

**Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Instituto Politécnico Nacional**



Diseño y obtención de películas biodegradables elaboradas a partir de proteínas de *Jatropha curcas* L. y compuestos nanoestructurados

Protocolo de investigación

Presenta

Ling-fa Montiel Juárez

Dirección

Dr. Marlon Rojas López

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-13-BIS

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS*

México, D.F. a 14 de Mayo del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-IPN en su sesión ordinaria No. 5 celebrada el día 14 del mes de Mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Montiel</u>	<u>Juárez</u>	<u>Ling-Fa</u>
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>

Con registro:

B	1	3	0	0	9	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Diseño y obtención de películas biodegradables elaboradas a partir de proteínas de Jatropha curcas L. y compuestos nanoestructurados

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Obtención de películas biodegradables, elaboradas a partir de glutelina presente en la semilla de Jatropha curcas L., con la incorporación de compuestos nanoestructurados, empleando métodos de dispersión continua.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Marlon Rojas López, Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. Marlon Rojas López

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

Aspirante

Ling-fa Montiel Juárez

Presidente del Colegio

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de Mayo del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-TLAXCALA para examinar la tesis titulada:

Diseño y obtención de películas biodegradables elaboradas a partir de proteínas de Jatropha curcas L. y compuestos nanoestructurados

Presentada por el alumno:

Montiel <small>Apellido paterno</small>	Juárez <small>Apellido materno</small>	Ling-Fa <small>Nombre(s)</small>							
		Con registro: <table border="1" style="display: inline-table;"> <tr> <td>B</td><td>1</td><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>9</td><td>6</td> </tr> </table>	B	1	3	0	0	9	6
B	1	3	0	0	9	6			

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Marlon Rojas López

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

Dr. Abel Ochoa Díaz

Dr. Javier Solorza Feria

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
 Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
 Unidad Tlaxcala
 Dirección



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACION EN
BIOTECNOLOGIA APLICADA TLAXCALA



Lardizábal, Tlaxcala a 18 de mayo de 2018

ACUERDO CONFIDENCIALIDAD

En el presente documento se hace constar que los profesores que suscriben: Alma Leticia Martínez Ayala, Marlon Rojas López, Raúl Jacobo Delgado Macuil, Abdú Orduña Díaz y Javier Solorza Feria (profesores investigadores, del CIBA-TLAXCALA del Instituto Politécnico Nacional (IPN), reconocen que con motivo de su participación en la Asesoría y Dirección de Tesis de la alumna de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, la C. Ling-Fa Montiel Juárez, hemos tenido acceso y conocemos el Trabajo de tesis desarrollado por la alumna y cuyo título se denomina Diseño y obtención de películas biodegradables elaboradas a partir de proteínas de Jatropha curcas L. y compuestos nanoestructurados

desarrollado (s) en esta escuela, conocemos su naturaleza, características, los métodos o procesos de producción y finalidades de sus productos y demás información del proyecto convenido con la empresa, toda clasificada como "INFORMACIÓN CONFIDENCIAL", la cual es propiedad del IPN.

Enterados de que las acciones para su adecuada protección intelectual están en proceso ante las autoridades correspondientes y de las ventajas que la confidencialidad le significa al IPN, me obligo a guardar y preservar la confidencialidad de los datos, documentos (protocolos y técnicas), características de los procesos, alcances, detalles de experimentos, incluyendo la información en cuyo desarrollo haya participado en cumplimiento de mis funciones, es decir de toda la "INFORMACION CONFIDENCIAL" a que tenga acceso; no usarla, revelarla, divulgarla y/o hacerla accesible a algún tercero por medio impreso, verbal, electrónico, conferencias, publicidad, o cualquier otra forma o medio conocido o por conocerse; y no exportarla, comercializarla, venderla o licenciarla, ya sea en parte o en su conjunto, debiendo observar lo anterior tanto en México como en el extranjero.

La obligación señalada en el párrafo anterior será durante (nuestra relación laboral, mi participación, mi colaboración, etc.) y subsistirá después de concluida, hasta que el IPN nos notifique en forma expresa el cese de dicha obligación.

Manifestamos tener conocimiento de la utilización de la "INFORMACION CONFIDENCIAL" de forma ilícita, impropia o sin autorización, causa perjuicio al IPN ya que son actos que constituyen delitos previstos en el artículo 223 de la ley de la Propiedad Industrial; y que



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA APLICADA TLAXCALA



independientemente de las sanciones penales a los infractores, prevén a favor de su titular el pago de daños y perjuicios.

CENTRO DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA APLICADA
UNIDAD TLAXCALA

Dr. Marlon Rojas López

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala

Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil

Dr. Abdú Orduña Díaz

Dr. Javier Solorza Feria

Alumna Ling-Fa Montiel Juárez

Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac- Tepetitla Km.1.5 (Ex - Hacienda San Juan Molino). Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala
C.P. 90700. Tels.: 015557296000 Ext. 87816 Directo 01248 48 707 62

Agradecimientos

Me gustaría expresar el más profundo agradecimiento a mis asesores, el Dr. Marlon Rojas López y Dra. Alma Leticia Martínez Ayala por su continuo apoyo de estudio e investigación, por su paciencia, motivación, entusiasmo e inmenso conocimiento. Sin su ayuda, no podría haber terminado este trabajo.

También me gustaría agradecer al resto de los miembros del comité de tesis, el Dr. Raúl Jacobo Delgado Macuil, Dr. Abdú Orduña Díaz y Dr. Javier Solorza Feria por su apoyo, observaciones e invertir su valioso tiempo para revisar mi disertación.

Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-IPN) y al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN), por otorgarme los medios y facilidades para la realización de este trabajo.

A David

Índice General

	Pag.
Capítulo I	
Introducción	
1.1 Introducción general	1
Capítulo II	
Marco teórico	
2.1 <i>Jatropha curcas</i> L.: Generalidades y aplicaciones	4
2.2 Materiales de origen renovable y biodegradable	6
2.3 Plásticos y empaques alimenticios	8
2.4 Películas de origen proteínico nanocompuestas	10
2.5 Nanoestructuras y nanomateriales	10
2.5.1 Nanoarcillas	11
2.5.1a) Montmorillonita.	13
2.6 Propiedades de películas nanocompuestas	14
2.6.1 Propiedades de barrera	14
2.6.1a) Permeabilidad de materiales de origen renovable	16
2.6.1b) Modelos de permeabilidad para materiales nanocompuestos	18
2.6.2 Propiedades mecánicas	26
2.6.2a) Nanoindentación	29
2.6.2b) Curvas carga-desplazamiento	30
2.6.2c) Modelos para la estimación de propiedades mecánicas y físicas de polímeros nanocompuestos	32
2.6.3 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)	34
2.6.4 Propiedades morfológicas	36
2.6.4a) Microscopia de fuerza atómica (AFM)	36
2.6.4b) Microscopia electrónica de barrido (SEM)	37
2.6.5 Propiedades ópticas	37

Capítulo III

Alcances del proyecto

3.1 Justificación	38
3.2 Hipótesis	38
3.3 Objetivo general	38
3.3.1 Objetivos particulares	39
3.4 Descripción del proyecto	39

Capítulo IV

Desarrollo experimental

4.1 Materiales	41
4.1.1 Elemento nanoestructurado	41
4.1.2 Proteína	42
4.2 Métodos	43
4.2.1 Proceso general para la obtención de películas de glutelina nanocompuestas	43
4.2.2 Diseño experimental	44
4.2.3 Elaboración de películas	48
4.3 Caracterización de películas nanocompuestas	49
4.3.1 Propiedades morfológicas	49
4.3.1a) Microscopía electrónica de barrido (SEM)	49
4.3.1b) Microscopía de fuerza atómica (AFM)	50
4.3.2 Propiedades químicas y estructurales	50
4.3.2a) Espectroscopía infrarroja (FTIR)	50
4.3.3 Propiedades mecánicas	51
4.3.3a) Nanoindentación	51
4.3.4 Propiedades de barrera	52

Capítulo V

Resultados

5.1 Propiedades morfológicas	53
5.1.1 Microscopía electrónica de barrido – SEM	53

5.1.2 Microscopia de fuerza atómica – AFM	56
5.2 Análisis químico y estructural	62
5.2.1 Espectroscopia de infrarrojo	62
5.2.1a) Espectroscopia de la 2da derivada	73
5.2.1b) Análisis de deconvolución	80
5.3 Análisis de propiedades de barrera	87
5.3.1 Permeabilidad a vapor de agua	87
5.4 Propiedades mecánicas.	88
5.4.1 Nanoindentación.	88
5.4.1a) Dureza de películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺	90
5.4.1b) Módulo de Young de películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺	92
5.5 Análisis por superficies de respuesta	96
5.5.1 Modelos- propiedades mecánicas y de barrera	96
5.5.2 Modelo para permeabilidad a vapor de agua	101
5.5.3 Modelo para propiedades mecánicas	105
5.5.3a) Dureza	105
5.5.3b) Módulo de Young	108
Conclusiones	112
Referencias	113
Anexos	125
Índice de figuras	X
Índice de tablas	XIV
Resumen	XV
Abstract	XVII

Índice de figuras

Figura		Pag.
1	Difusión de gas a través de una matriz polimérica a) sin la presencia de nanoestructuras y b) con la incorporación de estas (Duncan, 2011).	3
2	Partes de la planta de <i>Jatropha curcas</i> L.	5
3	Clasificación de los polímeros biodegradables (modificado de Averous y Boquillon, 2004).	7
4	Formación de bio nanoplásticos (adaptado de Sozer y Kokini, 2009).	9
5	Estructura de la montmorillonita (, Alexandre y Dubois, 2000, Ray y Okamoto, 2003 y Scaffaro y Botta, 2014).	13
6	Propiedades de barrera necesarios para productos alimenticios y farmacéuticos (Schmid y col. 2012).	15
7	Representación esquemática de la difusión, con una concentración C_0 y una concentración final C_1 , a la derecha del espesor de la película (Bodnár y col., 2007).	18
8	a) Régimen diluido, b) Régimen semidiluido (Fredickson y bicerano, 1999).	20
9	Orientación predefinida (n) de las estructuras (p), con respecto al plano de la película, así como tres valores para el parámetro (s). Bharadwaj, 2001.	22
10	Efecto de la delaminación y agregación, manteniendo una dirección paralela al plano de la película. Bharadwaj, 2001.	23
11	Tipos de vibraciones moleculares.	35
12	Estructuras empleadas para la elaboración de materiales plásticos.	40

13	Fraccionamiento proteínico de la semilla de <i>Jatropha curcas</i> L. (Peralta L., 2004).	42
14	Estrategia experimental.	43
15	Variables de respuesta para el estudio de películas de glutelina de <i>Jatropha curcas</i> L. nanocompuestas.	44
16	Diseño experimental Box-Benhken; a) diseño derivado de un cubo, b) representación entrelazada como un diseño factorial 2 ² (Aslan y Cebeci, 2006).	45
17	Sistema Bruker Modelo Vertex 70.	50
18	Nanoindentador, modelo Nanoindentation Tester NHT, CSM Instruments.	51
19	Micrografías SEM de Cloisita Na ⁺ .	54
20	Micrografías SEM a) película de proteína de glutelina, b) película nanocompuesta (20% cloisita Na ⁺).	55
21	Micrografías AFM de películas de glutelina de <i>Jatropha curcas</i> L. pH 10.	57
22	Micrografías AFM de películas de glutelina de <i>Jatropha curcas</i> L. nanocompuestas con cloisita Na ⁺ (20%), pH 10.	58
23	Micrografías AFM de películas de glutelina de <i>Jatropha curcas</i> L. pH 12.	59
24	Micrografías AFM de películas de glutelina de <i>Jatropha curcas</i> L. nanocompuestas con cloisita Na ⁺ (20%), pH 12.	60
25	Espectro de FTIR de glutelina.	62
26	Espectro de FTIR de glicerol.	63
27	Espectros FTIR de películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10. Contenido de Cloisita Na ⁺ : 0%, 5%, 10% y 20%.	64

28	Espectros FTIR de películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11. Contenido de Cloisita Na ⁺ : 0%, 5%, 10% y 20%.	65
29	Espectros FTIR de películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12. Contenido de Cloisita Na ⁺ : 0%, 5%, 10% y 20%.	66
30	Espectros FTIR de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, 20% (p) cloisita Na ⁺ y pH 10, 11 y 12.	69
31	Espectros FTIR de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, pH 10 y diferentes concentraciones de cloisita Na ⁺ : 0, 10 y 20%(p).	70
32	Espectros FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10. Contenido de Cloisita Na ⁺ : 0%, 5%, 10% y 20% (p).	74
33	Espectros FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11. Contenido de Cloisita Na ⁺ : 0%, 5%, 10% y 20% (p).	75
34	Espectros FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na ⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12. Contenido de Cloisita Na ⁺ : 0%, 5%, 10% y 20% (p).	76
35	Espectros FTIR (segunda derivada) de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, 20% (p) cloisita Na ⁺ y pH 10, 11 y 12.	77
36	Espectros FTIR (segunda derivada) de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, pH 10 y diferentes concentraciones de cloisita Na ⁺ : 0, 10 y 20%(p).	78

37	Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10.	81
38	Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11.	82
39	Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12.	83
40	Curvas de carga-desplazamiento de películas de glutelina-MMT, a) 40% glicerol, b) 50% glicerol.	89
41	Micrografías ópticas de películas nanocompuestas de glutelina-MMT.	94
42	Gráficos de superficie de respuesta- Permeabilidad.	102
43	Gráficos de contorno para PVA; a) efecto de los niveles de cloisita y glicerol sobre la PVA de las películas, b) efecto de los niveles de pH y glicerol sobre la PVA de las películas, c) efecto de los niveles de pH y cloisita sobre la PVA de las películas.	103
44	Gráficos de superficie de respuesta- Dureza.	106
45	Gráficos de contorno para dureza; a) efecto de los niveles de cloisita y glicerol sobre la dureza de las películas, b) efecto de los niveles de pH y glicerol sobre la dureza de las películas, c) efecto de los niveles de pH y cloisita sobre la dureza de las películas.	107
46	Gráficos de superficie de respuesta-Módulo de Young.	109
47	Gráficos de contorno para módulo de Young; a) efecto de los niveles de cloisita y glicerol sobre el módulo de Young de las películas, b) efecto de los niveles de pH y glicerol sobre el módulo de Young de las películas, c) efecto de los niveles de pH y cloisita sobre el módulo de Young de las películas.	110

Índice de tablas

Tabla		Pag.
1.	Principales grupos de las arcillas (Uddin, 2008).	12
2.	Propiedades mecánicas de diferentes polímeros (modificado de Crompton, 2012).	27
3.	Compuestos nanoestructurados propuestos.	41
4.	Niveles y variables seleccionadas para el diseño Box Benhken.	46
5.	Arreglo para el diseño experimental.	48
6.	Contenido de estructura secundaria (amida I).	85
7.	Contenido de estructuras hélice.	85
8.	Permeabilidad a vapor de agua.	87
9.	Dureza de películas de glutelina nanocompuestas.	90
10.	Módulo de Young de películas de glutelina nanocompuestas.	93
11.	. Análisis de varianza para los diferentes modelos.	97
12.	Coefficientes de regresión y valores de probabilidad para variables de respuesta en el diseño experimenta.	98
13.	Respuestas experimentales y predichas para películas de glutelina nanocompuestas con cloisita.	100

Resumen

El interés por el desarrollo de formulaciones filmogénicas, para aplicaciones alimenticias, farmacéuticas y de embalaje, a partir de recursos renovables se ha incrementado en los últimos años debido a la problemática social y ambiental del uso de materiales plásticos. Recursos como proteínas, lípidos y polisacáridos han sido empleados para la fabricación de materiales, convirtiéndose en una alternativa viable en la generación de polímeros biodegradables que puedan llegar a reemplazar a los plásticos derivados del petróleo.

En particular, las proteínas obtenidas a partir de recursos agropecuarios renovables o subproductos industriales han mostrado ser una alternativa con potencial para la generación de materiales biodegradables. Lo anterior debido a que los materiales de origen proteínico presentan excelentes propiedades de barrera a gases, principalmente oxígeno, así como propiedades mecánicas moderadas, sin embargo, también presentan una alta permeabilidad al vapor de agua, debido a su naturaleza higroscópica.

Basado en esto, en años recientes, se ha enfatizado en la obtención de una nueva generación de materiales, denominados bionanocompuestos, los cuales consisten en una matriz polimérica de origen renovable, con la presencia de estructuras orgánicas o inorgánicas con al menos una de sus dimensiones en el rango de los nanómetros, con los cuales se busca la optimización de las propiedades mecánicas y de barrera de los materiales renovables. Una dispersión uniforme de nanopartículas conduce al incremento del área superficial de contacto, lo que permite modificar la movilidad molecular y el efecto de relajación en la película, que modulan las propiedades de barrera y mecánicas del material.

Se diseñaron películas nancompuestas de glutelina de semilla de *Jatropha curcas* L. con una arcilla de tipo montmorillonita, variando los valores de pH de la solución filmogénica, así como las concentraciones de plastificante y nanoestructura.

Se empleó una metodología de superficie de respuesta para evaluar y describir el efecto de las variables independientes, constituidas por un plastificante (contenido de glicerol), nanosilicato (contenido de cloisita) y pH en la permeabilidad al vapor de agua y parámetros de dureza de películas nancompuestas basadas en glutelina de *Jatropha curcas* L. Los modelos de regresión obtenidos para cada propiedad física describen adecuadamente (R^2 0.9513 y 0.9421 respectivamente) los datos experimentales utilizados en el diseño del experimento. Además, los coeficientes de regresión determinados a partir de los cálculos muestran que el pH es el factor con mayor efecto sobre la permeabilidad al vapor de agua, mientras que el contenido de cloisita es el factor con mayor efecto sobre la dureza de la película de nanocompuestos. La espectroscopia FTIR permite determinar que la intensidad de las bandas relacionadas con las proteínas depende fuertemente del pH, ya que esto modifica las interacciones entre las proteínas con el resto de los constituyentes, modificando así la permeabilidad al vapor de agua de la película. Por otro lado, el contenido de cloisita es el factor con mayor efecto sobre la dureza de la película de nanocompuestos. Esta metodología puede ser muy útil para el diseño y preparación de películas nancompuestas basadas en *Jatropha curcas* L. con barrera específica y propiedades mecánicas

Abstract

The interest in the development of film formulations for food, pharmaceutical and packaging applications, based on renewable resources has increased in recent years due to the social and environmental problems of the use of plastic materials. Resources such as proteins, lipids and polysaccharides have been used for the manufacture of materials, becoming a viable alternative in the generation of biodegradable polymers that can eventually replace petroleum-based plastics.

Proteins obtained from renewable agricultural resources or industrial by-products have proven to be an alternative with potential for the generation of biodegradable materials. This is since the materials of protein origin have excellent gas barrier properties, mainly oxygen, as well as moderate mechanical properties, however, they also have a high permeability to water vapor, due to their hygroscopic nature.

Based on this, in recent years, emphasis has been placed on obtaining a new generation of materials, called bio-nanocomposite, which consist of a polymer matrix of renewable origin, with the presence of organic or inorganic structures with at least one of its dimensions in the range of nanometers, with which the optimization of the mechanical and barrier properties of renewable materials is sought. A uniform dispersion of nanoparticles leads to the increase of the contact surface area, which allows to modify the molecular mobility and the relaxation effect in the film, which modulate the barrier and mechanical properties of the material.

Nanocomposite films of *Jatropha curcas* L. seed glutelin were designed with a montmorillonite type clay, varying the pH values of the filmogenic solution, as well as the plasticizer and nanostructure concentrations.

A response surface methodology was employed to evaluate and describe the effect of the independent variables, constituted by a plastizicer (glycerol content), nanofiller (cloisite content) and pH on the water vapor permeability and hardness parameters of nanocomposite films based on glutelin from *Jatropha curcas* L. The regression models obtained for each physical property describes adequately (R^2 0.9513 and 0.9421 respectively) the experimental data used in the design of experiment. Also, the regression coefficients determined from the calculations show that pH is the factor with major effect on the water vapor permeability, whereas the cloisite content is the factor with major effect on the hardness of the nanocomposite film. FTIR spectroscopy allows determine that the intensity of the bands related with proteins depends strongly from pH, because this modifies the interactions between the proteins with the rest of the constituents, modifying thus the water vapor permeability of the film. In the other hand, cloisite content is the factor with major effect on the hardness of the nanocomposite film. This methodology could be very useful to design and prepare nanocomposite films based on *Jatropha curcas* L. with specific barrier and mechanical properties

Introducción

1.1 Introducción general

El desarrollo de los materiales plásticos de origen petroquímico se ha desarrollado desde finales de los años 1800 y principios de los 1900's, a partir de la obtención del celuloide y la baquelita. Desde el principio de la industria de los materiales plásticos, esta se basó en las propiedades tanto funcionales como estructurales de los polímeros naturales, sin embargo, factores como el encarecimiento y reducción de los recursos petroquímicos, así como los problemas medioambientales derivados de sus procesos de producción y disposición final de los materiales, han llevado a la necesidad de buscar recursos que permitan su sustentabilidad, y es que la industria de los plásticos, se ha convertido en un factor de importancia para la economía de las naciones. En México la manufactura de plásticos es una actividad secundaria, que provee de insumos a consumidores finales como a otras ramas de la industria. Su producción en el año 2012 alcanzó los 178,236 millones de pesos, sobresaliendo las actividades de producción de bolsas y películas plásticas flexibles (18.87%), autopartes (18.84%) la fabricación de botellas de plástico (9.25%) y la elaboración de llantas y cámaras (9.72%) (Interfaz, 2013).

Durante los últimos 20 años, el interés por los polímeros naturales (polisacáridos, lípidos y proteínas) para la investigación y desarrollo de materiales plásticos renovables, ha ido en aumento debido a las ventajas que ofrecen tanto económicas como medioambientales, en comparación con los materiales plásticos de origen sintético (Kumar y col., 2010, Rhim y col., 2009, Verbeek, van den Berg, 2010).

Las proteínas son recursos naturales, disponibles ya sea como subproductos o como desechos de las industrias agrícolas u hortícolas, por lo que proteínas de origen vegetal (maíz, soya, trigo, girasol) y animal (suero lácteo, huevo, queratina, caseína) son producidas actualmente para la manufactura de plásticos, mediante técnicas de dispersión continuas y de moldeo por compresión, así mismo se ha reportado su aplicación en la elaboración de surfactantes y recubrimientos. Sin embargo, la viabilidad comercial de los materiales a base de proteínas depende del uso de técnicas comunes en la industria de los materiales sintéticos; tales como la extrusión y el moldeo por inyección (Verbeek, van den Berg, 2010).

Entre los recursos proteínicos de origen vegetal, la harina de *Jatropha curcas* L. presenta un 50-60% de proteína cruda, por lo que se ha considerado su empleo en la alimentación animal y humana (Martínez y col., 2006). *Jatropha curcas* L. se ha empleado fuera de la industria alimenticia, en la elaboración de jabones y cosméticos, además de la obtención de biodiesel, sin embargo, aplicaciones como la obtención de surfactantes, películas, recubrimientos y adhesivos, no han sido explorados ampliamente. Sin embargo, los materiales elaborados a partir de proteínas, aunque se adhieren bien a superficies hidrofílicas, poseen excelentes propiedades de barrera (permeabilidad de O₂, CO₂), no cumplen con los requerimientos necesarios para competir con los materiales plásticos de origen petroquímico, debido a que no poseen buenas propiedades mecánicas (elasticidad y resistencia a la ruptura).

Se ha reportado que el uso de materiales plastificantes como glicerol y sorbitol, mejoran las propiedades mecánicas de las películas hechas a base de proteínas, sin embargo, aún hoy en día ha sido difícil competir con los materiales plásticos hechos a base de hidrocarburos.

Es por esto por lo que actualmente se está investigando la obtención de películas hechas a partir de la combinación de macromoléculas, que permitan mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de los materiales unicomponentes (Kumar y col. 2010). Además de esto, recientemente se ha reportado una nueva clase de materiales denominados como bio-nanocompuestos, los cuales son una matriz bio-polimérica, que incluye nano estructuras, empleadas tanto para reforzar y mejorar las propiedades mecánicas, así como para mejorar las propiedades de barrera de la matriz original (Kumar y col. 2010, Kadam y col., 2013, Vartiainen y col., 2009), que generan una trayectoria tortuosa para la difusión de gas.

La figura 1 esquematiza la modificación estructural y morfológica que sufre la matriz polimérica al incorporar nanoestructuras en ella, donde: a) muestra la difusión de moléculas de gas (O_2 , CO_2 , y vapor de H_2O) a través de la matriz polimérica de forma perpendicular a esta, mientras que en b) las moléculas deben navegar alrededor de las nanoestructuras, y a través de las zonas con diferente permeabilidad del polímero sin nanoestructuras (Duncan, 2011).

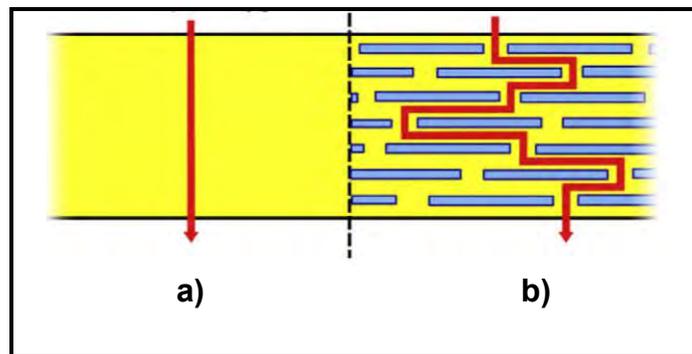


Figura 1.- Difusión de gas a través de una matriz polimérica a) sin la presencia de nanoestructuras y b) con la incorporación de estas (Duncan, 2011).

Marco teórico

2.1 *Jatropha curcas* L.: Generalidades y aplicaciones.

Jatropha curcas L. es una planta conocida a nivel mundial con más 34 nombres, en México es conocida como piñoncillo, piñon, xuta, aishte, sikil-té, x-kakal-che, sikililte, ni-in, quahayohuachtli, skilte, kakal-che, Ashcuahuitl, Ashté, avellana purgante, Cak siil, Cuahayohuachtli, Cuipi, Kxakal-che, Que-ca, Scu-luú, Tempatl, Yaga-be-pale (Gómez-Pompa y col., 2009, Bermejo, 2009). *Jatropha curcas*, es un árbol pequeño o arbusto grande que puede alcanzar una altura de hasta 5 m. La planta presenta un crecimiento articulado, con una discontinuidad morfológica en cada incremento. La latencia es inducida por las fluctuaciones en las precipitaciones y la temperatura / luz, presenta de 5-7 hojas lobuladas y poco profundas de longitudes de 6-15 cm (longitud- ancho), dispuestas de manera alternativa, el fruto es una capsula de aproximadamente 4-5cm de longitud y 3-4 cm de ancho y cuyo interior contiene 3 semillas de coloración blanca y testa oscura de forma elipsoidal de aproximadamente 2cm de largo y una masa aproximada de 0.65g (Heller, 1996 Peralta, 2004), figura 2.



Figura 2. Partes de la planta de *Jatropha curcas* L.

El género botánico *Jatropha* pertenece a la tribu *Joannesieae* de las *Crotonoideae* en la familia de las *Euphorbiaceae*, la cual contiene 170 especies conocidas aproximadamente. En 1979, Dehgan y Webster, resaltan dos subgéneros del género *Jatropha*; *Curcas* y *Jatropha*, así mismo postularon que *Jatropha curcas* L. era la forma más primitiva del género *Jatropha* y que especies en otras áreas evolucionaron a partir de su forma primitiva.

Diferentes científicos han tratado de definir el origen de *Jatropha curcas* L., sin embargo, aún existe polémica. Dehgan y Webster (1979), citan a Wilbur (1954) de la siguiente manera: “sin lugar a duda es parte de la flora de México y probablemente del norte de América Central, antes de que arribara Cortes y es probable que se originara allí, por lo que la subsección fue uno que originalmente fue casi o completamente restringido a México” (Heller, 1996), actualmente la mayoría de los estudios concluyen y aceptan esta hipótesis.

En México, se encuentra ampliamente distribuida, localizándose en más de 15 estados y es el único país donde es posible localizar genotipos tanto tóxicos como no tóxicos de manera natural, los estados de Guerrero, Chiapas y Michoacán cuentan con el 90% de los genotipos tóxicos de *Jatropha curcas*, mientras que aquellos no tóxicos (comestibles) existen en el norte de Puebla y en la región de Totonacapan, en el estado de Veracruz (Steinmann, 2002, Martínez y col., 2010).

Jatropha curcas L. es una planta que se desarrolla en latitudes desde los 10-1430 metros sobre el nivel del mar y bajo diferentes condiciones agroclimáticas, es una planta multipropósito, por lo que es considerada de potencial económico, debido a la diversidad de sus aplicaciones médicas e industriales. La Organización Internacional de *Jatropha*, ha proyectado que para el año 2017 existirán alrededor de 32.72 millones de hectáreas a nivel mundial cultivadas con *Jatropha*, lo que produciría 160 millones de toneladas de semilla

Entre los usos conocidos de la *Jatropha*, se destacan; la posibilidad de su uso en la refinería, debido al alto contenido de aceite de su semilla (60-68%), tradicionalmente el aceite ha sido empleado para la elaboración de jabón, velas y lubricante, mientras que la pasta obtenida del proceso de extracción de aceite es empleada como fertilizante, producción de biogás, fabricación de pellets para la cocción de alimentos, y en algunas zonas donde se localizan genotipos no tóxicos, es empleada para la elaboración de alimentos (Heller, 1996, Peralta, 2004). La planta como tal es empleada para la construcción de cercos vivos, como control en la erosión de suelos, medicina tradicional, pesticida (Heller, 1996, Martínez y col., 2010, Kumar, 2011, Oyuela, 2012, Insanu, 2013).

2.2 Materiales de origen renovable y biodegradable.

Los avances químicos y tecnológicos, permitieron la introducción de una gran diversidad de materiales plásticos de origen sintéticos, a lo largo del siglo pasado, tales como el nylon, el polietileno y el poliuretano, entre otros, los cuales han impactado en diferentes sectores industriales y sociales, sin embargo de manera paralela a la creciente dependencia hacia los materiales plásticos, se ha incrementado la preocupación por los problemas ambientales y mantenimiento de los ecosistemas debido a la persistencia de los materiales plásticos convencionales. Debido a esta problemática, en años recientes se ha enfocado la atención al desarrollo e investigación de materiales que puedan cumplir con las características y ventajas que ofrecen los materiales plásticos de origen petroquímico, pero que adicionalmente provengan de precursores biológicos o subproductos de los diferentes sectores agroindustriales, los cuales puedan producir materiales biodegradables y compostables, denominados también, plásticos biodegradables (U.S. Congress, 1993, Avérous y Pollet, 2012, Zhao y col., 2008,). Los polímeros biodegradables se encuentran basados en recursos renovables que pueden incluir ácido poliláctico (PLA) y polihidroxialcanoato

(PHA), o bien pueden obtenerse a partir de plantas y vegetales, tales como el maíz, soya y papa, entre otras (Kolybaba y col., 2003), figura 3.

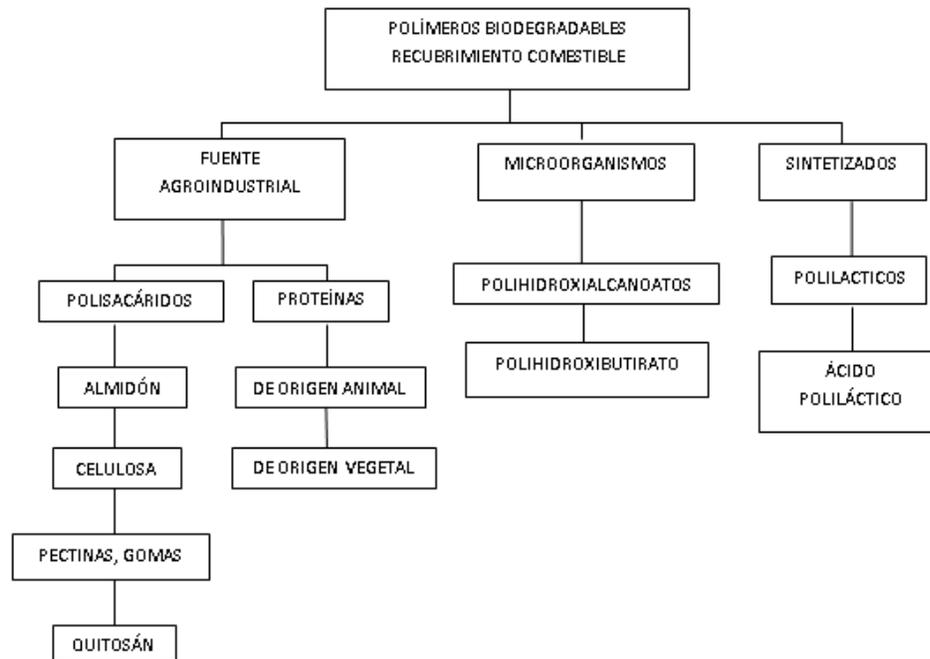


Figura 3.- Clasificación de los polímeros biodegradables (modificado de Averous y Boquillon, 2004).

La Sociedad Americana para Pruebas en Materiales ASTM, por sus siglas en inglés y la organización internacional de estándares; ISO, han dado las siguientes definiciones para los términos plástico biodegradable y compostaje:

Un plástico biodegradable se define como aquellos materiales que sufren un cambio significativo en su estructura química, bajo condiciones ambientales específicas, por acción de microorganismos, algas u hongos, los cuales pueden derivar en la disminución de las propiedades físicas, mecánicas (Kolybaba y col.2003).

Compostaje: es un proceso que controla la descomposición biológica de materiales biodegradables en una sustancia humus, (compost); la degradación

aeróbica y mesófilas y termófilas de la materia orgánica para hacer compost; por otro lado, la transformación de materiales biológicamente descomponibles a través de un proceso controlado de bio-oxidación que procede a través de fases mesofílica y termofílica, dará como resultado la producción de dióxido de carbono, agua, minerales y materia orgánica estabilizada (compost o humus).

La biodegradación puede ocurrir en diferentes etapas; Inicialmente, las macromoléculas digeribles, que se unen para formar una cadena, experimentan una escisión enzimática directa. Esto es seguido por el metabolismo de los fragmentos, que conduce a una disimilación enzimática progresiva de la macromolécula, a partir de los extremos de la cadena, también se puede producir una escisión oxidativa de las macromoléculas que conduce a la metabolización de los fragmentos. De cualquier manera, con el tiempo los fragmentos de cadena se convierten en fragmentos lo suficientemente pequeños, para ser metabolizados por los microorganismos (Avérous y Pollet, 2012, Kolybaba, 2003).

2.3 Plásticos y empaques alimenticios.

Los materiales plásticos se definen como aquellos que están procesados a partir de polímeros y que pueden ser transformados en productos finales. Debido a su versatilidad y durabilidad, se han convertido en recursos ideales para la fabricación de materiales en diversas industrias, en su mayoría los productos finales se encuentran destinados a la industria alimentaria; empaques, botellas, contenedores, películas y recubrimientos (Baner y Piringer, 2008), cuyo propósito es el proteger a los alimentos del medioambiente y proporcionar las condiciones apropiadas para su transportación, distribución, venta y almacenamiento, pues presentan diversas ventajas: son desechables, permiten controlar fácilmente la permeabilidad a gases, son materiales duraderos, por otro lado, también son materiales que no se degradan con facilidad, generan demasiado calor y gases (monóxido de carbono, cianuro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno y el fosgeno), dependiendo del plástico y de las condiciones en las que se produzca su quema (Zhang y Mittal, 2010).

Actualmente los polímeros sintéticos constituyen los principales recursos para la fabricación de materiales plásticos, sin embargo, el desarrollo de plásticos verdes ha retomado interés en los últimos años, debido a implicaciones medioambientales y económicas, concernientes a los plásticos sintéticos (independencia de los recursos petroquímicos, eco-amigables, periodos de

degradación cortos comparativamente con los polímeros sintéticos). A nivel mundial el uso por polímeros biodegradables se ha visto en aumento, de 14 millones de kg en 1996, a 68 millones de kg en el año 2001 (Gross y Kalra, 2002).

La industria del empaqueo de alimentos ha encontrado en el creciente interés por los bio-nanomateriales (Figura 4), la posibilidad de mejorar las deficiencias de los bioplásticos actuales, para su aplicación no solo para la protección del alimento, sino para incrementar la vida de anaquel del producto (Chau y col., 2007, Sozer y Kokini, 2009).

Otros campos de aplicación son en la generación de materiales que puedan ser incorporados en industrias, tales como la automotriz en sustitución de autopartes plásticas de origen petroquímico, mientras que en la medicina se desea implementar la nanotecnología, ya sea para reparar o depositar medicamentos en un área específica, o bien solo para explorar el organismo.

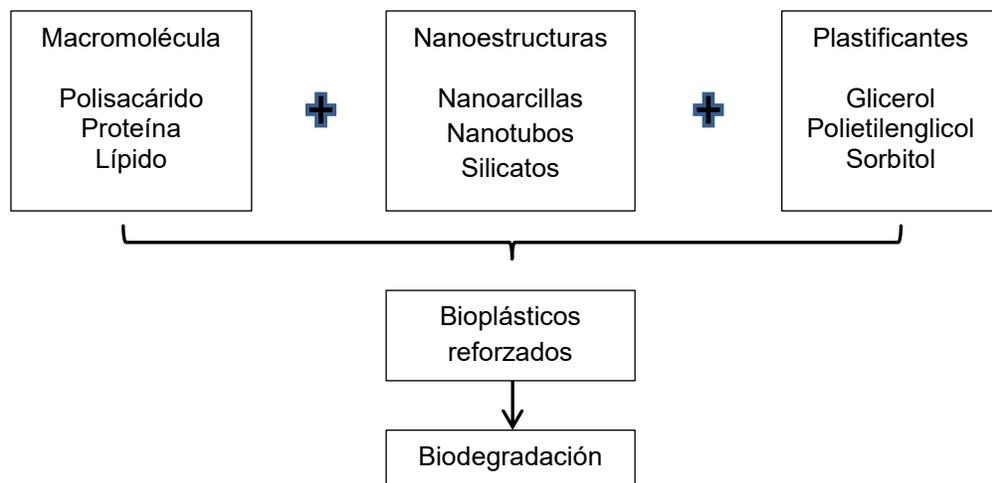


Figura 4.- Formación de bio nanoplásticos (adaptado de Sozer y Kokini, 2009).

2.4 Películas de origen proteínico nanocompuestas.

Las proteínas, como polímeros naturales, son capaces de formar estructuras amorfas tridimensionales, que en su mayoría son estabilizadas a través de interacciones no covalentes, propiciando materiales con una alta dependencia en la heterogeneidad de su estructura, su estabilidad térmica y su comportamiento hidrófilo. Así mismo, las proteínas han sido consideradas como buenos candidatos para la generación de materiales plásticos verdes, sin embargo, los plásticos verdes de origen proteínico presentan baja resistencia a la tracción y flexibilidad, con la finalidad de resolver estos problemas, se han empleado materiales plastificantes y recientemente materiales nanoestructurados. Entre las estructuras comúnmente empleadas como reforzadores, se destacan las nanoarcillas, óxidos metálicos, fibras de quitina y lignina (Yang y col., 2007).

Olabarrieta y col. (2006), elaboraron películas a partir de gluten de trigo, adicionando montmorillonita, con la finalidad de que la arcilla incrementara la tortuosidad, reduciendo la tasa de envejecimiento de la película y aumentara las propiedades de barrera a gases y líquidos.

Shi y col. (2008), elaboraron películas a partir de suero de leche, empleando óxido de zinc, debido a que éste, es un compuesto comúnmente empleado en la industria alimentaria y farmacéutica.

2.5 Nanoestructuras y nanomateriales.

Nanoestructura- Estructura que se caracteriza por presentar en al menos en uno de sus lados, una dimensión en un intervalo entre 1-100nm, mismo que se encuentra definido en el término nanoescala (Xia y col., 2003, Diario Oficial, 2011). La Organización Internacional de Normalización, define a un nanomaterial como aquel material que presente cualquier dimensión externa en la nanoescala o con una estructura interna o superficial en la nanoescala. Así mismo el informe Definition of Nanomaterials for regulatory purposes, sugiere que el tamaño debe ser la única propiedad definitoria de un nanomaterial(Diario oficial, 2011). Por otro lado, el termino nanotecnología, fue definido por Norio Taniguchi (1974) y hace referencia al estudio multidisciplinario de la materia en una escala atómica y molecular, con la capacidad de mejorar propiedades en materiales, construir a escala atómica (Arivalagan y col. 2011).

La aplicación de nanomateriales se puede remontar al año 1857; Faraday publica que el uso de nanopartículas metálicas afecta el color de ventanas en iglesias, (Arivalagan y col., 2011). En años recientes el uso de nanoestructuras tales como nanoarcillas, nanopartículas, nanotubos de carbón, grafeno, nanocristales de almidón, nanofibras de celulosa y otros materiales inorgánicos, se ha convertido en una alternativa para mejorar las propiedades químicas, físicas y mecánicas de los materiales, al dispersar en una concentración baja a un elemento nanoestructurado en una matriz polimérica; una dispersión uniforme de la nanoestructura, producirá una gran superficie de contacto entre la nanoestructura y la matriz polimérica, generando un incremento en las interacciones nanoestructura- polímero (Sposito y col., 1999, Jeon y Baek, 2010, Quang y col., 2007, Uddin, 2008).

2.5.1 Nanoarcillas.

Las arcillas son rocas sedimentarias, conformadas por diferentes minerales, principalmente silicatos hidratados de aluminio, hierro y magnesio, de acuerdo con Grim (Okada y col., 1990, Usuki y col., 1993), el termino arcilla implica un material finamente granulado, natura y terroso, que puede desarrollar la capacidad de plasticidad al mezclarse con agua, esta propiedad le permite al material deformarse al aplicar sobre él presión. En función a su localización natural, pueden clasificarse como arcilla residual y arcillas transportadas o sedimentarias: la primera se forma por la alteración y disgregación superficial de las rocas por el contacto con la atmosfera (Uddin, 2008).

Las arcillas, presentan una estructura laminar, conformada por laminas tetraédricas (donde un átomo de silicio se encuentra rodeado por cuatro átomos de oxígeno) y láminas octaédricas (donde un metal como aluminio o magnesio se encuentra rodeado por ocho átomos de oxígeno), ambas capas se encuentran fusionadas debido a que comparten átomos de oxígeno, mientras que los átomos de oxígeno no compartidos se encuentran presentes en forma de grupos hidroxilos. La fusión de ambos arreglos forma a las principales estructuras de las arcillas;

- un arreglo tetraédrico o bilaminar (arreglo 1:1) fusionado con un octaédrico, conocido como grupo caolín y que presenta una composición general de $Al_2Si_2O_5(OH)_5$ y un espesor aproximado de 0.7nm

- un arreglo octaédrico o trilaminar (arreglo 2:1) en medio de dos arreglos tetraédricos, conocido como filosilicatos, que puede ser electrostáticamente neutro sin la presencia de una capa intermedia denominada pirofilita, así mismo la falta de capas iónicas intermedias (Davidovic y col., 2011, Fernández, 2014).

La sustitución isomórfica es la responsable de las propiedades de las arcillas, este fenómeno se efectúa cuando los cationes Si^{4+} y Al^{3+} son sustituidos por otros elementos cuyo radio iónico permita adaptarse a la estructura, creando una densidad de carga negativa, que puede ser compensada por los cationes que se encuentran en el espaciado interlaminaar (Na^+ principalmente) y que por lo general se intercambian por otros de igual carga; un catión Si^{4+} puede ser sustituido por un Al^{3+} , mientras que Al^{3+} puede ser sustituido por Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} . Las arcillas presentan una estructura cristalina, formada fundamentalmente por grupos de sílice tetraédricos y grupos de alúmina octaédricos (Fernández, 2014), cuya estructura final se forma a partir de la combinación de los átomos de oxígeno presentes en la capa tetraédrica con los átomos de oxígeno presentes en la capa octaédrica. Por otro lado, las arcillas pueden dividirse en cuatro grupos, en función a la variabilidad de su estructura (tabla 1).

Tabla 1.- Principales grupos de las arcillas (Uddin, 2008).

Grupo	Minerales	Formula general	Observaciones
Caolinita	Caolinita, dickita, nacrita	$\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$	Son polimorfos
Montmorillonita o esmectita	Montmorillonita, pirofilita, talco, vermiculita, sauconita, saponita, nontronita	$(\text{Ca}, \text{Na}, \text{H})(\text{Al}, \text{Mg}, \text{Fe}, \text{Zn})_2(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$	X indica variabilidad en el nivel de agua
Illiita	Illiita	$(\text{K}, \text{H})\text{Al}_2(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$	
Clorita	a) Amesita b) Chamosita c) Cookeita d) Nimita, etc.	a) $(\text{Mg}, \text{Fe})_4\text{Al}_4\text{Si}_2\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ b) $(\text{Fe}, \text{Mg})_3\text{Fe}_3\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ c) $\text{LiSi}_5\text{Si}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ d) $(\text{Ni}, \text{Mg}, \text{Fe}, \text{Al})_6\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH})_8$	Se considera un grupo separado de las arcillas

2.5.1a) Montmorillonita.

La montmorillonita es un filosilicato mineral del tipo esmectita, abundante y de fácil obtención en suelos de arreglo 2:1), las capas consisten en dos laminas tetraédricas, intercalando una lámina octaédrica de borde compartida de aluminio o hidróxido de magnesio. Las láminas de arcilla, se encuentran separadas por fuerzas de Van Der Waals, formando capas intermedias o galerías, entre las cuales se encuentran cationes como Ca^{2+} y Na^+ , K^+ , Li^+ , que permiten contrarrestar el exceso de carga negativa, debida a las sustituciones isomorfas de Si^{4+} para Al^{3+} en una red tetraédrica y Al^{3+} para Mg^{2+} o Fe^{2+} para una red octaédrica, así mismo es común la presencia de moléculas de agua debido a la hidrofiliidad de la montmorillonita (Ray y Okamoto, 2003, LeBaron y col., 1999, Alexandre y Dubois, 2000, Tournassat y col. 2004, Brigatti y col., 2006), figura 5.

