag NO V. The reactions of aliphatic acid chlorides. Reaction with phenols. Reaction with polyhydroxy compounds. Reaction with hydroperoxides. Published online 1952.
129. Reis A V., Fajardo AR, Schuquel ITA, et al. Reaction of Glycidyl Methacrylate at the Hydroxyl y Carboxylic Groups of Poly(vinyl alcohol) y Poly(acrylic acid): Is This Reaction Mechanism Still Unclear? *J Org Chem.* 2009;74(10):3750-3757. doi:10.1021/jo900033c
130. Bonollo S, Lanari D, Vaccaro L. Ring-opening of epoxides in water. *European J Org Chem.* 2011;(14):2587-2598. doi:10.1002/ejoc.201001693
131. Sessa DJ, Eller FJ, Palmquist DE, Lawton JW. Improved methods for decolorizing corn zein. *Ind Crops Prod.* 2003;18(1):55-65. doi:10.1016/S0926-6690(03)00033-5
132. Kim S, Sessa DJ, Lawton JW. Characterization of zein modified with a mild cross-linking agent. *Ind Crops Prod.* 2004;20(3):291-300. doi:10.1016/j.indcrop.2003.10.013
133. Wu Y, Zhao L. Electrospun Poly (Aspartic Acid) -Modi fi ed Zein Nano fi bers for Promoting Bone Regeneration. Published online 2019.
134. Pereira AGB, Fajardo AR, Nocchi S, Nakamura C V., Rubira AF, Muniz EC. Starch-based microspheres for sustained-release of curcumin: Preparation y cytotoxic effect on tumor cells. *Carbohydr Polym.* 2013;98(1):711-720. doi:10.1016/j.carbpol.2013.06.013
135. Reis A V., Fajardo AR, Schuquel ITA, et al. Reaction of glycidyl methacrylate at the hydroxyl y carboxylic groups of poly(vinyl alcohol) y poly(acrylic acid): Is this reaction mechanism still unclear? *J Org Chem.* 2009;74(10):3750-3757. doi:10.1021/jo900033c
136. Reis A V, Fajardo R, Schuquel ITA, et al. Clearing the mechanism of reaction of glycidyl methacrylate at the hydroxyl y carboxyl groups of poly (vinyl alcohol) y poly (acrylic acid) Reaction of Glycidyl Methacrylate at the Hydroxyl y Carboxylic Groups of Poly (vinyl alcohol) y Poly. *Polymer (Guildf).* 2006;47(January):2023-2029.
137. Wei Y, Hu L, Yao J, Shao Z, Chen X. Facile Dissolution of Zein Using a Common Solvent Dimethyl Sulfoxide. *Langmuir.* 2019;35:6640-6649. doi:10.1021/acs.langmuir.9b00670

138. Kim S, Xu J, Liu S. Production of biopolymer composites by particle bonding. *Compos Part A Appl Sci Manuf.* 2010;41(1):146-153. doi:10.1016/j.compositesa.2009.09.019
139. Kim S, Xu J. Aggregate formation of zein y its structural inversion in aqueous ethanol. *J Cereal Sci.* 2008;47(1):1-5. doi:10.1016/j.jcs.2007.08.004
140. Shi K, Kokini JL, Huang Q. Engineering zein films with controlled surface morphology y hydrophilicity. *J Agric Food Chem.* 2009;57(6):2186-2192. doi:10.1021/jf803559v
141. Wang Y, Padua GW. Formation of zein microphases in ethanol-water. *Langmuir.* 2010;26(15):12897-12901. doi:10.1021/la101688v
142. Panahi R, Baghban-Salehi M. *Protein-Based Hydrogels.* (Mondal MIH, ed.). Springer International Publishing; 2019. doi:10.1007/978-3-319-77830-3
143. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, y applications: A review. *J Adv Res.* 2015;6(2):105-121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
144. Andrade J. Hydrogels in medicine y pharmacy. *J Control Release.* 1989;10(2):225-226. doi:10.1016/0168-3659(89)90068-0
145. Rao K, Rao K, Ha C-S. Stimuli Responsive Poly(Vinyl Caprolactam) Gels for Biomedical Applications. *Gels.* 2016;2(1):6. doi:10.3390/gels2010006
146. Sonzogni AS, Yealland G, Kar M, et al. Effect of Delivery Platforms Structure on the Epidermal Antigen Transport for Topical Vaccination. *Biomacromolecules.* 2018;19(12):4607-4616. doi:10.1021/acs.biomac.8b01307
147. Maitra J, Shukla VK. Cross-linking in Hydrogels - A Review. *Am J Polym Sci.* 2014;4(2):25-31. doi:10.5923/j.ajps.20140402.01
148. Zhang R, Ruan H, Zhou T, et al. High-performance poly(acrylic acid) hydrogels formed with a block copolymer crosslinker containing amino-acid derivatives. *Soft Matter.* 2019;15(37):7381-7389. doi:10.1039/c9sm01512d
149. Ceylan Tuncaboylu D. Photo-crosslinked mechanically strong PCL4-PDMAEM hydrogels. *React Funct Polym.* 2018;126:44-51.
