



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE FILMS A BASE DE PHBV Y RESIDUO DE HORCHATA DE CHUFA PARA EL ENVASADO DE ALIMENTOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: GLEDY MABEL ARANIBAR TITO

TUTOR/A ACADEMICO: CHELO GONZALEZ MARTINEZ

Curso Académico:2020 - 2021

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2021

DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE FILMS A BASE DE PHBV Y RESIDUO DE HORCHATA DE CHUFA PARA EL ENVASADO DE ALIMENTOS

Gledy Mabel Aranibar Tito¹, Chelo González Martínez¹.

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrollaron films a base de PHBV conteniendo 0 (control), 10, 20 y 30% de residuo de horchata de chufa obtenido tras la producción de “horchata” mediante termocompresión. Estos films se evaluaron en términos de espesor, humedad, solubilidad, permeabilidad al vapor de agua, permeabilidad al oxígeno, propiedades mecánicas y ópticas, fenoles totales, capacidad antioxidante y microestructura por FESEM. Los resultados mostraron que es posible sustituir hasta un 30% de PHBV por residuo de horchata para la obtención de films, aunque dicha sustitución empeoró significativamente las propiedades fisicoquímicas, ya que se volvieron mecánicamente menos resistentes y deformables, con menor capacidad de barrera al vapor de agua y oxígeno, mayor opacidad, menor brillo y mayor solubilidad en agua. De los tres tratamientos evaluados, el film con 10% de residuo de horchata fue el que presentó mejores propiedades funcionales ya que se vieron modificadas en menor medida, y al mismo tiempo, presentaron capacidad barrera frente al oxígeno.

PALABRAS CLAVE: termoprocesado, PEG1000, tensión de fractura, módulo de elasticidad, solubilidad, color, fenoles, capacidad antioxidante.

¹Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València, España. Camino de Vera s/n 46022

RESUM

En el present treball es van desenvolupar films a base de *PHBV contenint 0 (control), 10, 20 i 30% de residu de xufa obtingut després de la producció de "orxata", mitjançant fusió-mescla i termocompressió. Es van avaluar propietats com ara, grossària, humitat, solubilitat, permeabilitat al vapor d'aigua, permeabilitat a l'oxigen, propietats mecàniques i òptiques, fenols totals, capacitat antioxidant i microestructura per *FESEM. Els resultats van mostrar que és possible substituir fins a un 30% de *PHBV per residu d'orxata per a l'obtenció de films, encara que aquesta substitució va empitjorar les propietats fisicoquímiques, ja que es van tornar mecànicament menys resistents i deformables, amb menor capacitat de barrera al vapor d'aigua i oxigen, major opacitat, menor lluentor i major solubilitat en aigua. Dels tres tractaments avaluats, el film amb 10% de residu d'orxata va ser el que va presentar millors propietats funcionals ja que els valors obtinguts van ser mes pareguts als del control, i conservaren la capacitat barrera a l'oxigen.

PARAULES CLAU: termoprocesado, PEG1000, tensió de fractura, mòdul d'elasticitat, solubilitat, color, fenols, capacitat antioxidant.

ABSTRACT

In the present work, PHBV-based films containing 0 (control), 10, 20 and 30% of tigernut residue obtained after the production of "horchata" were developed by thermocompression molding. Films were characterized in terms of thickness, moisture and phenolic content, solubility, water vapor and oxygen permeabilities, mechanical and optical properties, antioxidant capacity and microstructure by FESEM. The results showed that it is possible to substitute up to 30% the PHBV using horchata residue to obtain films, although such substitution worsened the physicochemical properties, since they became mechanically less resistant and stretchable, with lower water vapor and oxygen barrier capacities, higher opacity, lower gloss and higher water solubility. Of the three treatments evaluated, the film incorporating 10% horchata residue was the one that presented the best functional properties, since their properties were closer to the ones of the control film, while preserving the oxygen barrier capacity.

KEY WORDS: thermoprocessing, PEG1000, fracture toughness, modulus of elasticity, solubility, color, phenols, antioxidant capacity.