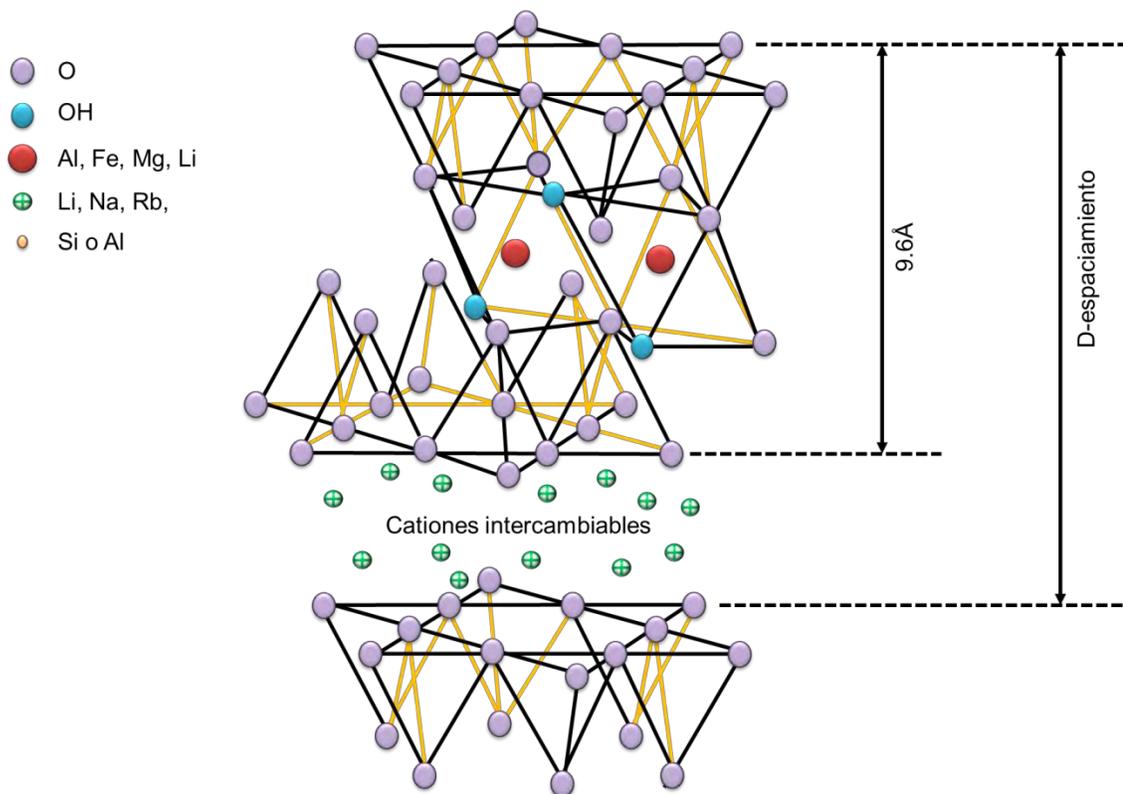


Figura 5.- Estructura de la montmorillonita (, Alexandre y Dubois, 2000, Ray y Okamoto, 2003 y Scaffaro y Botta, 2014).

La unidad que se repite en la molécula; d-espaciamiento, se representa por la suma del espesor de una de las láminas y la galería, generalmente para la montmorillonita natural (Na^+MMT), el espaciado d es de 9.6Å en montmorillonita seca y de 19Å para arcilla bajo condiciones de humedad relativa de 99%. Por otro lado su microestructura consiste en láminas de aproximadamente 1nm de espesor, empalmadas paralelamente, formando una partícula principal de aproximadamente 8-10nm, así mismo la partícula principal es agregada en partículas de mayor tamaño de forma irregular (Tournassat y col. 2004, Brigatti y col., 2006); su estructura multicapa y densidad de carga, son factores que permiten el intercalamiento de la montmorillonita con polímeros hidrófilos o bien con polímeros químicamente modificados para mejorar su compatibilidad con recursos hidrófobos (Alexandre y Dubois, 2000, Ray y Okamoto, 2003, LeBaron y col., 1999).

2.6 Propiedades de películas nanocompuestas.

Sectores como la medicina, la agricultura y de embalaje, se han enfocado en el desarrollo de materiales que se integren al ambiente para la sustitución o complemento de aquellos materiales ya existentes, que sean de naturaleza no renovable, por lo que la optimización de las características de los materiales de origen renovable, a partir de nanocompuestos es una de las principales disposiciones (Tang y col., 2008, Cyras y col., 2007, Kumar y col., 2011).

2.6.1 Propiedades de barrera.

La permeabilidad es una de las propiedades más importantes tanto en los materiales plásticos convencionales, como en los nanocompuestos. A diferencia de los materiales de vidrio o metálicos, los materiales plásticos son permeables en diferentes grados, por lo que la capacidad de barrera de estos materiales presenta diferentes intervalos de transferencia, así mismo el uso de polímeros como materiales de empaque se encuentra en función a las propiedades del producto a proteger (Siracusa, 2012), la figura 6, resume los requerimientos de películas plásticas mayormente empleadas en la industria del empaque.

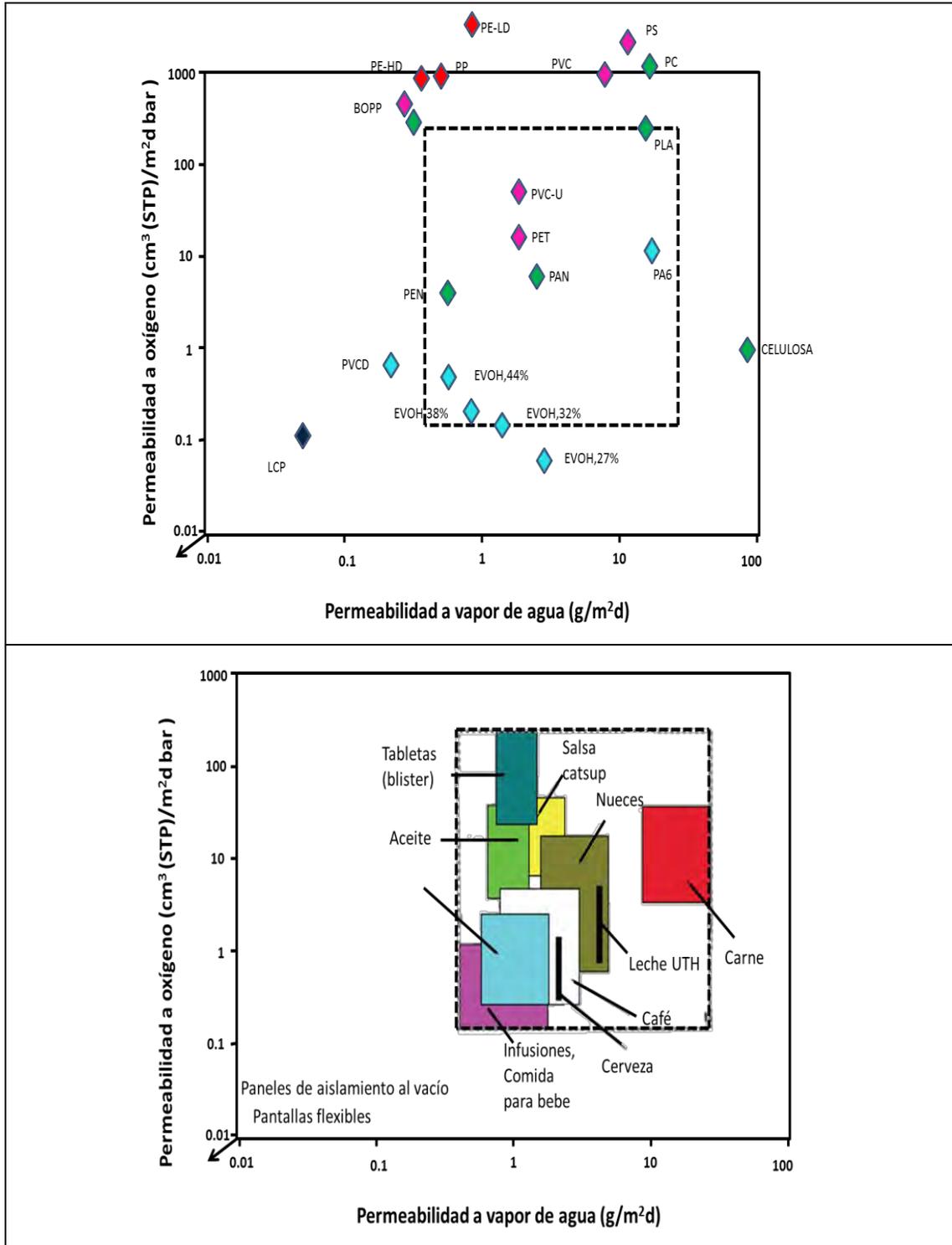


Figura 6.- Propiedades de barrera necesarios para productos alimenticios y farmacéuticos (Schmid y col. 2012).

La capacidad de barrera a gases y vapores se determina a partir de métodos estándar de la ASTM E96/E96M – 10. debido a que la permeabilidad involucra la capacidad de los materiales para resistir fenómenos de permeabilidad y sorción con diferentes grados de intensidad ocasionando el intercambio de gases y vapores en el sistema mediante dos procesos de permeación; 1) debido al tamaño del poro y por donde gases y vapores pasaran, este efecto es debido a defectos de sellado y 2) efectos de la difusión de una solución, donde gases y vapores disuelven la superficie del polímero y se difunden a través del polímero mediante un gradiente de concentración para evaporar al otro lado del polímero (Mueller y col., 2011).

2.6.1a) Permeabilidad de materiales de origen renovable.

La permeabilidad de los bioplásticos puede ser asumida a partir del enfoque de Fick; donde la ley de estado de Fick, establece que la difusión de reflujo de un determinado componente es proporcional al gradiente de concentración local de ese componente.

$$\vec{j} = D\nabla c \quad (1)$$

Dónde:

- \vec{j} Difusión del flujo ((mol m⁻²s⁻¹)
- D Coeficiente de difusión efectiva (m²s⁻¹)
- c Concentración de permeante (molm⁻³)

La ley de Fick se considera una aproximación válida, para sistemas diluidos, aplicando la ecuación de masa, la ecuación de Fick puede derivarse de la siguiente manera:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial^2 x} \quad (2)$$

Dónde:

- t Tiempo (s)
- x Coordinación espacial de la película

En donde se especifica solo una dimensión en la ecuación de balance de masa, al considerar a la permeabilidad en una sola dirección. Así mismo, el modelo considera que la película presenta una estructura homogénea, por lo que el coeficiente de difusión se considera homogéneo, la representación de la celda de difusión se presenta en la figura 7.

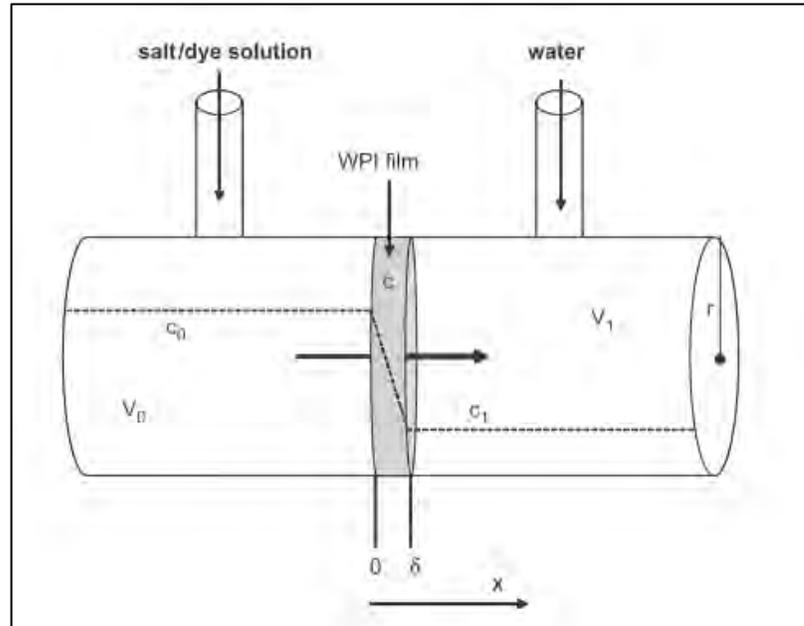


Figura 7.-Representación esquemática de la difusión, con una concentración C_0 y una concentración final C_1 , a la derecha del espesor de la película (Bodnár y col., 2007).

2.6.1b) Modelos de permeabilidad para materiales nanocompuestos.

La capacidad de barrera en los materiales plásticos nanocompuestos, se encuentran estrechamente relacionada a la reorganización del compuesto nanoestructurado, dentro de la matriz polimérica, por lo que la predicción de como el cambio estructural modifica la permeabilidad, ha llevado a la formulación de diferentes modelos de permeabilidad para materiales nanocompuestos, basados en como la alineación de las estructuras y las estructuras con una alta relación de radio/longitud, influenciara la permeabilidad a través de la matriz más que estructuras con una relación menor:

Modelo de Nielsen (Nielsen, 1967); Describe el decrecimiento máximo en la permeabilidad, basándose únicamente en la tortuosidad debido a la adición de un material a la matriz polimérica. El modelo de Nielsen asume que las estructuras adicionadas son impermeables, lo que da lugar a que las moléculas que se difunden tiendan a ir alrededor de las partículas adicionadas, por lo que las moléculas difundidas tendrían una trayectoria más larga y tortuosa para viajar, resultando en un tiempo mayor para su difusión a través de la membrana

Así mismo, supone que las estructuras de adición presentan un tamaño uniforme, se encuentran completamente dispersadas dentro de la matriz de manera paralela a la superficie del composito y finalmente, que las propiedades del material final no se ven afectadas por la presencia de las estructuras. La dispersión incompleta, los huecos y una alineación no paralela de las estructuras adicionadas, producirán permeabilidades más altas que las predichas por el modelo. La permeabilidad relativa se encuentra dada por la siguiente expresión:

$$\frac{P}{P_0} = \frac{1 - \emptyset}{1 + \alpha \emptyset / 2} \quad (3)$$

Dónde:

- P*** Es la permeabilidad del composito.
- P₀*** Es la permeabilidad neta del polímero.
- \emptyset** Es la fracción volumen de la estructura adicionada.
- α** Es la relación de radio dada por la ecuación 2.

Dónde:

$$\alpha = w/t \quad (4)$$

- w*** Es la dimensión intermedia de la partícula.
- t*** Es la dimensión más pequeña de la partícula.

Modelo de Fredrickson y Bicerano (Fredrickson y Bicerano, 1999); En él, se plantea que las estructuras de adición presentan forma de disco, similar a placas, de tamaño regular, impermeables y con una orientación neta, pero sin un orden posicional (fase nemática), así mismo, los autores plantean que el centro de masa de los discos se encuentra aleatoriamente distribuido y sin correlaciones espaciales.

El modelo se encuentra centrado en análisis de regímenes diluidos y semidiluidos (figura 8); el primero supone que los discos del material adicionado presenta orientaciones distribuidas independientemente, mientras que la dispersión en los radios de los discos se asocia a un factor adicional en una función de distribución de tamaño normalizado, exceptuando a los discos de distribución de radio patológicamente alta, el régimen diluido, también considera al producto del radio del disco y la fracción de volumen pequeño en comparación con la unidad .

El régimen semidiluido, considera un radio mayor a la unidad, mientras que el volumen de la fracción es menor a la unidad, mientras que la difusión de la sustancia penetrante se vuelve tortuosa debido a que las barreras presentan una alta superposición

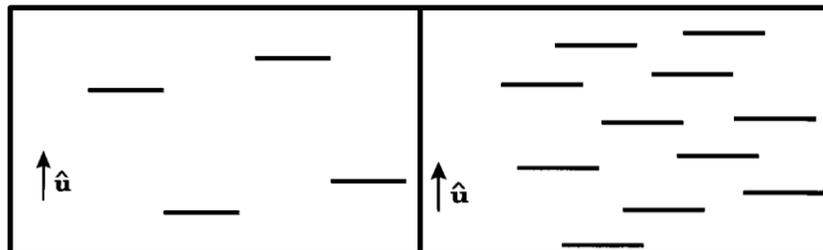


Figura 8.- a) Régimen diluido, b) Régimen semidiluido (Fredrickson y Bicerano, 1999).

La ecuación final del modelo de Fredrickson y Bicerano, se presenta en la ecuación 5.

$$\frac{P}{P_0} = 1/4 \left(\frac{1}{1 + a_1 \kappa \alpha \emptyset} + \frac{1}{1 + a_2 \kappa \alpha \emptyset} \right)^2 \quad (5)$$

Donde:

$P, P_0, \emptyset, \alpha$ Mantienen la misma definición
 κ Es un factor geométrico que viene dado por la ecuación 4

$$\kappa = \frac{\pi}{\ln \alpha} \quad (6)$$

Mientras que los valores de a_1 y a_2 se obtienen a partir de las siguientes expresiones:

$$a_1 = \frac{[2 - \text{sqrt}(2)]}{4} \quad (7)$$

$$a_2 = \frac{[2 + \text{sqrt}(2)]}{4} \quad (8)$$

Modelo de Bharadwaj (Bharadwaj, 2001); El modelo se basa en la permeabilidad solo debida a la tortuosidad generada por la presencia de estructuras (esféricas, cilíndricas, laminares, etc.) que modificaran la difusión de un penetrante, sin importar la geometría de estas, sin embargo, plantea la eficiencia de estructuras laminares al maximizar las trayectorias, debido a la longitud y ancho de estructuras laminares con respecto a otro tipo de geometrías.

Así mismo, el modelo describe, que las estructuras son colocadas de manera coincidente con la dirección de la difusión, lo que provoca una mayor tortuosidad, donde cualquier desviación del arreglo afectara a las propiedades de barrera, figura 9.

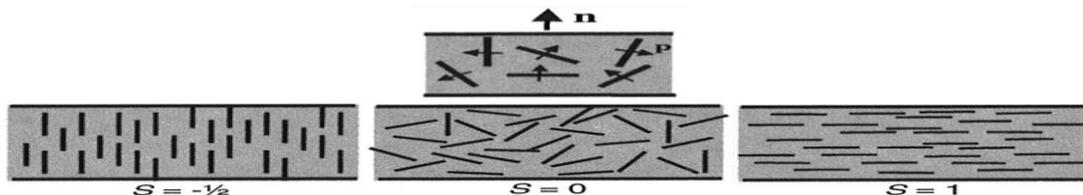


Figura 9.- Orientación predefinida (n) de las estructuras (p), con respecto al plano de la película, así como tres valores para el parámetro (s). Bharadwaj, 2001.

La mejoría de la permeabilidad de los materiales nanocompuestos es en gran parte debido a la delaminación (exfoliación) y la dispersión de las estructuras dentro de la matriz polimérica. Así mismo, dependiendo del grado de delaminación, las nanoestructuras adoptaran espaciamientos variables, o bien formaran agregados, la figura 10, muestra el efecto del incremento en la agregación y el decremento en la delaminación.

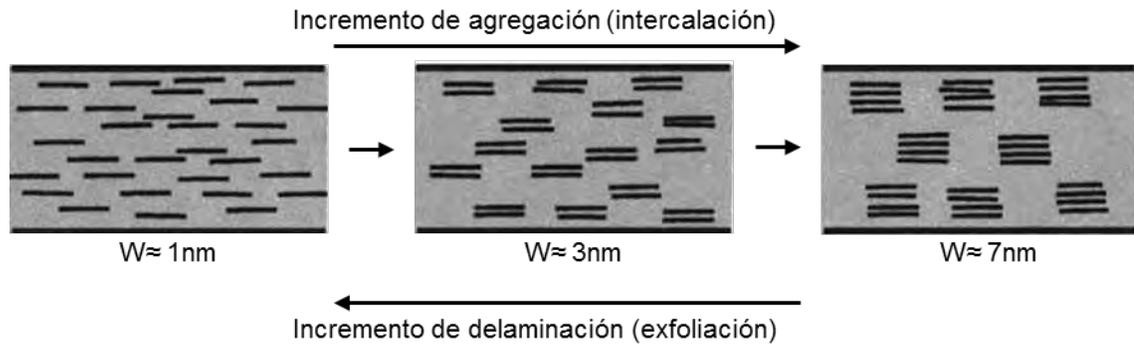


Figura 10.- Efecto de la delaminación y agregación, manteniendo una dirección paralela al plano de la película. Bharadwaj, 2001.

La ecuación de la permeabilidad en función al modelo de Bharadwaj se presenta en la ecuación 9.

$$\frac{P_s}{P_p} = \frac{1 - \phi_s}{1 + \frac{L}{2W} \phi_s \left(\frac{2}{3}\right) \left(S + \frac{1}{2}\right)} \quad (9)$$

Dónde:

- P_s, P_p** Permeabilidad de la nanoestructura y polímero.
- ϕ_s** Fracción volumétrica de la nanoestructura.
- L** Longitud de la nanoestructura.
- W** Espesor de la nanoestructura.
- S** Parámetro de orden, dado por la ecuación 8.

$$S = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1) \quad (10)$$

Dónde:

- θ Representa el ángulo entre la dirección de la orientación (n) y los vectores unitarios

Modelo de Lape, Nuxol y Cussler (Lape y col., 2004); Como Nielsen, este modelo asume que la adición de estructuras a una película polimérica mejora sus propiedades de barrera, a partir de la combinación de dos fenómenos:

- 1) La disminución del área disponible para la difusión, como resultado de la adición de estructuras impermeables que sustituyen al polímero permeable.
- 2) El incremento de la distancia que un fluido debe recorrer, debida a la tortuosidad por la presencia de estructuras en la película polimérica.

El modelo de Lape y colaboradores, asume que la permeabilidad relativa de un material compuesto puede presentar un arreglo regular o bien un arreglo aleatorio.

Arreglo regular:

$$\frac{P_0}{P_f} = 1 + \frac{\alpha^2 \phi^2}{1 - \phi} \quad (11)$$

$$\frac{t_{L,f}}{t_{L,0}} = 1 + \alpha^2 \phi^2 \quad (12)$$

Arreglo aleatorio:

$$\frac{P_0}{P_f} = \frac{[1 + (2/3) \alpha \phi^2]}{1 - \phi} \quad (13)$$

$$\frac{t_{L,f}}{t_{L,0}} = \left[1 + \frac{2}{3} \alpha \phi\right]^2 \quad (14)$$

Dónde:

- P₀** Película polimérica pura.
- P_f** Película polimérica compuesta.
- t_{L,0}** Periodo de tiempo en película pura.
- t_{L,f}** Periodo de tiempo en película compuesta.
- α** Razón de aspecto de la estructura, dada por la ecuación.
- ϕ** Fracción volumétrica de la estructura.

2.6.2 Propiedades mecánicas.

Los materiales poliméricos presentan propiedades visco-elásticas diferentes en función a su naturaleza, al ser sometidos a fuerzas externas y dependiendo de factores estructurales (peso molecular y estructura química, grado de

cristalinidad) y ambientales (humedad y temperatura), presentaran un comportamiento variable, por lo que estudios acerca del comportamiento mecánico en los materiales poliméricos son críticos para el control, aplicación y comercialización del material. Un ensayo de tracción o tensión permite medir la resistencia a esfuerzos de tracción, el estrés se define como la fuerza por unidad de área aplicada a la muestra. Cualquier cambio en la longitud, más exactamente la deformación por unidad de longitud, de la muestra como resultado de esta tensión se denomina tensión. La rigidez de un material se mide como la relación entre la tensión a la tensión y es la pendiente de la porción de línea recta de un diagrama de esfuerzo-tensión. Este valor se conoce como módulo de Young o módulo de elasticidad (Spence, 1994), por otro lado, la resistencia a la deformación plástica se define como la dureza del material. De manera general en películas poliméricas, las propiedades mecánicas son evaluadas a partir de ensayos de tensión, que permitan obtener información acerca del comportamiento de la película (fuerza de tensión, módulo elástico o módulo de Young, elongación al quiebre), sin embargo, las películas elaboradas a partir de proteínas, sin importar su origen, son sensibles al agua, debido a factores como su naturaleza hidrofílica y la adición de plastificantes hidrofílicos, que brindan termo-procesabilidad y flexibilidad a la película, por otro lado, las condiciones de alta humedad en el proceso de formación de la película, deriva en propiedades mecánicas en el material limitadas, en comparación a materiales de origen sintético, como el polietileno de baja densidad (Dufresne y col., 2013), la tabla 2, muestra las propiedades mecánicas de diferentes polímeros de uso comercial.

Tabla 2.- Propiedades mecánicas de diferentes polímeros (modificado de Crompton, 2012).

Polímero	Tensión al quiebre (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Elongación al quiebre (%)	Dureza superficial
Polímeros con carbono/hidrogeno				
LDPE (polietileno de baja densidad)	10	0.25	400	SD 48
HDPE (Polietileno de alta densidad)	32	1.25	150	SD 68
PE (Polietileno entrecruzado)	18	0.5	350	DS 58
PP (polipropileno)	26	2	80	RR 85
Etileno-prropileno	26	0.6	500	RR 75
Polimetil penteno	28	1.5	15	RR 70
Estireno-butadieno	28	1.6	50	SD 75
Estireno-etilen-butilen-estireno	6	0.002	800	SA 45
PS (poliestireno de alto impacto)	42	2.1	2.5	RM 30
PS de uso general	34	3	1.6	RM 80
Polímeros con oxígeno				
Epoxy (propósitos generales)	600	80	1.3	RM 113
Acetal (Polioximetileno)	50	27	20	RM 109
Poliésteres (bisfenol), poliéster laminado (fibra de vidrio)	280	16	1.5	RM125
Poibutilen tereftalato	52	2.1	250	RM 70
PET (polietilen tereftalato)	55	2.3	300	RM 30
PEEK (Polieter éter ketona)	92	3.7	50	RM 99
Dialil iosftalato	82	11.3	0.9	RM 112
Dialil ftalato	70	10.6	0.9	RM 112
Resina alquídica reforzada con fibra de vidrio	72	8.6	0.8	RM 125
poliarilatos	68	2.2	50	RM125
PC (policarbonato)	50	2.1	200	RM 70
Oxido de polifenil	65	2.5	60	RR119
Fenol-formaldehido	45	6.5	1.2	RM 114
Anhídrido maleico de estireno	52	3	1.8	RL 105
Acetato de celulosa	30	1.7	60	RR 71
Propionato de celulosa	35	1.76	60	RR 94
Acetato de celulosa acrílico butirato	70	2.9	2.5	RM 92
Etilen vinil acetato	17	0.02	750	SA 85

Polímeros con nitrógeno				
PA6 (poliamida 6)	40	1	60	SD 75
PA 4,6	100	1	30	SD 85
PA 11	52	0.9	320	RR 105
PA 6,9	50	1.4	15	SD 78
PA 12	50	1.4	15	SD 78
PA 6,6	59	1.2	60	RR 90
PA 6, 12	51	1.4	300	RR 105
(ABS) Nylon/acrilonitrilo-butadien-estireno	47	2.14	270	RR 99
PA- imida	185	4.58	12	RM 109
Poliamida	72	2.45	8	RM 100
Polieterimida	105	3.3	60	RM 109
PU (Poliuretano elastómero termoelastico)	24	0.003	700	SA 70
Elastomero éter ester amida urea formaldehido	57	10	0.6	RM 115
Estireno acrilonitrilo	72	3.6	2.4	RM 80
ABS	34	2.1	6	RR 106
Polímeros con Fluorina				
politetrafluoroetileno	25	0.70	400	RM 69
Fluoruro de polivinilo	40	1.4	150	SD 80
Polifluoruro de vinilideno	100	5.5	6	SD 90
Perfluoroalcoxi etileno	29	0.7	300	SD 60
Etilen tetrafluoroetileno	28	1.4	150	RR 50
Etilen clorotrifluoropropileno	30	1.7	200	RR 93
Etileno propileno fluorado	14	0.6	150	RR 45
Polimeros con clorina				
PVC (Poli cloruro de vinilo clorado)	58	3.1	30	SA 70
UPVC (PVC no plastificado)	51	3	60	RR 110
PVC plastificado	14-20	0.007-0.03	280-95	SA 85
Polímeros con sulfuro				
Sulfuro de polifenileno	91	13.8	0.6	RR 121
Polisulfona	70	2.65	80	RM 69
Polietersulfona	84	2.6	60	RM 80
Polímeros con silicón				
Silicones	28	3.5	2	RM 80
Valores a temperatura ambiente RM= Dureza Rockwell M 123 (duro) RR= Dureza Rockwell R112 SA 65= Dureza Shore A 65 (suave) SD 75= Dureza Shore 75				

Recientemente la investigación de materiales poliméricos de origen renovable se ha orientado al desarrollo de nuevas técnicas y uso de materiales que permitan optimizar sus propiedades, surgiendo así los materiales nanocompuestos; se ha reportado que la adición de materiales nanoestructurados, permite el reforzamiento de matrices poliméricas de fuentes renovables debido al incremento en la interacción del área superficial con la superficie del polímero (Özçalik, 2010).

Las nanopartículas de silicatos son los materiales más empleados para la optimización de matrices poliméricas a base de proteínas, desde su primera publicación en el año 2002, donde Zheng y col., reportaron por primera vez el efecto de la adición de montmorillonita no modificada a una matriz polimérica de gelatina, en dicha publicación se evidencio la mejora de propiedades en la matriz proteínica-nanoarcilla, tales como el Módulo de Young y la resistencia a la tensión. Actualmente, diversos estudios están dedicados al uso de nanoarcillas no modificadas (especialmente montmorillonita), debido a que tanto proteínas como arcillas no modificadas son de naturaleza hidrofílica, por lo que se espera que este tipo de nano reforzadores genere estados de nanodispersión mejoradas (intercaladas o exfoliadas) que resulten en la optimización de las propiedades mecánicas (Dufresne y col., 2013, Özçalik, 2010).

2.6.2a) Nanoindentación.

La Nanoindentación es un método de prueba mecánica para materiales, desarrollado a principios de los años 70's, que consiste en ejercer una fuerza de presión sobre el material de interés por medio de otro, cuyas propiedades se conozcan, produciendo una pequeña huella sobre el mismo, la cual se considera no destructiva. La escala de penetración se mide en nanómetros (10^{-9} m), requiere una preparación sencilla de la muestra y se caracteriza por efectuar una medición indirecta del área de contacto de la muestra, pues a diferencia de la indentación convencional, que calcula el área de contacto a partir de las impresiones residuales de la muestra, la Nanoindentación produce impresiones en el orden de los micrómetros, lo que dificulta su medición a partir de la impresión, por lo que emplea la profundidad de penetración del indentador sobre la superficie de la muestra, que aunado al conocimiento de la geometría del indentador, proporciona de manera indirecta el área de contacto (Fisher, 2011, Feng y col., 2010, Poon y col., 2008).

En general, la nanoindentación tiene como objetivo la obtención de la dureza y el módulo de elasticidad de un material en base a lecturas experimentales de la profundidad de penetración del indentador en función a la carga aplicada de manera gradual y localizada sobre las muestras.

2.6.2b) Curvas carga-desplazamiento.

Durante el ensayo de nanoindentación los datos de la fuerza de carga y desplazamiento son almacenados conforme la punta del indentador presiona sobre la superficie del material, generando un perfil de carga y descarga, el cual se traduce en una curva de carga-desplazamiento (curva p-h), donde la curva de carga representa la deformación elasto-plástica del material y la curva de descarga muestra el comportamiento del material tras la recuperación.

El análisis de los datos recabados en el ensayo de nanoindentación fue desarrollado a partir de diferentes métodos:

Oliver, Hutchings y Pethicai (1983) proponen un método basado en el análisis de las curvas de carga-desplazamiento y el conocimiento de la función de área del indentador (el área transversal del indentador como una función de la distancia desde la punta. El método propuesto se basó en la noción de que a una carga dada el material presentara la marca del indentador con cierta profundidad, estableciendo la profundidad de la huella del indentador como el resultado de la carga y el desplazamiento sobre el material, por lo que el área de contacto puede ser estimada directamente a partir de la función de área.

Doerner y Nix (1986), proponen el cálculo de la dureza y el módulo de elasticidad de los materiales a partir de los datos de las curvas de carga-desplazamiento, basándose en la observación del estado inicial y de descarga del material, comparando el comportamiento elástico del material indentado con una punción cilíndrica plana, por lo que el área de contacto permanece constante hasta que el indentador es descargado, así mismo proponen un método empírico para determinar el área de contacto, a partir de la extrapolación de la porción lineal de la curva de descarga al punto inicial de la carga y empleando la extrapolación de la profundidad con la función de área para determinar el área de contacto.

El método propuesto por Doerner y Nix, asume que la de descarga produce un efecto lineal, sin embargo, las gráficas de cargar-desplazamiento de los materiales rara vez son lineales, en base a estas observaciones, Oliver y Pharr

(1992), plantean que la comparación del comportamiento elástico del material con una punción cilíndrica plana sería inadecuada al emplear un indentador Berkovich, puesto que su área transversal varía permitiendo asumir que ninguna geometría presenta una forma perfecta, además debido a la plasticidad, una singularidad elástica no puede existir en la punta del indentador, mientras que la curvatura en la línea de descarga se puede estimar asumiendo que el área de contacto cambia continuamente durante la descarga.

La Organización Internacional de Normalización (ISO), publicó la norma ISO14577, que reglamenta las pruebas de indentación instrumentada en materiales metálicos, estableciendo que los ensayos de profundidad de penetración deberán estar en rangos en las escalas macro, micro y nano, definiendo los rangos de aplicación de la siguiente manera:

nanoindentación	$h_{\text{máx}} \leq 200 \text{nm}$
microindentación	$h_{\text{máx}} > 200 \text{nm}$ y $P_{\text{máx}} < 2 \text{N}$
macroindentación	$2 \text{N} \leq P_{\text{máx}} \leq 30 \text{kN}$

$h_{\text{máx}}$	Profundidad máxima de indentación
$P_{\text{máx}}$	Fuerza máxima del ensayo

2.6.2c) Modelos para la estimación de propiedades mecánicas y físicas de polímeros nanocompuestos.

La eficiencia de los materiales depende de propiedades y aplicaciones específicas, en función a esto, se han desarrollado diferentes métodos de predicción de propiedades en nanocompuestos, los cuales requieren de información acerca de los componentes individuales. Los modelos analíticos normalmente se desarrollan para analizar la composición o a materiales heterogéneos a nivel de los constituyentes individuales, en polímeros nanocompuestos los modelos analíticos se han empleado para la estimación de las propiedades físicas y mecánicas.

Modelo Halpin-Tsai- modelo teórico para la predicción de la rigidez en composites unidireccionales en función a su relación dimensional; permite la estimación del módulo, basado en el módulo del material de reforzamiento y la matriz del material (Ramakrishna y col., 2006, Zeng y Yu, 2010). El modelo presenta al módulo de Young longitudinal y transversal en la siguiente expresión (ecuación 15):

$$\frac{E}{E_m} = \frac{1 + \xi n v_f}{1 - n v_f} \quad (15)$$

Donde:

E, E_m= Módulo de Young en el composito y la matriz respectivamente
 V_f= Fracción volumétrica

Mientras que n se encuentra dada por la ecuación 16.

$$n = \frac{E/E_m - 1}{E_f/E_m + \xi_f} \quad (16)$$

Donde:

E_f = Representa el módulo de Young de la estructura de adición
 ξ_f = Parámetro de forma, depende de la geometría de la estructura y la dirección de carga

Cuando se calcula el módulo de carga longitudinal, ξ_f es igual a l/t , mientras que, si el módulo calculado es transversal, ξ_f es igual a w/t , donde los parámetros l , w y t , son la longitud, el ancho y el espesor de la estructura dispersada.

Modelo Mori-Tanaka- este modelo deriva los principios del modelo de inclusión de Eshelby (Kinloch y Taylor, 2006, Tandon y Weng, 1984) para la predicción del estrés elástico alrededor de una estructura de adición elipsoidal en una matriz infinita. El módulo elástico de una matriz isotrópica con un elemento de adición alineado esféricamente se da mediante las ecuaciones 17 y 18.

$$\frac{E_{11}}{E_m} = \frac{A_0}{A_0 + V_f(A_1 + 2\nu_0 A_2)} \quad (17)$$

$$\frac{E_{22}}{E_m} = \frac{2A_0}{2A_0 + V_f(-2A_3 + (1 - \nu_0)A_4 + (1 + \nu_0)A_5 A_0)} \quad (18)$$

Donde:

V_0 = Relación de Poisson en la matriz
 $A_0, A_1 \dots A_5$ = Tensión de Eshelby y propiedades de la estructura de adición y la matriz: módulo de Young, relación de Poisson, concentración de la estructura de adición y relación dimensional o de aspecto

2.6.3 Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).

Esta técnica de análisis estructural se basa en la medición de las frecuencias de vibración de los enlaces atómicos en las moléculas. Con esta se determinan los principales grupos funcionales de los compuestos que constituyen a las muestras. Esta técnica representa gran utilidad, pues no solamente proporciona información de la naturaleza química de las muestras a analizar, sino también permite asociar la absorción infrarroja con las propiedades mecánicas (resistencia a la ruptura, elongación), ópticas (índice de refracción, transmitancia, opacidad) y estructurales (módulo de Young), de las películas preparadas bajo distintas condiciones.

Fundamento-La espectroscopia de FTIR, se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la radiación de un haz de luz infrarroja, cuando la energía incidente sea igual a la energía necesaria para que ocurra una transición vibracional en la molécula. Se pueden distinguir dos tipos básicos de vibración; vibraciones por tensión y vibraciones de flexión (Koenig, 2001). La figura 11, presenta las diferentes vibraciones moleculares, donde los signos + y - corresponden a movimientos desde el plano de papel hacia el lector y en dirección contraria respectivamente.

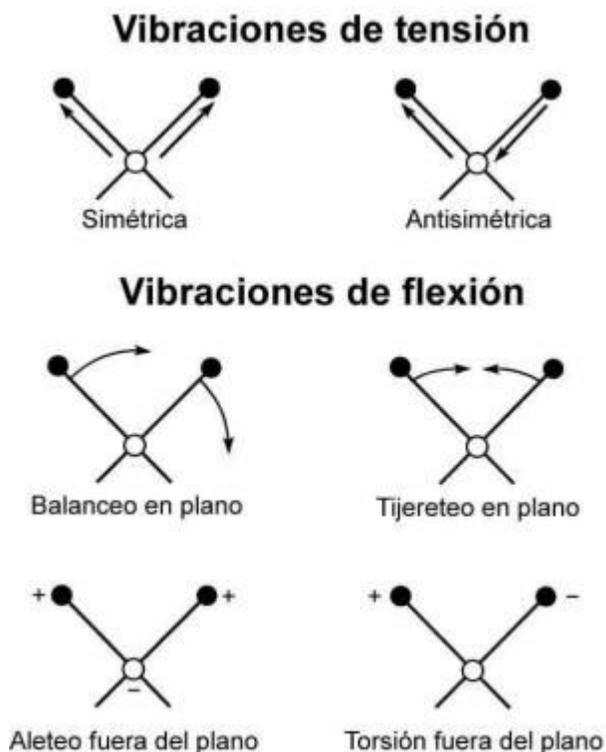


Figura 11. Tipos de vibraciones moleculares.

La espectroscopia de infrarrojo, aplicada al análisis de proteínas es una de las técnicas ampliamente utilizadas en las últimas décadas, Elliot y Ambrose, publicaron un trabajo, pionero de la aplicación de la espectroscopia de infrarrojo para el estudio de las subestructuras de la insulina, donde identificaron bandas vibracionales y frecuencias características de la amida I (Elliot y Ambrose, 1950, Dong y col., 1990).

El espectro de infrarrojo de una proteína, está compuesto de diversas bandas vibracionales que surgen de los grupos funcionales de los que se encuentra constituida, que permiten determinar la constitución de la cadena principal y las estructuras secundarias, a partir de la medición de la longitud de onda y la intensidad de absorción de la radiación infrarroja por la muestra, así mismo se ha reportado que la zona espectral más sensible a la conformación de la estructura secundaria es la región de la amida I ($1700-1600\text{cm}^{-1}$), la cual se encuentra constituida principalmente por las vibraciones del enlace C=O (aproximadamente 80%) y se encuentra estrechamente relacionada a la estructura del esqueleto

polipeptídico, por otro lado, la banda de la amida II se encuentra relacionada a las vibraciones de flexión del enlace N-H (aproximadamente 60%), las vibraciones de tensión de los enlaces C-N (aproximadamente 40%) y las vibraciones del enlace C-C, cuya contribución es aproximadamente 10% (Kong y Yu, 2007, Jiang y col., 2011)

El uso de la derivación de espectros de infrarrojo ha sido empleado para el análisis de proteínas, desde mediados de la técnica de los 50's, que permite separar dos bandas de absorción de longitudes de ondas muy cercanas permitiendo una mejor resolución espectral (Rodríguez, A., 2001). Por otro lado, el concepto de la deconvolución se basa en la ampliación de las bandas individuales, a partir de la separación de las áreas de cada banda, así las bandas que se superponen son distinguibles y la cuantificación de los componentes de la banda (estructura secundaria) es posible a partir de un ajuste de curva (Susy y Byler, 1986, Contreras y col., 2010, Castorena y col., 2011).

2.6.4 Propiedades morfológicas.

2.6.4a) Microscopia de fuerza atómica (AFM).

Mediante esta técnica es posible obtener imágenes de la naturaleza superficial de las películas (morfoloía). Los análisis de las propiedades morfológicas son de gran utilidad debido a que están asociadas a las propiedades mecánicas, ópticas y estructurales de estas, las cuales repercuten directamente en la permeabilidad de las películas.

Fundamento- La microscopia de fuerza atómica, permite la medición de la topografía de una superficie a una escala micrométrica a nanométrica, así mismo, permite la medición de diversas propiedades de superficie, a partir del sondeo de una superficie mediante el uso de una punta flexible. La interacción entre la punta y la superficie a analizar producirá una fuerza que se puede medir y trasladar a imágenes

2.6.4b) Microscopia electrónica de barrido (SEM).

Esta técnica permite de manera complementaria a AFM, la observación de la calidad superficial de las películas a analizar en este trabajo. En esta técnica, el área a analizar es irradiada por un haz de electrones, los cuales se dispersan en diversas direcciones de acuerdo con la morfología de la superficie, proporcionando una imagen de esta con varios órdenes de amplificación.

Fundamento- la microscopia SEM se basa en la interacción de los electrones sobre la superficie de la muestra, ofreciendo información sobre la estructura superficial.

2.6.5 Propiedades ópticas.

Espectrofotometría UV-visible: Esta técnica de análisis utiliza el espectro de luz UV-visible, para transmitir cada longitud de onda a través de la película y así determinar regiones de máxima transmisión (transparencia), así como regiones de absorción (opacidad), las cuales servirán de indicadores de la calidad visual de cada película preparada.

Fundamento- La espectroscopia de uv/vis, involucra la absorción de la radiación ultravioleta por una molécula, causando la transición de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberando el exceso de energía en forma de calor.



Alcances del proyecto

3.1 Justificación

Debido a la creciente necesidad de emplear materiales plásticos eco-amigables, en distintas aplicaciones como envolturas de productos alimentarios, empaques secundarios, recubrimientos y para la elaboración de diversos productos, ha surgido el interés por desarrollar materiales y tecnologías para la obtención de películas con estas cualidades, a partir de recursos renovables (*Jatropha curcas* L.), que no amenacen a los recursos alimenticios, tales como los recursos agroindustriales.

3.2 Hipótesis

El uso de nanoarcillas (montmorillonita) y materiales nanoestructurados (SiO_2 y TiO_2), inmersos en una matriz polimérica de proteínas de *Jatropha curcas* L., permite controlar (aumentar o disminuir) el intervalo de permeabilidad al vapor de agua y oxígeno a través de una película, así como modificar las propiedades mecánicas, ópticas y morfológicas de ésta.

3.3 Objetivo general

Obtener películas biodegradables elaboradas a partir de proteínas presentes en la semilla de *Jatropha curcas* L., con incorporación de compuestos nanoestructurados empleando métodos de dispersión continua.

3.3.1 Objetivos particulares

1. Obtener películas poliméricas a partir de la fracción proteínica glutelina, presente en la harina de semillas de *Jatropha curcas* L., obtenida como subproducto del proceso de prensado para la obtención de aceite de *Jatropha curcas* L.
2. Caracterizar química, física y estructuralmente películas poliméricas de *Jatropha curcas* L., con presencia de la nanoarcilla montmorillonita (cloisita Na⁺), a fin de analizar sus propiedades de barrera, mecánicas, morfológicas, ópticas, estructurales.
3. Desarrollar una metodología de preparación de películas poliméricas de *Jatropha curcas* L. con presencia de nanoarcillas que tengan propiedades de barrera ubicadas aplicaciones en alimentos y fármacos.
4. Desarrollar una metodología de preparación de películas poliméricas de *Jatropha curcas* L. con presencia de nanoarcillas; que tengan propiedades mecánicas y morfológicas requeridas para su posible uso como empaques secundarios.

3.4 Descripción del proyecto

Las propiedades físico-químicas de los nanomateriales dependen fuertemente de las dimensiones de sus unidades estructurales básicas, y suelen ser muy diferentes de las correspondientes al mismo material no nanoestructurado (Roco, 2002), actualmente existe un notable interés científico y tecnológico por los nanomateriales debido a que sus propiedades inusuales generan, a menudo, nuevas aplicaciones (Gleiter, 1989, Gleiter, 2000). Con la nanotecnología, el reordenamiento de los átomos en un arreglo permite crear materiales con otras características específicas, con la finalidad de hacer mejoras en las áreas de construcción, almacenamiento de datos o disminución de espacio, materiales plásticos y biomateriales. En estas dos últimas áreas, se desea implementar la nanotecnología para la elaboración de materiales plásticos de fuentes renovables con un mayor rendimiento y menor costo de producción, que agreguen funcionalidad al mismo; para mejorar la preservación y las características de los alimentos, así como para facilitar su transporte.

Respecto a los nanomateriales que se pueden estudiar, se ha trabajado básicamente sobre: Arcillas del tipo esmectitas y óxidos metálicos (figura 12).

Arcillas Esmectitas	
Dioctaedricas { Montmorillonita Trioctaedricas { Hectorita Laponita	Filosilicatos de estructura 2:1 Tipo TOT: T-Tetraédrica O- Octaédrica T-Tetraédrica
Óxidos metálicos	
SiO ₂ (a) { Red tridimensional Resistencia química y térmica Incoloro	
TiO ₂ (b) { Estabilidad química y térmica Semiconductor	

Figura 12.- Estructuras empleadas para la elaboración de materiales plásticos.

Para este proyecto, se desea establecer la metodología necesaria para la obtención de películas biodegradables a partir de proteínas contenidas en la semilla de *Jatropha curcas* L., incorporando a la solución formadora de película, macromoléculas o nanoestructuras que permitan potencializar las propiedades mecánicas y de barrera, de los materiales unicomponentes del mismo origen, empleando metodologías de dispersión continua. Esta técnica podría representar una manera económica y practica de obtener películas con características optimizadas de propiedades mecánicas y de barrera que puedan representar un potencial uso tecnológico.

IV

Desarrollo experimental

4.1 Materiales

4.1.1 Elemento nanoestructurado

El elemento nanoestructurado fue suministrado por BYK additives & Instruments (tabla 3).

<p>Cloisita Na⁺ Bentonita natural (Bentonita 99-100%) Cuarzo <1%)</p>	<ul style="list-style-type: none">❖ Color: Blanco-amarillo claro❖ Humedad: 4-9%❖ Tamaño típico de partícula: <math><\mu\text{ m}</math> (d₅₀)❖ Densidad: 2.86g/cm³❖ Rayos X: d₀₀₁= 1.17nm❖ pH 9.0, al 2% de dispersión❖ Gravedad específica: 2.80-2.90
--	--

Tabla 3.- Compuestos nanoestructurados propuestos.

4.1.2 Proteína

Se utiliza la fracción proteínica de glutelina, presente en la semilla de *Jatropha curcas* L., empleando ecotipos no tóxicos. El fraccionamiento proteínico se realiza en función a la solubilidad de las diferentes fracciones proteínicas presentes en la semilla, figura 13.