-

- doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2018.03.001
150. Jin C, Song W, Liu T, et al. Temperature y pH Responsive Hydrogels Using Methacrylated Lignosulfonate Cross-Linker: Synthesis, Characterization, y Properties. *ACS Sustain Chem Eng*. 2018;6(2):1763-1771. doi:10.1021/acssuschemeng.7b03158
 151. Kim S hee, Chu CC. Pore structure analysis of swollen dextran-methacrylate hydrogels by SEM y mercury intrusion porosimetry. *J Biomed Mater Res*. 2000;53(3):258-266. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(2000)53:3<258::AID-JBM11>3.0.CO;2-O
 152. Cao Z, Wang Y, Wang H, et al. Tough, ultrastretchable y tear-resistant hydrogels enabled by linear macro-cross-linker. *Polym Chem*. 2019;10(25):3503-3513. doi:10.1039/c9py00600a
 153. Ramirez A, Benítez JL, De Astudillo LR, De Gáscue BR. Materiales polimeros de tipo hidrogeles: Revisión sobre su caracterización mediante FTIR, DSC, MEB y MET. *Rev Latinoam Metal y Mater*. 2016;36(2):108-130.
 154. Lim JYC, Lin Q, Xue K, Loh XJ. Recent advances in supramolecular hydrogels for biomedical applications. *Mater Today Adv*. 2019;3:100021. doi:10.1016/j.mtadv.2019.100021
 155. Yang J, Pal R. Investigation of Surfactant-Polymer Interactions Using Rheology y Surface Tension Measurements. *Polymers (Basel)*. 2020;12(10):2302. doi:10.3390/polym12102302
 156. Kozanoğlu S, Özdemir T, Usanmaz A. Polymerization of N-Vinylcaprolactam y Characterization of Poly(N-Vinylcaprolactam). *J Macromol Sci Part A*. 2011;48(6):467-477. doi:10.1080/10601325.2011.573350
 157. Meeussen F, Nies E, Berghmans H, Verbrugghe S, Goethals E, Du Prez F. Phase behaviour of poly(N -vinyl caprolactam) in water. *Polymer (Guildf)*. 2000;41(24):8597-8602. doi:10.1016/S0032-3861(00)00255-X
 158. Luo R, Neu B, Venkatraman SS. Surface Functionalization of Nanoparticles to Control
-

- Cell Interactions y Drug Release. *Small*. 2012;8(16):2585-2594. doi:10.1002/smll.201200398
159. Şenel M, Ebru Koç F. Controlled release of methylene blue from layer-by-layer assembled chitosan/polyacrylic acid. *Int J Polym Mater Polym Biomater*. 2020;69(4):258-262. doi:10.1080/00914037.2018.1563082
160. Chung AJ, Rubner MF. Methods of Loading y Releasing Low Molecular Weight Cationic Molecules in Weak Polyelectrolyte Multilayer Films. *Langmuir*. 2002;18(4):1176-1183. doi:10.1021/la010873m
161. Gagliardi A, Voci S, Paolino D, Fresta M, Cosco D. Influence of Various Model Compounds on the Rheological Properties of Zein-Based Gels. *Molecules*. 2020;25(14):3174. doi:10.3390/molecules25143174
162. Hou Y, Matthews AR, Smitherman AM, et al. Thermoresponsive nanocomposite hydrogels with cell-releasing behavior. *Biomaterials*. 2008;29(22):3175-3184. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.024