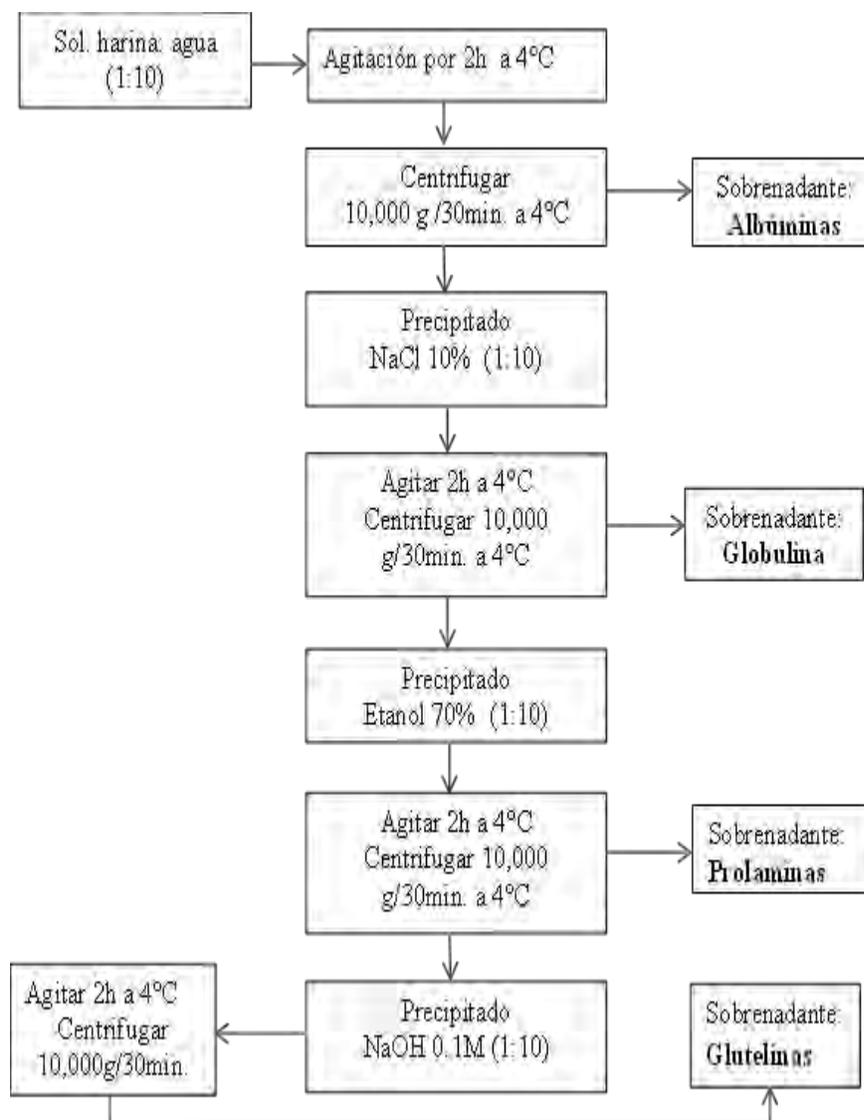


Figura 13.- Fraccionamiento proteínico de la semilla de *Jatropha curcas* L. (Peralta L., 2004).

4.2 Métodos

4.2.1 Proceso general para la obtención de películas de glutelina nanocompuestas

La obtención de los materiales nanocompuestos elaborados a base de glutelina de *Jatropha curcas* L. se desarrollaron en base a la estrategia experimental mostrada en la figura 14.

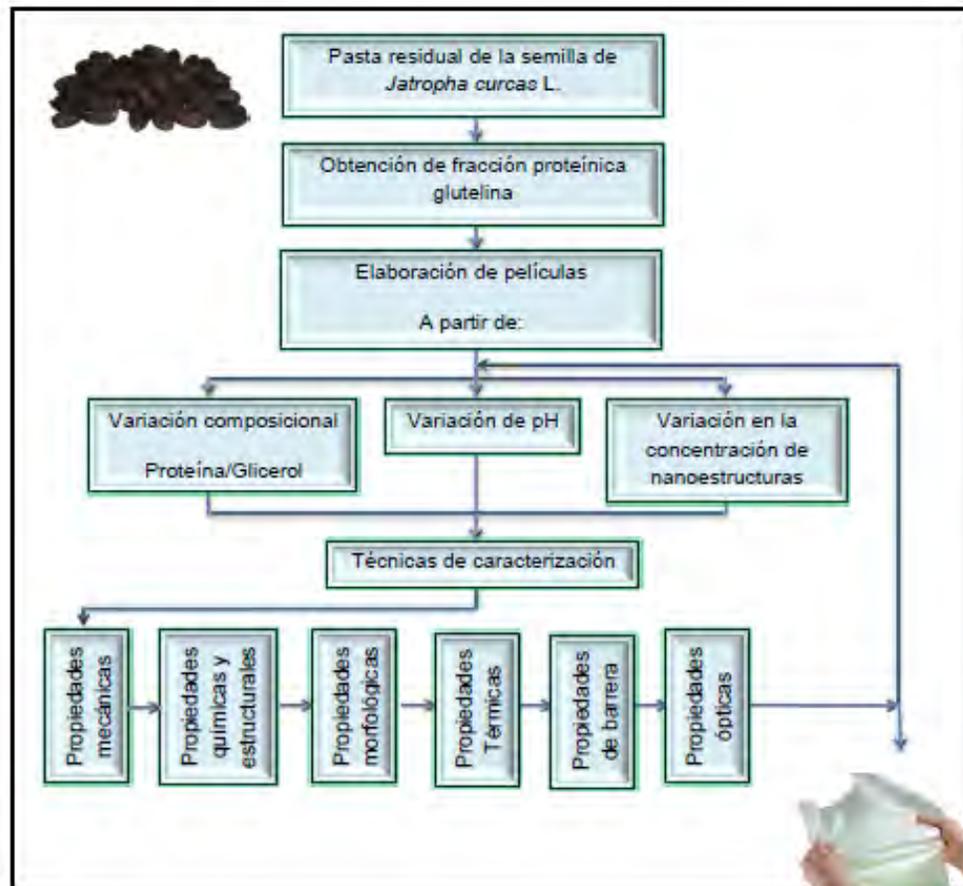


Figura 14.- Estrategia experimental.

4.2.2 Diseño experimental

Se emplea un diseño experimental que consiste en una matriz con tres factores (concentración de glicerol, contenido de nanoestructura y valor de pH), con tres niveles de experimentación, las variables de respuesta (figura15).

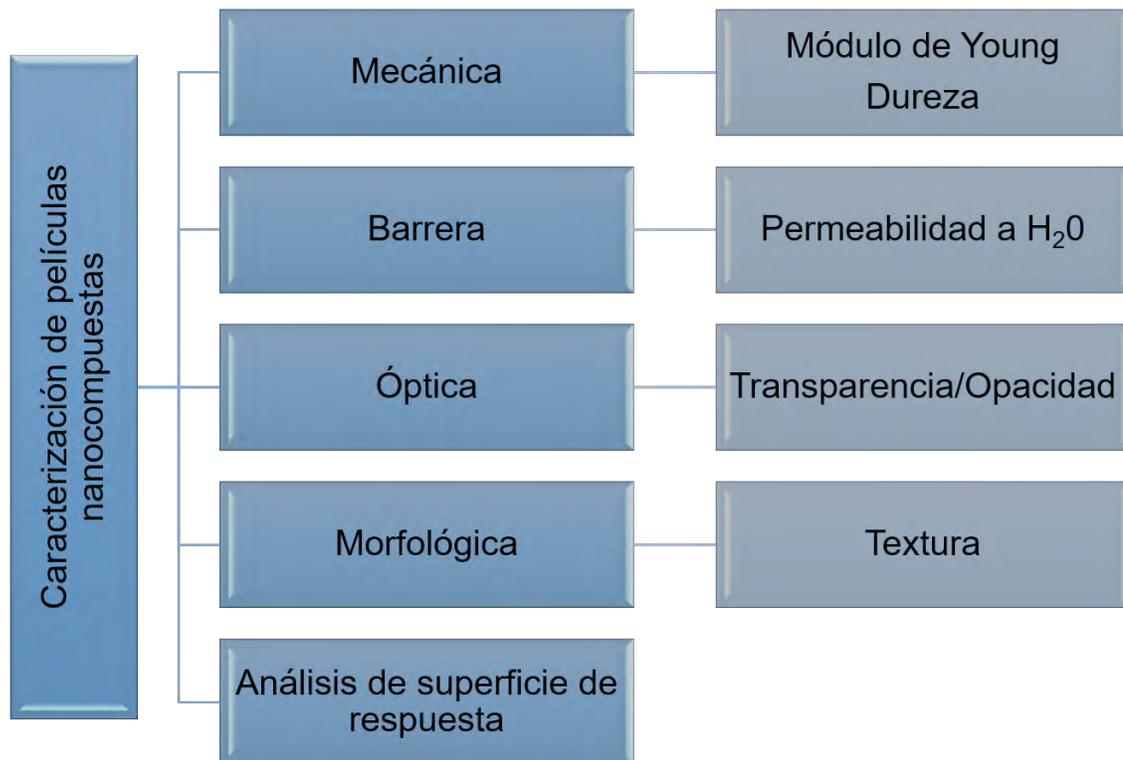


Figura 15. Variables de respuesta para el estudio de películas de glutelina de *Jatropha curcas* L. nanocompuestas.

Se emplea un diseño experimental Box-Benhken que permita encontrar la relación entre las funciones de respuesta y las variables de estudio. Box-Benhken es un diseño de segundo orden rotatable, que se basa en un diseño factorial incompleto de tres niveles, que requiere un numero de experimentos de acuerdo con (ecuación 19):

$$N = k^2 + k + c_p \quad (19)$$

Donde:

N	Número de experimentos
k	Es el número de factores
c_p	Es el número de réplicas del punto central

El diseño Box-Benhken es un sistema esférico, que visto como un cubo (Figura 16), consiste en las réplicas de un punto central y los puntos medios de los bordes del cubo (Aslan y Cebeci, 2006, Ferreira y col., 2007).

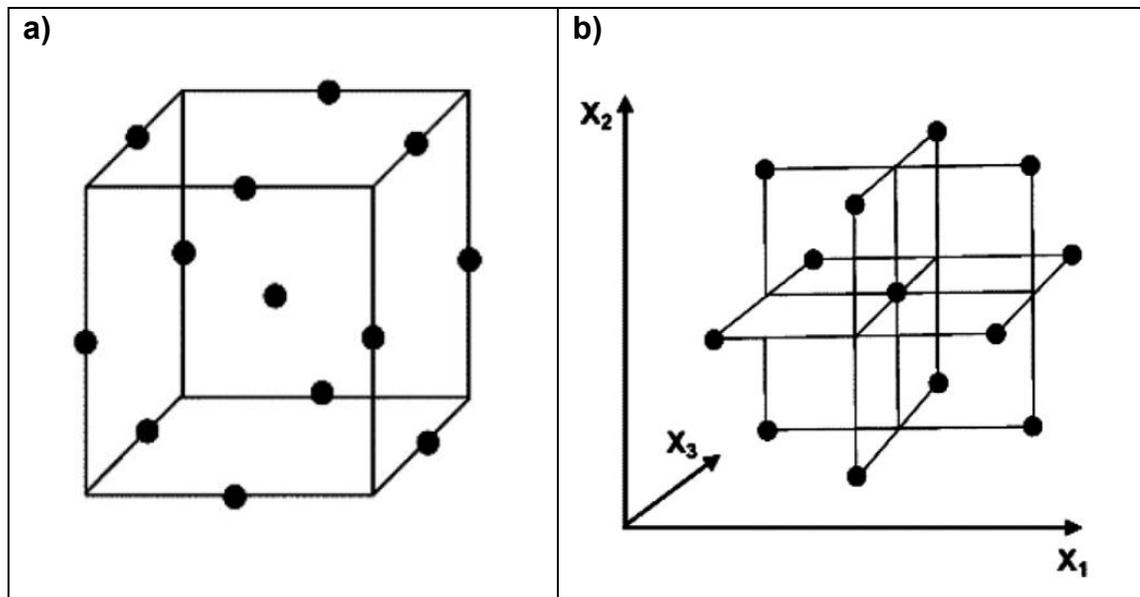


Figura 16.- Diseño experimental Box-Benhken; a) diseño derivado de un cubo, b) representación entrelazada como un diseño factorial 2^2 (Aslan y Cebeci, 2006).

Para el diseño experimental Box-Benhken, un total de 17 experimentos, incluyendo cinco puntos centrales fueron llevados a cabo (tabla 4).

Tabla 4.- Niveles y variables seleccionadas para el diseño Box-Benhken.

Variable	Símbolo	Niveles de variables codificadas		
		Bajo	Centro	Alto
		-1	0	+1
<i>Concentración glicerol</i>	X ₁ (gr/100gr de glutelina)	40	50	60
<i>Concentración nanoestructura</i>	X ₂ (gr/100gr de glutelina)	5	10	20
<i>pH</i>	X ₃	10	11	12

La influencia de las variables de estudio sobre las diferentes respuestas fue a analizada por medio del software Design Expert® 10.0.3.

La significancia para cada termino en la ecuación es la estimada para caso, así mismo, los resultados fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA), determinando el efecto y la regresión de los coeficientes individuales.

En función de visualizar la relación de las respuestas y los niveles experimentales de cada factor, se emplearon los coeficientes de regresión para la realización de gráficos de superficie y contorno a partir de las ecuaciones polinomiales.

Los gráficos fueron realizados manteniendo dos factores constantes variando el tercer factor, en función de comprender los efectos principales de las variables en las respuestas, así como sus interacciones.

El efecto de cada variable independiente sobre cada respuesta se determinó a partir de los datos experimentales, a partir del modelo propuesto para cada respuesta Y (ecuación 20):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (20)$$

Donde:

Y= Respuesta

X₁= Glicerol

X₂= Nanoestructura

X₃= pH

b₀= Intersección

b₁, b₂, b₃= Coeficientes lineales

b₁₁, b₂₂, b₃₃= Coeficientes cuadráticos

b₁₂, b₁₃, b₂₃= Coeficientes de interacción

Para cada respuesta se generó un gráfico de superficie, a partir de la ecuación de regresión, así mismo se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de los datos obtenidos (tabla 5).

Tabla 5.- Arreglo para el diseño experimental.

Corrida	Variables codificadas			Variables actuales		
	X ₁	X ₂	X ₃	Glicerol X ₁ (%)	Cloisita X ₂ (%)	pH X ₃
1	0	-1	1	50	0	12
2	0	1	1	50	20	12
3	0	0	0	50	10	11
4	0	1	-1	50	20	10
5	-1	0	-1	40	10	10
6	0	-1	-1	50	0	10
7	-1	1	0	40	20	11
8	0	0	0	50	10	11
9	0	0	0	50	10	11
10	-1	-1	0	40	0	11
11	1	0	-1	60	10	10
12	0	0	0	50	10	11
13	1	0	1	60	10	12
14	1	1	0	60	20	11
15	0	0	0	50	10	11
16	1	-1	0	60	0	11
17	-1	0	1	40	10	12

4.2.3 Elaboración de películas

Se elaboraron películas de glutelina nanocompuestas, plastificadas con glicerol con las siguientes condiciones:

La elaboración de las películas se efectuó por un método de dispersión continua, para las muestras realizadas como controles, se prepararon soluciones proteínicas, se ajustó el pH y se adiciono glicerol como plastificante. Las soluciones formadoras de película fueron calentadas en baño de agua durante 1 hora, alcanzando 80°C y manteniendo agitación magnética constante. Mientras que las muestras nanocompuestas se realizaron dispersando al elemento nanoestructurado en agua destilada, manteniendo agitación constante durante 2 horas, para posterior ser sonicadas durante 45 minutos a temperatura ambiente, de manera simultánea se disuelve la proteína en agua destilada, aplicando calor

y manteniendo agitación magnética constante y adicionando glicerol como plastificante.

El pH de las soluciones se ajustó a los valores deseados. Ambas soluciones son mezcladas para ser tratadas bajo las mismas condiciones que las soluciones control; calentamiento en baño de agua, alcanzando 80°C durante una hora manteniendo agitación magnética constante posterior al calentamiento, las muestras fueron sonicadas a temperatura ambiente durante 30 minutos.

El proceso de secado se realizó vertiendo las soluciones en cajas Petri de vidrio para evaporar el disolvente en horno de secado a 60°C durante 24 horas.

Los valores de pH que se empleados fueron de 10, 11 y 12, la concentración de plastificante fue de 40, 50 y 60 %(p) con respecto al contenido de proteína mientras que la concentración de nanoestructura fue de 0, 5, 10 y 20 %(p) con relación al contenido de proteína.

4.3 Caracterización de películas nanocompuestas

Previo a la caracterización, los materiales nanocompuestos fueron acondicionados en desecador con silica durante 7 días. El espesor fue determinado empleando un micrómetro digital Mitutoyo con un error instrumental de $\pm 3\mu\text{m}$.

4.3.1 Propiedades morfológicas

4.3.1a) Microscopia electrónica de barrido (SEM)

se obtuvieron micrografías SEM por medio de un microscopio electrónico de barrido ambiental (TESCAN SEM Vega TS-5136SB) de imágenes de microscopía digital. El voltaje de aceleración fue de 10-30 kV, así mismo el equipo cuenta con un detector de electrones retrodispersados y electrones secundarios.

4.3.1b) Microscopia de fuerza atómica (AFM)

De manera complementaria a SEM. LA microscopia de fuerza atómica se empleó para el análisis de la morfología de la superficie en las películas de glutelina nanocompuestas por medio de un microscopio de fuerza atómica Quesant Instrument Corporation, modelo QSCOPE-250.

4.3.2 Propiedades químicas y estructurales

4.3.2a) Espectroscopia infrarroja (FTIR)

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) empleando un sistema Bruker Mod. Vertex 70, provisto del software Opus (figura 17).



Figura17.- Sistema Bruker Modelo Vertex 70.

El espectrofotómetro FTIR se empleó en modo Transmitancia, operando bajo la técnica de ATR y empleando el accesorio MIRacle Pressure Clamp de PIKE technologies, con medidor y abrazadera digital de alta presión Para la obtención y procesamiento de los datos, se realizaron 120 escaneos para la muestra y 60 escaneos para la línea de base para cada espectro, el registro se realizó en la región de frecuencia de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 4 cm^{-1} .

La segunda derivada y deconvolución de los espectros se obtuvieron por las funciones diferenciar y fit multiple peaks respectivamente del software originlab

4.3.3 Propiedades mecánicas

4.3.3a) Nanoindentación

Se empleó un nanoindentador, modelo Nanoindentation Tester NHT de la marca CSM Instruments, Suiza. El equipo cuenta con una punta de diamante, tipo Berkovich, con una penetración máxima de $200\text{ }\mu\text{m}$ y puede aplicar un intervalo de carga de $0.1-500\text{ mN}$ con una resolución de $0.04\text{ }\mu\text{m}$. Cuenta con un microscopio óptico con epiluminiscencia con objetivos de 5 X y 100 X (figura 18).



Figura 18.- Nanoindentador, modelo Nanoindentation Tester NHT, CSM Instruments.

4.3.4 Propiedades de barrera

La permeabilidad de las películas nanocompuestas fue determinada gravimétricamente, empleando una versión modificada del método estándar ASTM-E96-93 para películas de alginato (Rangel y col., 2014).

Se emplearon muestras con 5 cm de diámetro, las cuales fueron colocadas en celdas de vidrio que contenían 5ml de agua destilada, dejando un espacio entre la superficie de la película con el agua de 2.5 cm. El sistema fue colocado en desecador con una solución saturada de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, una humedad relativa de 33% y una temperatura de 25°C.

La ganancia de peso fue monitoreada en intervalos de 24 horas, durante 5 días para determinar la velocidad de transmisión del vapor de agua, así como los valores de permeabilidad a vapor de agua de las películas.

V

Resultados

5.1 Propiedades morfológicas

5.1.1 Microscopia electrónica de barrido – SEM

La microscopia electrónica de barrido fue empleada para analizar la morfología de la cloisita Na⁺ así como la homogeneidad de su distribución dentro de la matriz polimérica y su efecto en las propiedades de los materiales.

La figura 19, muestra la morfología de la arcilla sin exfoliar. La cloisita Na⁺, presenta un aspecto primario asociación de láminas apiladas, generando una morfología agregada irregular, en algunas zonas se aprecia la forma del silicato; hojuelas voluminosas, laminares, apiladas con una relación de aspecto de alrededor de 200µm de longitud, 100µm de ancho y alrededor de 12.5µm de espesor. Se observan estructuras de superficie tanto lisa como rugosa.

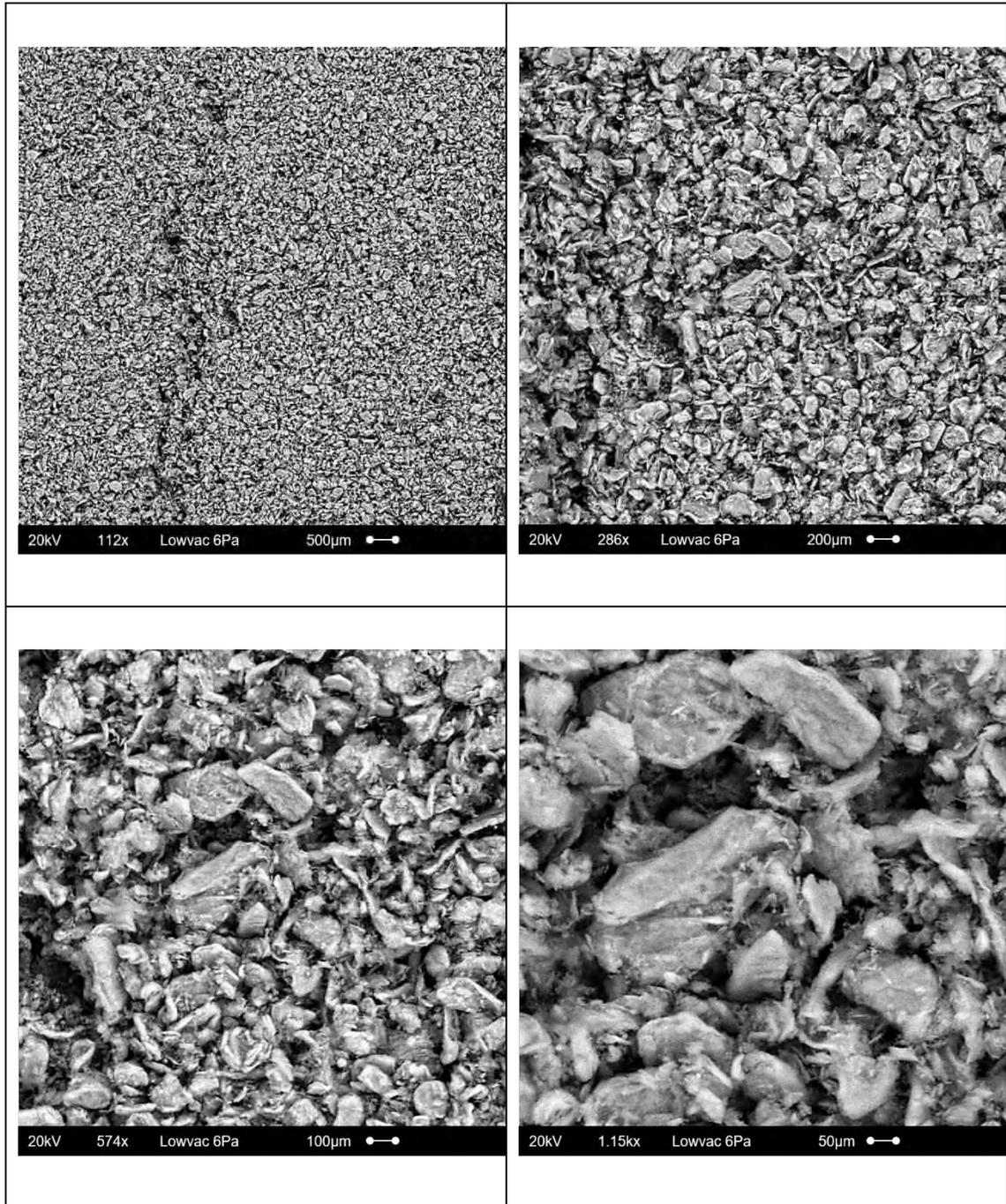


Figura 19.- Micrografías SEM de Cloisita Na⁺.

La figura 20, presenta las imágenes por microscopía electrónica de barrido de películas bio-nanocompuestas de *glutelina de Jatropha curcas* L. sin la presencia de cloisita (a) y con 20% de arcilla (b), ambas muestras fueron realizadas con un valor de pH para la solución filmogénica de 10 y 40% (peso) de glicerol. La película de glutelina presenta una morfología rugosa con partículas de proteína que sobresalen la superficie, Ogale y col. (2000), destacan que la formación de crestas y valles formadas por partículas de proteína son debidas a una deformación de la matriz proteínica formada después de la consolidación de las partículas de proteína individuales y que este, es el resultado del efecto del contenido de plastificante.

La imagen microscópica de la película nanocompuesta muestra además de las partículas de proteína, láminas de arcilla con un tamaño promedio de 2-5 μ m distribuidas por la superficie de la película. Se observan cavidades, las cuales podrían ser atribuidas a burbujas de aire disueltas durante el proceso de vaciado y secado.

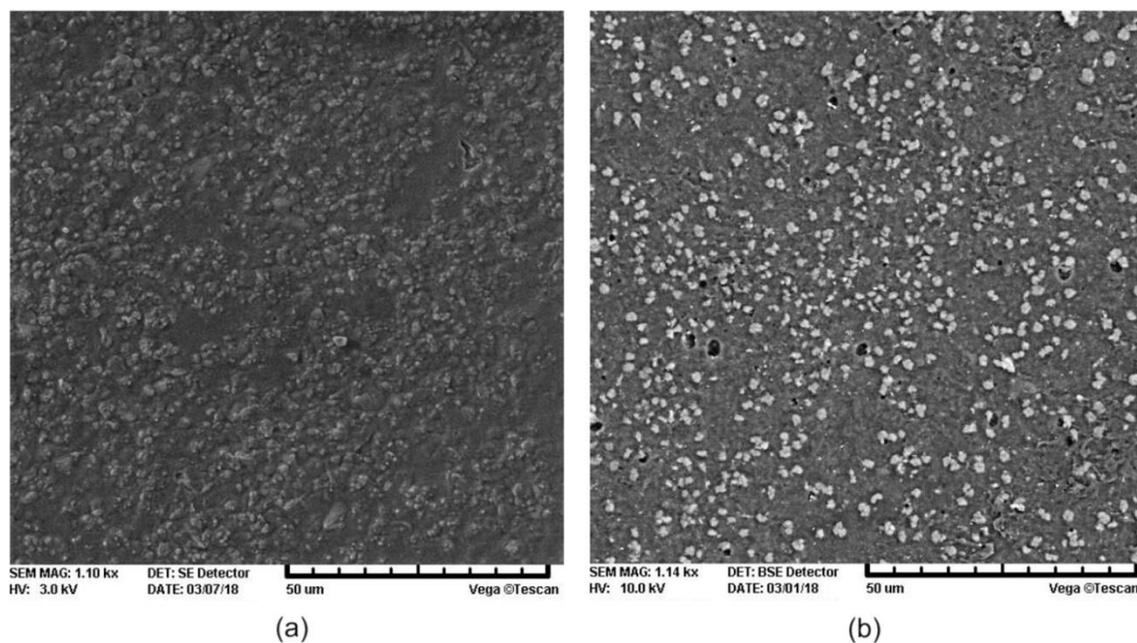


Figura 20.- Micrografías SEM a) película de proteína de glutelina, b) película nanocompuesta (20% cloisita Na⁺).

5.1.2 Microscopia de fuerza atómica - AFM

El análisis topográfico de las diferentes muestras se efectuó mediante microscopia de fuerza atómica, las figuras 21, 22, 23 y 24 muestran las imágenes topográficas de películas de glutelina y películas nanocompuestas con cloisita Na⁺ con diferentes concentraciones de plastificante (40-60% en peso) y pH (10-12).

Las imágenes muestran una superficie rugosa, con perfiles lineares que atraviesan la superficie de la muestra para mezclas con 40% de glicerol, sin embargo al incrementar la concentración de plastificante se observan superficies más dúctiles menos rugosas, la morfología de las películas muestran la presencia de glóbulos de proteína la microscopia de fuerza atómica deja ver una superficie heterogénea con agregados que indican que la rugosidad de la muestra es dependiente de la concentración de arcilla, así mismo, característica reportada para materiales de origen proteínico de diferentes fuentes nanocompuestos con silicatos. Debido al solapamiento de partículas el espesor local muestra variaciones.

Por otro lado, en función del pH de las soluciones filmogénicas, se obtuvo una superficie rugosa para muestras con pH 10, mientras que un pH de 12 resulta en superficies con una morfología menos rugosa, probablemente debido a la interacción proteína-silicato (figuras 24, 25 y 26), con la presencia de picos y valles que indican diferentes grados de ductilidad, donde la parte oscura de la imagen representa al polímero, mientras que las zonas claras son indicativas de la presencia de la arcilla. Las micrografías muestran la influencia del pH en la morfología de las películas, promoviendo un cambio conformacional en la estructura de las cadenas de proteína.

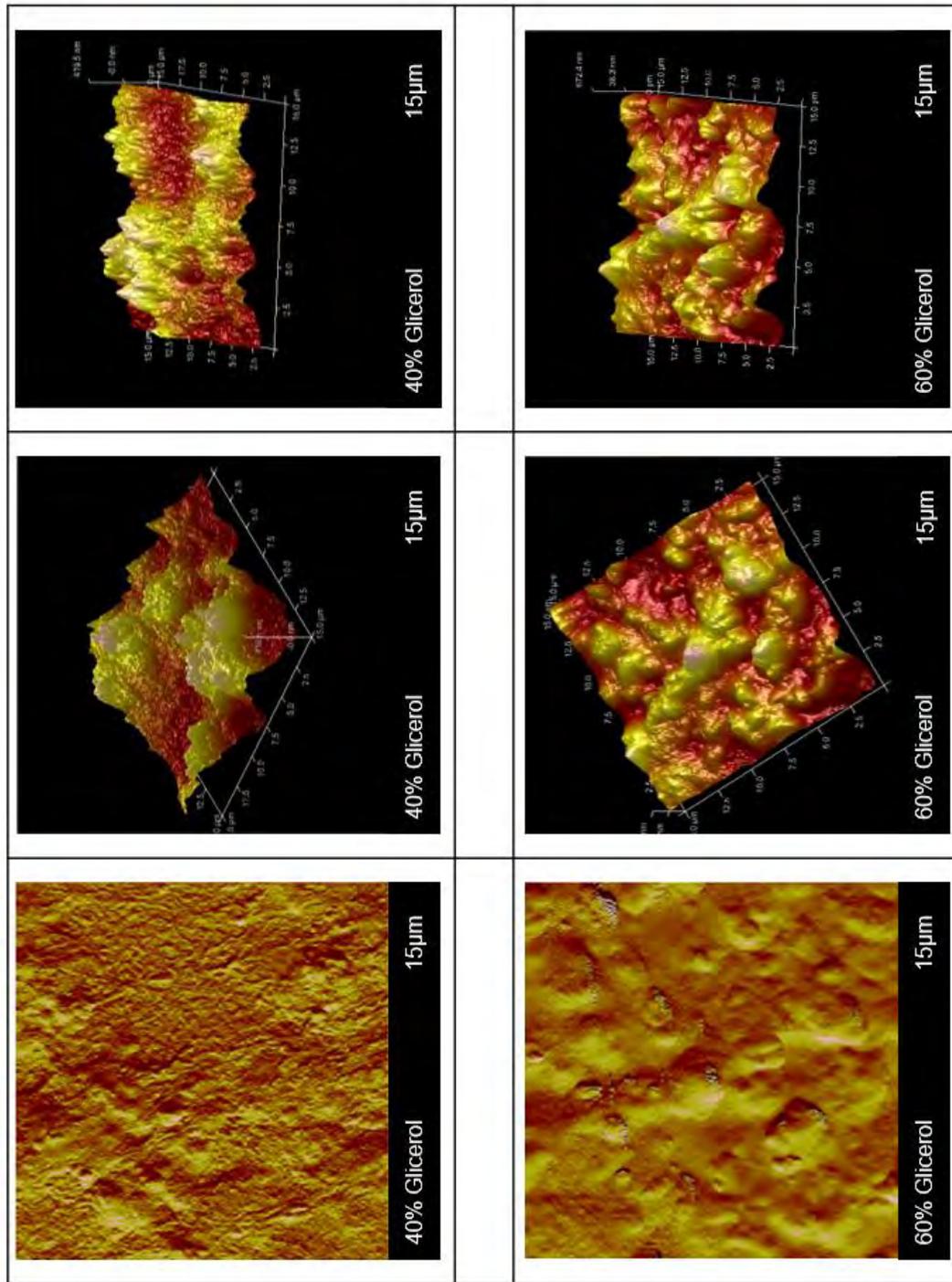


Figura 21.- Micrografías AFM de películas de glutelina de *Jatropha curcas* L. pH 10

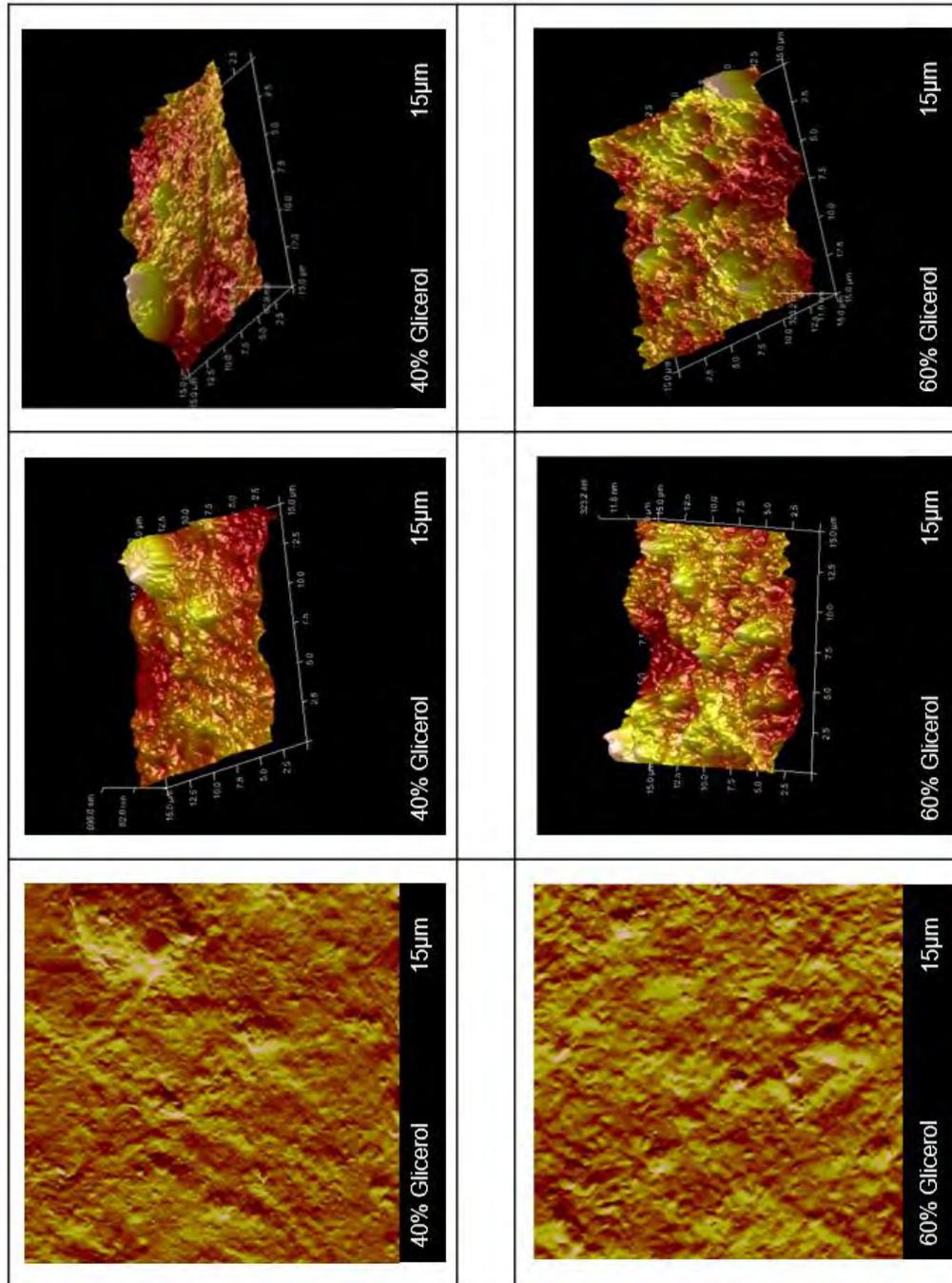


Figura 22.- Micrografías AFM de películas de glutelina de *Jatropha curcas* L. nanocompuestas con cloisita Na⁺ (20%), pH 10.

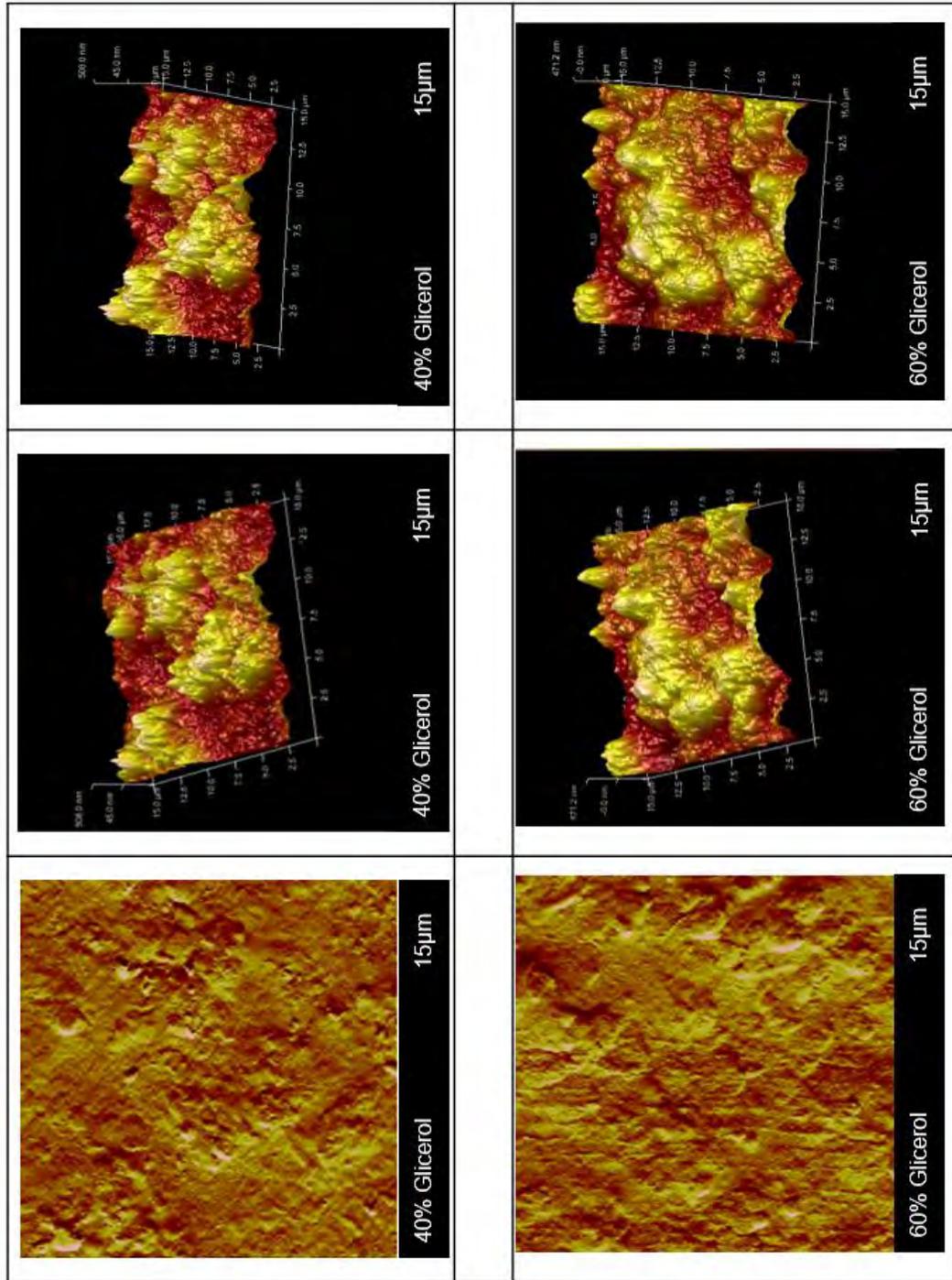


Figura 23.- Micrografías AFM de películas de glutelina de *Jatropha curcas* L. pH 12.

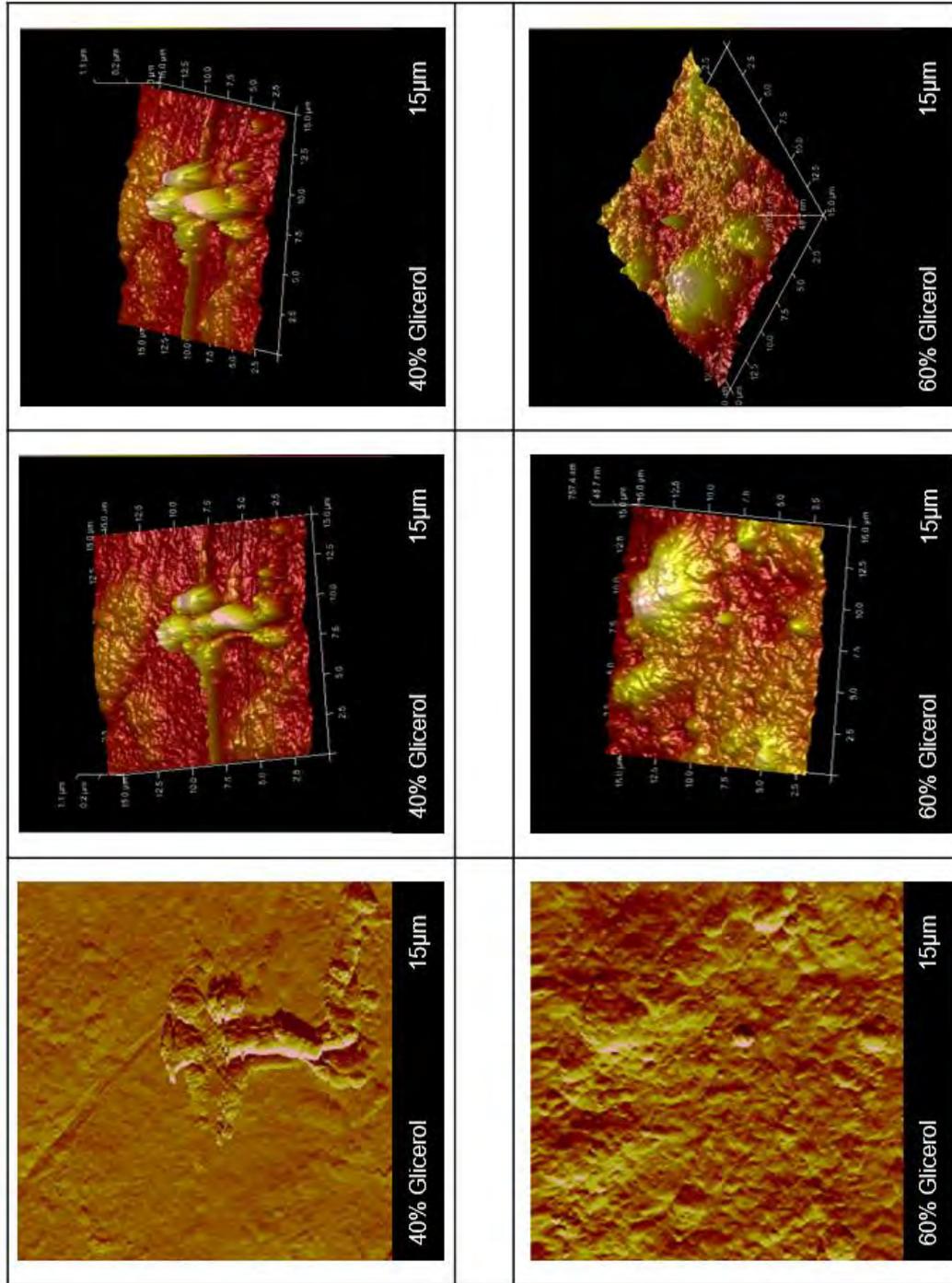


Figura 24.- Micrografías AFM de películas de glutelina de *Jatropha curcas* L. nanocompuestas con cloisita Na⁺ (20%), pH 12.

Gunning y col. (1996), analizaron la estructura interfacial de películas de albúmina de suero bovino (BSA) y β -caseína por medio de espectroscopía de fuerza atómica, las imágenes mostraron una morfología esponjosa, compuesta de objetos globulares que se sugiere son moléculas de BSA y β -caseína respectivamente, así mismo se sugiere que las estructuras globulares son deformables e incrementan su área al disminuir la superficie de cobertura, incrementando el espesor.

De Paula y col. (2004), estudian la morfología de películas comestibles de suero lácteo por medio de microscopía de fuerza atómica, evaluando el efecto del pH, la concentración de proteína y plastificante en la rugosidad del material y esta con la permeabilidad de este. Los resultados mostraron una influencia del pH en la morfología de los materiales, debido a este propicia un cambio en la estructura conformacional de la cadena de proteína, lo que genera cambios en la rugosidad

Por otro lado, Hong y col. (2011), evaluaron el efecto del tipo de arcilla en las propiedades del material, en películas nanocompuestas a base de agar y arcillas tipo Cloisita Na⁺, Cloisita 30B y Cloisita 20A; las imágenes morfológicas, mostraron una diferencia en la rugosidad superficial, mientras que el cálculo de la rugosidad media mostro una dependencia de la rugosidad en función al tipo de arcilla, así mismo las muestras con Cloisita Na⁺, presentaron una mayor rugosidad, lo cual fue atribuido a la compatibilidad entre la arcilla con la matriz polimérica.

Ayala y col. (2016), estudiaron el efecto de la laponita y su concentración en las propiedades físicas y morfológicas de películas de gelatina, observando que la rugosidad en las películas nanocompuestas incrementaba con la presencia de la laponita, el incremento en la concentración de silicato fue relacionado con la optimización de las propiedades mecánicas de los materiales; incrementando los valores de modulo elástico, fuerza de tensión, sin embargo la presencia de la arcilla no afecto propiedades físicas como el espesor, color, brillo y opacidad, contenido de humedad, permeabilidad a vapor de agua, propiedades térmicas y cristalinidad.

5.2 Análisis químico y estructural

5.2.1 Espectroscopia de infrarrojo

Se obtuvieron los espectros de infrarrojo de los componentes de la matriz polimérica, la figuras 25 y 26, muestran los espectros de la proteína y el glicerol respectivamente.

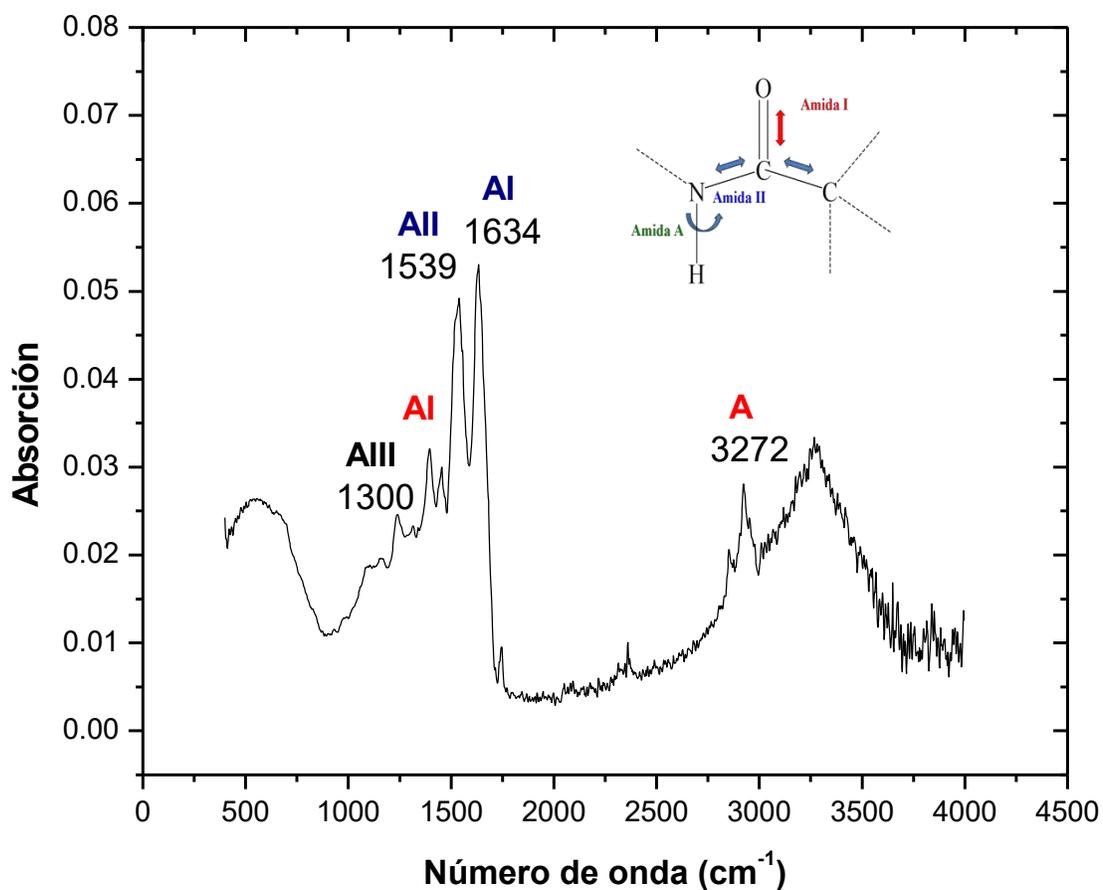


Figura 25.- Espectro de FTIR de glutelina.

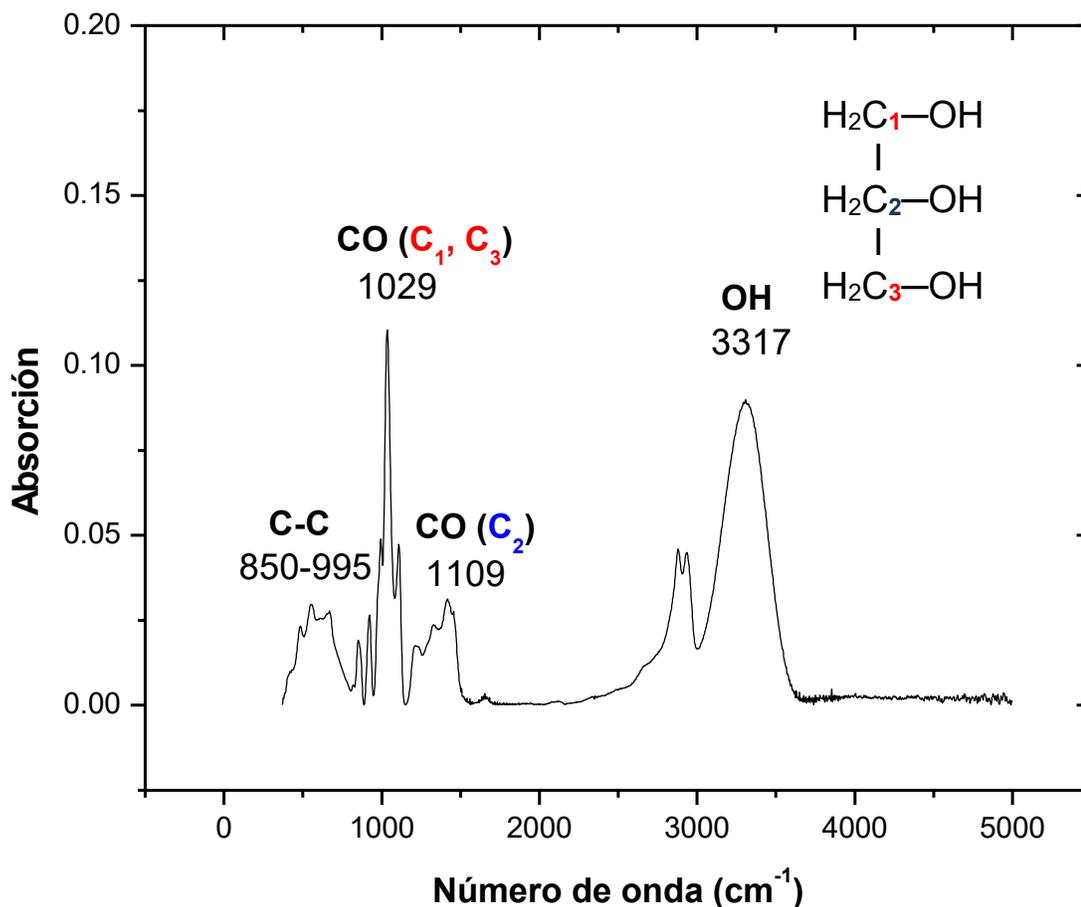


Figura 26.- Espectro de FTIR de glicerol.

La figura 25 muestra el espectro de la glutelina, donde diferentes bandas características pueden ser observadas en el intervalo espectral de 4000-400 cm^{-1} : la señal en 3272 cm^{-1} fue atribuida a la amida A, correspondiente a la señal originada debido a efectos de resonancia de la Amida II y la vibración del enlace N-H, la señal alrededor de 1634 cm^{-1} , fue asignada a la vibración del enlace C=O (amida I), mientras que las señales alrededor de 1539 y 1300 cm^{-1} , fueron asignadas a los enlaces N-H (amida II) y C-N (amida III) respectivamente. Así mismo, la figura 26, presenta el espectro FTIR del glicerol, en el que se destacan señales características de la estructura, la señal en 3317 cm^{-1} fue asignada a la vibración del grupo OH, las señales en 1109 y 1029 cm^{-1} fueron asignadas a las vibraciones de los enlaces C-O de C₂ y C₁, C₃ respectivamente, mientras que señales observadas en el intervalo espectral de

995-850 cm^{-1} fueron atribuidas a las vibraciones de C-C del esqueleto. La figura 27, 28 y 29 muestran los espectros de películas de glutelina, con diferentes concentraciones de plastificante, cloisita y valores de pH.

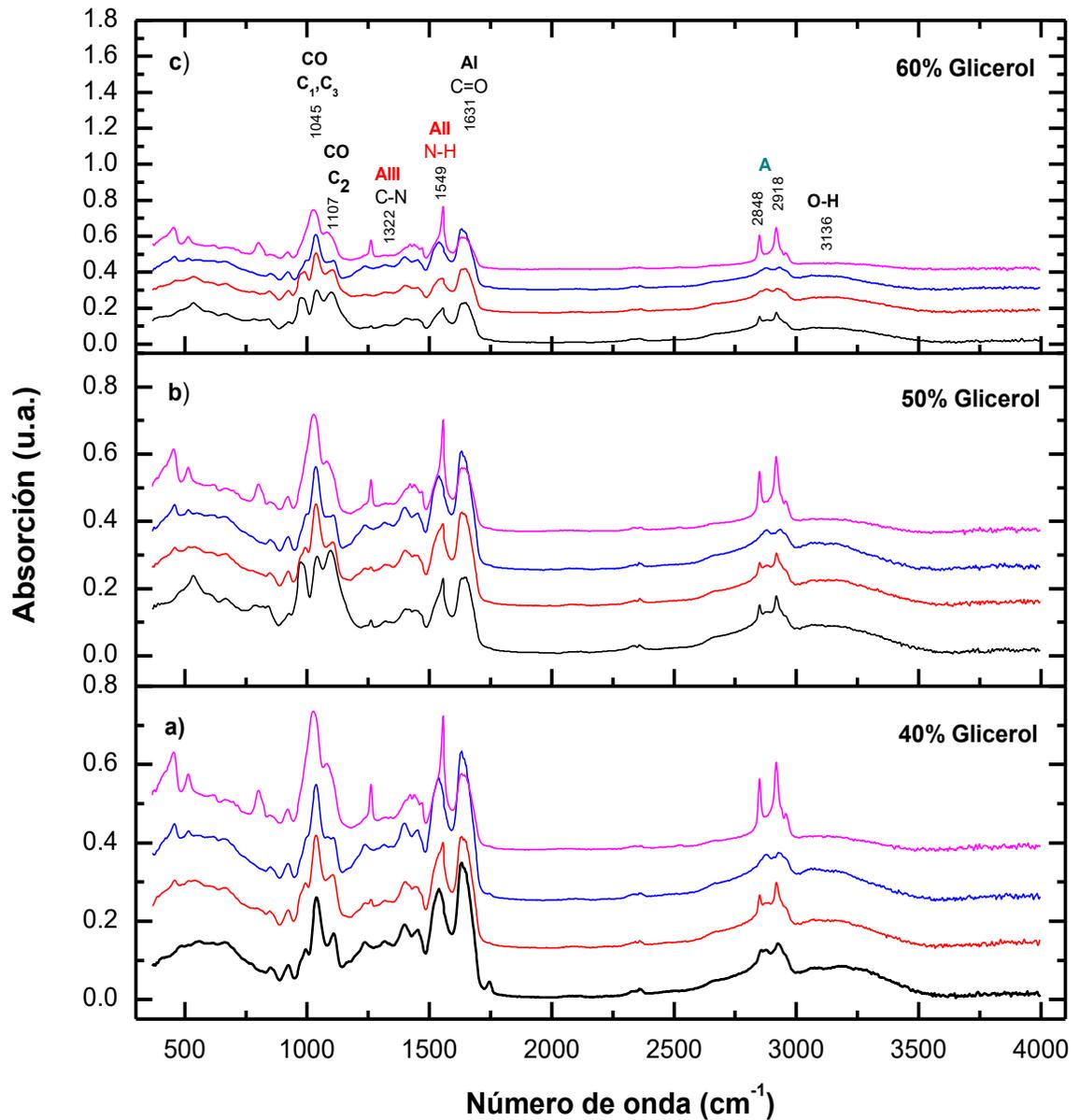


Figura 27.- Espectros FTIR de películas de Glutelina-Cloisita Na^+ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10. Contenido de Cloisita Na^+ : — 0%, — 5%, — 10% y — 20%.

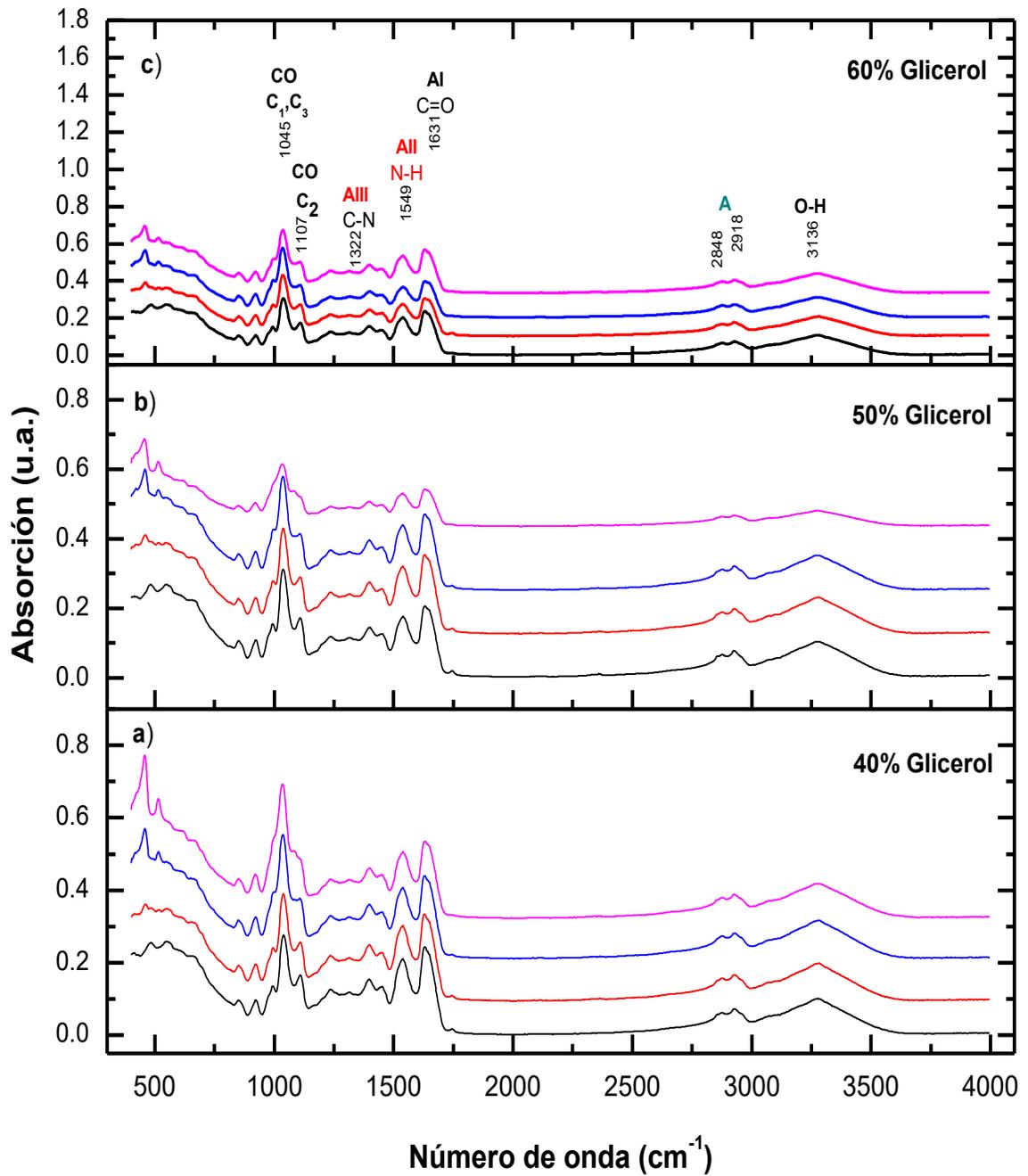


Figura 28.- Espectros FTIR de películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11. Contenido de Cloisita Na⁺: — 0%, — 5%, — 10% y — 20%.

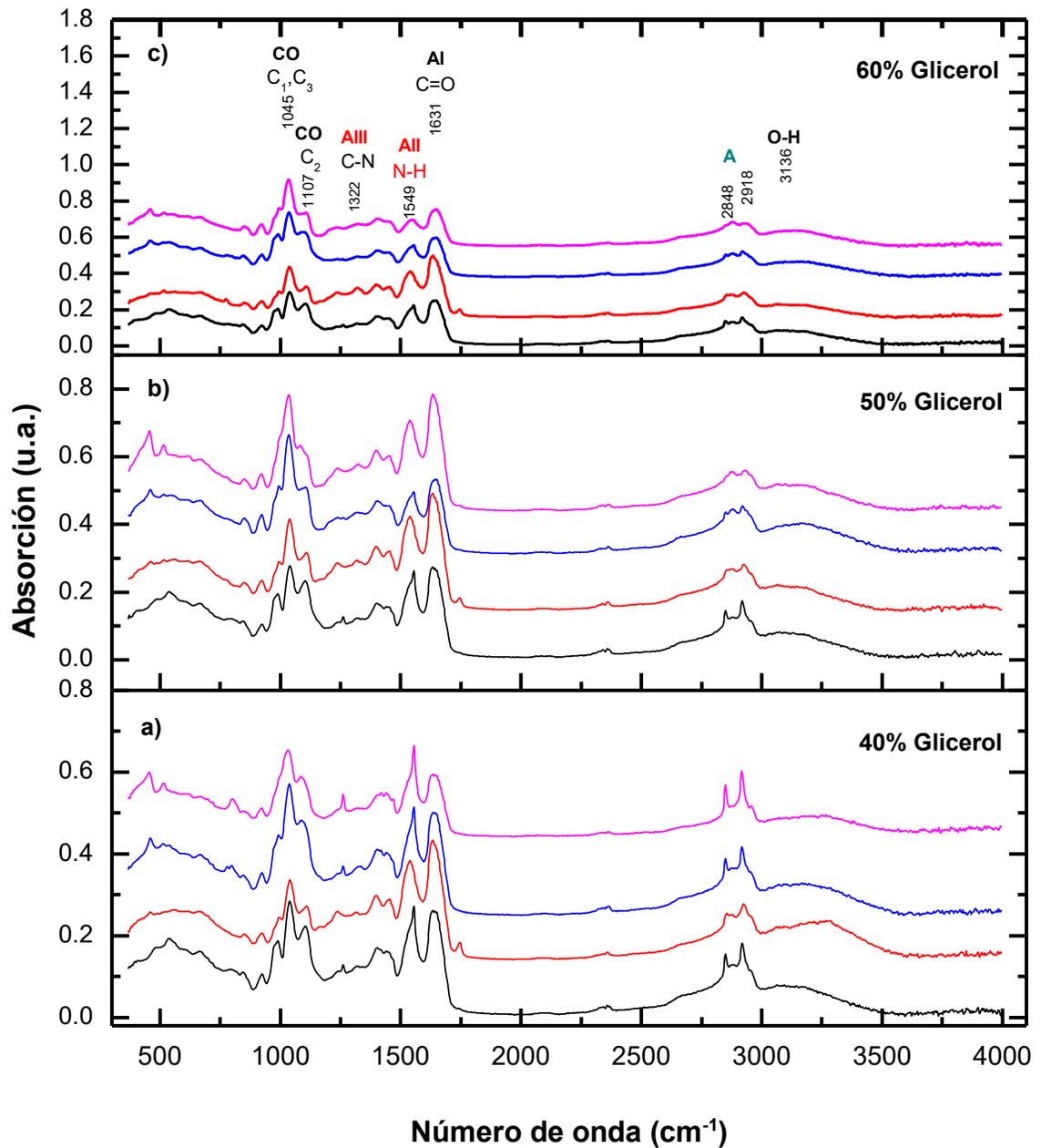


Figura 29.- Espectros FTIR de películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12. Contenido de Cloisita Na⁺: — 0%, — 5%, — 10% y — 20%.

Las figuras 27, 28 y 29, muestran los espectros FTIR de películas de glutelina nanocompuestas con diferentes valores de pH y concentraciones de cloisita Na⁺ empleando glicerol como plastificante, donde se destacan las bandas de absorción correspondientes a los enlaces C=O (amida I) alrededor de 1634 cm⁻¹, así como al enlace N-H (amida II) alrededor de 1554cm⁻¹. La señal en 1300 cm⁻¹ se atribuye al enlace C-N (amida III). Se observan además bandas centradas en 2923 y 2850 cm⁻¹ las cuales corresponden a vibraciones de extensión (stretching) de los enlaces C-H. Por otra parte, los espectros conservan las señales características del glicerol, empleado como plastificante; alrededor de 800 cm⁻¹ a 110 cm⁻¹, se observan señales correspondientes a las vibraciones de C-C y C-O. En la región denominada de huella dactilar, se observaron bandas cuya frecuencia se centra alrededor de 850 cm⁻¹ y en 995 cm⁻¹, las cuales se asignan a la vibración del esqueleto C-C. Las señales aproximadas a 1029 cm⁻¹ están asociadas a las vibraciones correspondientes al enlace C-O de los carbonos C₁ y C₃, mientras que las señales alrededor de 1109 cm⁻¹, se asocian al enlace C-O del carbono C₂.

La región espectral ≈1157-800cm⁻¹ es atribuida a la absorción de las bandas de la molécula de glicerol, correspondientes a las vibraciones de los enlaces C-C (≈997-850 cm⁻¹) asociados al esqueleto carbonado y C-O (≈1107-1045cm⁻¹), esta región en los diferentes espectros presenta cambios en la intensidad de las bandas con respecto al contenido de glicerol y arcilla; se observa un incremento progresivo en la intensidad de la banda al aumentar la presencia de glicerol en la película, lo cual es el resultado de que el número de grupos hidroxilos libres aumentara.

Una segunda región espectral (≈1700-1600cm⁻¹), correspondiente a las señales de absorción de la amida I y II; se observa un incremento en la intensidad de la amida I conforme se incrementa la presencia de glicerol en la película, lo cual podría deberse al aumento de enlaces de hidrogeno entre la proteína y la molécula de glicerol, lo cual disminuye los grupos peptídicos sin interacción, así mismo se ha reportado que el cambio de intensidad en las señales de amida I y II es el efecto de transiciones entre estructuras β laminar y α hélice (Panick y col., 1998, Gao y col., 2006).

La tercera región espectral (≈3200-2800 cm⁻¹) se encuentra caracterizada por las señales atribuidas a la amida A (≈2918-2848cm⁻¹), correspondientes a las vibraciones del enlace C-H stretching, las cuales se han reportado como dobletes que se originan por resonancia Fermi entre el primer armónico de la amida II y la tensión entre el enlace N-H que generalmente depende de la

fuerza del enlace de hidrogeno (Bandekar, 1992, Barth, 2007, Ramos y col. 2013). Por otro lado, la banda de absorción en $\approx 3136 \text{ cm}^{-1}$ es atribuida a la vibración de los enlaces O-H, sin embargo, la banda muestra menor intensidad conforme se adiciona cloisita a la matriz. El corrimiento de la señal a longitudes de onda menores se ha reportado ser característico de los grupos OH que se encuentran participando en puentes de hidrogeno (López y col., 2017).

La figura 30 presentan espectros de infrarrojo de películas de glutelina nanocompuestas con 20% (p) de arcilla y 40% (p) de plastificante a diferentes valores de pH (10,11,12). Se observa una variación espectral en las intensidades de las bandas de amida I y amida II relacionadas con la proteína debido a las variaciones de pH en las soluciones filmogénicas, este cambio en las señales puede ser relacionado con la permeabilidad a vapor de agua. De acuerdo con el análisis de superficie de respuesta (sección 5.5.2, figura 42), la permeabilidad del material tiene una dependencia cuadrática con el pH, presentando un valor máximo a un valor de pH de 11, mientras que en el espectro FTIR la intensidad de las señales debidas a la proteína disminuyen (figura 30).

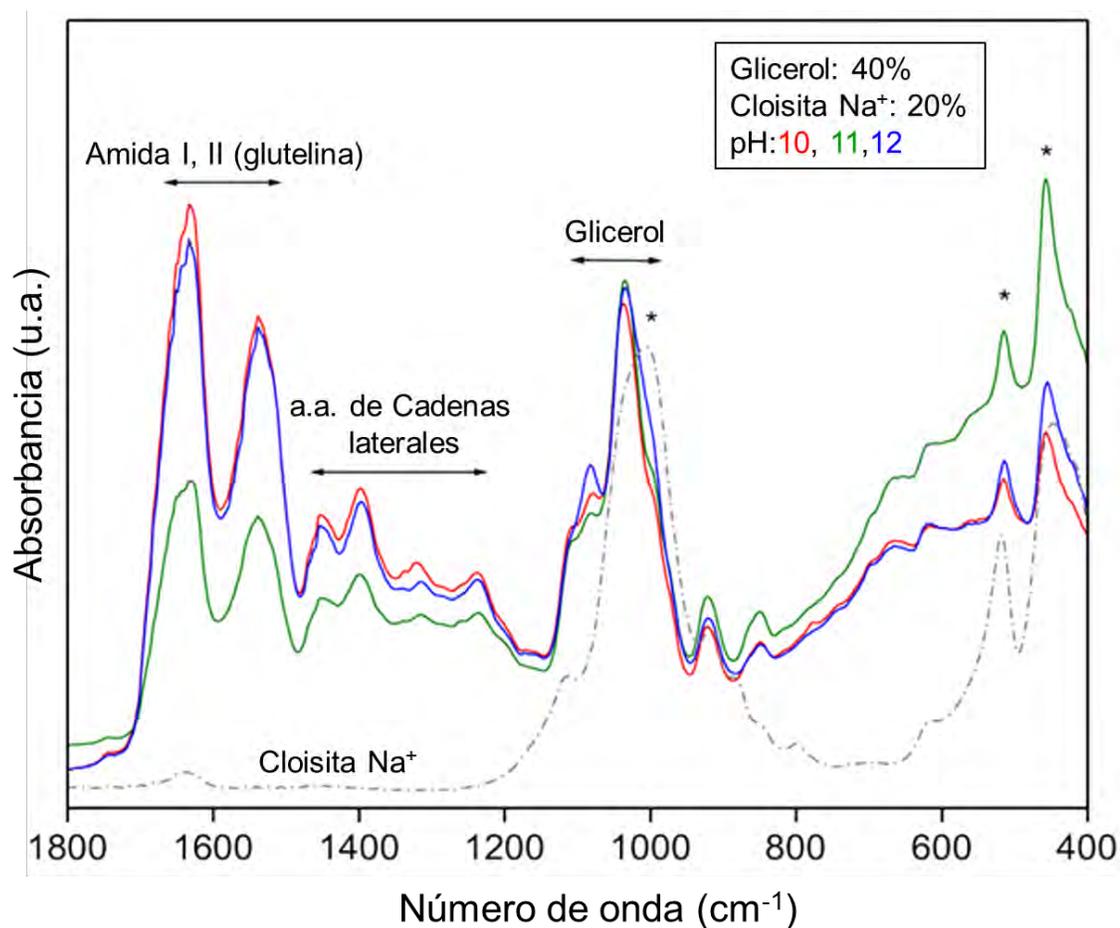


Figura 30.- Espectros FTIR de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, 20% (p) cloisita Na⁺ y pH 10, 11 y 12.

Por otro lado, los espectros de infrarrojo de las películas bio-nanocompuestas elaboradas con 40% (p) de plastificante y concentraciones de cloisita de 0,10 y 20% (p) a un valor de pH de 10 (figura 31), muestran un incremento en la intensidad de las bandas a 1008 y 447cm⁻¹, las cuales se encuentran relacionadas con la cloisita; se observa un incremento en la intensidad de las señales al incrementar el contenido de arcilla en la muestra. De acuerdo con lo que muestra el análisis de superficie de respuesta (sección 5.5.3, figuras 44 y 46), el contenido de cloisita constituye el factor principal que afecta a las propiedades mecánicas, donde la inclusión de arcilla genera el incremento de la dureza y el módulo de Young, llevando a ambas respuestas bajo las condiciones de preparación de los bio-nanocompuestos a un valor máximo en

el espacio analizado. Por otro lado, la variabilidad en el contenido de arcilla no presenta un efecto importante en la estructura de la glutelina, como puede observarse en la figura 31, donde la forma de las bandas relacionadas con las señales de la amida I y amida II no presentan cambios al variar la concentración de cloisita en los materiales, donde las condiciones de preparación (contenido de glicerol: 40%, contenido de cloisita: 20% y pH: 10) toman la dureza de la película de bionanocompuestos al máximo en el espacio analizado

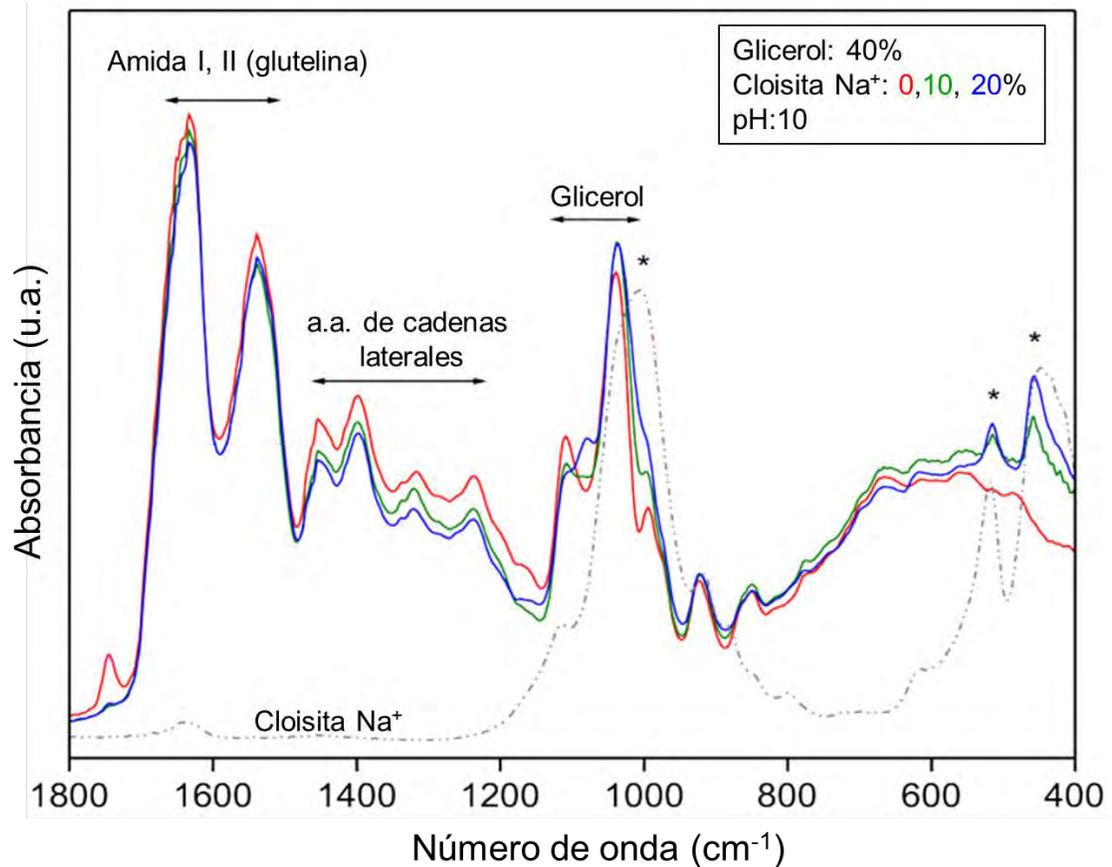


Figura 31.- Espectros FTIR de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, pH 10 y diferentes concentraciones de cloisita Na⁺: 0, 10 y 20%(p).

Schmidt y col. (2015), elaboraron películas a partir de proteínas extraídas del salvado de arroz, con la finalidad de evaluar el efecto fisicoquímico de diferentes concentraciones de proteína y glicerol, así como el efecto de la adición de montmorillonita en la película. Los espectros FTIR, mostraron que la absorción espectral de películas con diferentes formulaciones, presentan regiones de absorción similares, difiriendo solo en la intensidad de las bandas. El incremento en la absorción fue atribuida a incremento en la interacción de los constituyentes de la película debida a la presencia de grupos hidroxilo que permiten incrementar los enlaces por puentes de hidrógeno. Por otro lado, la adición de montmorillonita disminuyó la absorción de las señales, principalmente en la región de 3400 cm^{-1} y entre la región de $1700\text{ -}1500\text{ cm}^{-1}$, las cuales son características de la absorción de los grupos amino (-NH) y de las señales de la amida I y II de las proteínas, lo cual indica la interacción de la montmorillonita con la proteína, resultando en la reducción vibracional de los grupos funcionales de la proteína.

Coronado y col. (2015), investigaron las propiedades de películas biodegradables, nanocompuestas de gelatina- montmorillonita, considerando dos concentraciones de montmorillonita (0, 10g), empleando glicerol como plastificante del material, El análisis por espectroscopia FTIR, mostró cambios en las bandas correspondientes a la amida III (3283 cm^{-1}), amida II (1523 cm^{-1}) y amida I (1629 cm^{-1}) así como la región de interacción del carbono e hidroxilo ($800\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$), la cual fue atribuida a la vibración stretch del Si-O.

Pereira y col. (2017), caracterizaron y evaluaron las propiedades mecánicas de películas de suero lácteo con montmorillonita, observando señales en el espectro FTIR en los siguientes rangos espectrales: $1150\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ atribuidos a la absorción del glicerol, $1350\text{-}1170\text{ cm}^{-1}$ atribuido a la vibración C-N (stretching) y a la vibración del enlace N-H (bending) de la amida III, las señales en $1550\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ fue asociada a la vibración del enlace N-H (bending) de la amida II y el intervalo de $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ fue atribuida a la vibración del enlace C-O (stretching) de la amida I, la banda en el intervalo de $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ fue asignada a las vibraciones de los enlaces O-H y N-H, los cuales tienen la capacidad de formar enlaces por puente de hidrogeno con el grupo carbonilo de los enlaces peptídicos de las proteínas, la banda en $520\text{-}461\text{ cm}^{-1}$ se atribuyó principalmente al enlace Si-O. las señales de los enlaces O-H y N-H presentan la capacidad de formar enlaces inter e intramoleculares con los enlaces C-O presentes en los aminoácidos de la proteína.

Ramos y col. (2013), evaluaron el efecto de glicerol en propiedades como la permeabilidad y capacidad mecánica en películas de suero lácteo. El análisis por espectroscopia de infrarrojo mostró consistencia con los resultados obtenidos por otras técnicas, donde las capacidades térmicas, de barrera, ópticas y mecánicas mostraron ser influenciadas por el contenido de glicerol en los materiales. Observaron cambios en los espectros de las películas de suero cuando el contenido de glicerol aumentaba; las señales asociadas a al esqueleto carbonado C-C, así como las señales debidas al enlace C-O, mostraron un incremento en la frecuencia de sus señales, así mismo se presentó un incremento en la intensidad de estas señales, lo cual fue interpretado como el incremento de los grupos hidroxilos disponibles para interactuar con las moléculas de agua, lo cual presento afinidad con los resultados que obtuvieron en cuanto al contenido de humedad, cuyos valores se incrementaron al presentar las muestras un contenido mayor de glicerol, por otro lado la señal debida al enlace -OH mostró un incremento de intensidad, mientras que el ancho de la banda fue relacionado con el entrecruzamiento de la red proteínica, donde anchos de banda menores es indicativo de un grado mayor de entrecruzamiento con cadenas de proteína cercanas unas a otras, permitiendo interacciones por puente de hidrogeno, disminuyendo la disponibilidad de grupos -OH libres.

Así mismo, Machado y col., (2017) al efectuar el análisis de las propiedades ópticas y estructurales de películas de suero lácteo nanocompuestas con cloisita Na⁺, observaron en los espectros de infrarrojo presentaban bandas anchas en la región espectral de 3600-3000cm⁻¹, las cuales fueron relacionadas con el entrecruzamiento de la red de proteína, mientras que la frecuencia fue relacionada con la interacción entre la proteína con los componentes de la matriz; donde los desplazamientos a frecuencias menores fue relacionado a interacciones más fuertes entre la proteína y la arcilla. Ah reportado que la intensidad de absorción de la señal en los espectros de infrarrojo es proporcional a la concentración de las especies de análisis (Carbonaro y Nucara, 2010).

5.2.1a) Espectroscopia de la 2da derivada

El espectro en la región de la amida I, consiste en diferentes señales traslapadas, que representan las diferentes estructuras secundarias que la componen.

Las bandas traslapadas fueron localizadas a partir de los espectros de infrarrojo, mostrados en las figuras 27, 28 y 29, se efectuó un análisis de la segunda derivada en la región de $1700\text{-}1600\text{cm}^{-1}$, correspondiente a la amida I, para elucidar los cambios conformacionales debidos a cambios de pH y concentración del compuesto nanoestructurado.

El análisis de la segunda derivada permitió determinar la posición de los picos de absorbancia, situados en la posición de la amida I (figuras 32, 33 y 34).

Los espectros de segunda derivada muestran los cambios que ocurren en la estructura de las proteínas. Las señales alrededor de $1629\text{-}1622\text{ cm}^{-1}$ fueron atribuidas a estructuras β laminar, 1648 cm^{-1} a estructuras desordenada, $1656\text{-}1658\text{ cm}^{-1}$ a estructuras α hélice, mientras que las bandas en el intervalo de $1693\text{-}1663\text{ cm}^{-1}$, fueron atribuidas a las conformaciones de giros β (Zhao y col., 2008). Así mismo, los espectros de la -segunda derivada de las películas nanocompuestas, mostraron que los cambios de pH en las soluciones formadoras de película modificaron las intensidades en las bandas. Los cambios en el espectro de la proteína indican cambios en la conformación de la cadena proteínica debido a la desnaturalización de esta, debido a cambios en el pH y la temperatura (Shevkani y Singh, 2015). Se observa una predominancia de estructuras β laminar y random.

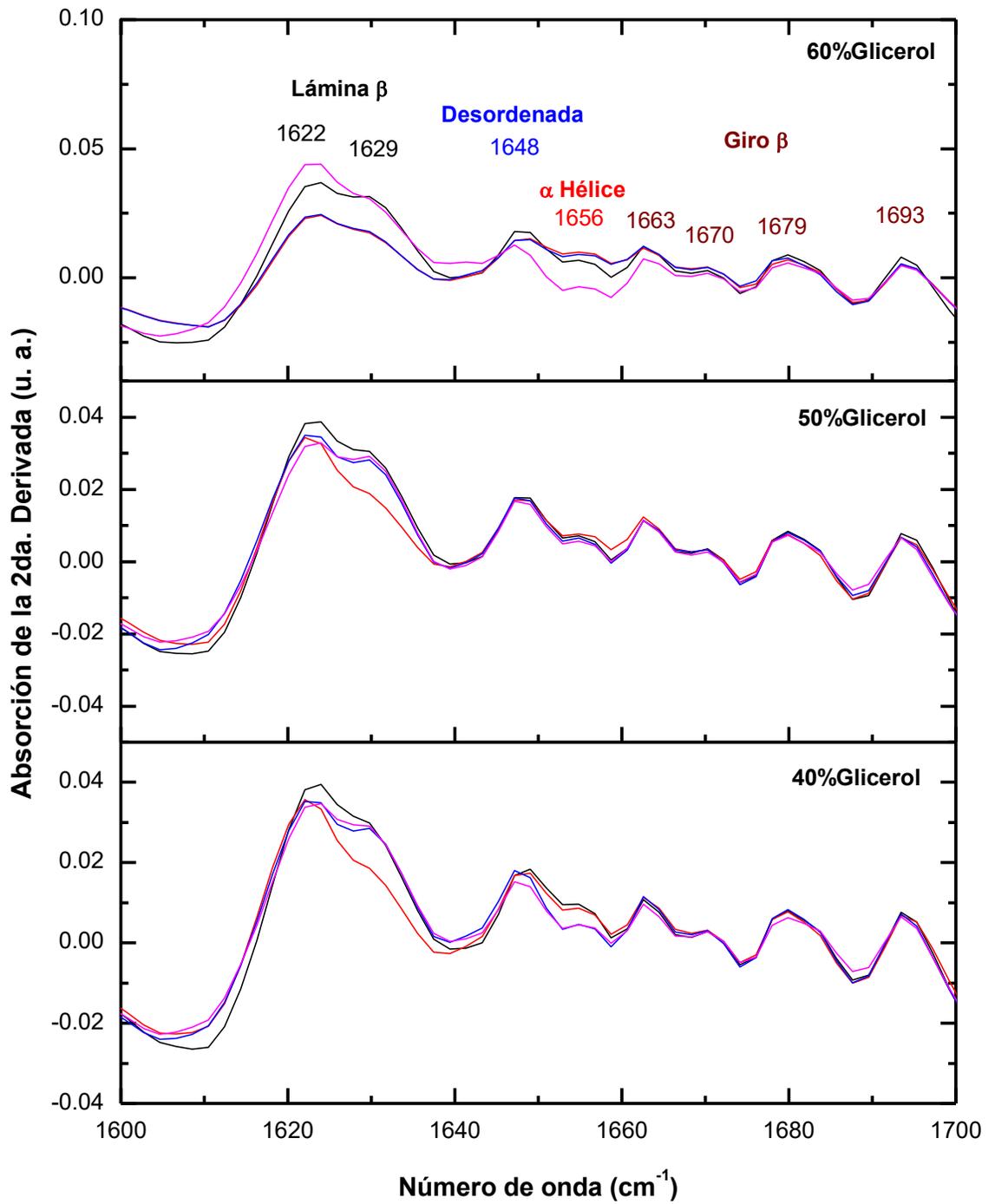


Figura 32.- Espectros FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na^+ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10. Contenido de Cloisita Na^+ :

— 0%, — 5%, — 10% y — 20

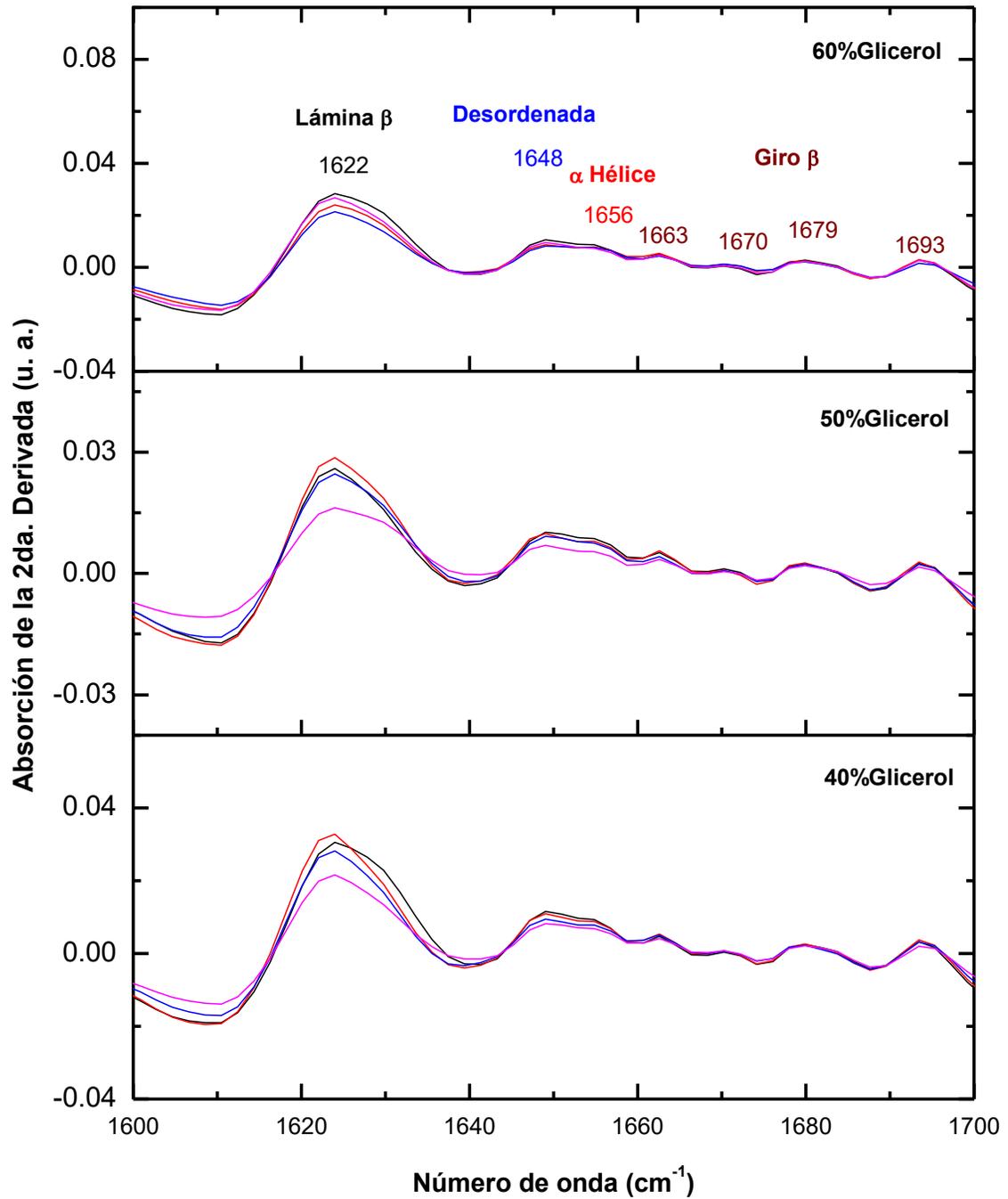


Figura 33.- Espectros FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11. Contenido de Cloisita Na⁺ : — 0%, — 5%, — 10% y — 20

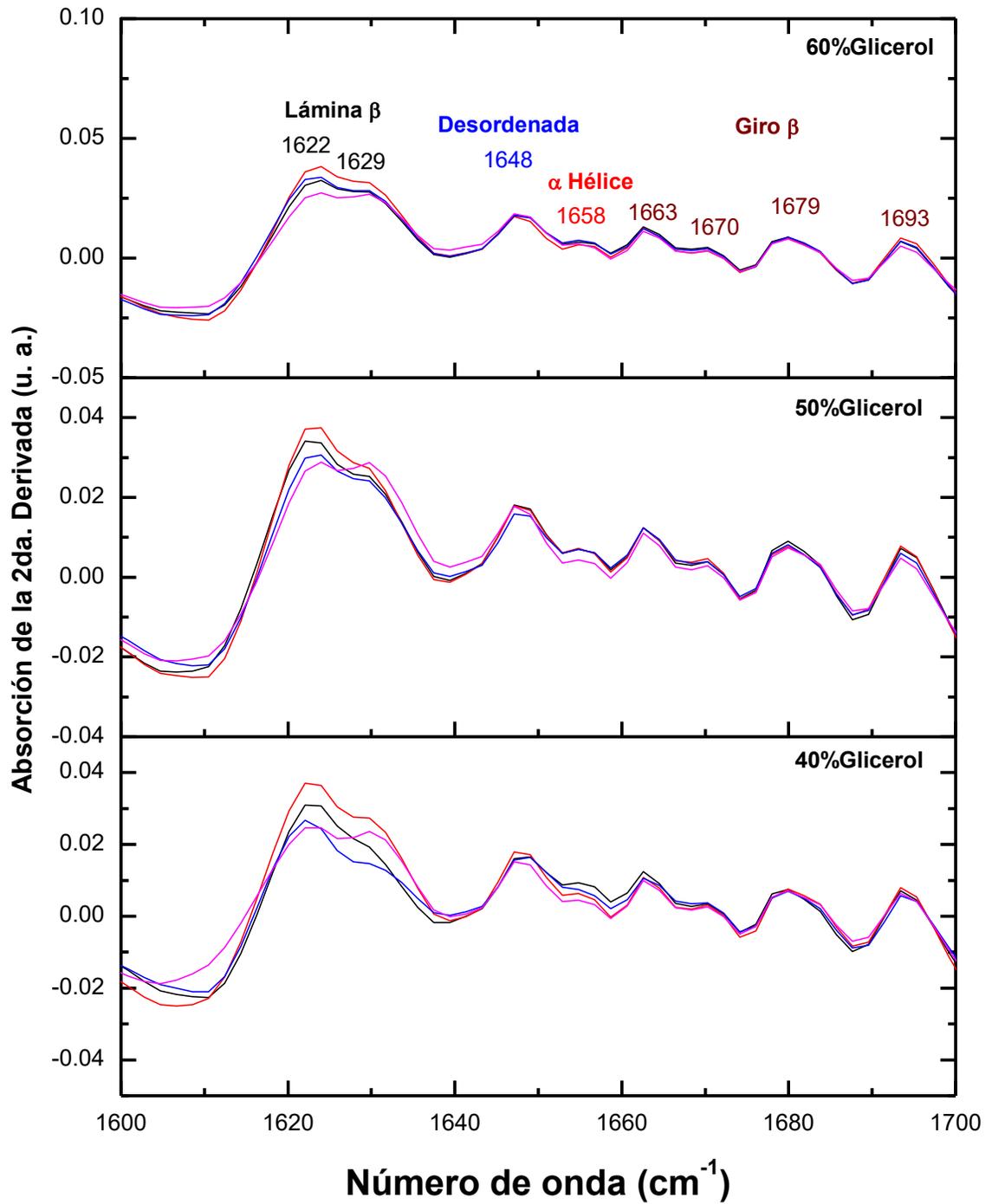


Figura 34.- Espectros FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12. Contenido de Cloisita Na⁺:

— 0%, — 5%, — 10% y — 20

La figura 35 muestra los espectros de la segunda derivada en la región espectral de la amida I para los bio-nanocompuestos para las composiciones: 40%(p) glicerol, 20%(p) cloisita Na⁺ y valores de pH de 10, 11 y 12. Se observan bandas asociadas con la estructura secundaria de la glutelina, tal como estructuras β giro (1694, 1680 y 1664cm⁻¹), random (1648cm⁻¹), α hélice (1647cm⁻¹) y β plisada (1625cm⁻¹), donde los espectros de la segunda derivada a partir de la estructura secundaria de la glutelina en la película, muestran una disminución de la intensidad para las bandas relacionadas con las estructuras β giro (1664cm⁻¹), α hélice (1647cm⁻¹) y β plisada (1625cm⁻¹) a un pH de 11.