163. Ma X, Guo L, Ji Q, Tan Y, Xing Y, Xia Y. Physical hydrogels constructed on a macro-cross-linking cationic polysaccharide with tunable, excellent mechanical performance. *Polym Chem*. 2016;7(1):26-30. doi:10.1039/c5py01437a
164. Bay E, Mueller P, Austin S. Growing Monomer Appeal. *Eur coatings J*. 2017;(09):32-39. https://360.european-coatings.com/journals/european_coatings_journal--9.2017/growing_monomer_appeal--EC__35ccff6f44c15aac40c35412d99ea0dbe541b4f2
165. Picchio ML, Passeggi MCG, Barandiaran MJ, Gugliotta LM, Minari RJ. Acrylic/casein latexes with controlled degree of grafting y improved coating performance. *Prog Org Coatings*. 2016;101(January 2018):587-596. doi:10.1016/j.porgcoat.2016.10.002
166. Gandini A, Lacerda TM, Carvalho AJF, Trovatti E. Progress of Polymers from Renewable Resources: Furans, Vegetable Oils, y Polysaccharides. *Chem Rev*. 2016;116(3):1637-1669. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00264
-

167. Miao S, Wang P, Su Z, Zhang S. Vegetable-oil-based polymers as future polymeric biomaterials. *Acta Biomater.* 2014;10(4):1692-1704. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.040
168. Aguirre M, Hamzehlou S, González E, Leiza JR. *Renewable Feedstocks in Emulsion Polymerization: Coating y Adhesive Applications*. Vol 56. 1st ed. Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/bs.ache.2020.07.004
169. Kristufek SL, Wacker KT, Tsao YYT, Su L, Wooley KL. Monomer design strategies to create natural product-based polymer materials. *Nat Prod Rep.* 2017;34(4):433-459. doi:10.1039/c6np00112b
170. Castagnet T, Aguirre G, Asua JM, Billon L. Bioinspired Enzymatic Synthesis of Terpenoid-Based (Meth)acrylic Monomers: A Solvent-, Metal-, Amino-, y Halogen-Free Approach. *ACS Sustain Chem Eng.* 2020;8(19):7503-7512. doi:10.1021/acssuschemeng.0c02307
171. Noppalit S, Simula A, Billon L, Asua JM. On the nitroxide mediated polymerization of methacrylates derived from bio-sourced terpenes in miniemulsion, a step towards sustainable products. *Polym Chem.* 2020;11(6):1151-1160. doi:10.1039/c9py01667h
172. Pezzana L, Mousa M, Malmström E, Johansson M, Sangermano M. Bio-based monomers for UV-curable coatings: allylation of ferulic acid y investigation of photocured thiol-ene network. *Prog Org Coatings.* 2021;150(June 2020). doi:10.1016/j.porgcoat.2020.105986
173. Man L, Hu Y, Feng Y, Zhang C, Yuan T, Yang Z. Facile synthesis of a novel bio-based methacrylate monomer derived from tung oil y its application for solvent-free thermosetting coatings. *Ind Crops Prod.* 2019;133(July 2018):348-356. doi:10.1016/j.indcrop.2019.03.047
174. Birajdar MS, Joo H, Koh WG, Park H. Natural bio-based monomers for biomedical applications: a review. *Biomater Res.* 2021;25(1):1-14. doi:10.1186/s40824-021-00208-8
175. Fox TG. No Title. *Bull Am Phys Soc.* 1956;1(123).
176. Stalder AF, Melchior T, Müller M, Sage D, Blu T, Unser M. Colloids y Surfaces A :
-

- Physicochemical y Engineering Aspects Low-bond axisymmetric drop shape analysis for surface tension y contact angle measurements of sessile drops. 2010;364:72-81. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.04.040
177. Lawton JW. Plasticizers for Zein: Their Effect on Tensile Properties y Water Absorption of Zein Films. *Cereal Chem.* 2004;81(1):1-5. doi:10.1094/CCHEM.2004.81.1.1
178. Chiralt A, González-Martínez C, Vargas M, Atarés L. *Edible Films y Coatings from Proteins*. Woodhead Publishing Limited; 2017. doi:10.1016/B978-0-08-100722-8.00019-X
179. Allasia M, Passeggi MCG, Gugliotta LM, Minari RJ. Waterborne Hybrid Acrylic/Protein Nanocomposites with Enhanced Hydrophobicity by Incorporating a Water Repelling Protein. *Ind Eng Chem Res.* Published online 2019:1-31. doi:10.1021/acs.iecr.9b02518
180. Cheng Y, Wang Z. Fluorinated poly(isobornyl methacrylate-co-butyl acrylate) core-shell latex nanoparticles: Synthesis, morphology y wettability of films. *Polymer (Guildf)*. 2013;54(12):3047-3054. doi:10.1016/j.polymer.2013.03.029
181. Chiu FC, Hsieh YC, Sung YC, Liang NY. Poly(butylene succinate-co-adipate) Green Composites with Enhanced Rigidity: Influences of Dimension y Surface Modification of Kenaf Fiber Reinforcement. *Ind Eng Chem Res.* 2015;54(51):12826-12835. doi:10.1021/acs.iecr.5b03384
182. Duan R, Ibrahim I, Edlund H, Norgren M. Acid-catalyzed synthesis of foamed materials from renewable sources. *Ind Eng Chem Res.* 2014;53(45):17597-17603. doi:10.1021/ie501169w
183. Li KK, Yin SW, Yang XQ, Tang CH, Wei ZH. Fabrication y characterization of novel antimicrobial films derived from thymol-loaded zein-sodium caseinate (SC) nanoparticles. *J Agric Food Chem.* 2012;60(46):11592-11600. doi:10.1021/jf302752v
184. Shi K, Huang Y, Yu H, Lee TC, Huang Q. Reducing the brittleness of zein films through chemical modification. *J Agric Food Chem.* 2011;59(1):56-61. doi:10.1021/jf103164r
-

185. Liu Y, Li J, Yang L, Shi Z. Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate onto Casein Initiated by Potassium Ditelluratocuprate(III). *J Macromol Sci - Pure Appl Chem.* 2004;41 A(3):305-316. doi:10.1081/MA-120028209
186. Shukla R, Cheryan M. <Shukla-2001-Zein_ the industrial.pdf>. 2001;13:171-192. doi:10.1016/S0926-6690(00)00064-9
187. Wu LY, Wen QB, Yang XQ, Xu MS, Yin SW. Wettability, surface microstructure y mechanical properties of films based on phosphorus oxychloride-treated zein. *J Sci Food Agric.* 2011;91(7):1222-1229. doi:10.1002/jsfa.4303
188. Yang L, Xu J, Sun P, Shen Y, Luo Y. Ab initio emulsion y miniemulsion polymerization of styrene mediated by a cyclohexenyl-functionalized amphiphilic RAFT Agent. *Ind Eng Chem Res.* 2014;53(28):11259-11268. doi:10.1021/ie501888b
189. Ronco LI, Minari RJ, Gugliotta LM. Particle nucleation using different initiators in the miniemulsion polymerization of styrene. *Brazilian J Chem Eng.* 2015;32(1):191-199. doi:10.1590/0104-6632.20150321s00003150
190. Patel AR, Bouwens ECM, Velikov KP. Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. *J Agric Food Chem.* 2010;58(23):12497-12503. doi:10.1021/jf102959b
191. Córdoba CA, Collins SE, Passeggi MCG, Vaillard SE, Gugliotta LM, Minari RJ. Crosslinkable acrylic-melamine latex produced by miniemulsion polymerization. *Prog Org Coatings.* 2018;118:82-90. doi:10.1016/J.PORGCOAT.2018.01.013
192. Sun C, Gao Y, Zhong Q. Properties of Ternary Biopolymer Nanocomplexes of Zein, Sodium Caseinate, y Propylene Glycol Alginate y Their Functions of Stabilizing High Internal Phase Pickering Emulsions. *Langmuir.* 2018;34(31):9215-9227. doi:10.1021/acs.langmuir.8b01887
193. Gurney RS, Dupin D, Nunes JS, et al. Switching off the tackiness of a nanocomposite adhesive in 30 s via infrared sintering. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2012;4(10):5442-5452. doi:10.1021/am3013642
-

194. Wang N, Zhang L, Lu Y. Effect of the Particle Size in Dispersions on the Properties of Waterborne Polyurethane/Casein Composites. *Ind Eng Chem Res.* 2004;43(13):3336-3342. doi:10.1021/ie049939+
195. Njobuenwu DO, Oboho EO, Gumus RH. Determination of contact angle from contact area of liquid droplet spreading on solid substrate. *Leonardo Electron J Pract Technol.* 2007;6(10):29-38. doi:10.5194/acp-13-3643-2013
196. Jones A, Sharma S. Surface y degradation properties of thermoplastic blends from albumin y zein-based plastics. *J Appl Polym Sci.* 2017;134(13):1-10. doi:10.1002/app.44646