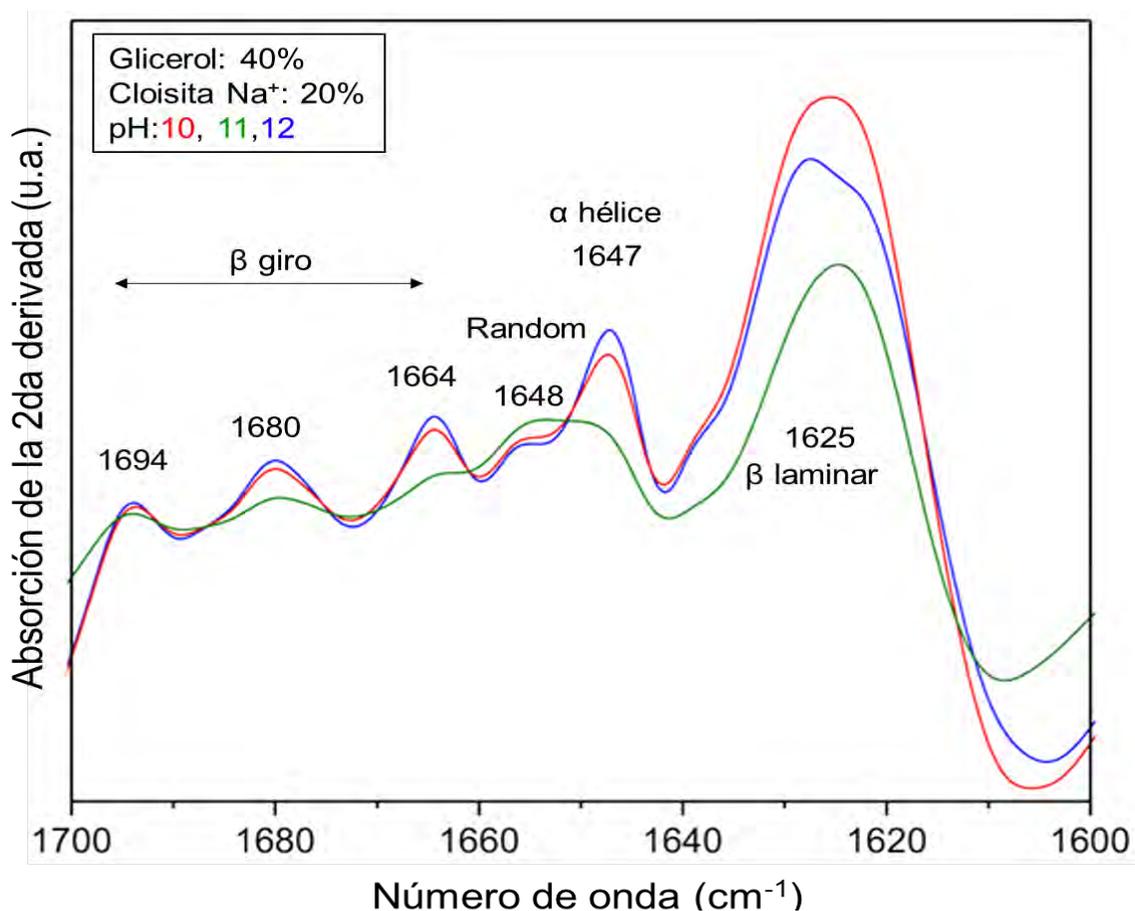


Figura 35.- Espectros FTIR (segunda derivada) de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, 20% (p) cloisita Na⁺ y pH 10, 11 y 12.

Por otro lado, los nanocompuestos de glutelina realizados bajo las condiciones de pH de la solución filmogénica de 40% (p) de glicerol y diferentes concentraciones de cloisita Na⁺; 0, 10 y 20% (p), la segunda derivada del espectro de infrarrojo muestra que si bien la inclusión del silicato permitió el incremento de la dureza y el módulo de Young, esta no represento un efecto significativo en la estructura de la proteína, por lo que no se aprecian cambios en las bandas relacionadas directamente con la estructura secundaria de la proteína debidos al cambio de concentración de cloisita en la película (figura 36).

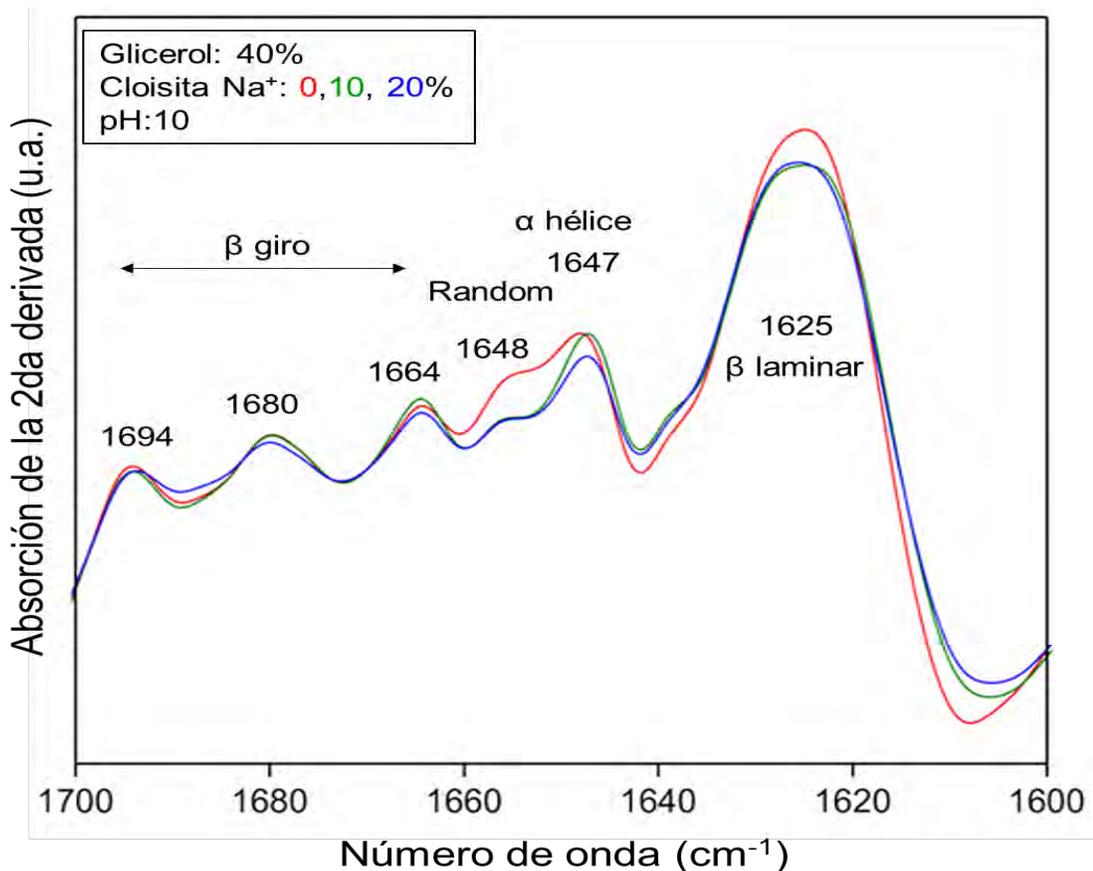


Figura 36.- Espectros FTIR (segunda derivada) de películas de glutelina nanocompuesta. 40%(p) glicerol, pH 10 y diferentes concentraciones de cloisita Na⁺: 0, 10 y 20%(p).

Ma y col. (2001), reportan que para proteínas globulares de avena, la dispersión varía en función a los valores de pH; espectros FTIR de la proteína dispersada a valores de pH en el intervalo de 5-7 fueron similares, sin embargo a valores altamente alcalinos (pH 11), los espectros mostraron la disminución de dos bandas atribuidas a estructuras β laminar, por lo que plantean que esta variación es el resultado de los cambios en los enlaces de hidrogeno o bien un cambio en la conformación de la proteína, por otro lado valores de pH ácidos (pH 3) produjo el incremento en señales en el intervalo de 1626-1623 cm^{-1} . variaciones en el periodo de calentamiento produjo cambios en la intensidad de diversas bandas del espectro de infrarrojo, donde bandas asociadas a conformaciones intramoleculares antiparalelas β laminar fueron progresivamente incrementando al incrementar el tiempo de calentado mientras que las bandas se corrieron a números de onda menores.

Torii y Tasumi (1992) reportan que la absorción en la señal de la amida I será afectada por la estructura carbonada de la proteína, así mismo, aminoácidos de las cadenas laterales de proteínas globulares, tales como arginina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, tirosina, histidina y fenilalanina, presentan absorciones intensas en la región espectral de la amida I (Venyaminov y Kalnin, 1990)

Kong y Yu, (2007), reconsideran que los métodos de análisis matemáticos pueden ser empleados para mejorar la resolución de espectros FTIR, al permitiendo la ampliación de sus componentes, para separarlos más allá de la resolución del instrumento de medición.

Georget y Belton (2006), analizaron el efecto de la temperatura y contenido de agua en la estructura secundaria del gluten de trigo, a partir de un análisis de la –segunda derivada y deconvolución de los espectros de infrarrojo en la región representativa a la amida I, donde a 0% de hidratación, la estructura secundaria no presento cambios, sin embargo a un porcentaje de hidratación del 13%, se observaron cambios en las frecuencias bajas de la región representativa de la amida I, lo cual fue atribuido a cambios presentados en las estructuras β laminar.

Así mismo, observaron que la mayoría de los cambios ocurrieron a temperaturas superiores a la temperaturas de transición, a una hidratación del 47% y el aumento de temperatura, se presentan cambios más complejos e irreversibles y diferentes bandas surgen en el intervalo de la amida I.

Dang y col. (2010), analizaron el efecto del pH en la conformación de nanocompuestos de proteína de seda con nanoarcillas, determinando que las soluciones con pH ácido, por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, permitía que esta se cargara de manera positiva facilitando la interacción y dispersión de la nanoarcilla, así mismo, observaron un cambio significativo en la estructura secundaria de la proteína al estar bajo condiciones ácidas, generando un cambio en la cristalización de la estructura β laminar; y al estar relacionadas las propiedades térmicas, ópticas, mecánicas y de degradación con la estructura β laminar, plantean la importancia del control de las transiciones de esta estructura para el desarrollo óptimo en las diferentes aplicaciones en materiales

5.2.1b) Análisis de deconvolución

Se emplearon los espectros de –segunda derivada, para recuperar datos traslapados en el área representativa a la amida I ($1700-1600\text{cm}^{-1}$), debido a la alta sensibilidad de la banda de amida I a pequeñas variaciones en la geometría molecular y enlaces de hidrógeno. El análisis de deconvolución, efectuado mediante una función de línea lorentziana se muestra en las figuras 37, 38, 39 y anexo 1.

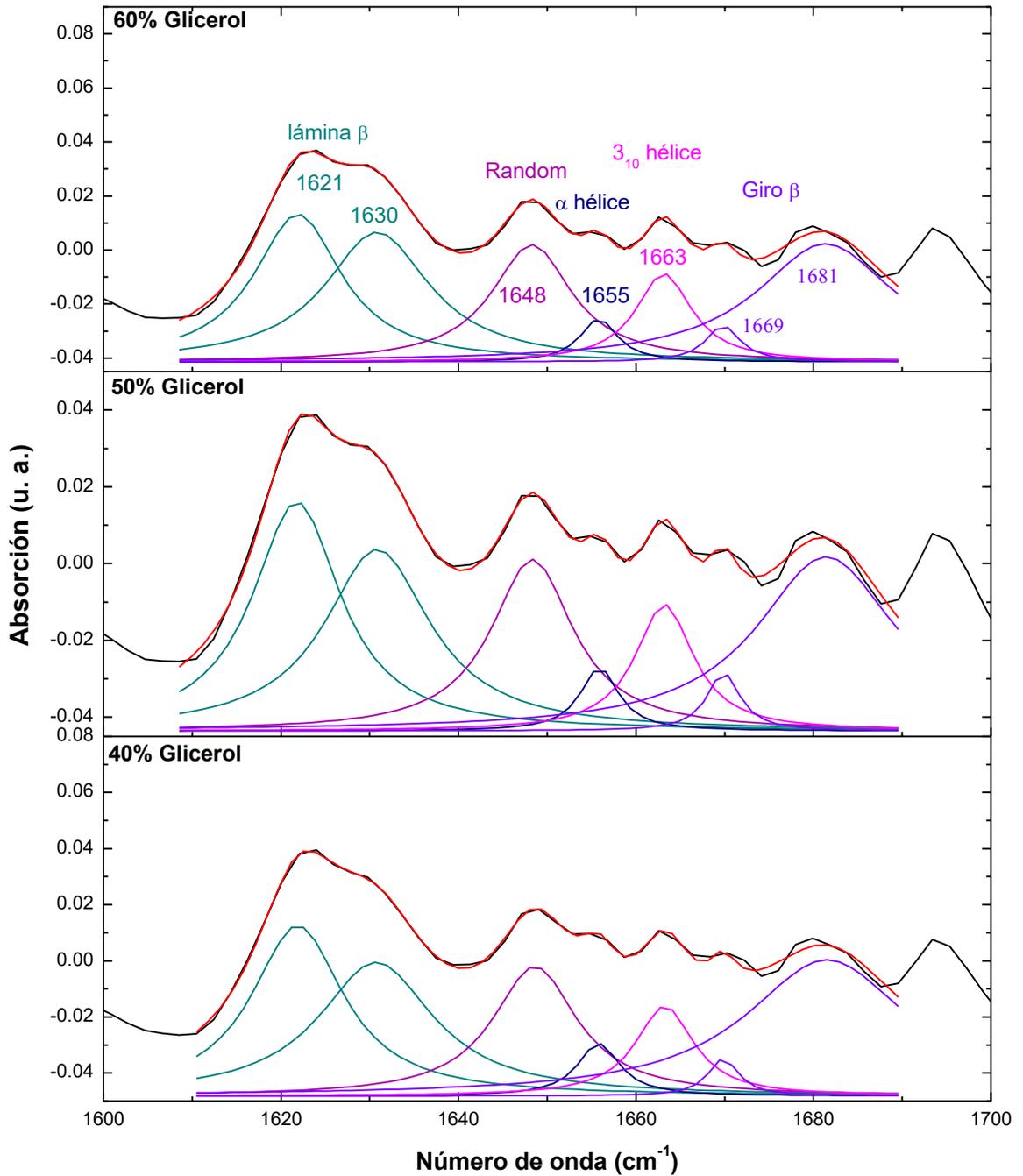


Figura 37.-Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10.

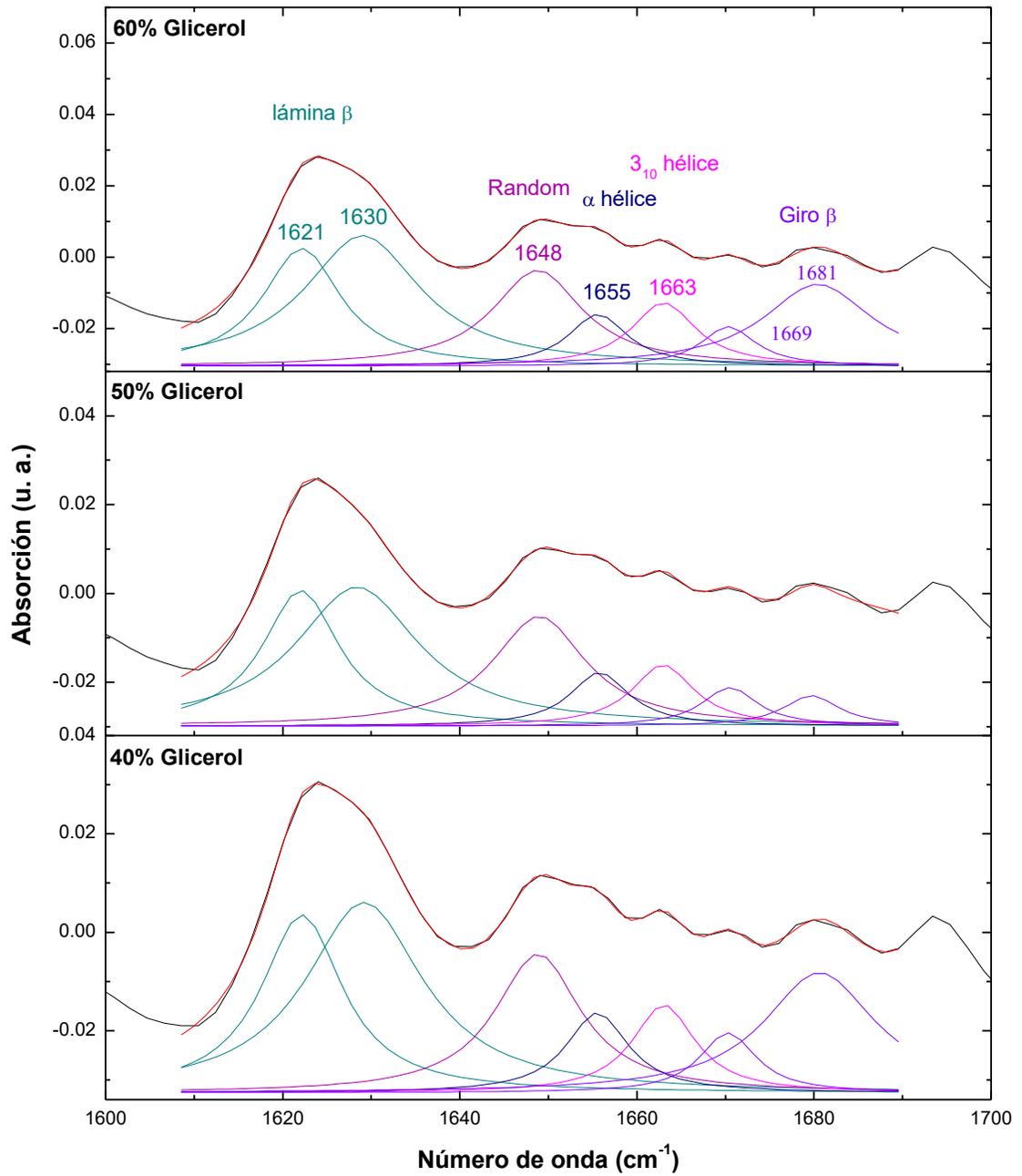


Figura 38.-Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11.

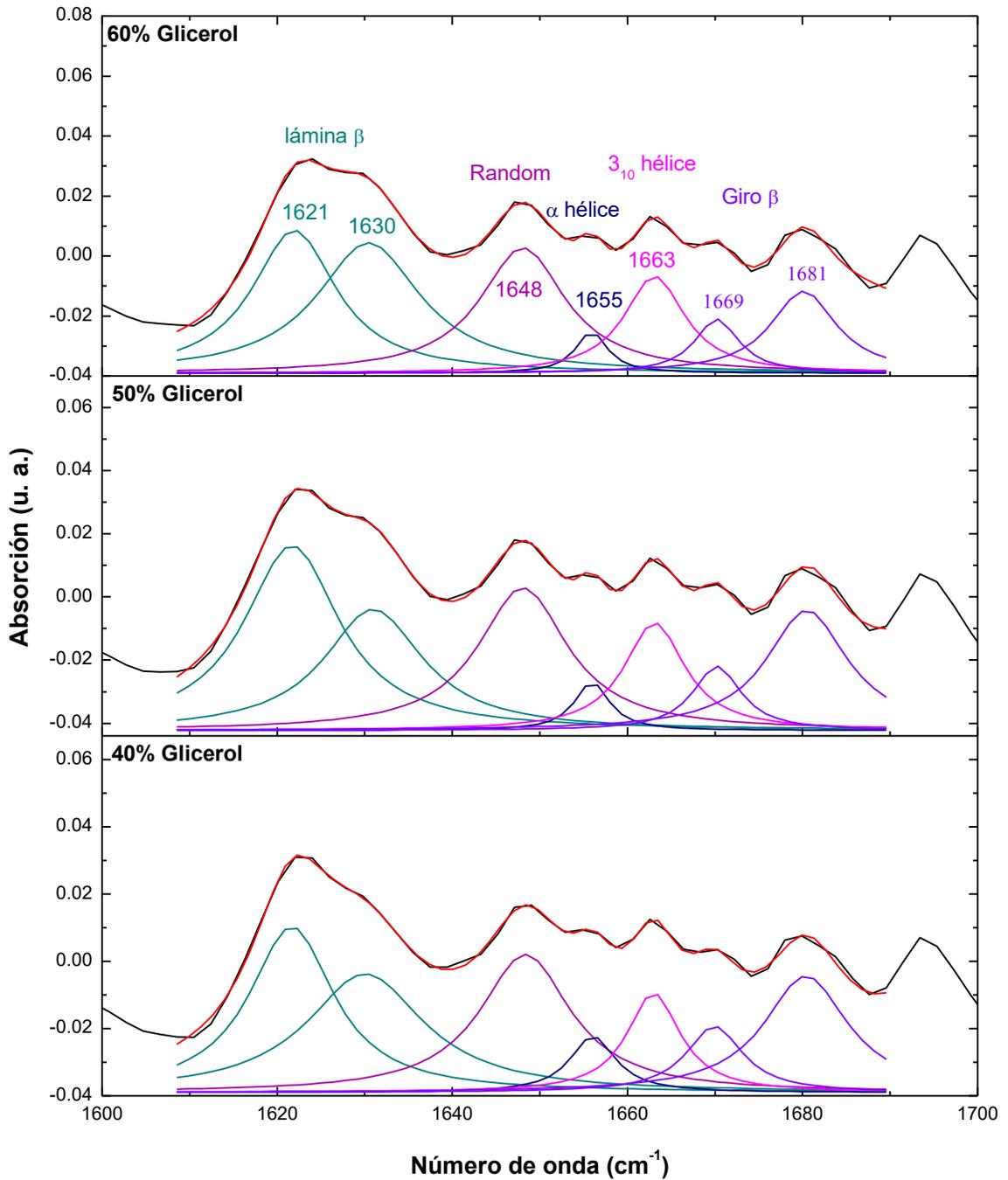


Figura 39.-Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12.

La región representativa de la amida I, constituida principalmente por vibraciones C=O (stretching) y en menor medida a las vibraciones de los enlaces C-N (stretching) de los enlaces peptídicos, es sensible a la estructura secundaria (Gilbert y col., 2005).

Los espectros de las figuras 37, 38, 39 y anexo 1, se encuentran constituidos por siete señales; las señales de mayor intensidad, localizadas en ≈ 1621 y ≈ 1630 cm^{-1} , es una señal típica en proteínas con estructuras β predominantes (Remondetto y Subirade, 2003, Gilbert y col. 2005, Kong y Yu, 2007). Las señales en ≈ 1663 , ≈ 1655 y ≈ 1648 cm^{-1} , fueron atribuidas a estructuras 3_{10} hélice, hélice y random; mientras que las señales en ≈ 1681 y ≈ 1669 cm^{-1} fueron atribuidas a estructuras de giro β . Las estructuras 3_{10} hélice, son una variación de la estructura α hélice que presentan una unidad repetida que comprende tres residuos de aminoácido en un giro, localizadas principalmente en las extensiones terminales N o C de α hélice (Armen y col., 2002). Las estructuras del tipo giro β , permiten el cambio de dirección de la cadena peptídica para obtener una estructura plegada.

La cuantificación de las diferentes estructuras secundarias, mediante el análisis de la banda de amida I del espectro FTIR, muestra como componente principal a la estructura β laminar (tabla 6), constitución seguida de estructuras random y hélice, de esta última, la optimización del espectro mostró una mayor abundancia de la estructura 3_{10} hélice con respecto a α hélice (tabla 7).

Tabla 6.- Contenido de estructura secundaria (amida I).

Cloisita Na ⁺ (%)	pH10			pH11			pH 12			Estructura
	Glicerol (%)									
	40	50	60	40	50	60	40	50	60	
	Área (%)									
0	42.615	43.934	44.165	48.438	35.162	47.668	56.831	54.932	39.455	β Lámina
5	41.803	41.406	40.142	38.414	46.372	63.840	41.101	39.338	42.079	
10	44.510	40.856	41.412	52.598	40.856	49.535	39.218	56.329	39.804	
20	45.406	58.886	53.748	38.747	39.821	57.053	45.406	58.886	53.748	
0	15.046	15.771	15.635	15.676	13.070	16.804	16.019	17.055	16.495	Random
5	17.633	16.619	18.792	12.716	19.507	5.671	15.527	17.383	16.920	
10	16.905	16.428	20.516	6.255	16.428	20.106	17.452	17.235	16.755	
20	14.699	15.103	11.173	15.110	15.146	5.631	14.699	15.103	11.173	
0	10.229	10.870	10.850	13.798	8.847	13.984	9.972	10.919	11.018	α Hélice
5	11.433	11.533	13.080	9.192	13.080	17.181	9.963	10.573	10.991	
10	10.532	10.072	13.528	17.920	10.072	13.930	10.586	11.456	10.224	
20	9.512	11.031	15.128	9.274	10.720	10.281	9.512	11.031	15.128	
0	32.110	29.425	29.351	22.088	42.921	21.543	17.179	17.094	33.032	β Giro
5	29.131	30.442	27.986	39.678	21.041	13.308	33.410	32.706	30.010	
10	28.053	32.644	24.544	23.227	32.644	16.429	32.744	14.980	33.217	
20	30.383	14.980	19.951	36.869	34.313	27.035	30.383	14.980	19.951	

Tabla 7.- Contenido de estructuras hélice.

Cloisita Na ⁺ (%)	pH 10			pH 11			pH 12			Estructura
	Glicerol (%)									
	40	50	60	40	50	60	40	50	60	
	Área (%)									
0	29.930	24.692	24.641	47.441	45.480	42.852	32.810	20.502	18.445	α hélice
5	30.069	28.568	35.614	52.927	33.493	78.604	23.594	20.855	16.755	
10	19.525	22.582	26.549	92.886	22.582	39.843	20.245	19.903	24.882	
20	29.690	26.721	14.872	38.205	28.813	63.636	29.690	26.721	14.872	
0	70.070	75.308	75.359	52.559	54.520	57.148	67.190	79.498	81.555	3_{10} hélice
5	69.931	71.432	64.386	47.073	66.507	21.396	76.406	79.145	83.245	
10	80.475	77.418	73.451	7.114	77.418	60.157	79.755	80.097	75.118	
20	70.310	73.279	85.128	61.795	71.187	36.364	70.310	73.279	85.128	

Kong y Yu (2007), efectúan una revisión de los avances de la espectroscopia de FTIR y sus aplicaciones para el análisis estructural de proteínas; señalan que los componentes estructurales de la amida I de las proteínas, pueden ser estudiados y asignados, a partir del análisis de sus frecuencias vibracionales, en donde la estructura secundaria que la constituye es reconocida por medio de otras técnicas. La vibración de la banda de la amida I, depende de la naturaleza de los enlaces de hidrogeno involucrados con los enlaces C=O y N-H, A su vez, esto está determinado por la estructura secundaria adoptada por la cadena polipeptídica, lo que refleja la conformación de la cadena principal y el patrón de enlaces de hidrógeno. Las señales representativas a la amida I en las proteínas, consisten en el solapamiento de las señales de sus constituyentes (α hélice, giro y lamina β y estructuras desordenadas). Así mismo plantean que la estimación de la estructura secundaria de una proteína se basa en la suposición de que cualquier proteína puede considerarse como la suma lineal de algunos elementos fundamentales de la estructura secundaria.

Guilbert y col. (2005), analizaron el comportamiento de películas elaboradas a partir de proteínas de suero de leche con diferentes agentes plastificante, a partir del análisis de la deconvolución de espectros FTIR; señalan que la presencia de componentes entre 1680 y 1625 cm^{-1} , son indicativos de la presencia de segmentos poli peptídicos no plegados, mientras que las señales alrededor de 1653 cm^{-1} son característicos de los elementos secundarios residuales, probablemente α hélices y que puede ser atribuible a dos factores: el primero se encuentra relacionado con los momentos dipolares capaces de interrumpir los enlaces de hidrógeno de los grupos peptídicos, a partir de la competencia entre los grupos O-H de los alcoholes y los grupos N-H del péptido para formar enlaces de hidrógeno con la amida (C=O), el segundo factor, se encuentra relacionado con la baja constante dieléctrica de los alcoholes, capaz de perturbar la estructura de las proteínas, reduciendo su efecto hidrofóbico, que al mismo tiempo promueve el desarrollo y replegado en una conformación helicoidal conformacional más estable energéticamente). Finalmente plantean que la presencia de señales en el intervalo de 1627 a 1621 cm^{-1} , dependen del tipo de plastificante empleado, pues la posición de la banda disminuye en el siguiente orden glicerol> dietilenglicol>etilenglicol, lo que indicaría un fortalecimiento de los enlaces de hidrógeno intermoleculares entre las hojas β .

Bourbon y col. (2011), efectuaron un análisis comparativo de la interacción de matrices elaboradas a partir de quitosano y compuestos bioactivos (proteínas de soya), a partir de espectroscopia FTIR y la deconvolución de sus espectros, observando la deformación de los espectros en los intervalos de 1584 a 1536 cm^{-1} .

¹ y 1650 a 1630cm⁻¹, se encuentran asociados a la incorporación de proteínas de soya a la matriz y que al mismo tiempo es reflejada en el área de las bandas, influenciando las diferentes propiedades de las películas (mecánicas, morfología, barrera).

5.3 Análisis de propiedades de barrera

5.3.1 Permeabilidad a vapor de agua

Los valores obtenidos para permeabilidad a vapor de agua se muestran en la tabla 8.

Tabla 8.- Permeabilidad a vapor de agua.

Glicerol (%)	Cloisita Na ⁺ (%)	pH10	pH11	pH12
PVA (g mm/ mmHg d m ²)				
40	0	8.381	8.073	4.842
40	5	4.791	8.134	5.459
40	10	6.785	7.580	2.704
40	20	5.632	5.116	1.165
50	0	9.832	11.743	6.133
50	5	9.073	7.689	4.595
50	10	5.569	11.807	9.251
50	20	7.583	3.341	5.020
60	0	6.058	11.180	8.054
60	5	9.489	9.772	7.927
60	10	9.603	8.828	6.536
60	20	1.912	8.793	13.128

Se observó un incremento en los valores de permeabilidad en las muestras con arcilla. Por otro lado, al incrementar la concentración de plastificante, la higroscopicidad del glicerol reduce las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero, permitiendo un incremento en el volumen libre, facilitando que las moléculas de agua migren, sin embargo, una excesiva movilidad de la cadena disminuye la capacidad de barrera del material. Por otro lado, el incremento en el pH produjo de manera general la reducción de los valores de permeabilidad. Hong y col. (2011), evaluaron los efectos del contenido y tipo de arcilla en las propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas en películas de agar; elaboraron películas a partir del método de dispersión continua, empleando arcillas tales como Cloisita Na⁺, Cloisita 20A, Cloisita 30B y concluyeron que para las propiedades evaluadas, la cloisita Na⁺ fue más compatible con la matriz, a concentraciones del 5% de arcilla, permitió la disminución de la permeabilidad 24%, mientras que la fuerza a la tensión incremento 18%, debido a su carácter hidrófilo en comparación con las arcillas modificadas (Cloisita 20A, Cloisita 30B), por lo que concluyen que una selección adecuada no solo de la concentración de arcilla sino del tipo de arcilla es fundamental para la optimización de los materiales.

Echeverría y col. (2014), al evaluar el efecto de la adición de montmorillonita en películas de proteínas de soya, reportaron que el incremento en la concentración de montmorillonita en la matriz y su adecuada dispersión permitió disminuir la permeabilidad a vapor de agua y concluyen que debido a que la montmorillonita posee un carácter hidrófilo, tiene la capacidad de interactuar con las moléculas de agua, a través de enlaces de hidrogeno, sugiriendo una afinidad entre la arcilla y la proteína y el glicerol con la arcilla, dejando menos sitios de interacción disponibles para la retención de agua.

5.4 Propiedades mecánicas.

5.4.1 Nanoindentación.

La figura 40, muestra las curvas de carga-desplazamiento, obtenidas en el proceso de carga y descarga del nanoindentador, los cuales representan la penetración total del indentador en la muestra al aplicarse una fuerza de presión sobre su superficie (Fischer, 2011, Zeng y Chiu, 2001, Meza y col., 2008).

Las curvas de desplazamiento muestran que la adición e incremento en la concentración de montmorillonita desplaza la curva hacia la, indicando que la adición de arcilla favorece la disminución de la deformación plástica del material. Así mismo, esta tendencia se mantiene al incrementar la concentración de plastificante, sin embargo, la diferencia entre las curvas de carga-desplazamiento fue menor, es decir, la dureza es mayor para materiales nanocompuestos y menor concentración de plastificante.

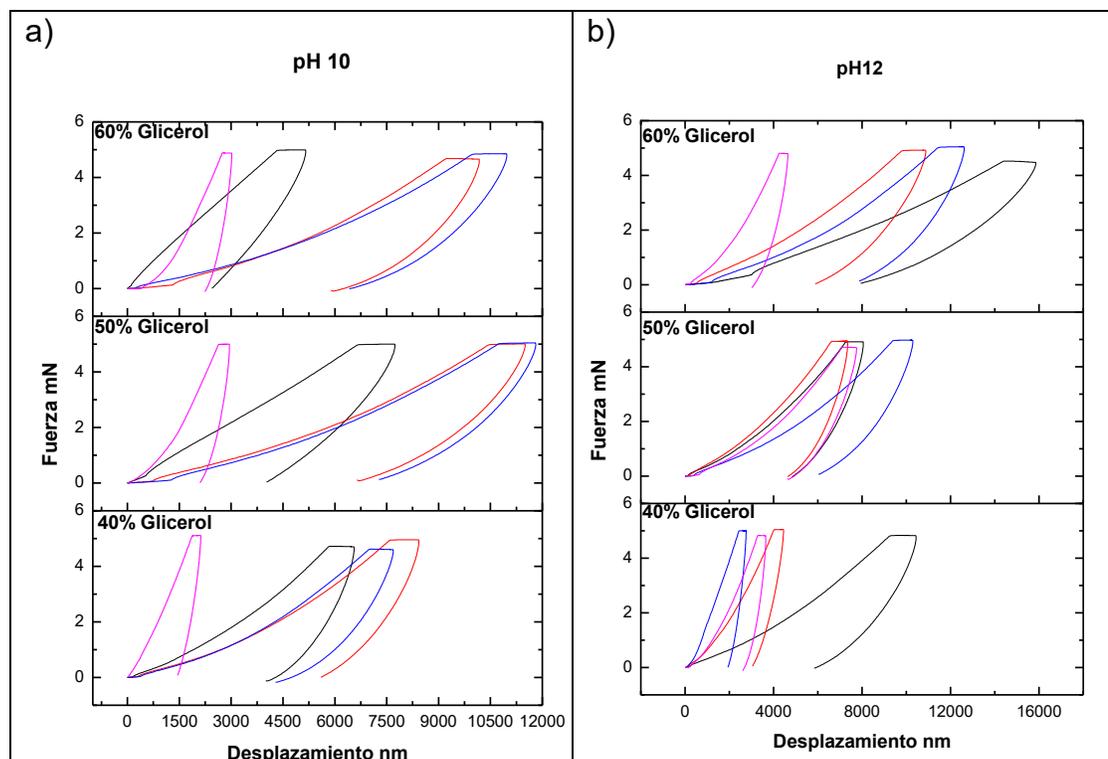


Figura 40.- Curvas de carga-desplazamiento de películas de glutelina-MMT, a) 40% glicerol, b) 50% glicerol.

— 0%, — 5%, — 10% y — 20% de cloisita.

5.4.1a) Dureza de películas de Glutelina-Cloisita Na⁺

Los valores experimentales de la dureza de las películas nanocompuestas y el efecto de los parámetros experimentales, se muestran en la tabla 9, donde los valores se encuentran organizados en base al diseño experimental. Se obtuvieron valores de dureza de los materiales en un intervalo de 0.879 a 8.210 MPa, así mismo el valor de dureza mayor, se obtuvo para las muestras con 50% (peso) de glicerol y 20 % (peso) de plastificante a un pH de la solución filmogénica de 10, mientras que los valores menores de dureza, se obtuvieron para las muestras con las siguientes condiciones; 60% (peso) de glicerol, 20% (peso) de cloisita a un pH de la solución de 11.

Tabla 9.- Dureza de películas de glutelina nanocompuestas.

Corrida	Glicerol (%)	Cloisita Na ⁺ (%)	pH	Dureza (MPa)
1	50	0	12	3.898
2	50	20	12	4.634
3	50	10	11	3.641
4	50	20	10	8.209
5	40	10	10	4.627
6	50	0	10	3.670
7	40	20	11	8.040
8	50	10	11	2.484
9	50	10	11	3.852
10	40	0	11	1.618
11	60	10	10	2.317
12	50	10	11	4.230
13	60	10	12	1.860
14	60	20	11	0.878
15	50	10	11	3.551
16	60	0	11	1.046
17	40	10	12	5.779

Las películas nanocompuestas, mostraron valores superiores de dureza, con respecto a las películas sin la presencia del elemento nanoestructurado. Sin embargo, se observó una dependencia de la dureza con el contenido de glicerol en la matriz, así a mayor concentración de plastificante se produjo la disminución de los valores de dureza en los materiales.

Sin embargo, el efecto más importante sobre la dureza de las películas nanocompuestas son debido al contenido de cloisita en el material, mientras que la combinación de los parámetros alto contenido de cloisita y bajo valor de pH (con respecto a los valores analizados), producen películas de glutelina nanocompuestas con altos valores de dureza.

El incremento en la dureza de las películas nanocompuestas al incrementar el contenido de cloisita, podría atribuirse al área superficial de la arcilla, su relación de aspecto, así como la fuerte interacción superficial entre la matriz polimérica y la arcilla mediante enlaces de puente de hidrogeno y enlaces iónicos; la resistencia ejercida por la arcilla con una gran área superficial, la orientación y las relaciones de aspecto de las capas de silicato intercaladas, además de la interacción interfacial más fuerte de hidrógeno y enlaces iónicos entre la matriz polimérica y la arcilla estratificada aumentaron la capacidad de dureza.

En general, la mejora en las propiedades mecánicas de las películas de bionanocompuestos se atribuye a la alta relación de aspecto y a la rigidez causada por la fuerte afinidad entre el biopolímero y la arcilla (Zolfi y col. 2015).

Yun y col. (2008), evaluaron las propiedades mecánicas por medio de nanoindentación, de películas nanocompuestas, basadas en polihidroxialcanoatos y nanotubos de carbono; observando que el incremento de nanotubos en el polímero provocaba el desplazamiento de las curvas de carga hacia la izquierda, así mismo, el incremento de nanoestructura propiciaba el incremento en la dureza de los materiales. (las curvas de carga-desplazamiento, obtenidas en el proceso de carga y descarga del nanoindentador, los cuales representan la penetración total del indentador en la muestra al aplicarse una fuerza de presión sobre su superficie (Fischer, 2011, Zeng y Chiu, 2001, Meza y col., 2008).

La curva de desplazamiento muestra que la adición e incremento en la concentración de montmorillonita desplaza la curva hacia la izquierda, indicando que la adición de arcilla favorece la disminución de la deformación plástica del material. Así mismo, esta tendencia se mantiene al incrementar la concentración de plastificante (figura 40), sin embargo, la diferencia entre las curvas de carga-desplazamiento fue menor, es decir, la dureza es mayor para materiales nanocompuestos y menor concentración de plastificante).

5.4.1b) Módulo de Young de películas de Glutelina-Cloisita Na⁺

La tabla 10, muestra los valores experimentales para Módulo de Young. Los valores obtenidos se encuentran en el intervalo de 0.011 a 0.876 GPa, los cuales se obtuvieron para las muestras con un contenido de cloisita de 10% (peso), una concentración de plastificante del 60% (peso) con un valor de pH de la solución filmogénica de 11, mientras que el valor de módulo de elasticidad fue obtenido a partir de soluciones con un contenido de plastificante del 40% (peso), una concentración de arcilla de 10% (peso) con un pH de la solución filmogénica de 12.

Al incrementar la presencia de arcilla en la película, se observó el incremento en los valores de módulo de elasticidad, sin embargo, concentraciones de 20% de cloisita produjeron una disminución de estos valores para los tres valores de pH analizados lo cual podría atribuirse al grado de dispersión y al incremento en la dificultad para exfoliar la nanoestructura a concentraciones superiores. Así mismo, se observó la influencia del pH sobre la capacidad mecánica de las películas; el incremento en el pH de las soluciones filmogénicas produce materiales con módulos de elasticidad mayores

Tabla 10.- Módulo de Young de películas de glutelina nanocompuestas.

Corrida	Glicerol (%)	Cloisita Na⁺ (%)	pH	Mod. De Young (GPa)
1	50	0	12	0.720
2	50	20	12	0.104
3	50	10	11	0.315
4	50	20	10	0.715
5	40	10	10	0.090
6	50	0	10	0.052
7	40	20	11	0.169
8	50	10	11	0.291
9	50	10	11	0.281
10	40	0	11	0.037
11	60	10	10	0.047
12	50	10	11	0.269
13	60	10	12	0.036
14	60	20	11	0.103
15	50	10	11	0.263
16	60	0	11	0.011
17	40	10	12	0.876

Yun y col. (2008), evaluaron las propiedades mecánicas por medio de nanoindentación, de películas nanocompuestas, basadas en polihidroxialcanoatos y nanotubos de carbono; observando que el incremento de nanotubos en el polímero provocaba el desplazamiento de las curvas de carga hacia la izquierda, así mismo, el incremento de nanoestructura propiciaba el incremento en la dureza de los materiales.

Luecha y col. (2010), elaboraron y evaluaron películas de zeína nanocompuestas con montmorillonita y reportan una optimización en las propiedades mecánicas en las muestras con presencia de nanoestructura, sin embargo, la optimización de las propiedades no fue lineal en relación con el contenido de montmorillonita en la matriz.

En el año 2010, Guerrero y colaboradores, reportan que los grupos hidroxilo del glicerol pueden interactuar con los grupos amino y carboxilo de la proteína, a través de puentes de hidrógeno, permitiendo incrementando el volumen libre del sistema, Por otro lado Oses y colaboradores (2009) y Sothornvit (2007), plantean

que grandes cantidades de glicerol no mejoran la capacidad de elongación, pero si disminuyen la fuerza de tensión a la ruptura, debido a que las proteínas presentan sitios polares y no polares que generan fuertes atracciones intermoleculares e intramoleculares, tales como puentes de hidrógeno y fuerzas dipolo-dipolo, las cuales van a restringir la movilidad de la cadena, lo que permite el incremento en la fuerza necesaria para fracturar a los materiales y el módulo de elasticidad, sin embargo, un exceso del mismo, provocara la ruptura excesiva de enlaces.

La figura 41, muestra las impresiones residuales, que fueron analizadas por microscopio óptico, se observaron marcas piramidales, características de la geometría de la punta Berkovich empleada en el indentador; las impresiones presentan una menor profundidad en las muestras con mayor concentración de glicerol y menor o nula concentración de montmorillonita, por lo que los materiales podrían presentar una mayor recuperación elástica bajo estas condiciones.

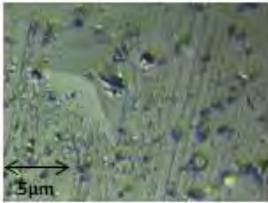
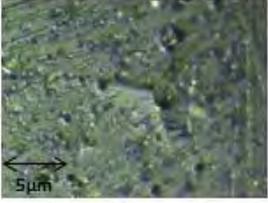
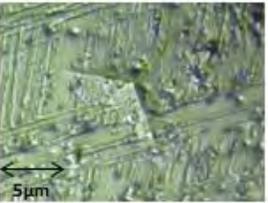
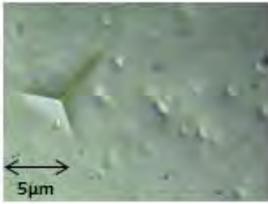
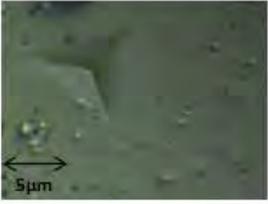
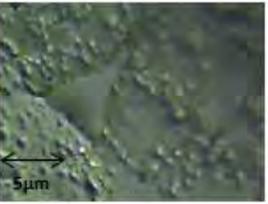
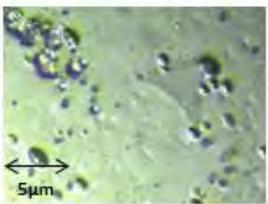
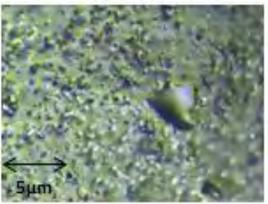
% de Glicerol			% de MMT
40	50	60	
			0
			3
			5

Figura 41.- Micrografías ópticas de películas nanocompuestas de glutelina-MMT.

Yun y col. (2008), en su estudio de películas de polihidroxialcanoatos nanocompuestas con nanotubos de carbono, indican que las grietas radiales observadas en las microscopias ópticas son indicadores del incremento en la fragilidad del material al aumentar la concentración de nanotubos en el material,

Así mismo, los resultados de dureza provistos por el indentador mostraron un incremento en la dureza de los materiales, al incluir y aumentar la concentración de montmorillonita en la matriz, así mismo, debido al efecto plastificante del glicerol, la dureza en los materiales de manera general se ve disminuida al incrementar la concentración de plastificante en el material.

Mientras que los valores de módulo de Young estimados por la misma técnica mostraron un incremento en el módulo de elasticidad conforme se adiciona montmorillonita a los materiales, sin embargo, al incrementar la concentración del elemento nanoestructurado, se genera una disminución en el módulo de elasticidad, lo cual podría deberse al grado de exfoliación de la nanoestructura.

Schütz y col. (2012), evaluaron las propiedades mecánicas de celulosa nanocompuestas con dióxido de titanio, sus resultados mostraron que al incrementar la concentración de nanopartículas con concentraciones superiores al 16 % la homogeneidad del material disminuye, afectando las propiedades mecánicas de las películas; la dureza se ve disminuida, sin embargo concentraciones de dióxido de titanio menores al 16% produce materiales con una dureza y módulo de Young de 3.4GPa y 44GPa respectivamente, valores superiores con respecto a las propiedades del material sin la presencia de nanoestructura.

5.5 Análisis por superficies de respuesta

A partir de metodologías de superficie de respuesta, se investigaron las condiciones óptimas de las diferentes variables de experimentación, así mismo se evaluó la influencia de las variables de respuesta.

Para cada respuesta, se generaron los gráficos de superficie a partir de las ecuaciones de regresión, manteniendo una variable constante y cambiando las otras dos. El modelo de regresión para las diferentes variables de respuesta, como funciones de las variables analizadas, fueron descritos en términos de los valores codificados a partir de sus ecuaciones.

5.5.1 Modelos- propiedades mecánicas y de barrera

El análisis de varianza del modelo de regresión cuadrática (tabla 11), para el caso de la permeabilidad a vapor de agua mostró significancia, así como la prueba de F mostró un valor de baja probabilidad ($p < 0.0008$), lo cual significa que existe un 0.08% de probabilidad de que un modelo con un valor de F de esta esta magnitud pueda suceder debido a ruido (Cheng y col., 2013). Mientras que los modelos para la dureza y módulo de Young mostraron valores de $p < 0.0014$ y $p < 0.0205$, indicando la significancia de los modelos. Por otro lado, el análisis de falta de ajuste no mostró significancia relativa al error, indicando que existe un 95.41%, 26.79% y 0.02% de oportunidad para que un valor de análisis de falta de ajuste pueda ocurrir debido a ruido para permeabilidad a vapor de agua, dureza y módulo de Young respectivamente.