197. Fassihi R. *Modified-Release Delivery Systems.* 1 st editi.; 2017.
198. Porter S, Sackett G, Liu L. Process Parameters : Pan Coating. *Dev Solid Oral Dos Forms Pharm Theory Pract.* Published online 2009:761-805.
199. Dos Santos J, da Silva GS, Velho MC, Beck RCR. Eudragit®: A versatile family of polymers for hot melt extrusion y 3D printing processes in pharmaceuticals. *Pharmaceutics.* 2021;13(9):1-36. doi:10.3390/pharmaceutics13091424
200. Picchio ML, Paredes AJ, Palma SD, et al. pH-responsive casein-based films y their application as functional coatings in solid dosage formulations. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2018;541:1-9. doi:10.1016/j.colsurfa.2018.01.012
201. Picchio ML, Cuggino JC, Nagel G, et al. Crosslinked casein-based micelles as a dually responsive drug delivery system. *Polym Chem.* 2018;9(25):3499-3510. doi:10.1039/c8py00600h
202. Giteru SG, Ali MA, Oey I. Recent progress in understanding fundamental interactions y applications of zein. *Food Hydrocoll.* 2021;120(April):106948. doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106948
203. Labib G. Overview on zein protein: a promising pharmaceutical excipient in drug delivery systems y tissue engineering. *Expert Opin Drug Deliv.* 2018;15(1):65-75. doi:10.1080/17425247.2017.1349752
-

204. Abdelsalam AM, Somaida A, Ayoub AM, et al. Surface-tailored zein nanoparticles: Strategies y applications. *Pharmaceutics*. 2021;13(9):1-25. doi:10.3390/pharmaceutics13091354
205. Li K, Yin S, Yin Y, Tang C, Yang X, Wen S. Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach y their characterization. *J Food Eng*. 2013;119(2):343-352. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.038
206. Blenner D, Stubbs J, Sundberg D. Multi-lobed composite polymer nanoparticles prepared by conventional emulsion polymerization. *Polymer (Guildf)*. 2017;114:54-63. doi:10.1016/j.polymer.2017.02.080
207. Chen Y, Gao Z, Duan JZ. Dissolution testing of solid products. *Dev Solid Oral Dos Forms Pharm Theory Pract Second Ed*. Published online 2017:355-380. doi:10.1016/B978-0-12-802447-8.00013-3
208. Morales FJ, Romero C, Jiménez-PÉREZ S. New methodologies for kinetic study of 5-(Hydroxymethyl)-furfural formation y reactive lysine blockage in heat-treated milk y model systems. *J Food Prot*. 1995;58(3):310-315. doi:10.4315/0362-028X-58.3.310
209. Vigo MS, Malec LS, Gomez RG, Llosa RA. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of reactive lysine in dairy products. *Food Chem*. 1992;44(5):363-365. doi:10.1016/0308-8146(92)90269-8
210. Picchio L. Nanopartículas híbridas acrílico/caseína dispersas en agua, para su empleo como recubrimiento de bajo impacto ambiental. Published online 2015.
211. Horcas I, Fernández R, Gómez-Rodríguez JM, Colchero J, Gómez-Herrero J, Baro AM. WSXM: A software for scanning probe microscopy y a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum*. 2007;78(1):013705. doi:10.1063/1.2432410
212. Myers D. *Surfaces, Interfaces y Colloids — Principles y Applications, Second Edition*. Vol 51.; 2000. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914099003057>