Tabla 11.-. Análisis de varianza para los diferentes modelos.

Respuesta	Recurso	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	p
Permeabilidad a vapor de agua (Modelo	15.75	9	1.75	15.18	0.0008
	Residual	0.80	7	0.11		
	Prueba falta de ajuste	0.057	3	0.019	0.10	0.9541
	Error	0.74	4	0.18		
	Total	16.55	16			
Dureza (MPa)	Modelo	67.44	9	7.49	12.66	0.0014
	Residual	4.14	7	0.59		
	Prueba falta de ajuste	2.44	3	0.81	1.91	0.2679
	Error	1.69	4	0.42		
	Total	71.58	16			
Módulo de Young (GPa)	Modelo	0.99	9	0.11	5.19	0.0205
	Residual	0.15	7	0.021		
	Prueba falta de ajuste	0.15	3	0.049	116.11	0.0002
	Error	1.685E-3	4	4.212E-4		
	Total	1.14	16			

El análisis de regresión para el modelo (tabla 12), mostró significancia para los coeficientes de las diferentes respuestas consideradas en el diseño experimental, donde los términos cuadráticos (X_1^2 =Contenido de glicerol, X_2^2 =Contenido de cloisita Na^+ y X_3^2 =pH) fueron significativos para permeabilidad a vapor de agua, contenido de cloisita Na^+ y pH ($p < 0.05$), sin embargo, para sus interacciones (X_1X_2 , X_1X_3 y X_2X_3) no se obtuvo significancia ($p > 0.05$).

Por otro lado, para la dureza, solo el análisis de factores X_1 , X_2 , los términos cuadráticos X_1^2 , X_3^2 y los términos de interacción X_1X_2 y X_2X_3 fueron significativos

($p < 0.05$), mientras que para el análisis del factor X_3 , el término cuadrático X_2^2 y la interacción X_1X_3 no mostraron significancia ($p > 0.05$).

Tabla 12.- Coeficientes de regresión y valores de probabilidad para variables de respuesta en el diseño experimental.

Termino	Permeabilidad a vapor de agua		Dureza		Módulo de Young	
	Coefficiente	Probabilidad	Coefficiente	Probabilidad	Coefficiente	Probabilidad
Constante	-145.5041	—	86.9046	—	-1.15948	—
X_1 : Glicerol	0.7450	0.0033	1.4891	0.0004	0.37754	0.0497
X_2 : Cloisita	-0.0429	0.0253	1.9336	0.0011	0.36685	0.5315
X_3 : pH	24.1387	0.0033	-22.6878	0.2622	-1.8388	0.0832
X_1^2	-0.0078	0.0021	-0.0106	0.0259	-1.69575E-3	0.0482
X_2^2	-0.0055	0.0122	0.0040	0.3208	-3.4075E-4	0.6457
X_3^2	-1.1431	0.0002	1.1508	0.0181	0.14812	0.0752
$X_1 X_2$	0.0004	0.8007	-0.0165	0.0036	-9.85E-5	0.8962
$X_1 X_3$	0.0079	0.6549	-0.0402	0.3305	-0.019925	0.0290
$X_2 X_3$	0.0089	0.6174	-0.0951	0.0427	-0.031975	0.0032

Un valor elevado de los coeficientes de regresión, es interpretado como un gran efecto de las variables independientes sobre las respuestas, por lo que el pH presenta un gran efecto sobre la permeabilidad a vapor de agua, mientras que el contenido de glicerol y cloisita Na^+ presentan un mayor efecto sobre la dureza y el módulo de Young de las películas nanocompuestas, así mismo, los coeficientes positivos de las variables independientes indican un efecto favorable en las propiedades mecánicas y de barrera en los materiales (Hadi, 2011).

La viabilidad de los modelos fue inspeccionada a partir de los valores de R^2 ; la permeabilidad a vapor de agua mostró un valor de 0.9513, mientras que la dureza y módulo de Young mostró valores de 0.9421 respectivamente. Sin embargo, la precisión de la ecuación fue de 11.73 para la permeabilidad a vapor de agua y de 11.66 Para dureza y módulo de elasticidad, respectivamente. Tanto R^2 como la precisión de la ecuación, indican que el modelo puede ser empleado para el diseño y predicción de las propiedades de estudio en materiales nanocompuestos de glutelina de *Jatropha curcas* L./cloisita Na^+ .

Así mismo el diseño experimental aplicado, muestra que la capacidad de barrera (permeabilidad a vapor de agua) aumenta para valores altos tanto de plastificante (>40%), como de nanoarcilla (>5%) dentro de la matriz polimérica, mientras que las propiedades mecánicas (dureza y módulo de Young) aumentan para valores bajos de plastificante (<50%), y valores altos de nanoarcilla (>5%).

La influencia de las variables (contenido de glicerol, contenido de nanoestructura y pH), sobre las respuestas de las películas de *Jatropha curcas* L. nanocompuestas, son presentadas en la tabla 1.

Tabla 13.- Respuestas experimentales y predichas para películas de glutelina nanocompuestas con cloisita Na⁺.

Corrida	Glicerol	Cloisita	pH	Módulo de Young (GPa)			Dureza (MPa)			Permeabilidad (grmm/kPahrn ²)		
				Experimental	Predicción	Error	Experimental	Predicción	Error	Experimental	Predicción	Error
1	50	0	12	0.72	0.7868	0.09277778	3.8982	4.2810	0.09819917	1.9167	1.9595	0.02233005
2	50	20	12	0.104	0.2150	1.06730769	4.6344	5.2619	0.13540048	1.5688	1.4568	0.07139215
3	50	10	11	0.315	0.2830	0.1015873	3.641	3.5517	0.02452623	3.69	3.9296	0.06493225
4	50	20	10	0.7152	0.6468	0.095663758	8.2096	7.8267	0.04664052	2.37	2.3271	0.01810127
5	40	10	10	0.0902	0.0804	0.10864745	4.6274	5.3207	0.14982496	2.1205	2.0807	0.01876916
6	50	0	10	0.0522	-0.0603	2.15517241	3.6704	3.0428	0.17098954	3.0727	3.1846	0.03641748
7	40	20	11	0.169	0.2450	0.44970414	8.0403	7.7298	0.03861796	1.599	1.6816	0.05165729
8	50	10	11	0.291	0.2830	0.02749141	2.484	3.5517	0.42983092	3.69	3.9296	0.06493225
9	50	10	11	0.281	0.2830	0.00711744	3.852	3.5517	0.0779595	3.69	3.9296	0.06493225
10	40	0	11	0.0373	0.1576	3.22520107	1.618	1.5522	0.04066749	2.523	2.4507	0.02865636
11	60	10	10	0.047	0.2350	4	2.3176	2.6347	0.13682258	3.0012	2.9718	0.00979608
12	50	10	11	0.269	0.2830	0.05204461	4.23	3.5517	0.16035461	3.69	3.9296	0.06493225
13	60	10	12	0.036	0.0442	0.22777778	1.8604	1.1670	0.37271555	2.0428	2.0825	0.01943411
14	60	20	11	0.1033	-0.0185	1791.90029	0.8786	0.9443	0.07477806	2.748	2.8202	0.02627365
15	50	10	11	0.263	0.2830	0.07604563	3.55175	3.5517	1.4078E-05	3.69	3.9296	0.06493225
16	60	0	11	0.011	-0.0665	60455.5455	1.0466	1.3570	0.2965794	3.494	3.4113	0.02366915
17	40	10	12	0.8762	0.6866	0.21638895	5.779	5.4618	0.05488839	0.8452	0.8745	0.03466635

5.5.2 Modelo para permeabilidad a vapor de agua

Uno de los aspectos fundamentales en los materiales de empaque, es la permeabilidad del material al vapor de agua. La ecuación cuadrática 21, muestra la relación entre las variables independientes decodificadas con la variable dependiente PVA (permeabilidad a vapor de agua).

$$\begin{aligned}
 PVA = & -145.504 + 0.744X_1 - 0.0429X_2 + 24.138X_3 \\
 & + 4.450E^{-004}X_1X_2 + 7.922E^{-003}X_1X_3 \\
 & + 8.870E^{-003}X_2X_3 - 7.841E^{-003}X_1^2 - 5.544E^{-003}X_2^2 \\
 & - 1.143X_3^2
 \end{aligned} \tag{21}$$

El modelo mostró que el contenido de glicerol (lineal y cuadráticamente), el contenido de arcilla (lineal y cuadráticamente) y el pH ($p < 0.05$) afectan de manera significativa la permeabilidad del material. Los valores de R^2 (0.88), son una medida de la factibilidad del modelo, indicando que el 88.8% de la variación total es explicado por el modelo. La permeabilidad a vapor de agua inicialmente muestra una disminución de los valores de permeabilidad con el incremento de la concentración de plastificante y el incremento del contenido de nanoestructura, la misma tendencia se observó en los valores experimentales. La razón para la obtención de valores menores de permeabilidad podría estar relacionada con el grado de dispersión de nanoestructura en el polímero. Así mismo el gráfico de superficie muestra que el pH tendrá influencia sobre la permeabilidad a vapor de agua del material (figura 42).

De manera semejante, los gráficos de contorno (figura 43), muestran la influencia de la concentración de nanoestructura, plastificante y valores de pH sobre la permeabilidad de las películas nanocompuestas; concentraciones elevadas de plastificante, producirán valores mayores de permeabilidad, mientras que concentraciones mayores de nanoestructura y valores mayores de pH producen valores menores de permeabilidad.

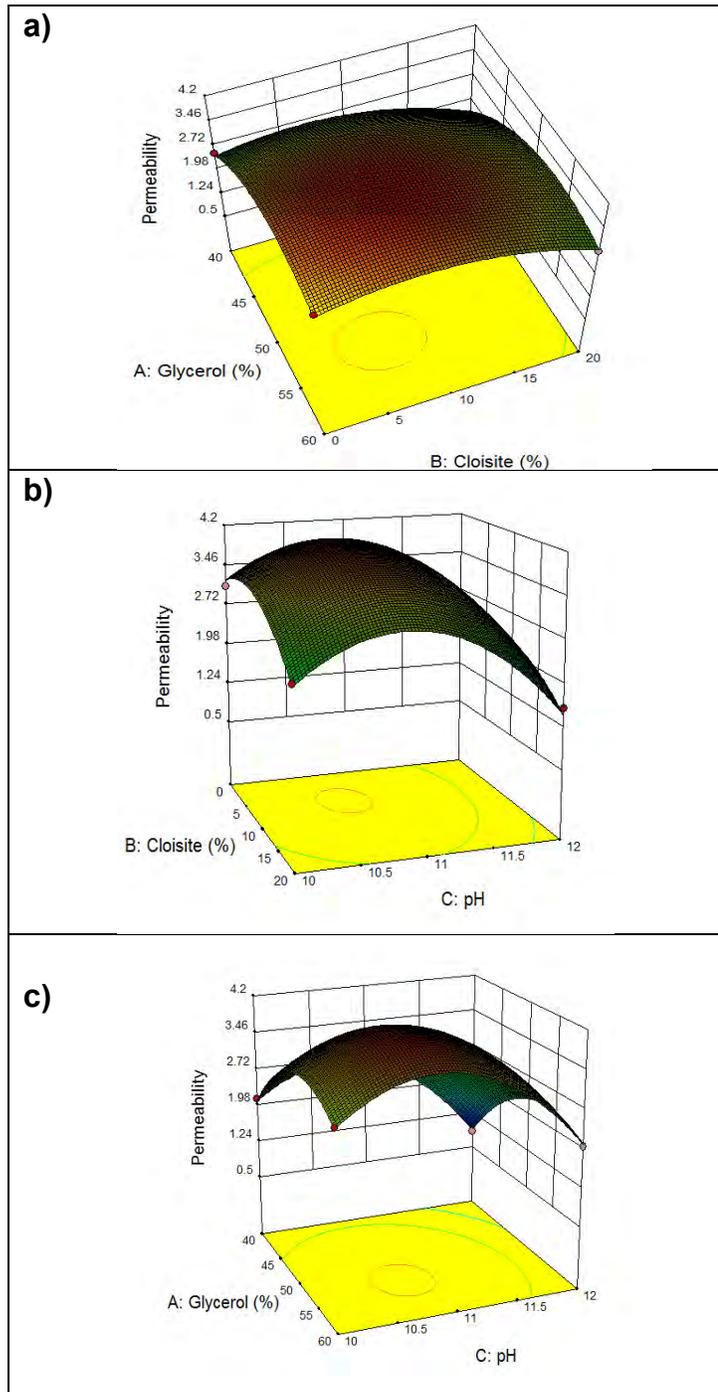


Figura 42.- Gráficos de superficie de respuesta- Permeabilidad.

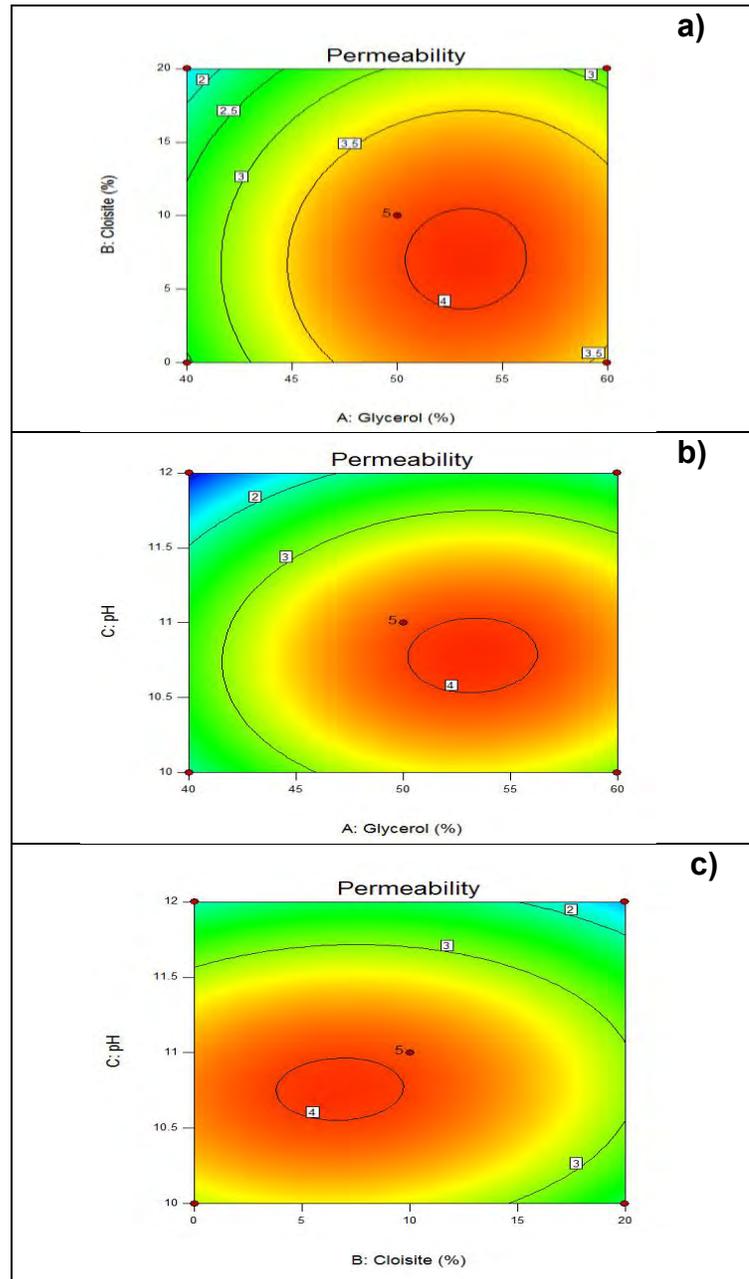


Figura 43.- Gráficos de contorno para PVA; a) efecto de los niveles de cloisita y glicerol sobre la PVA de las películas, b) efecto de los niveles de pH y glicerol sobre la PVA de las películas, c) efecto de los niveles de pH y cloisita sobre la PVA de las películas.

Ozdemir y Floros (2008), evaluaron el efecto de los constituyentes en películas de suero lácteo con cera de abeja y sorbato de potasio, sobre la permeabilidad al vapor de agua de las películas, para obtener la combinación óptima de los constituyentes, mediante gráficos de superficie, los cuales mostraron que la permeabilidad al vapor de agua se ve influenciada por todos los constituyentes de la película; la adición de proteína y cera de abeja, disminuye los valores de permeabilidad, mientras que la adición de sorbitol los incrementa, así mismo el sorbato fue el factor que más afecta a la permeabilidad, así mismo los términos significativos de segundo orden para sorbato de potasio, así como las interacciones entre el sorbitol y el sorbato y la cera de abeja con el sorbato son significativas.

Bae y col. (2009), evaluaron el efecto de factores como el tipo de arcilla, el pH y el grado de homogenización de nanoestructura en las propiedades mecánicas y de barrera de películas de gelatina nanocompuestas con montmorillonita. La presencia de montmorillonita disminuyó 75% la permeabilidad a vapor de agua de las películas, así mismo reportaron que de manera general la permeabilidad disminuyó conforme el pH de las soluciones filmogénicas se incrementaba; a pH de 5, se obtuvo un valor de permeabilidad de $15.6 \times 10^{-3} \text{ ng m/m}^2 \text{ s Pa}$, mientras que, a valores de pH de 7, la permeabilidad disminuye a $12.4 \times 10^{-3} \text{ ng m/m}^2 \text{ s Pa}$, mientras que la sonicación permitió mejorar la capacidad de barrera, sugiriendo que este resultado es debido al grado de exfoliación de la arcilla, sin embargo la evaluación estadística no mostró diferencias significativas. Slavutsky y Bertuzzi (2012), evaluaron las propiedades de barrera en películas de almidón de maíz nanocompuestas con montmorillonita al emplear diferentes condiciones de dispersión de la arcilla (método 1; agitación a 200rpm para posterior sonicar durante 60 minutos, método 2; la dispersión se efectuó por baño sonicador durante 60 minutos) , describiendo que el método de dispersión de la arcilla presenta un efecto importante en la permeabilidad a vapor de agua de las películas, donde las muestras obtenidas mediante el método 2, presentaron valores de permeabilidad a vapor de agua menores en comparación con las muestras obtenidas mediante el método 1, debido a que el segundo método mostró un efecto de tortuosidad derivado de la dispersión de la arcilla dentro de la matriz, permitiendo la disminución de la solubilidad de las películas . la permeabilidad de los materiales, mostró dependencia en la solubilidad y la difusión de agua en la matriz, los resultados obtenidos sugirieron que la disminución a la permeabilidad a vapor de agua puede ser atribuida a una fuerte interacción entre la arcilla con el almidón, así como la tortuosidad generada en la matriz polimérica debido al grado de exfoliación.

5.5.3 Modelo para propiedades mecánicas

5.5.3a) Dureza

El modelo de regresión de la dureza muestra una estadística significativa, entre el desarrollo de la película nanocompuesta y la dureza de la misma, la cual se vio influenciada por el efecto de las nanopartículas de cloisita Na⁺. La ecuación cuadrática 22, muestra la relación entre las variables independientes decodificadas con la variable dependiente dureza.

$$\begin{aligned} Dureza = & 86.904 + 1.489X_1 + 1.933X_2 - 22.687X_3 - 0.016X_1X_2 \\ & - 0.040X_1X_3 - 0.095X_2X_3 - 0.010X_1^2 + 4.005E^{-003}X_2^2 \\ & + 1.150X_3^2 \end{aligned} \quad (22)$$

La regresión lineal del coeficiente de plastificante, el cual es negativo, indica que bajas concentraciones de glicerol, producirán valores elevados en la dureza del material. Así mismo el coeficiente cuadrático de las nanopartículas de arcillas, indica que la dureza de la película nanocompuesta aumenta al incrementar la concentración de nanoestructura (figura 44).

Se generaron gráficos de contorno, para un mejor entendimiento de las respuestas del sistema con la región experimental. La figura 45, muestra la influencia de la concentración de glicerol y nanoestructura sobre la dureza del material nanocompuesto; donde el incremento en el contenido de plastificante, así como la disminución en de nanoestructura, promueve la disminución de la dureza.

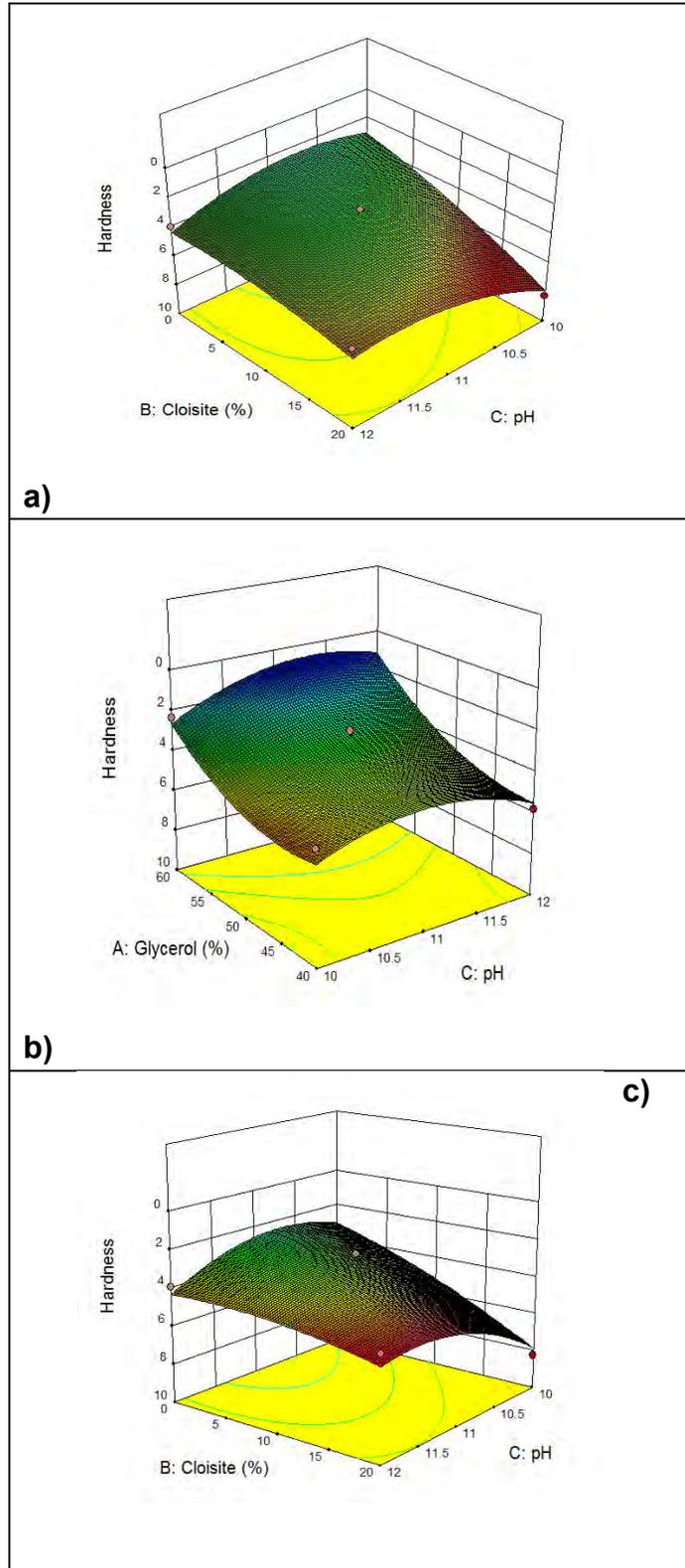


Figura 44.- Gráficos de superficie de respuesta- Dureza.

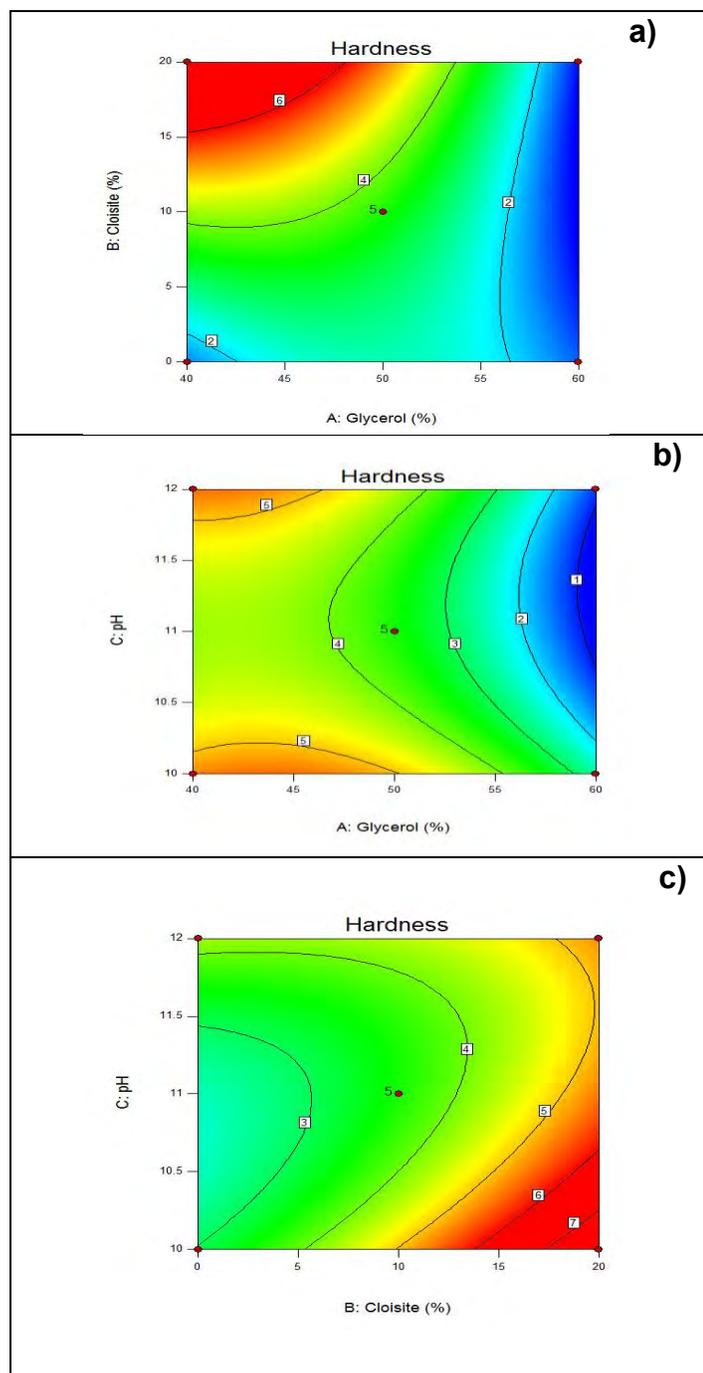


Figura 45.- Gráficos de contorno para dureza; a) efecto de los niveles de cloisita y glicerol sobre la dureza de las películas, b) efecto de los niveles de pH y glicerol sobre la dureza de las películas, c) efecto de los niveles de pH y cloisita sobre la dureza de las películas.

5.5.3b) Módulo de Young

Concerniente al módulo de elasticidad, los resultados mostraron una influencia en cuanto a la presencia de nanopartículas, el incremento en la concentración de cloisita conlleva a obtener valores mayores de módulo de Young, la ecuación del modelo se presenta a continuación (ecuación 23).

$$\begin{aligned}
 M.Y. = & -1.159 + 0.377X_1 + 0.366X_2 - 1.838X_3 - 9.850E^{-005}X_1X_2 \\
 & - 0.019X_1X_3 - 0.031X_2X_3 - 1.695E^{-003}X_1^2 \\
 & - 3.407E^{-004}X_2^2 + 0.148X_3^2
 \end{aligned} \tag{23}$$

La regresión del coeficiente de glicerol, muestra que el incremento en la concentración de plastificante tiende a disminuir los valores de módulo de Young, produciendo muestras con menor resistencia a una deformación reversible (figuras 46 y 47), así mismo el grafico de contorno, muestra la influencia de la nanoestructura y el glicerol; produciendo materiales con valores elevados de módulo de Young a concentraciones mayores de cloisita, mientras que concentraciones elevadas de plastificante mermaran los valores de este parámetro.

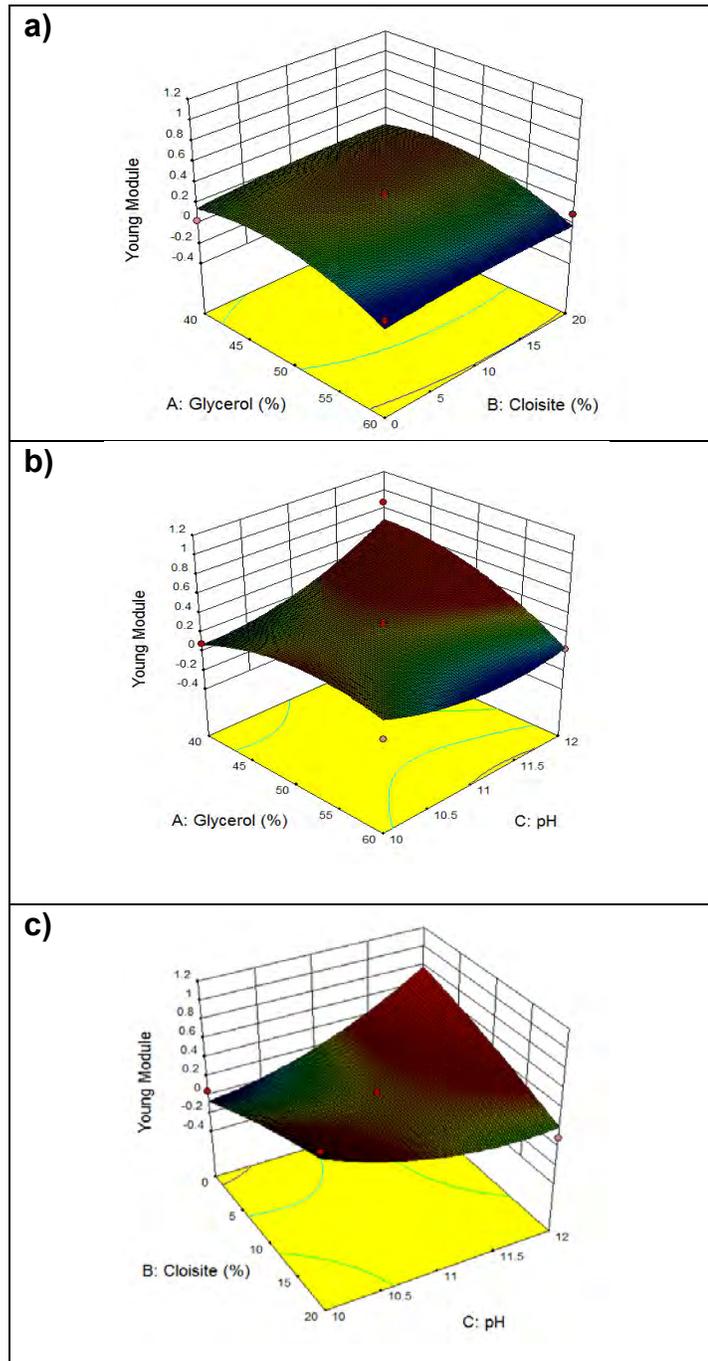


Figura 46.- Gráficos de superficie de respuesta-Módulo de Young.

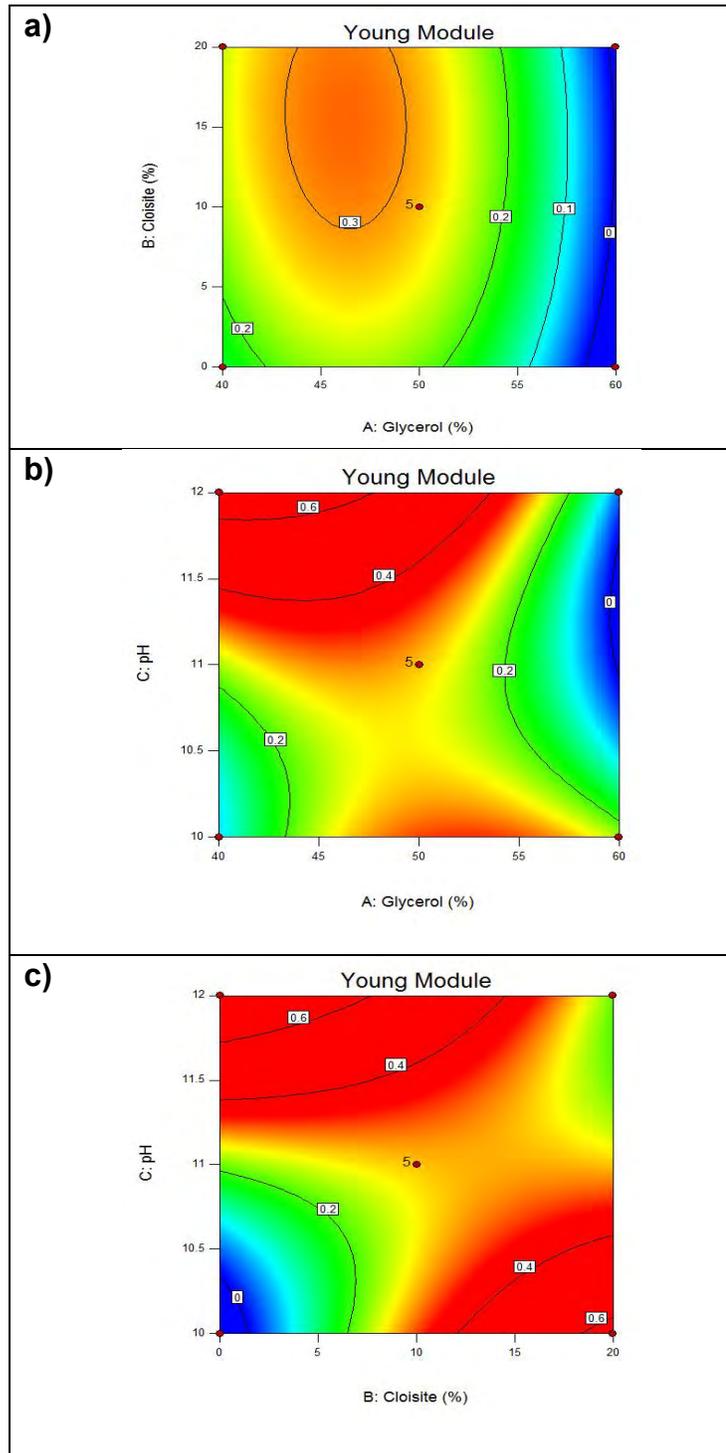


Figura 47.- Gráficos de contorno para módulo de Young; a) efecto de los niveles de cloisita y glicerol sobre el módulo de Young de las películas, b) efecto de los niveles de pH y glicerol sobre el módulo de Young de las películas, c) efecto de los niveles de pH y cloisita sobre el módulo de Young de las películas.

Kumar y col. (2010); evaluaron el efecto de una montmorillonita modificada (Cloisita 20A, Cloisita 30B) sobre la estructura y las propiedades de una película de proteína de soya, observando que los valores de fuerza de tensión se incrementaban de 2.26MPa en las muestras sin nanoarcilla, a 12.4 y 15.8MPa tras incorporar Cloisita 20A y Cloisita 30B, respectivamente, así mismo, mencionan en base a un análisis previo del mismo autor que el uso de una montmorillonita no modificada (Cloisita Na⁺), con la misma concentración evaluada en para las arcillas modificadas, produce valores de fuerza de tensión de 2.86MPa. Bajo las mismas concentraciones, las arcillas modificadas presentan una fracción de volumen mayor en comparación con la arcilla sin modificar, la cual se encuentra relacionada con la optimización de las propiedades en los materiales, por otro lado, las arcillas modificadas, presentan un espaciamiento entre placas mayor en comparación con aquellas arcillas sin modificar, lo que permite una mayor interacción con el polímero, debido a que las cadenas de la proteína pueden penetrar con mayor facilidad a las galerías de la arcilla modificada; por lo que el incremento en los valores de fuerza de tensión al incorporar arcillas modificadas en una película a base de proteína aislada de soya fue atribuida a interacción de la proteína con la arcilla, debido a la elevada fracción de volumen de la montmorillonita.

Lavorgna y col. (2010); al evaluar el efecto de glicerol y arcilla en las propiedades de películas de quitosano, observaron que el módulo de elasticidad y la dureza de las películas era mayor en los sistemas nanocompuestos, sin embargo, la posibilidad de obtener una distribución heterogénea también incrementada al aumentar la concentración de arcilla en el sistema, así mismo la ausencia de glicerol en muestras nanocompuestas, no produjo diferencias significativas en las propiedades del material, sin embargo en muestras nanocompuestas con la presencia de glicerol, la optimización de las mismas fue mayor al incrementar la presencia de arcilla, debido al efecto de la combinación del plastificante y la montmorillonita; el glicerol modificó la red polimérica a través de puentes de hidrógeno, permitiendo una mayor interacción entre el nanocompuesto y la matriz, permitiendo facilitar la transferencia de estrés de la fase reforzada, mejorando así las propiedades mecánicas de la película.

Conclusiones

- ❖ La metodología de superficies de respuesta y los métodos gráficos, permitieron obtener modelos estadísticos, que mostraron que tanto el contenido de cloisita, el contenido de plastificante y el pH, afectan de manera significativa las propiedades mecánicas y de barrera de las películas de glutelina nanocompuestas con cloisita Na⁺.
- ❖ El análisis de permeabilidad a vapor de agua mostró una disminución de la permeabilidad al incrementar la concentración de cloisita en la matriz, sin embargo, a concentraciones de 20gr/100gr de glutelina, los valores obtenidos fueron mayores, lo que permite suponer que, al incrementar la concentración de arcilla en la matriz, el grado de dispersión de esta se ve reducido, mientras que el plastificante producirá valores de permeabilidad mayores al incrementarse su presencia en la matriz. La variabilidad en los valores de pH en las soluciones filmogénicas produce efectos significativos en la permeabilidad del material; valores mayores de pH (12) produce una reducción en la permeabilidad de la película nanocompuesta.
- ❖ Las propiedades mecánicas de las películas de glutelina y cloisita Na⁺, se ven influenciadas por el pH; el módulo de elasticidad de las películas incrementa al incrementar los valores de pH, que podría ser el resultado de una interacción entre las cargas positivas de la proteína y las cargas negativas de la arcilla. De manera similar, la dureza se ve afectada positivamente cuando las soluciones se efectúan a valores mayores de pH en el intervalo investigado (10-12). Esto permite sugerir que la carga positiva de la proteína es capaz de reemplazar los iones de sodio, que se encuentran en el espacio interlamilar de la arcilla; se ha reportado que la interacción entre la montmorillonita y las proteínas involucra principalmente el intercambio entre los grupos catiónicos de los aminoácidos de las cadenas laterales de la proteína y los iones Na⁺ que se encuentran en el espacio interlamilar.

Referencias

- Alexandre, M., & Dubois, P. (2000). Polymer-Layered Silicate Nanocomposites: Preparation, Properties and Uses of a New Class of Materials and uses of a new class of materials. *Materials Science and Engineering*, 28, 1–63.
- Altinişik, A., Seki, Y., & Yurdakoç, K. (2009). Preparation and characterization of chitosan/KSF biocomposite film. *Polymer Composites*, 30(8), 1035–1042.
- Arivalagan, K., Ravichandran, S., Rangasamy, K., & Karthikeyan, E. (2011). Nanomaterials and its potential applications. *International Journal of ChemTech Research*, 3(2), 534–538.
- Armen, R., Alonso, D. O. V., & Daggett, V. (2003). The role of α -, 310 -, and π -helix in helix→coil transitions. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 12, 1145–1157.
- Aslan, N., & Cebeci, Y. (2006). Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel*, 86, 90–97.
- Averous, L., & Boquillon, N. (2004). Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours.
- Avérous, L., & Pollet, E. (2012). Biodegradable Polymers. En E. P. Luc Avérous (Ed.), *Green Energy and Technology Enviromental Silicate Nano - Biocomposites* (pp. 13–39). Springer Berlin Heidelberg.
- Bae, H. J., Park, H. J., Hong, S. I., Byun, Y. J., Darby, D. O., Kimmel, R. M., & Whiteside, W. S. (2009). Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1179–1186.
- Bandekar, J. (1992). Amide modes and protein conformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1120(2), 123–143.

- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101.
- Bermejo, M. E. G. (2010). *Cultivo in vitro de Jatropha curcas para la obtención de curcina*. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos IPN.
- Bharadwaj, R. K. (2001). Modeling the barrier properties of polymer-layered silicate nanocomposites. *Macromolecules*, 34(26), 9189–9192.
- Bodnár, I., Alting, A. C., & Verschueren, M. (2007). Structural effects on the permeability of whey protein films in an aqueous environment. *Food Hydrocolloids*, 21, 889–895.
- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M. R., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., & Vicente, A. A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, 106, 111–118.
- Brigatti, M. F., Galan, E., & Theng, B. K. G. (2006). Chapter 2 Structures and Mineralogy of Clay Minerals. En B. K. G. T. and G. L. F. Bergaya (Ed.), *Developments in Clay Science vol I Handbook of Clay Science* (1a ed., pp. 19–86). Elsevier Ltd.
- Carbonaro, M., & Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids*, 38(3), 679–690.
- Castorena, J.H. , Rojas, M. , Delgado, R., Robles, R. R. (2011). Análisis de Pulpa y Aceite de Aguacate con Espectroscopia Infrarroja. *Conciencia Tecnológica*, (42), 5–10.
- Chau, C. F., Wu, S. H., & Yen, G. C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 269–280.
- Cheng Lv, Wang, Y., Wang, L.-J., Dong, L., & Adhikari, B. (2013). Optimization of production yield and functional properties of pectin extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 233–240.
- Commission, R. D. E. L. A. (2011). L 275/38. *Diario Oficial de la Unión Europea*, pp. 38–40.
- Contreras, H. J., Trujillo, H. A., Arias, G., Pérez, J., & Delgado, E. (2010). ATR-FTIR spectroscopy of cellulose: instrumental aspect and mathematical treatment of spectra. *Revista digital científica y tecnológica*, 8(9), 1–13.
- Coronado Jorge, M. F., Alexandre, E. M. C., Caicedo Flaker, C. H., Bittante, A. M. Q. B., & Sobral, P. J. D. A. (2015). Biodegradable films based on gelatin and montmorillonite produced by spreading. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 1–9.

- Cyras, V. P., Manfredi, L. B., Ton-That, M.-T., & Vázquez, A. (2007). Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 73, 55–63.
- Dang, Q., Lu, S., Yu, S., Sun, P., & Yuan, Z. (2010). Silk fibroin/montmorillonite nanocomposites: Effect of pH on the conformational transition and clay dispersion. *Biomacromolecules*, 11(7), 1796–1801.
- Davidovic, M., Kutin, M., Linic, S., Mioc, U., Nedic, Z., & Sredic, S. (2011). Nanocomposite Based on Natural Materials. En B. Reddy (Ed.), *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites* (pp. 37–56). InTech.
- de Paula Herrmann, P. S., Yoshida, C. M. P., Antunes, A. J., & Marcondes, a. (2004). Surface evaluation of whey protein films by atomic force microscopy and water vapour permeability analysis. *Packaging Technology and Science*, 17(5), 267–273.
- Doerner, M. F., Nix, W. D. (1986). A method for interpreting the data from depth-sensing indentation instruments. *Journal of Materials Research*, 1(4), 601–609.
- Dong, A., Huang, P., & Caughey, W. S. (1990). Protein Secondary Structures in Water from Second-Derivative Amide I Infrared Spectra+. *Biochemistry*, 29(13), 3303–3308.
- Dufresne, A., Thomas, S., & Pothan, L. A. (2013). *Biopolymer Nanocomposites Processing, Properties, and Applications*. (S. E. Richard F. Grossman and Domasius Nwabunma, Ed.) (2a ed.). United States of America: Wiley.
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363, 1–24.
- Echeverría, I., Eisenberg, P., & Mauri, A. N. (2014). Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 449, 15–26.
- Elliot, A., Ambrose, J. y Robinson, C. (1950). elliot_Chain configuration in natured and denatured insulin.pdf. *Nature*, 166, 194.
- Factors, C., Europeias, D. A. S. C., Comissão Europeia, & ASTM. (2002). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials 1. *Astm*, 14(July 2000), 1–10.
- Feng Z.-Q., HeQ.-C. , Zeng Q., J. P. (2010). Theory of Nanoindentation. En K. D. Sattler (Ed.), *Handbook of Nanophysics Functional Nanomaterials* (pp. 1–15). CRC Press.
- Fernández, C. (2014). *Polietileno nanoarcillas*. Universidad de Murcia.

- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179–186.
- Fischer-Cripps, A. C. (2011). *Nanoindentation*. Springer New York.
- Fredrickson, G. H., & Bicerano, J. (1999). Barrier properties of oriented disk composites. *The Journal of Chemical Physics*, 110(4), 2181–2188.
- Gao, C., Stading, M., Wellner, N., Parker, M. L., Noel, T. R., Mills, E. N. C., & Belton, P. S. (2006). Plasticization of a protein-based film by glycerol: A spectroscopic, mechanical, and thermal study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4611–4616.
- Georget, D. M. R., & Belton, P. S. (2006). Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 7(2), 469–475.
- Gilbert, V., Rouabhia, M., Wang, H., Arnould, A. L., Remondetto, G., & Subirade, M. (2005). Characterization and evaluation of whey protein-based biofilms as substrates for in vitro cell cultures. *Biomaterials*, 26, 7471–7480.
- Gleiter, H. (1989). Nanocrystalline Materials. *Progress in Materials Science*, 33, 223–315.
- Gleiter, H. (2000). Nanostructured Materials: Basic Concepts and Microstructure. *Acta Materialia*, 48(1), 1–29.
- Gómez A, Marín A I, Campo J, Domínguez J H, Cano L M, Segura L M, Cuéllar M, Fernández M J, S. O. y L. X. (2009). *La XUTA se come*. (X. L. Arturo Gómez Pompa, Ana Isabel Marín Andrade, Joel Campo García, José Homero Domínguez Landa, Leticia M. Segura Juárez, Marina Cuéllar Martínez, Mario José Fernández Sánchez, Odilón Sánchez Sánchez, Ed.), *La xuta se come* (1a ed.). Veracruz, México: Universidad Veracruzana Dirección General Editorial.
- Gross, R. a, & Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), 803–807.
- Guerrero, P., Retegi, a., Gabilondo, N., & De La Caba, K. (2010). Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 145–151.
- Gunning, A. P., Wilde, P. J., Clark, D. C., Morris, V. J., Parker, M. L., & Gunning, P. A. (1996). Atomic Force Microscopy of Interfacial Protein Films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 183(2), 600–602.
- Hadi A E, Salit MS, Ahmad M H M, D. K. Z. H. M. and U. M. (2011). Tensile properties of abaca (*Musa textile Nee*) fibre reinforced High Impact

- Polystyrene (HIPS) composite. *Pertanika Journal of Science & Technology*, 19(2), 349–363.
- Heller, J. (1996). *Physic nut*. Roma: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Re- search, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
 - Hong, S.-I., Lee, H.-H., & Rhim, J.-W. (2011). Effects of clay type and content on mechanical, water barrier and antimicrobial properties of agar-based nanocomposite films. En G. D. Petros S. Taoukis, Stoforos, Nikolaos G., Karathanos, Vaios T., Saravacos (Ed.), *The 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF)* (Vol. 2, p. 689). Athens, Greece: Cosmosware
 - Insanu, M., Dimaki, C., Wilkins, R., Brooker, J., Van Der Linde, P., & Kayser, O. (2013). Rational use of *Jatropha curcas* L. in food and medicine: From toxicity problems to safe applications. *Phytochemistry Reviews*, 12, 107–119.
 - Jeon, I. Y., & Baek, J. B. (2010). Nanocomposites derived from polymers and inorganic nanoparticles. *Materials*, 3(6), 3654–3674.
 - Jiang, Y., Li, C., Nguyen, X., Muzammil, S., Towers, E., Gabrielson, J., & Narhi, L. (2011). Qualification of FTIR spectroscopic method for protein secondary structural analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(11), 4631–4641.
 - Kadam, D. M., Thunga, M., Wang, S., Kessler, M. R., Grewell, D., Lamsal, B., & Yu, C. (2013). Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 133–140.
 - Kinloch, A. J., & Taylor, A. C. (2006). The mechanical properties and fracture behaviour of epoxy-inorganic micro- and nano-composites. *Journal of Materials Science*, 41(11), 3271–3297.
 - Koenig, J. L. (2001). *Infrared and Raman Spectroscopy of Polymers Rapra review reports effect of thermal history on the rheological behavior of thermoplastic polyurethanes*. Rapra Technology Limited (Vol. 12). Unated Kingdom.
 - Kolybaba, M., Tabil, L. G. G., Panigrahi, S., Crerar, W. J., Powell, T., Wang, B., Dakota, N. (2003). Biodegradable polymers: past, present, and future. *2003 CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting*, 300(3), 1–15.
 - Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549–559.
 - Kumar, A. (2011). Properties of biodegradable polymers and degradation for sustainable development. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2(3), 164–167.

- Kumar, P., Sandeep, K. P., Alavi, S., Truong, V. D., & Gorga, R. E. (2010). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. *Journal of Food Engineering*, *100*, 480–489.
- Kumar, P., Sandeep, K. P., Alavi, S., Truong, V. D., & Gorga, R. E. (2010). Effect of Type and Content of Modified Montmorillonite on the Structure and Properties of Bio-Nanocomposite Films Based on Soy Protein Isolate and Montmorillonite. *Journal of Food Science*, *75*(5), 46–56.
- Lape, N. K., Nuxoll, E. E., & Cussler, E. L. (2004). Polydisperse flakes in barrier films. *Journal of Membrane Science*, *236*, 29–37.
- Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., & Buonocore, G. G. (2010). Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, *82*(2), 291–298.
- LeBaron, P. C., Wang, Z., & Pinnavaia, T. J. (1999). Polymer layered silicate nanocomposites: an overview. *Applied Clay Science*, *15*, 11–29.
- Li, Y., Jiang, Y., Liu, F., Ren, F., Zhao, G., & Leng, X. (2011). Fabrication and characterization of TiO₂/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 1098–1104.
- López, M.C. Osorio, G. Arellano, S. Gallardo, T. Flores, S.O. López, M. S. (2017). Preparation of starch/clay/glycerol nanocomposite Films and their FTIR, XRD, SEM and mechanical characterizations. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *16*(3), 793–804.
- Luecha, J., Sozer, N., & Kokini, J. L. (2010). Synthesis and properties of corn zein/montmorillonite nanocomposite films. *Journal of Materials Science*, *45*, 3529–3537.
- Ma, C. Y., Rout, M. K., & Mock, W. Y. (2001). Study of oat globulin conformation by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(7), 3328–3334.
- Machado V., Vilela S, Soraia Vilela Borgesa , de Barros R.V., Silva E.K., Medeiros E.A., S. N. de. (2017). Optical and structural properties of biodegradable whey protein isolate nanocomposite films for active packaging. *International Journal of Food Properties*, *20*(2), 1869–1878.
- Martelli, S. M., Moore, G. R. P., & Laurindo, J. B. (2006). Mechanical properties, water vapor permeability and water affinity of feather keratin films plasticized with sorbitol. *Journal of Polymers and the Environment*, *14*(3), 215–222.
- Martínez-Herrera, J., Martíne Ayala, A., Makkar, H., Francis, G., & Becker, K. (2010). Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization

- of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research*, 39(3), 396–407.
- Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortiz, G., & Becker, K. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry*, 96, 80–89.
 - Meng, B. Y., & Hay, J. (s/f). Standardized Nanoindentation : ISO 14577, 1–4.
 - Meza, J. M., Franco, E. E., Farias, M. C. M., Buiochi, F., & Souza, R. M. (2008). Medición del módulo de elasticidad en materiales de ingeniería utilizando la técnica de indentación instrumentada y de ultrasonido. *Revista de Metalurgia*, 44(1), 52–65.
 - Mueller, K., & Schoenweitz, C. and L. H.-C. (2012). Thin Laminate Films for Barrier Packaging Application – Influence of Down Gauging and Substrate Surface Properties on the Permeation Properties. *Packaging and Technology and Science*, 25, 137–148.
 - Nguyen, Q. T., & Baird, D. G. (2007). An improved technique for exfoliating and dispersing nanoclay particles into polymer matrices using supercritical carbon dioxide. *Polymer*, 48(23), 6923–6933.
 - Nielsen, L. E. (1967). Models for the Permeability of Filled Polymer Systems. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry*, 1(5), 929–942.
 - Ogale A.A., Cunningham P., Dawson P.L., A. J. C. (2000). Characterization of Soy Protein Isolate Films. *Journal of Food Science*, 65(4), 672–679.
 - Okada A, Kawasumi M, Usuki A, Kojima Y, K. T. and K. O. (1990). Nylon 6-clay hybrid. En M. J. E. Schaefer D W (Ed.), *Polymer Based Molecular Composites vol 171*. United States of America: MAterials Research Society.
 - Olabarrieta, I., Gallstedt, M., Ispizua, I., Sarasua, J. R., & Hedenqvist, M. S. (2006). Properties of aged montmorillonite-wheat gluten composite films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1283–1288.
 - Oliver, W. C., & Pharr, G. M. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments experiments. *Journal of Materials Research*, 7(6), 1564–1583.
 - Osés, J., Niza, S., Ziani, K., & Maté, J. I. (2009). Potato starch edible films to control oxidative rancidity of polyunsaturated lipids: Effects of film composition, thickness and water activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(7), 1360–1366.
 - Oyuela D, Hernández E, Samayoa S, Bueso C, P. O. (2012). *Guía técnica-ambiental para el cultivo de la Jatropha curcas (piñón)*. Secretaría de

- Recursos Naturales y del Ambiente* (1a ed., Vol. 1). Tegucigalpa, Honduras: Caracol Impresiones.
- Özcalik, O. (2010). *Preparation and Characterization of Antimicrobial Polymeric Films for Food Packaging Applications*. Izmir Institute of Technology.
 - Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 215–224.
 - Panick, G., Malessa, R., Winter, R., Rapp, G., Frye, F. J., & Royer, C. A. (1998). Structural characterisation of the pressure-denatured state and unfolding/refolding kinetics of Staphylococcal nuclease by synchrotron small angle X-ray scattering and Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 275, 389–402.
 - Peralta, E. (2004). *Caracterización Bioquímica de las Proteínas de la semilla de Jatropha Curcas L.* Instituto Politécnico Nacional.
 - Pereira, R. C., Carneiro, J. de D. S., Assis, O. B. G., & Borges, S. V. (2017). Mechanical and structural characterization of whey protein concentrate/montmorillonite/lycopene films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14), 4978–4986.
 - Pethica, J. B., Hutchings, R., & Oliver, W. C. (1983). Hardness measurement at penetration depths as small as 20 nm. *Philosophical Magazine A*, 48(June 2015), 593–606.
 - Piringer O G, B. A. L. (2008). *Plastic packaging interactions with food and pharmaceuticals*. (B. A. L. Piringer O G, Ed.) (2a ed.). Federal Republic of Germany: WILEY-VCH.
 - Poon, B., Rittel, D., & Ravichandran, G. (2008). An analysis of nanoindentation in elasto-plastic solids. *International Journal of Solids and Structures*, 45, 6399–6415.
 - Ramakrishna, S., Lim, T. C., Inai, R., & Fujihara, K. (2006). Modified Halpin-Tsai equation for Clay-Reinforced polymer nanofiber. *Mechanics of Advanced Materials and Structures*, 13(1), 77–81.
 - Ramos, Ó. L., Reinas, I., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., ... Malcata, F. X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 110–122.
 - Rangel-Marrón, M., Montalvo-Paquini, C., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Physical and mechanical properties of alginate edible films formulated with a two level experimental design. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*, 8, 89–97.

- Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2003). Molecular mechanisms of Fe²⁺-induced β -lactoglobulin cold gelation. *Biopolymers*.
- Rhim, J. W., Hong, S. I., & Ha, C. S. (2009). Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 612–617.
- Roco, M. (2002). Government nanotechnology funding: An international outlook. *Jom Government Nanomaterials*, 54(9), 22–23.
- Rodríguez, A. (2001). Determinación De Cafeína En Bebidas Gasificadas Oscuras Y Determinación De Caseína En Leche; Aplicación De La Espectrofotometría De Segunda Derivada. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 4(2), 72–77.
- Scaffaro, R., & Botta, L. (2014). Degradation Behavior of Nanocomposite Polymer Blends. En R. S. and C. S. Sabu Thomas (Ed.), *Nanostructured Polymer Blends* (pp. 423–447). United Kingdom: Elsevier Inc.
- Schmid, M., Dallmann, K., Bugnicourt, E., Cordoni, D., Wild, F., Lazzeri, A., and Noller, K. (2013). Processing and validation of whey-protein-coated films and laminates at semi-industrial scale as novel recyclable food packaging materials with excellent barrier properties. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2012, 5–7.
- Schmidt, C. G., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., José, A., & Teixeira, Furlong, E. B. (2015). Rice bran protein-based films enriched by phenolic extract of fermented rice bran and montmorillonite clay. *CyTA - Journal of Food*, 13(2), 204–212.
- Schütz, C., Sort, J., Bacsik, Z., Oliynyk, V., Pellicer, E., Fall, A., ... Salazar-Alvarez, G. (2012). Hard and Transparent Films Formed by Nanocellulose-TiO₂ Nanoparticle Hybrids. *PLoS ONE*, 7(10), 1–8.
- Shevkani, K., & Singh, N. (2015). Relationship between protein characteristics and film-forming properties of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 1033–1043.
- Shi, L., Zhou, J., & Gunasekaran, S. (2008). Low temperature fabrication of ZnO-whey protein isolate nanocomposite. *Materials Letters*, 62(28), 4383–4385.
- Sinha Ray, S., & Okamoto, M. (2003). Polymer/layered silicate nanocomposites: A review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 28(11), 1539–1641.
- Siracusa, V. (2012). Food packaging permeability behaviour: A report. *International Journal of Polymer Science*, 2012, 1–11.

- Slavutsky, A. M., Bertuzzi, M. A., & Armada, M. (2012). Water barrier properties of starch-clay nanocomposite films. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(3), 208–218.
- Sothornvit, R., Hong, S. I., An, D. J., & Rhim, J. W. (2010). Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 279–284.
- Sothornvit, R., Olsen, C. W., McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (2007). Tensile properties of compression-molded whey protein sheets: Determination of molding condition and glycerol-content effects and comparison with solution-cast films. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 855–860.
- Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82–89.
- Spence, K. E. (1994). *Biodegradable plastic made from dialdehyde starch and zein*. Iowa State University.
- Sposito, G., Skipper, N. T., Sutton, R., Park, S. -h., Soper, A. K., & Greathouse, J. A. (1999). Surface geochemistry of the clay minerals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3358–3364.
- Steinmann, V. W. (2002). Diversidad y endemismo de la Familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 61, 61–93.
- Susi, B. H., & Byler, D. M. (1986). Resolution-Enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Enzymes. *Methods in Enzymology*, 130, 290–311.
- Tandon, G. P., & Weng. (1984). The effect of aspect ratio of inclusions on the elastic properties of unidirectionally aligned composites. *Polymer Composites*, 5(4), 327–333.
- Tang, X., Alavi, S., & Herald, T. J. (2008). Barrier and mechanical properties of starch-clay nanocomposite films. *Cereal Chemistry*, 85(3), 433–439.
- Torii, H., & Tasumi, M. (1992). Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins. *The Journal of Chemical Physics*, 96(5), 3379–3387.
- Tournassat, C., Ferrage, E., Poinignon, C., & Charlet, L. (2004). The titration of clay minerals: II. Structure-based model and implications for clay reactivity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(1), 234–246.
- U.S.Congress, O. of T. A. (1993). Biopolymers: Making Materials Nature's Way September 1993. *Office of Technology Assessment*, (September), 1–80.
- Uddin, F. (2008). Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals. *Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science*, 39, 2804–2814.

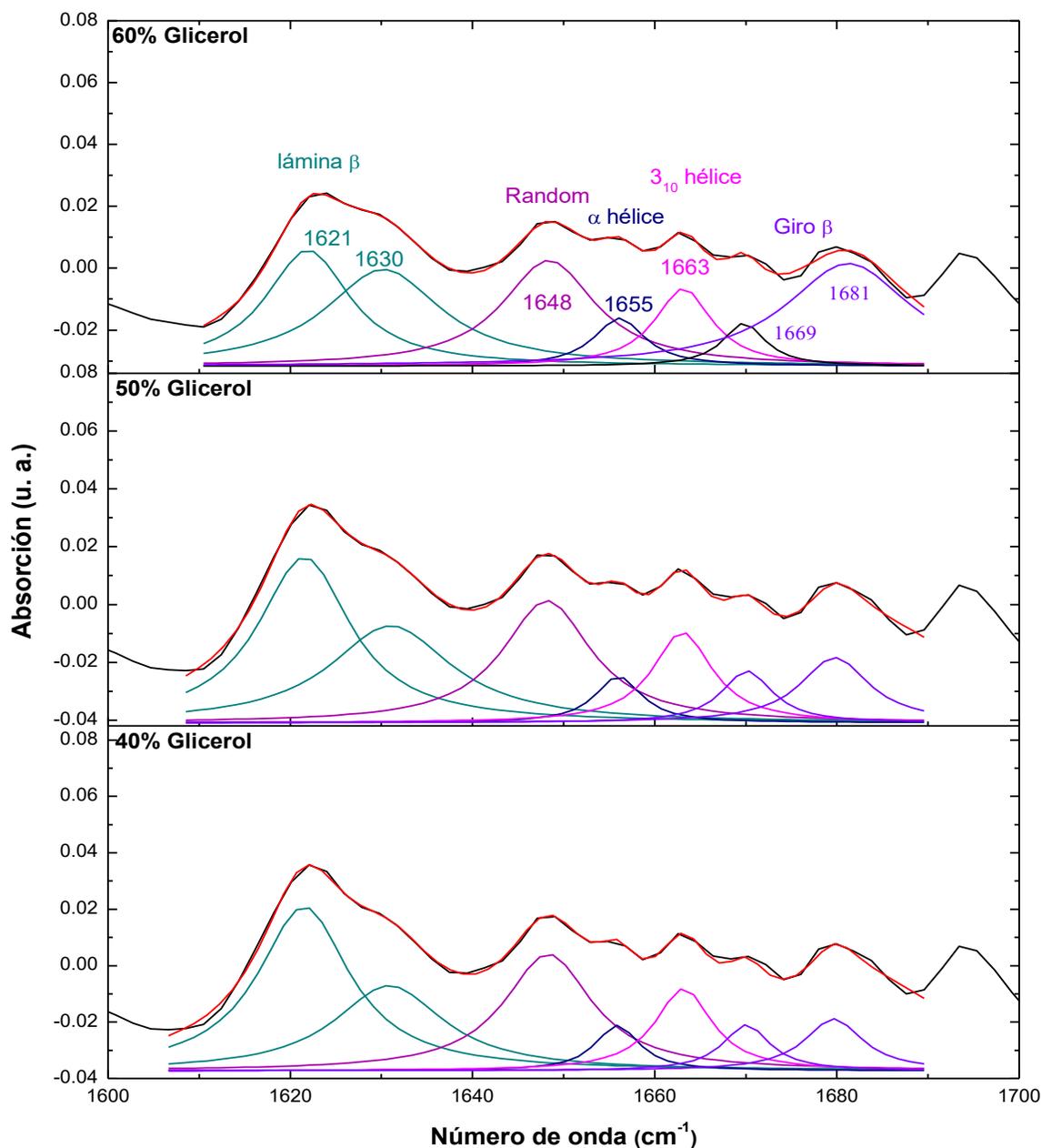
- Usuki A, Kojima Y, Kawasumi M, Okada A, Fukushima Y, K. T. and K. O. (1993). Synthesis of nylon 6-clay hybrid. *Journal of Materials Research*, 8(5), 1179–1184.
- Vartiainen, J., Tuominen, M., & Nättinen, K. (2010). Bio-hybrid nanocomposite coatings from sonicated chitosan and nanoclay. *Journal of Applied Polymer Science*, 116, 3638–3647.
- Venyaminov, S.YU. and Kalnin, N. N. (1990). Quantitative IR. Spectrophotometry of Peptide Compounds in Water (H₂O) Solutions. I. Spectral Parameters of Amino Acid Residue Absorption Bands. *Biopolymers*, 30, 1243–1257.
- Verbeek, C. J. R., & Van Den Berg, L. E. (2010). Extrusion processing and properties of protein-based thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295(1), 10–21.
- Wang, S.-Y., Zhu, B.-B., Li, D.-Z., Fu, X.-Z., & Shi, L. (2012). Preparation and characterization of TiO₂/SPI composite film. *Materials Letters*, 83, 42–45.
- Xia, B. Y., Yang, P., Sun, Y., Wu, Y., Mayers, B., Gates, B., Yan, H. (2003). One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications, 15(5), 353–389.
- Yang, K.-K., Wang, X.-L., & Wang, Y.-Z. (2007). Progress in Nanocomposite of Biodegradable Polymer. *J. Ind. Eng. Chem*, 13(4), 485–500.
- Yun, S. Il, Gadd, G. E., Latella, B. A., Lo, V., Russell, R. A., & Holden, P. J. (2008). Mechanical properties of biodegradable polyhydroxyalkanoates/single wall carbon nanotube nanocomposite films. *Polymer Bulletin*, 61(2), 267–275.
- Zeng, K., & Chiu, C. H. (2001). An analysis of load-penetration curves from instrumented indentation. *Acta Materialia*, 49(17), 3539–3551.
- Zeng, Q., & Yu, A. (2010). Prediction of the Mechanical Properties of Nanocomposites. En V. Mittal (Ed.), *Optimization of Polymer Nanocomposite Properties* (pp. 301–332). Alemania.
- Zhang, H., & Mittal, G. (2010). Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 29(2), 203–220.
- Zhao, R., Torley, P., & Halley, P. J. (2008). Emerging biodegradable materials: Starch- and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 43(9), 3058–3071.
- Zhao, X., Chen, F., Xue, W., & Lee, L. (2008). FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 568–575.

- Zheng, J. P., Li, P., Ma, Y. L., & Yao, K. De. (2002). Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(5), 1189–1194.
- Zhou, J. J., S. Y. W. and S. G. (2009). Preparation and Characterization of Whey Protein Film Incorporated with TiO₂ Nanoparticles. *Journal of Food Science*, 74(7), 50–56.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2015). Characterization of the new biodegradable WPI/clay nanocomposite films based on kefiran exopolysaccharide. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3485–3493.

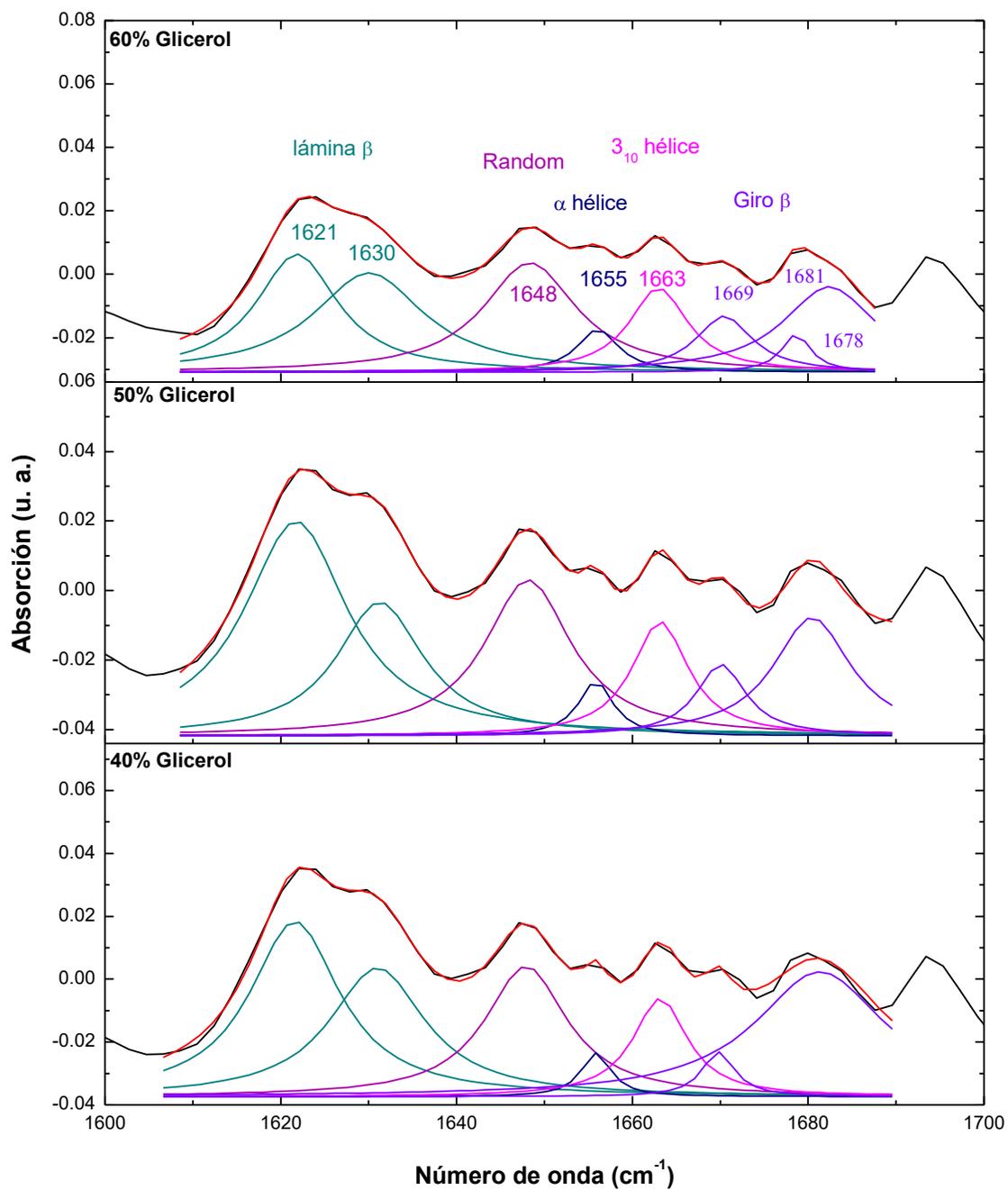
Anexos

Anexo 1

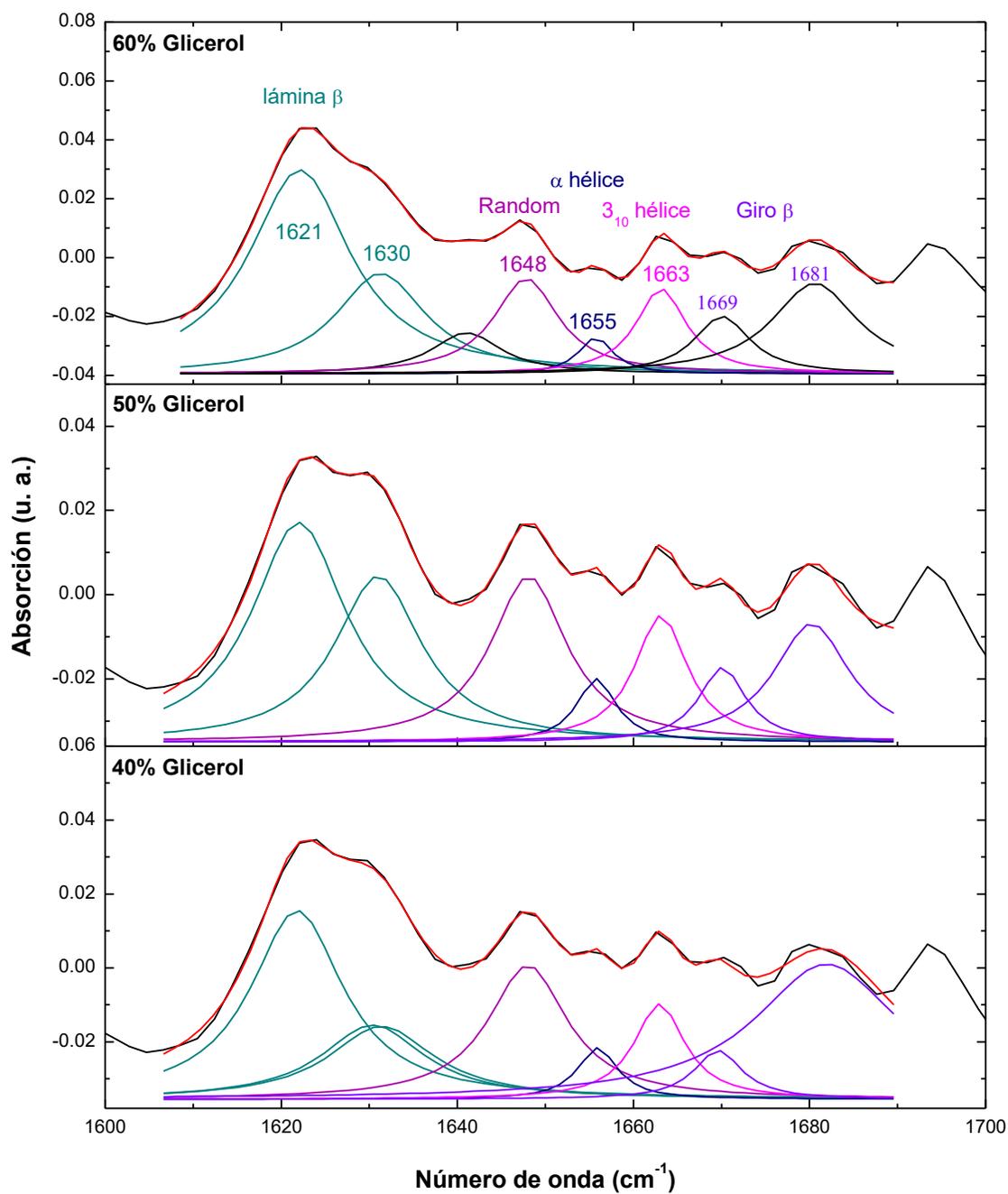
Deconvolución de espectros FTIR de películas de Glutelina-Cloisita Na⁺.



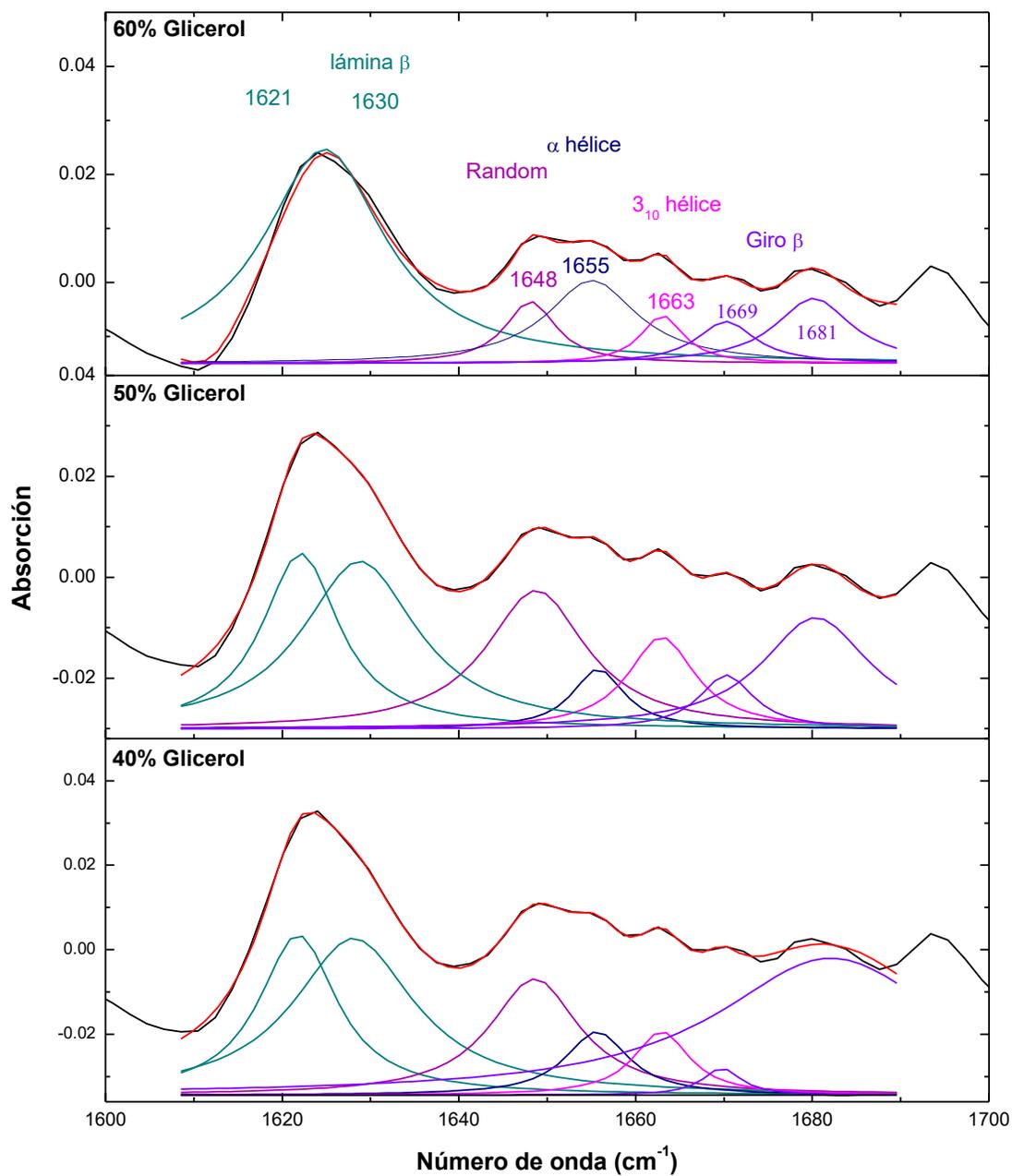
Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ (5%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10.



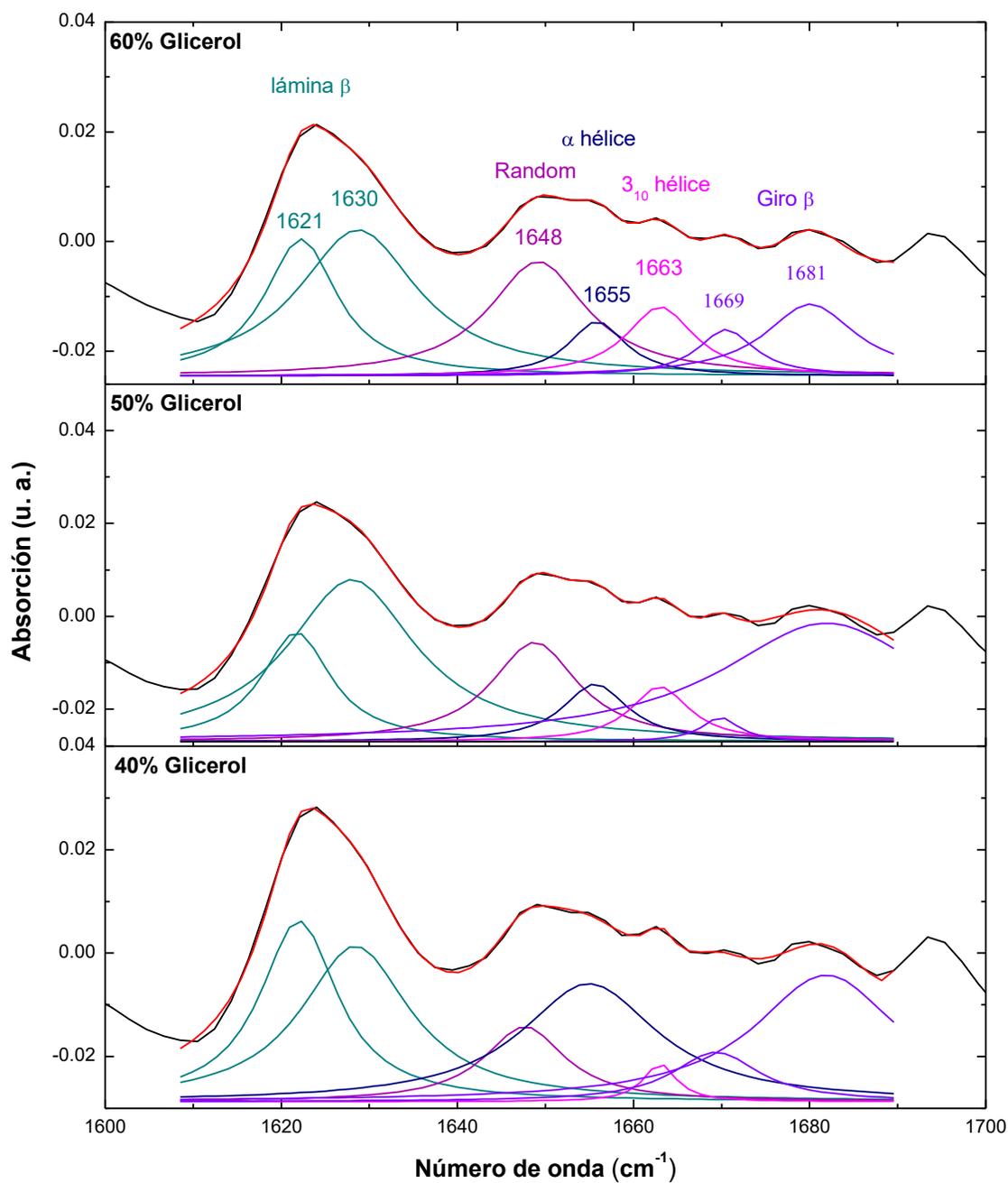
Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ (10%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10.



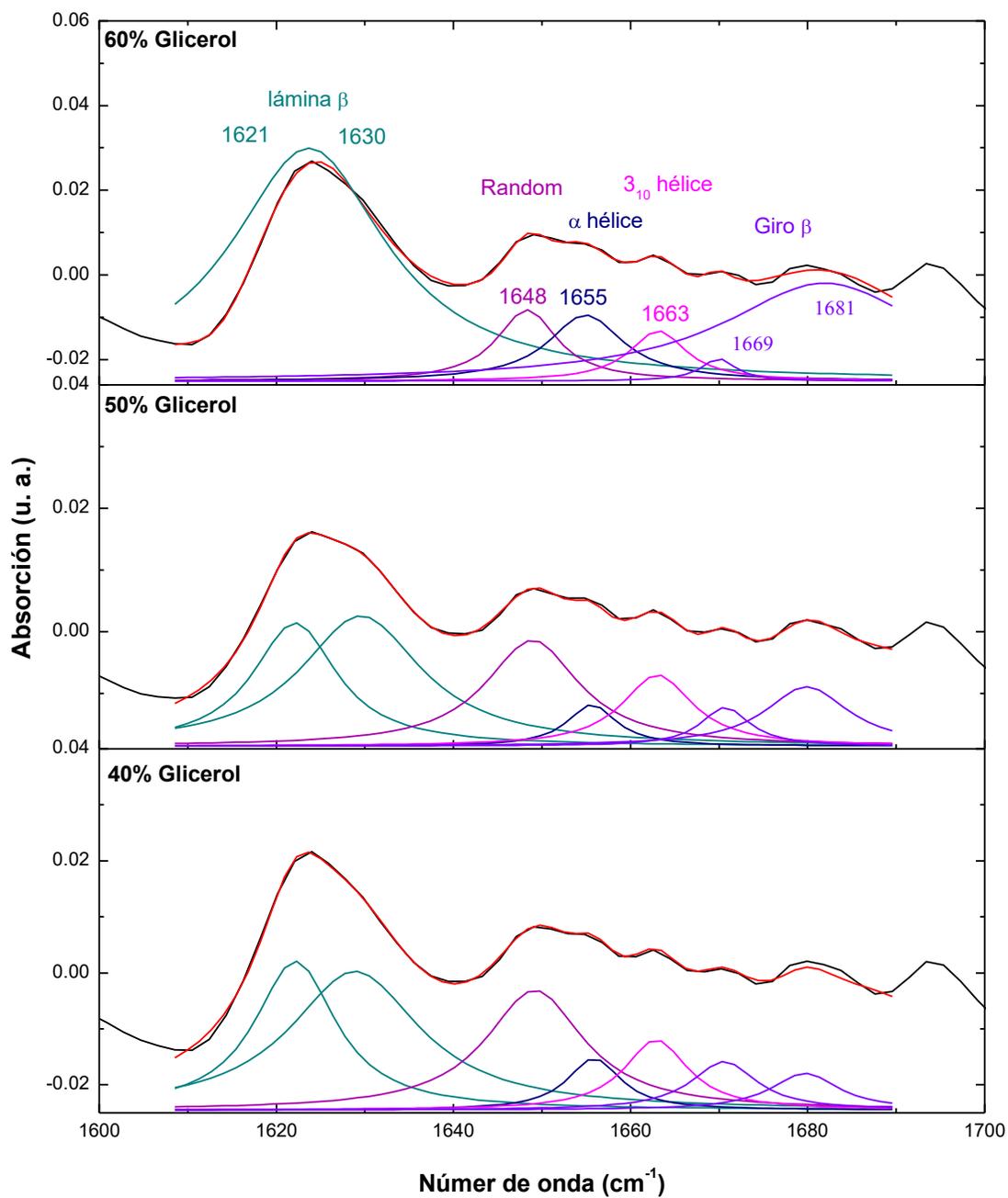
Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ (20%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 10.



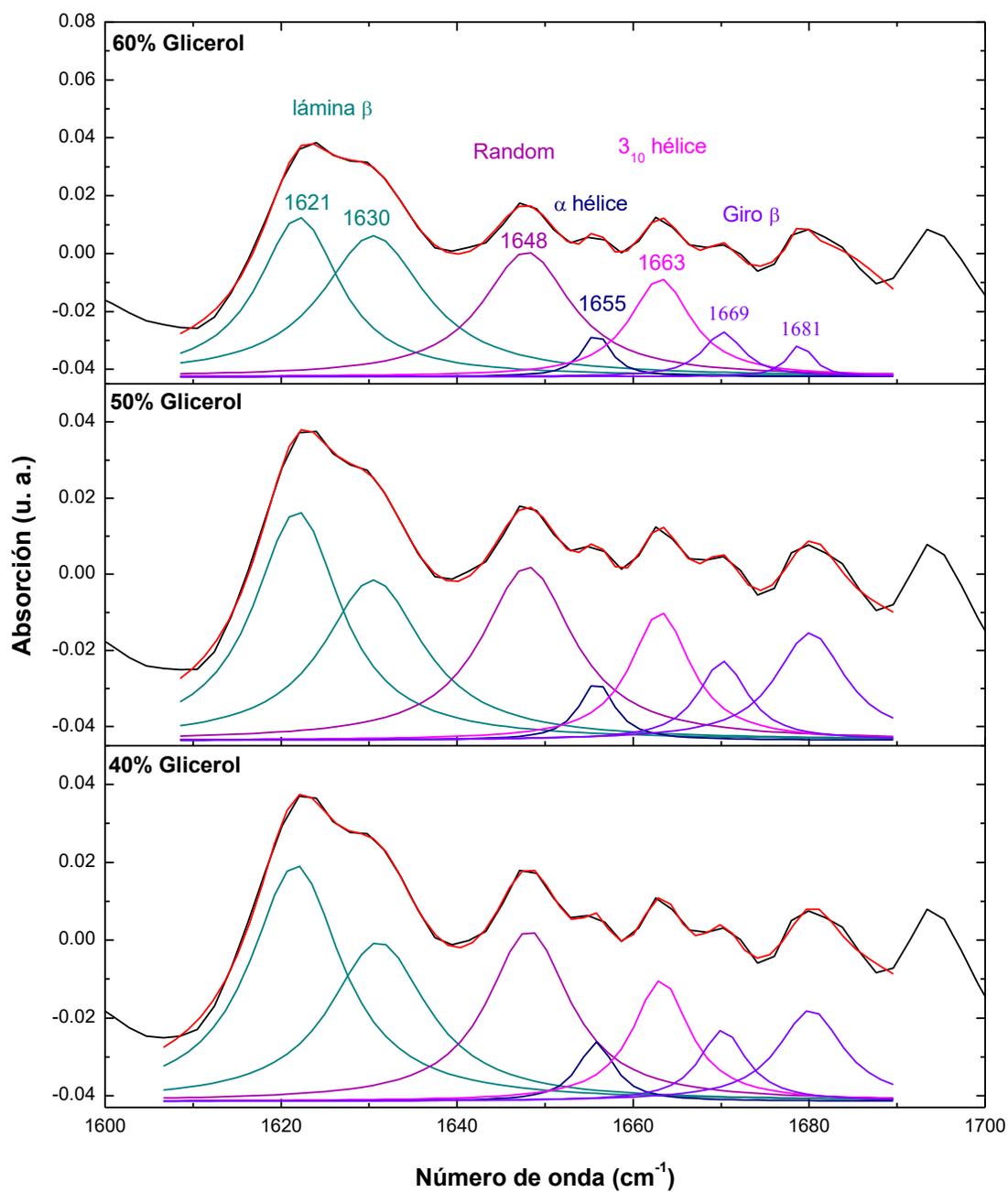
Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Choisita Na⁺ (5%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11.



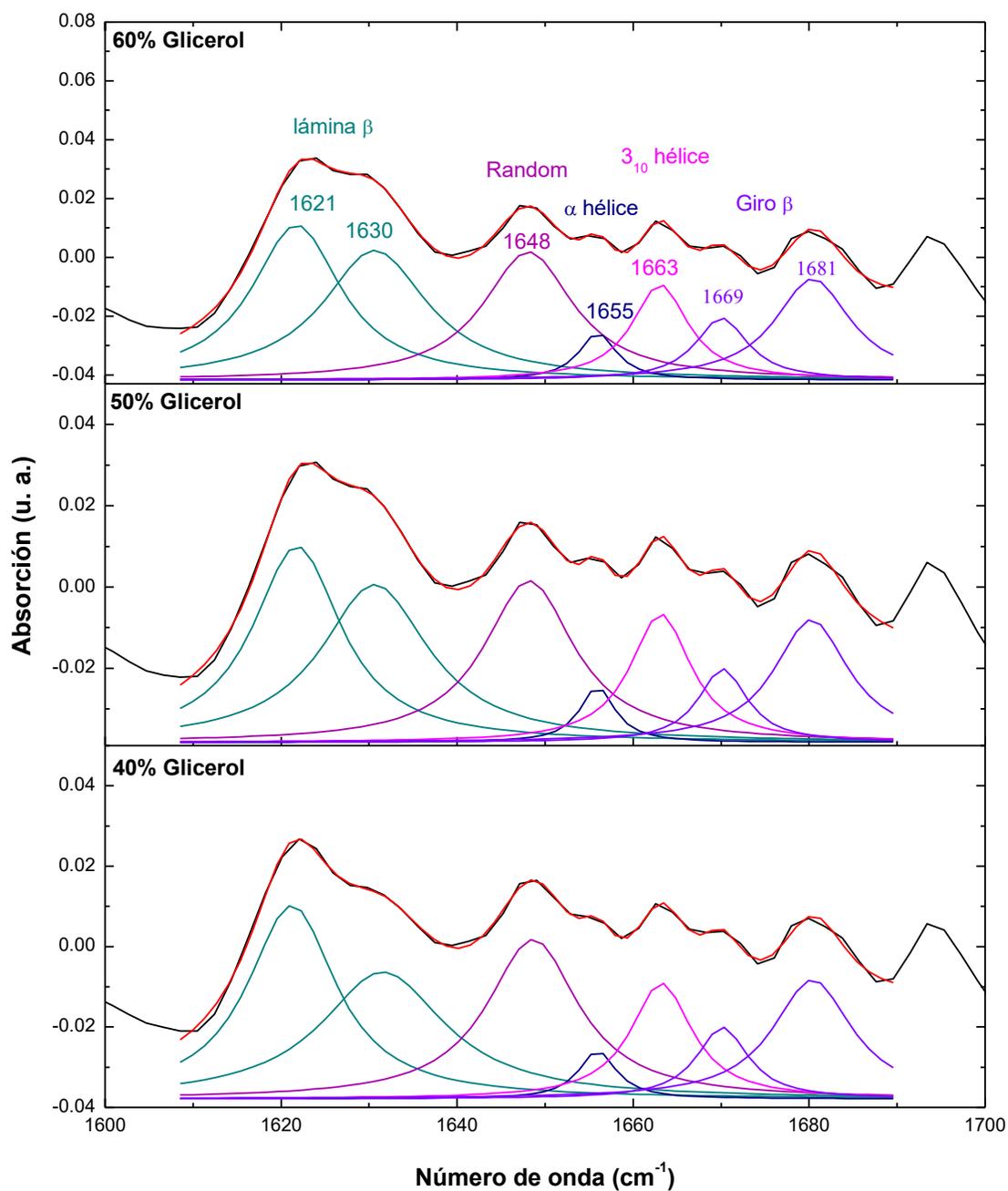
Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ (10%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11.



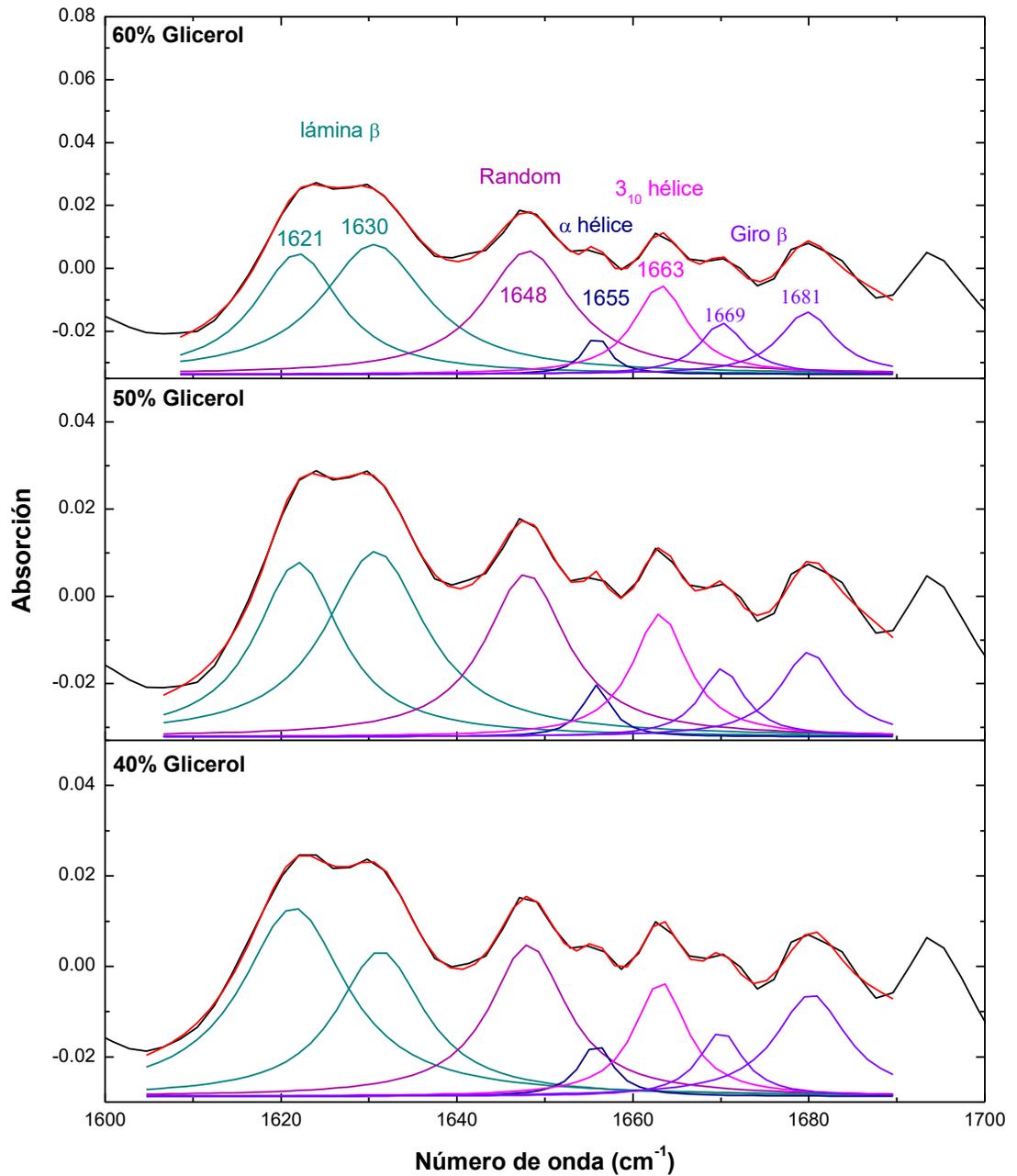
Deconvolución del espectro FTIR de la -2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na^+ (20%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 11.



Deconvolución del espectro FTIR de la 2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ (5%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12.



Deconvolución del espectro FTIR de la 2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ (10%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12.



Deconvolución del espectro FTIR de la 2da derivada para películas de Glutelina-Cloisita Na⁺ (20%) con diferentes concentraciones de glicerol a pH 12.

Anexo 2

Analytical Letters



Biodegradable Nanocomposite Films Based on Glutelin from *Jatropha curcas* L.: Response Surface and Physical Characterization

Journal:	<i>Analytical Letters</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Montiel-Juarez, Ling-Fa; Instituto Politecnico Nacional, Centro de Investigacion en Biotecnologia Aplicada Martinez-Ayala, Alma Leticia; Instituto Politecnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bioticos Rios-Corripio, Maria Antonieta; Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba Arzate-Vazquez, Israel; Instituto Politecnico Nacional, Centro de Nanociencias y Micro Nanotecnologias Zaca-Moran, Placido; Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Fisicoquímica de Materiales Rojas, Marlon; Instituto Politecnico Nacional, Centro de Investigacion en Biotecnologia Aplicada
Keywords:	Nanocomposite films, response surface methodology, <i>Jatropha curcas</i> L., barrier properties, mechanical properties

SCHOLARONE™
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/lanl> E-mail: analyticalletters@email.wcu.edu

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Biodegradable Nanocomposite Films Based on Glutelin from *Jatropha curcas* L.: Response Surface and Physical Characterization

Ling-Fa Montiel-Juárez¹, Alma Leticia Martínez Ayala²,
María Antonieta Ríos-Corripio³, Israel Arzate-Vázquez⁴
Placido Zaca-Moran⁵ and Marlon Rojas-López^{1*}

¹ Instituto Politécnico Nacional, CIBA-Tlaxcala, Carretera estatal Tepetitla-Tlaxcala Km. 1.5, Tepetitla, Tlax., 90700, México.

² Instituto Politécnico Nacional, CEPROBI, Km 6 Carretera Yautepec-Jojutla, Calle Ceprobi 8, col. San Isidro, Yautepec, Mor. C.P. 62731, México

³ Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Congregación Manuel León, Amatlan de los Reyes, Córdoba, Ver. C.P. 94500, México.

⁴ Instituto Politécnico Nacional, CNMN, Calle Luis Enrique Erro s/n, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Colonia Zacatenco, C.P. 07738, Cd. de México, México.

⁵ Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ecocampus Valsequillo, Pue. C.P. 72960, Mexico

* Corresponding author e-mail: marlonrl@yahoo.com.mx

Abstract

Water vapor permeability and hardness of biodegradable nanocomposite films based on glutelin from *Jatropha curcas* L. were determinate and the experimental data were analyzed by using a response surface methodology. The effect of the independent variables, constituted by the plasticizer (glycerol), nanofiller (cloisite) and pH on the physical parameters was evaluated. The regression models obtained for each physical property describes adequately (R^2 0.9513 and 0.9421 for water vapor permeability and hardness respectively) the experimental data used in the design of experiment. Also, the regression coefficients determined from the calculations show that pH is the factor with major effect on the water vapor permeability, whereas the cloisite content is the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

factor with major effect on the hardness of the nanocomposite film. FTIR spectroscopy shows good agreement with the results from the response surface methodology, corroborating through both the raw and the second derivative of the absorbance that the gluteline structure (in a similar form as the water vapor permeability) is affected mainly by pH; whereas the hardness of the film depends mainly on the cloisite content. This methodology could be very useful for the design and elaboration of nanocomposite films based on *Jatropha curcas* L. with specific barrier and mechanical properties.

Keywords

Nanocomposite films, response surface methodology, *Jatropha curcas* L., barrier properties, mechanical properties.

Introduction

Sustainable materials are an alternative to synthetic plastics that have being under research since last decades, they are made from sources as carbohydrates, lipids and proteins (Maryam et al. 2018, Abdelhedi et al. 2018). Because of their abundance and nutritional factor, proteins are frequently used for materials development (Moraes et al. 2018), however, it has been reported that proteins have good film-forming characteristics to get materials with great barrier, mechanical and optical properties with a low cost and good adhesion to different substrates (Chen and Zhang 2006, Barone and Walter 2006, Raquez et al. 2010). Even with that, it still has applicative limitations, so the nano sized fillers are integrated to improve the polymer matrix; these nanocomposite materials have a interfacial interaction between the polymeric matrix

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

and the nanofiller, the tortuous pathway hinders the gas transference forcing penetrants to travel around the impermeable structures, mechanical resistance is improved too, it have being reported the increased tensile strength in bio-nanocomposites according to nanostructure dispersion ability in polymer matrix and its interactions with the matrix constituents . Among natural nanofillers, clays are the most commonly used as a reinforced agent because its compatibility, stability, high aspect ratio and surface area (Echeverria et al. 2018, Miao et al. 2012, Yu et al. 2007, Kim et al. 2013). Since enhanced properties were reported to be related to nanofiller dispersion and the kind of interactions between polymer and the constituents the knowledge of their structural and morphological characteristics becomes transcendental. Response surface methodology (RMS) is a statistical tool for building models to find out the optimum conditions, evaluating the effect of factors to optimize the bio-composite film allowing to select the optimum condition to develop the nanocomposite film (Gong et al. 2005, Cakmak et al. 2012, Jian et al. 2012, Jian et al. 2008, Manninen et al. 2016).

On the other hand, Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) allows analyze polymeric materials structure as the same time, it tracks changes in the polymer chain when a nanofiller is added. FTIR technique can be used to analyze structural properties of polymers, based on their molecular vibrations, which can be localized in specific groups, like proteins, that are characterized by the absorptions of the amide group. In addition to that, the broad of the amide infrared band can be analyzed with more detail using the second-derivative and deconvolution procedures. FTIR spectroscopy also has the advantage of being a non-destructive technique, it can be collected in a few seconds and for most biological material it is possible to obtain their spectra in a variety

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

of environments with a minimal amount of source (Partini and Pantani 2007, Meyer et al. 2004, Abdelhedi et al. 2018). Due to the sensitivity of FTIR, it has been used to characterize the structure and interactions of the components of the films and the information obtained can be related to mechanical and barrier properties, as well as morphological changes (Bhargava et al. 2003). Any spectroscopic variation in infrared spectrum, reflects the vibrational behavior, as a consequence of change of inter / intra molecular interactions of the components of the material (Siesler 1993).

In this work, we have analyzed the barrier (water vapor permeability) and mechanical (hardness) parameters of nanocomposite films based on *Jatropha curcas* L. employing a design of experiment with three factors or independent variables (glycerol content, cloisite content and pH). Also, FTIR spectroscopy was used to analyze possible interactions between the components of the films and their effect on water vapor permeability and hardness parameters.

Materials and methods

Materials.

Seeds of *Jatropha curcas* L. from Huitzilán, Puebla, were employed on the films preparation. Two main components, Glycerol (J.T. Baker) and Cloisite Na⁺ (DYK additives and instruments) were used as plasticizer and nanofiller respectively. All the chemical reagents were commercially available of and were used as received without further purification.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Protein fractionation procedure.

Flour was obtained from the husked seed, which was after defatted. Bio-nanocomposite films, were prepared using a solvent casting method; Glutelin from *Jatropha curcas* L. was obtained from defatted flour, by a sequentially Osborne modified method. The flour was dispersed in water 1:10 (w/v) and stirred for 2 hours at 4°C, the suspension was centrifuged at 10000g for 30 minutes, protein in the supernatant was freeze-dried. The centrifugate was re-dispersed in sodium chloride and stirred for 2 hours at 4°C and after centrifuged at 10000g for 30 minutes, protein in the supernatant was dialyzed and freeze-dried, the centrifugate. The residue from this step, was treated like previous one with Ethanol 70% (v/v) to obtain prolamin fraction, supernatant was distilled and freeze dried. The centrifugate was suspended in sodium hydroxide 0.1 M and stirred for 2 hours at 4°C, then it was centrifuged at 10000g for 30 minutes, supernatant was dialyzed and freeze dried.

Films preparation

Glutelin-based nanocomposite films were prepared using pH 10, 11 and 12 solutions. It consisted of Glycerol (40, 50 and 60 % dry basis) and clay (Cloisite Na⁺ 0,5,10, 20% dry basis). Clay was left with water under stirred at room temperature for hydration for 24 hours and it was subsequently sonicated for 30 minutes. Protein and glycerol were mixed with water. The clay suspension was then added into the protein emulsion with stirring at 80°C for 1hour. The final light yellow solution was poured into a glass petri dish coated with silicone, which was kept at 60°C for 24 hours.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FTIR spectroscopy

A Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR) Bruker Vertex 70 in the Attenuated Total Reflection (ATR) sampling mode, in the spectral range between 4000 cm⁻¹ to 400 cm⁻¹ was employed. A total of 60 scans were performed for background and 120 scans for samples at 4 cm⁻¹ resolution.

Scanning electron microscopy

The surface morphology of the films was examined using a scanning electronic microscope (TESCAN SEM Vega TS-5136SB). Film samples, were mounted on aluminum base using carbon tape.

Hardness measurement

A nanoindentation tester (TTX-NHT, CSM Instruments) integrated with a Berkovich diamond tip was used to evaluate the hardness (H_{IT}) of the elaborated films. Before performing the measurements, the instrument was calibrated with a quartz standard. The conditions tests were: maximum load of 5 mN, loading and unloading rate of 15 mN/ min and pause time of 10 seconds. Three films of each formulation were evaluated and at least five measurements were made on each. The separation distance between the indentations was at least five times the size of residual footprint. Typical indentation curves were recorded and analyzed with the Oliver and Pharr method for to calculate projected contact area (A_p). The hardness parameter was estimate using the following equation (1):

$$H_{IT} = \frac{F_m}{A_p} \quad (1)$$

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Where F_m is de maximum load and A_p is the projected contact area.

Water vapor permeability determination

WVP of the films was determined gravimetrically. A bottle weighing containing Calcium Chloride as a desiccant was covered with the film to be tested and placed in a controlled desiccator. Edible films were cut into 6 cm diameter, the temperature and relative humidity inside the desiccator chamber were periodically checked. The weight gained by the bottle weighing was measured at 24 h intervals within 5 days to determine water vapor transmission (WVTR) rate and thereafter was used to calculate the water vapor permeability (WVP) value. Water vapor transmission rate was obtained by the slope of the regression analysis of weight loss as a function of time and water vapor permeability was calculated according the expressions:

$$WVTR = \frac{m_1}{A} = \frac{g}{m^2s} \quad (2)$$

$$WVP = \frac{L \cdot WVTR}{(p_1 - p_a)} \quad (3)$$

Were m_1 is the slope of the weight change as a function of time, A is the exposed area, L is the films thickness, p_1 and p_a are the partial pressure of water vapor in the air and air saturated respectively at 33% relativity humidity and 25°C. Finally, the water vapor permeability value was expressed in gmm/kPahm^2 .

Experimental design and statistical analysis

The experimental results were analyzed by using a Box-Behnken design of three independent variables and three levels that generated a total of 17 runs, which included 5 replicates at the central point. The independent variables were the Glycerol content

1
2
3
4 (X₁), nanofiller content (Cloisite) (X₂), and pH of the film forming solution (X₃). The code
5
6 levels for independent variables are shown in Tables 1 and 2. The response variables
7
8 were the water vapor permeability, hardness. Response surface methodology (RSM) of
9
10 the experimental data was used to obtain the surface plots associated to both: the
11
12 barrier (water vapor permeability) and mechanical (hardness) properties of the
13
14 composite films, in order to dilucidate the influence of the independent variables on
15
16 these properties.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1

Table 2

All the calculations were done using multiple regression procedures with Design Expert, version 10 (Statease Inc., Minneapolis, MN, USA). Thus, the effect of each independent variable on the responses was determined, and the experimental data was fitted to the model proposed for each response (Y):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

(4)

Where Y= response, X₁= glycerol content, X₂= nanofiller content, X₃= pH, b₀= intercepts, b₁, b₂, b₃ = are linear, b₁₁, b₂₂, b₃₃= are quadratic and b₁₂, b₁₃, b₂₃= are interaction regression coefficient terms respectively. For each response, a response plot

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

was generated from the regression equations. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine the significance differences of the data.

Results and discussion

Scanning electron microscopy

The microscopic observation of the surface of the films provides information on the integrity, continuity and also about the structural organization of the filmogenic polymeric matrix. Some irregularities like pinholes were also observed on the surface, possibly due to air bubbles. Figure 1 shows the scanning electron microscopy images of biodegradable nanocomposite films based on glutelin from *Jatropha curcas* L. (a) without presence of cloisite, and (b) with 20% of cloisite as nanofiller. Both films were made with 40% of glycerol as plastizicer at pH 10. The main morphological difference is the presence of grains of cloisite with an average size between 2-5 μm .

Figure 1

Water vapor permeability.

The results of the 17 runs of the Box Behnken design to determine the water vapor permeability of bio-nanocomposite films are shown in Table 3. Also are included the three factors tested in this study, glycerol content, cloisite content and pH. The water vapor permeability of the film ranged from 1.569 to 4.522 g mm / m² kPa h. The highest value was obtained under test conditions of 50 wt. % glycerol content, 10 wt. % cloisite

1
2
3
4 content and pH 11; meanwhile the lowest value was obtained with 50 wt. % glycerol
5
6 content, 20 wt. % cloisite content and pH 12.

7
8 **Table 3**

9
10 ***Hardness.***

11
12 Experimental measurements of hardness of the composite films and the test factors
13 (Glycerol content, Cloisite content and pH), which affect this parameter are shown in
14 Table 3. Data are organized according to the Box Behnken design applied in this study.
15
16 Hardness values of the films ranged from 0.879 to 8.210 MPa. The highest value was
17 obtained under test conditions of 50 wt. % glycerol content, 20 wt. % cloisite content
18 and pH 10; meanwhile the lowest value was obtained with 60 wt. % glycerol content, 20
19 wt. % cloisite content and pH 11.

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31 ***Model selection for water vapor permeability and hardness.***

32 For both properties, water vapor permeability and hardness, the analysis of variance
33 (ANOVA) is summarized in Table 4. The ANOVA shows that the quadratic regression
34 model of water vapor permeability was highly significant as the F-test had a very low
35 probability value ($p < 0.0008$); which means that there was only 0.08% chance that a
36 Model F value of this magnitude could occur due to noise (Cheng et al. 2013). The
37 model for hardness was ($p < 0.0014$) also indicated that the model was significant.
38 However, the Lack of Fit F value of 0.10 for water vapor permeability and 1.91 for
39 hardness implied that the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is
40 a 95.41% (water vapor permeability) and 26.79 % (hardness) chances that a Lack of Fit
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

F-value this large could occur due to noise. Non-significant Lack of Fit is good because it is desirable the model fits.

Table 4

On the other hand the goodness of fit of the models was further inspected by using the R^2 value. For water vapor permeability and hardness, R^2 of the model was 0.9513 and 0.9421 respectively, whereas the adequate precision was 11.73 and 11.66 respectively. The last measures the signal to noise ratio, being desirable a ratio greater than 4. In this case both the R^2 and the adequate precision values indicate this model can be used to navigate the design space. Therefore, these models are suitable for predicting the water vapor permeability and hardness parameters of the bio-nanocomposite films based on glutelin from *Jatropha curcas* L.

The regression analysis for model fitting to evaluate the significance of the coefficient terms for all the responses in the experimental design, is summarized in Table 5. For water vapor permeability the test factors X_1 (glycerol content), X_2 (cloisite content) and X_3 (pH), such as the quadratic terms (X_1^2 , X_2^2 and X_3^2) were all significant ($p < 0.05$); whereas their interactions (X_1X_2 , X_1X_3 and X_2X_3) were no significant ($p > 0.05$). However, for hardness only the test factors X_1 (glycerol content), X_2 (cloisite content), the quadratic terms (X_1^2 , X_3^2) and the interaction terms (X_1X_2 , X_2X_3) were significant ($p < 0.05$); whereas the test factor X_3 (pH), (X_2^2) and (X_1X_3) were no significant ($p > 0.05$). A higher value of regression coefficients can be directly translated to a greater effect of the independent variables on the responses. Thus, pH had the greatest effect on water

vapor permeability, whereas glycerol content and cloisite content have the greatest effect on hardness of the nanocomposite film. Moreover, the positive coefficients for the independent variables indicated a favorable effect on the barrier and mechanical properties (Hadi 2011).

Table 5

Thus, the estimated models built for the Water vapor permeability (WVP) and hardness can be described by the equations (5) and (6) in terms of the coded variables, respectively.

For water vapor permeability, the model equation is as follows:

$$\begin{aligned} \mathbf{WVP} = & -145.5041 + 0.7450X_1 - 0.0429X_2 + 24.1387X_3 - 0.0078X_1^2 - 0.0055X_2^2 - \\ & 1.1431X_3^2 + 0.0004X_1X_2 + 0.0079X_1X_3 + 0.0089X_2X_3 \end{aligned} \quad (5)$$

For hardness, the model equation is as follows:

$$\begin{aligned} \mathbf{Hardness} = & 86.9046 + 1.4891X_1 + 1.9336X_2 - 22.6878X_3 - 0.0106X_1^2 + 0.0040X_2^2 + \\ & 1.1508X_3^2 - 0.0165X_1X_2 - 0.0402X_1X_3 - 0.0951X_2X_3 \end{aligned} \quad (6)$$

Where WVP and Hardness is the predicted response; X_1 is the glycerol content, X_2 is the cloisite content, and X_3 is pH. Moreover, a graphical representation of the quality of the models is shown in Figure 2. The predicted versus experimental data for water vapor permeability (Figure 2a) and hardness (Figure 2b) show that the quadratic model

1
2
3 fits are adequate, having R^2 values for water vapor permeability and hardness of 0.9513
4
5 and 0.9421 respectively.
6

7 **Figure 2**

8 ***Analysis of response surfaces.***

9
10 As a result of the obtaining of the best fit model for both parameters: water vapor
11 permeability and hardness, which are represented by the equations (5) and (6)
12 respectively, a 3D response surface plots and contour plots of the combined effects of
13 the independent variables were obtained. Figures 3 and 4 shows the response surfaces
14 obtained for water vapor permeability and hardness respectively, as a function of X_1 :
15 glycerol content, X_2 : cloisite content, and X_3 : pH; whose combined effects of these
16 independent variables can be observed by keeping one of these constant at a zero level
17 while varying the other two variables.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30
31
32 Particularly, Figure 3(a) and 3(c) shows the quadratic dependence of the water vapor
33 permeability with the cloisite content, although this factor does not generate the most
34 important effect, which can also be corroborated by the low magnitude of the regression
35 coefficients related with this variable (Table 5). On different way, Figures 3(b) and 3(c)
36 show that the factor pH generates the most important effect on the water vapor
37 permeability, which can also be corroborated by the higher value of the regression
38 coefficients (Table 5) related mainly with pH, although also the glycerol content had an
39 important effect too.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **Figure 3**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The latest descriptions, which were obtained from the response surface methodology, agree with the high dependence of the solubility of the proteins (glutelin) with pH. Solubility increases at pH values above to the isoelectric point (Nagarajan et al. 2015, Dang et al. 2010), since intramolecular electrostatic interactions would be minimal at this point, causing the molecule adopt a less compact conformation, allowing a contact increment between the protein and cloisite. At acidic conditions, repulsive forces develop, among positively charged protein, resulting in water vapor permeability values higher than alkaline pH values because of less intermolecular protein cross linking occurs under acidic conditions. It could be suggested that the proper interaction between protein and cloisite, could provide the strong network that could hinder the migration of water vapor through the film (Gennadios et al. 1993, Nagarajan et al. 2015).

Figure 4

Figures 4(a) and 4(b) show a low quadratic dependence of the hardness with the glycerol content, thus this factor does not generate the most important effect on the response, which can also be corroborated by the low magnitude of the regression coefficients related with this variable (Table 5). On different way, Figures 4(a) and 4(c) shows that the cloisite content generates the most important effect on hardness, which can also be corroborated by the higher value of the regression coefficient X_2 of 1.9336 and a low probability value 0.0011 (Table 5). According to the surface response of the Figure 4(a), the use of low glycerol contents and high cloisite contents will results on the obtaining of a nanocomposite films with the highest hardness values in the experiment.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Also, response surface of Figure 4(c) show that high cloisite contents combined with low pH (near 10) will produce nanocomposite films with higher hardness values (2-10 MPa). Therefore, the hardness of the nanocomposite films (made from gluteline/cloisite Na+) increased with the clay content, and this could be attributed to the surface area of the clay, its aspect ratio and also by the stronger interfacial interaction though hydrogen bonds or by ionic bonds between polymer matrix and clay (Rhim 2011). The resistance exerted by the clay, with a high surface area, the orientation and aspect ratios of the intercalated silicate layers, in addition the stronger interfacial interaction of hydrogen and ionic bonds between the polymer matrix and the layered clay increased the hardness capacity. In general improvement in the mechanical properties of bionanocomposite films are attributed to the high aspect ratio and rigidity caused by the strong affinity between the biopolymer and the clay (Zolfi et al. 2015).

FTIR spectroscopy.

The FTIR technique was employed to analyze the bio-nanocomposite films prepared for several experimental conditions; X_1 (glycerol content), X_2 (cloisite content) and X_3 (pH). Figure 5 shows the FTIR spectra of the nanocomposite films prepared with 40% of Glycerol, 20% of Cloisite and pH:10, 11 and 12. The description of the main spectral features is as follow: two intense bands at 1650 and 1540 cm^{-1} are related with the amide I (C=O stretching) and amide II (N-H bending) functional groups of proteins respectively. Other band at 1450 cm^{-1} is commonly related with methyl methylene groups from lipids and proteins, whereas the band at 1396 cm^{-1} arises from the COO^- stretching vibrations of amino acid side chains. The next bands at 1238 cm^{-1} and 1080

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cm^{-1} are related with the P=O asymmetrical and symmetrical stretching vibrations of PO_2 phosphodiester groups from phosphorylated molecules. Additional absorptions in the fingerprint region at 1110 and 1038 cm^{-1} , and also at 993, 923 and 850 cm^{-1} are related with vibrations of the C-O and C-C modes in the skeleton of the glycerol molecule [26]. Also is included the spectrum of cloisite to identify their vibrational bands in the film spectra.

Figure 5

The FTIR spectra of this particular composition of the nanocomposite films were selected to observe the spectral variation of the intensities of the amide I and II bands related with glutelin as the pH changes. The change in intensity of the protein bands with pH agree in an inverse form compared with the increase of the water vapor permeability at pH near 11, according to the response surface shown in Figure 3(b), where this parameter has a quadratic dependence with pH and having a maximum value at pH near 11. The maximum value of water vapor permeability (according to RSM results, Fig. 3) occurs at pH near 11, when the FTIR intensity of the amide I and II bands from glutelin diminishes, as can be observed on Fig. 5. For other hand, it is well known that the second derivative of the FTIR spectra show absorption bands associated to the secondary structure of the proteins. Thus, Figure 6 shows the second derivative absorption of the FTIR spectra of the same nanocomposite films (40% of Glycerol, 20% of Cloisite and pH:10, 11 and 12) in the amide I spectral region of proteins (1700-1600 cm^{-1}). Several observed bands are associated with the secondary structure of glutelin, as β -turns (1694, 1680 and 1664 cm^{-1}), disordered/turns (1656 cm^{-1}), α -helices (1647 cm^{-1}) and β -pleated sheets (1625 cm^{-1}). Thus, the second derivative

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

spectra from the secondary structure of the glutelin of the film show a decrease of the intensity of several bands related with β -turns (1664 cm^{-1}), α -helices (1647 cm^{-1}) and β -pleated sheets (1625 cm^{-1}) at pH 11. Such

Figure 6

Figure 7 shows the FTIR spectra of the bio-nanocomposite films prepared with Glycerol content: 40%, Cloisite content: 0, 10 and 20% and pH: 10. The FTIR spectra of this particular composition was selected to observe the spectral variation of the intensity of the bands at 1008 , 517 and 447 cm^{-1} related with cloisite. Thus, an increase in the intensity of the bands related with cloisite in the nanocomposite films can be observed as the content of this nanofiller increases. Therefore, the cloisite content, constitutes the main factor affecting the hardness of the bio-nanocomposite film, beyond glycerol content and pH, according with the surface response of Figure 4(a), where the conditions of preparation (glycerol content:40%, cloisite content: 20%, and pH:10) take hardness of the bio-nanocomposite film to a maximum on the analyzed space. In this case, the inclusion of cloisite provides increase of hardness in the bio-nanocomposite film. In other side, the inclusion of cloisite in the film, has not an important effect on the structure of the protein glutelin, as observed in Figure 7, because of the shape of the lines related with the amide I and amide II groups of the protein (1650 and 1540 cm^{-1} respectively) have no changes with the presence of cloisite. The second derivative of the FTIR spectra of the films (Fig. 8), which is related directly with the secondary structure of glutelin is no affected by the presence of cloisite.

Figure 7

Figure 8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Conclusions

Biodegradable nanocomposite films based on glutelin from *Jatropha curcas* L. were obtained. A response surface methodology was applied to analyze the barrier (water vapor permeability) and mechanical (hardness) parameters of bio-nanocomposite films based on glutelin from *Jatropha curcas* L. The regression models obtained for each physical property describes adequately (R^2 0.9513 and 0.9421 respectively) the experimental data used in the design of experiment. The regression coefficients determined from the calculations show that pH is the factor with major effect on the water vapor permeability, whereas the cloisite content is the factor with major effect on the hardness of the bio-nanocomposite film. FTIR spectroscopy shows good agreement with the results from the response surface methodology, corroborating through both the raw and the second derivative of the absorbance that the gluteline structure (in a similar form as the water vapor permeability) is affected mainly by pH; whereas the hardness of the film depends mainly on the cloisite content. This methodology could be very useful to design and prepare bio-nanocomposite films based on *Jatropha curcas* L. with specific barrier and mechanical properties.

References

1. Maryam Adilah, Z. A., B. Jamilah, and Z. A. Nur Hanani. 2018. "Functional and Antioxidant Properties of Protein-Based Films Incorporated with Mango Kernel Extract for Active Packaging." *Food Hydrocolloids* 74. Elsevier Ltd: 207–18.

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/lanl> E-mail: analyticalletters@email.wcu.edu

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2. Abdelhedi, Ola, Rim Nasri, Mourad Jridi, Hela Kchaou, Benbettaïeb Nasreddine, Thomas Karbowski, Frédéric Debeaufort, and Moncef Nasri. 2018. "Composite Bioactive Films Based on Smooth-Hound Viscera Proteins and Gelatin: Physicochemical Characterization and Antioxidant Properties." *Food Hydrocolloids* 74: 176–86.
3. Moraes Crizel, Tainara de, Alessandro de Oliveira Rios, Vítor D. Alves, Narcisa Bandarra, Margarida Moldão-Martins, and Simone Hickmann Flôres. 2018. "Active Food Packaging Prepared with Chitosan and Olive Pomace." *Food Hydrocolloids* 74: 139–50.
4. Chen, Pu, and Lina Zhang. 2006. "Interaction and Properties of Highly Exfoliated Soy Protein/montmorillonite Nanocomposites." *Biomacromolecules* 7 (6): 1700–1706.
5. Barone, Justin R., and Walter F Schmidt. 2006. "Nonfood Applications of Proteinaceous Renewable Materials." *Journal of Chemical Education* 83 (7): 1003–9.
6. Raquez, J. M., M. Deláglise, M. F. Lacrampe, and P. Krawczak. 2010. "Thermosetting (Bio)materials Derived from Renewable Resources: A Critical Review." *Progress in Polymer Science (Oxford)* 35 (4): 487–509.
7. Echeverría, Ignacio, María Elvira López-Caballero, María Carmen Gómez-Guillén, Adriana Noemi Mauri, and María Pilar Montero. 2018. "Active Nanocomposite Films Based on Soy Proteins-Montmorillonite- Clove Essential Oil for the Preservation of Refrigerated Bluefin Tuna (*Thunnus Thynnus*) Fillets." *International Journal of Food Microbiology* 266 (August 2017). Elsevier: 142–49.
8. Miao, Shiding, Zhiguo Qiu, and Peng Cui. 2012. "Clay-Protein Ultrathin Films: Design and Bio-Catalytic Performance Study." *Science China Chemistry* 55 (9): 1842–55.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
9. Yu, Jiahui, Guojuan Cui, Ming Wei, and Jin Huang. 2007. "Facile Exfoliation of Rectorite Nanoplatelets in Soy Protein Matrix and Reinforced Bionanocomposites Thereof."
10. Kim, Hyun Kyung, Seong Jin Kim, Hyun Soo Lee, Jae Hoon Choi, Chang Myeong Jeong, Myoung Hwan Sung, Seok Hoon Park, and Hyun Jin Park. 2013. "Mechanical and Barrier Properties of Poly(lactic Acid) Films Coated by Nanoclay-Ink Composition." *Journal of Applied Polymer Science* 127 (5): 3823–29.
11. Gong, Jianghong, Zhijian Peng, and Hezhuo Miao. 2005. "Analysis of the Nanoindentation Load-Displacement Curves Measured on High-Purity Fine-Grained Alumina." *Journal of the European Ceramic Society* 25: 649–54.
12. Cakmak, Umut D., Thomas Schöberl, and Zoltan Major. 2012. "Nanoindentation of Polymers." *Meccanica* 47 (3): 707–18.
13. Jian, Sheng Rui, I. Ju Teng, Ping Feng Yang, Yi Shao Lai, Jian Ming Lu, Jee Gong Chang, and Shin Pon Ju. 2008. "Surface Morphological and Nanomechanical Properties of PLD-Derived ZnO Thin Films." *Nanoscale Research Letters* 3: 186–93.
14. Manninen, N. K., J. C. Oliveira, S. Carvalho, and A. Cavaleiro. 2016. "Characterization of Surface Ag Nanoparticles in Nanocomposite a-C:Ag Coatings by Grazing Incidence X-Ray Diffraction at Sub-Critical Angles of Incidence." *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 122 (3). Springer Berlin Heidelberg: 1–5.
15. Partini, Maria, and Roberto Pantani. 2007. "Determination of Crystallinity of an Aliphatic Polyester by FTIR Spectroscopy." *Polymer Bulletin* 59: 403–12.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
16. Meyer, J.D., S.J. Bai, M. Rani, R. Suryanarayanan, R. Nayar, J.F. Carpenter, and M.C. Manning. 2004. "Infrared Spectroscopic Studies of Protein Formulations Containing Glycine." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93 (5): 1359–66.
17. Bhargava, Rohit, Shi-qing Wang, and Jack L Koenig. 2003. "FTIR Microspectroscopy of Polymeric Systems." *Advanced Polymer Science* 163 (January): 137–91.
18. Siesler, H. W. 1993. "Vibrational Spectra and Thermal and Mechanical Properties of Polymers H. W. Siesler Department of Physical Chemistry, University of Essen." In *9th International Conference on Fourier Transform Spectroscopy*, 2089:9–15.
19. Cheng Lv, Wang Y, Wang L-J, Li, and Adhikari B. D. 2013. "Optimization of Production Yield and Functional Properties of Pectin Extracted from Sugar Beet Pulp." *Carbohydrate Polymers* 95. Elsevier Ltd.: 233–40.
20. Hadi, A.E. 2011. "Characterization and Optimisation of Mechanical, Physical and Thermal Properties of Short Abaca (Musa Textile Nee) Fibre Reinforced High Impact Polystyrene Composites Agung Efriyo Hadi." Universiti Putra Malaysia.
21. Nagarajan, Muralidharan, Soottawat Benjakul, Thummanoon Prodpran, and Ponusa Songtipya. 2015. "Effects of pHs on Properties of Bio-Nanocomposite Based on Tilapia Skin Gelatin and Cloisite Na+." *International Journal of Biological Macromolecules* 75. Elsevier B.V.: 388–97.
22. Dang, Qinqin, Shoudong Lu, Shen Yu, Pingchuan Sun, and Zhi Yuan. 2010. "Silk Fibroin/montmorillonite Nanocomposites: Effect of pH on the Conformational Transition and Clay Dispersion." *Biomacromolecules* 11 (7): 1796–1801.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

23. Gennadios, Aristippos, Alice H Brandenburg, Curtis L Weller, and Robert F Testin. 1993. "Effect of pH on Properties of Wheat Gluten and Soy Protein Isolate Films." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (11): 1835–39.
24. Rhim, Jong Whan. 2011. "Effect of Clay Contents on Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of Agar-Based Nanocomposite Films." *Carbohydrate Polymers* 86.
25. Zolfi, Mohsen, Faramarz Khodaiyan, Mohammad Mousavi, and Maryam Hashemi. 2015. "Characterization of the New Biodegradable WPI/clay Nanocomposite Films Based on Kefiran Exopolysaccharide." *Journal of Food Science and Technology* 52 (6): 3485–93.
26. Guerrero, P., A. Retegi, N. Gabilondo, and K. De La Caba. 2010. "Mechanical and Thermal Properties of Soy Protein Films Processed by Casting and Compression." *Journal of Food Engineering* 100. Elsevier Ltd: 145–51.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Code levels for the independent variables.

Independent variables	Levels		
	-1	0	1
X_1 = Glycerol content, %	40	50	60
X_2 = Nanofiller content (Cloisite), %	0	10	20
X_3 = pH	10	11	12

Table 2. The arrangement of the design of experiment.

Run	Coded variables			Actual variables		
	X ₁	X ₂	X ₃	Glycerol X ₁ (%)	Cloisite X ₂ (%)	pH X ₃
1	0	-1	1	50	0	12
2	0	1	1	50	20	12
3	0	0	0	50	10	11
4	0	1	-1	50	20	10
5	-1	0	-1	40	10	10
6	0	-1	-1	50	0	10
7	-1	1	0	40	20	11
8	0	0	0	50	10	11
9	0	0	0	50	10	11
10	-1	-1	0	40	0	11
11	1	0	-1	60	10	10
12	0	0	0	50	10	11
13	1	0	1	60	10	12
14	1	1	0	60	20	11
15	0	0	0	50	10	11
16	1	-1	0	60	0	11
17	-1	0	1	40	10	12

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/lanl> E-mail: analyticalletters@email.wcu.edu

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 3. The responses of the parameters used in the design of experiment.

Run	Independent variables			Responses			
	Glycerol (%)	Cloisite (%)	pH	Water vapor permeability (g mm / m ² kPa h)		Hardness (MPa)	
				Experiment	Prediction	Experiment	Prediction
1	50	0	12	1.91±0.08	1.96	3.89±0.11	4.28
2	50	20	12	1.56±0.09	1.45	4.63±0.37	5.26
3	50	10	11	3.69±0.17	3.93	3.64±0.65	3.55
4	50	20	10	2.37±0.11	2.32	8.21±0.95	7.82
5	40	10	10	2.12±0.15	2.08	4.62±0.22	5.32
6	50	0	10	3.07±0.14	3.18	3.67±0.17	3.04
7	40	20	11	1.59±0.08	1.68	8.04±0.44	7.73
8	50	10	11	3.79±0.19	3.93	2.48±0.15	3.55
9	50	10	11	4.52±0.22	3.93	3.85±0.15	3.55
10	40	0	11	2.52±0.13	2.45	1.61±0.07	1.55
11	60	10	10	3.00±0.14	2.97	2.31±0.13	2.63
12	50	10	11	4.20±0.20	3.93	4.23±0.25	3.55
13	60	10	12	2.04±0.09	2.08	1.86±0.11	1.16
14	60	20	11	2.74±0.13	2.82	0.87±0.05	0.94
15	50	10	11	3.43±0.16	3.93	3.55±0.25	3.55
16	60	0	11	3.49±0.17	3.41	1.04±0.13	1.35
17	40	10	12	0.84±0.04	0.87	5.77±0.32	5.46

Table 4. Analysis of variance for different models

Response	Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	p-value
Water vapor permeability	Model	15.75	9	1.75	15.18	0.0008
	Residual	0.80	7	0.11		
	Lack of Fit	0.057	3	0.019	0.10	0.9541
	Pure Error	0.74	4	0.18		
	Total	16.55	16			
Hardness	Model	67.44	9	7.49	12.66	0.0014
	Residual	4.14	7	0.59		
	Lack of Fit	2.44	3	0.81	1.91	0.2679
	Pure Error	1.69	4	0.42		
	Total	71.58	16			

Table 5. Regression coefficients and probability values for response variables in the experimental design.

Term	Water vapor permeability		Hardness	
	Coefficient	Probability	Coefficient	Probability
Constant	-145.5041	---	86.9046	---
X ₁ :Glycerol	0.7450	0.0033	1.4891	0.0004
X ₂ :Cloisite	-0.0429	0.0253	1.9336	0.0011
X ₃ :pH	24.1387	0.0033	-22.6878	0.2622
X ₁ ²	-0.0078	0.0021	-0.0106	0.0259
X ₂ ²	-0.0055	0.0122	0.0040	0.3208
X ₃ ²	-1.1431	0.0002	1.1508	0.0181
X ₁ X ₂	0.0004	0.8007	-0.0165	0.0036
X ₁ X ₃	0.0079	0.6549	-0.0402	0.3305
X ₂ X ₃	0.0089	0.6174	-0.0951	0.0427

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

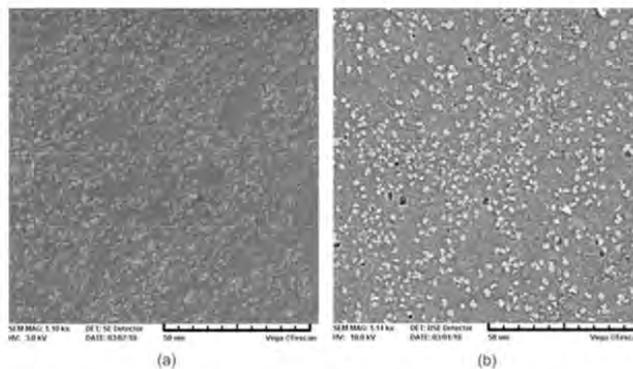


Figure 1. Scanning electron microscopy images of biodegradable nanocomposite films based on glutelin from *Jatropha curcas* L. (a) without presence of cloisite, and (b) with 20% of cloisite as nanofiller. Both films were made with 40% of glycerol as plasticizer at pH 10.

39x22mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

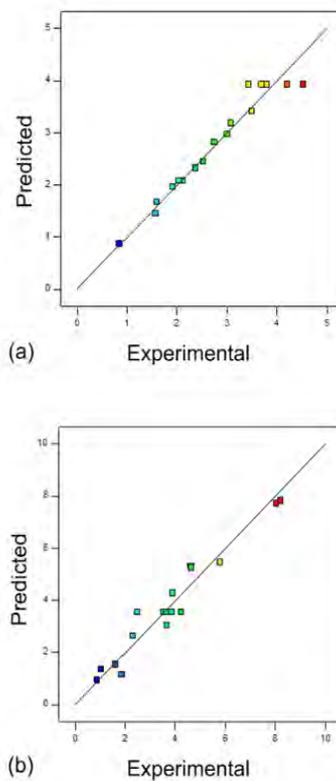


Figure 2. Correlation of predicted versus experimental response: (a) water vapor permeability, and (b) hardness.

63x132mm (300 x 300 DPI)

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/lanl> E-mail: analyticalletters@email.wcu.edu

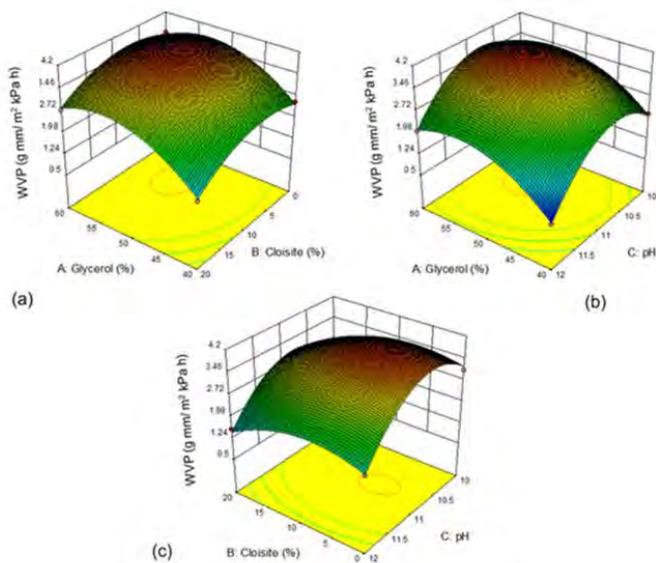


Figure 3. Response surfaces plots of the combined effects of the independent variables on water vapor permeability of the composite film.

42x36mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

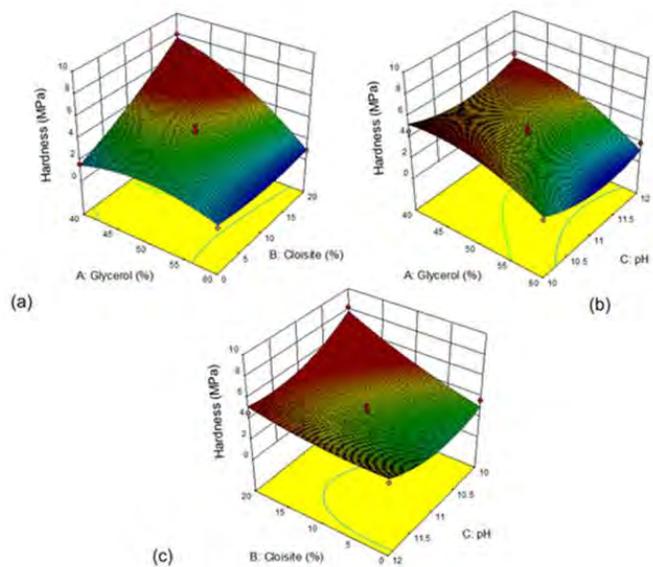


Figure 4. Response surfaces plots of the combined effects of the independent variables on hardness of the composite film.

42x36mm (300 x 300 DPI)

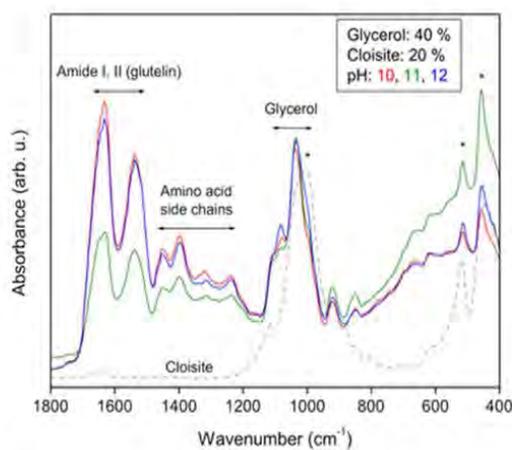
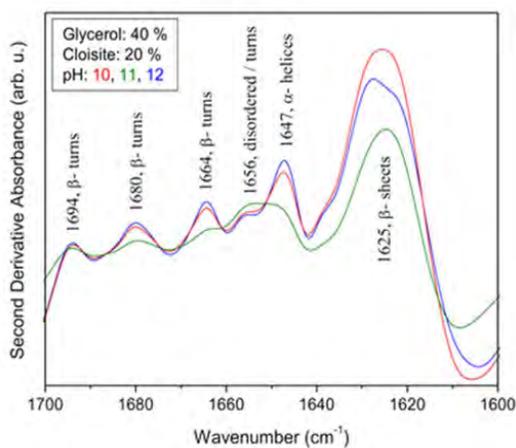


Figure 5. FTIR spectra of nanocomposite films made with glutelin from *Jatropha curcas* L. These films were prepared with a Glycerol content: 40%, Cloisite content 20% and pH: 10, 11 and 12.

33x28mm (300 x 300 DPI)



33x28mm (300 x 300 DPI)

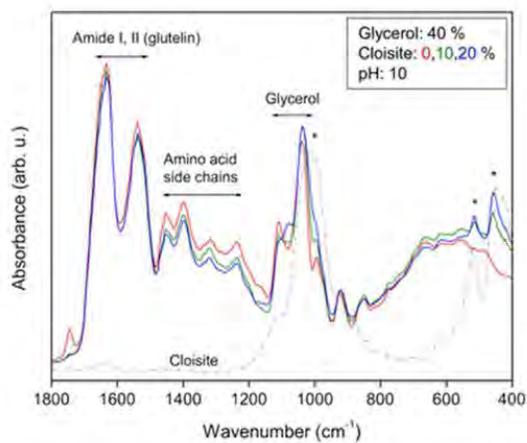


Figure 7. FTIR spectra of nanocomposite films made with glutelin from *Jatropha curcas* L. These films were prepared with Glycerol content: 40%, Cloisite content: 0, 10 and 20% and pH: 10.

33x28mm (300 x 300 DPI)

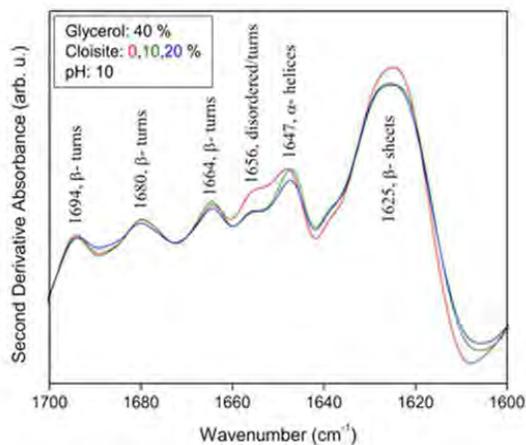


Figure 8. Second derivative of the FTIR spectra of nanocomposite films made with glutelin from *Jatropha curcas* L. These films were prepared with a Glycerol content: 40%, Cloisite content: 0, 10 and 20%, and pH 10.

33x28mm (300 x 300 DPI)

De: Analytical Letters
<onbehalf@manuscriptcentral.com>
Para: "marlonrl@yahoo.com.mx"
<marlonrl@yahoo.com.mx>
Enviado: miércoles, 25 de abril de 2018 7:53:38 GMT-5
Asunto: Analytical Letters - Decision on Manuscript ID LANL-2018-0373

25-Apr-2018

Dear Mrs. Rojas:

Ref: Characterization of Biodegradable Nanocomposite Films Prepared with Glutelin from *Jatropha curcas* L. by Response Surface Methodology and Infrared Spectroscopy

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in Analytical Letters. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course; once the Taylor and Francis production department receives and performs an initial check on your article, they will send you a link to complete your online article publishing agreement. This is an essential step. Your completed agreement must be accepted by the publisher before we can publish any version of your paper.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Analytical Letters and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,

David J. Butcher
Editor in Chief, Analytical Letters
Western Carolina University
analyticalletters@analytchem.org