1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria genera anualmente una gran cantidad de subproductos que no son aprovechados o se utilizan para una alimentación animal u otros fines distintos. Se puede considerar subproducto a todo producto no principal obtenido en un determinado proceso y que tiene o puede tener determinadas aplicaciones o aprovechamiento (Muñoz, 2013). Por ejemplo, la producción de horchata de chufa, una bebida refrescante típica de España de color blanco obtenido de los tubérculos de chufa (*Cyperus esculentus* L.), tiene un rendimiento del 40%, generando un residuo alrededor del 60% del material cosechado, el cual, si se utiliza, fundamentalmente se destina como masa orgánica para combustión, compostaje y alimentación animal (Sánchez-Zapata *et al.*, 2009) sin una revalorización importante. Algunos autores han concluido que este residuo de la horchata puede ser usado como fuente de fibra dietética ya que contiene 59,71g fibra/100g, así como 1,75% de proteína 8,85% grasa y 0.99% ceniza y no posee gluten (Sánchez-Zapata *et al.*, 2009; Zucco *et al.*, 2011). La práctica de revalorización de residuos está cobrando cada vez más importancia y se están desarrollando empresas y modelos de negocio alrededor de esta oportunidad. Una opción para revalorizar el residuo de horchata sería utilizarlo en la elaboración de envases, en línea con los objetivos de una economía circular.

Por otro lado, el agotamiento de los recursos petrolíferos y la contaminación que genera el empleo del plástico convencional han despertado el interés por desarrollar materiales más amigables con el medio ambiente, como los biodegradables. Sin embargo, la producción de este tipo de materiales tiene un coste de 2 a 4 veces más altos que los envases convencionales (Ecoembes, 2009). Dentro de los materiales biodegradables con mayor proyección industrial se encuentran el Poli (ácido láctico) (PLA) y el (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV), poliésteres biodegradables obtenidos de recursos naturales que se pueden utilizar para el envasado de alimentos, debido a sus adecuadas propiedades mecánicas y barrera, entre otras. De hecho, el PHBV posee una estructura semicristalina y propiedades mecánicas y térmicas similares a los polímeros convencionales tales como el polipropileno y el polietileno. (Requena, 2018; Beltrami *et al.*, 2014).

El empleo del residuo de horchata como un material composite en una matriz polimérica biodegradable permitiría, por un lado, reducir el coste de los materiales biodegradables obtenidos, así como la revalorización del residuo, contribuyendo así a obtener envases más sostenibles.

El objetivo de la presente Tesis de Máster es desarrollar y caracterizar films con diferentes proporciones de residuo de horchata de chufa y PHBV, en términos de propiedades mecánicas y ópticas, barrera al vapor de agua y al oxígeno, actividad antioxidante, contenido fenólico, estabilidad térmica y características microestructurales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Para la obtención de los films se utilizó poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) con 3% de hidroxi-valerato suministrado por Helian Polymers BV (Belfeld, Holanda). El plastificante, poli (etilenglicol) con un peso molecular de 1000 Da (PEG1000), se adquirió de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y el residuo de horchata fue suministrados por la horchatería Rin (Valencia, España)

2.2. Diseño y obtención de los films

Se prepararon 3 formulaciones a base PHBV y residuo de horchata al 10%, 20% y 30% (p/p). Los films de PHBV se prepararon por mezcla y moldeo por compresión. El PHBV se mezcló con PEG 1000 (10% en peso del polímero) en un molino de dos rodillos (Modelo LRM-M-100, Labtech Engineering Tailandia) a 180°C a 15 rpm durante 10 minutos. Los films se obtuvieron por termo prensado en una prensa hidráulica (Modelo LP20, Labtech Engineering, Tailandia), usando las siguientes condiciones: precalentamiento de 5 minutos 180°C, un presando de 4 minutos a 180°C durante 4 minutos a 100 bares, seguido de un ciclo de enfriamiento a 60°C durante 3 minutos. Las láminas obtenidas se acondicionaron a 25°C y 53% de HR empleando una disolución saturada de nitrato de magnesio 6-hidrato (Panreac Química, S.A. Castella del Valles, Barcelona) durante 10 días. La mezcla de PHBV y PEG 1000 (sin residuo) se usó como film control.

2.3. Caracterización de los films

2.3.1. ESPESOR DEL FILM

El espesor de los films se midió con una precisión de 0.0025 mm empleando un micrómetro electrónico digital (Modelo Palmer) en seis posiciones aleatorias

2.3.2. CONTENIDO DE HUMEDAD Y SOLUBILIDAD

El contenido de humedad de los films se determinó gravimétricamente, por quintuplicado colocando las muestras en una estufa de vacío (VaciotermT, JP Selecta SA, Barcelona, España) a 60°C durante 24 horas y, posteriormente se trasladaron a un desecador con pentóxido (P₂O₅) (Panreac Química, S.A. Castella del Valles, Barcelona) a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante.

La solubilidad se determinó por triplicado para cada formulación, colocándolas en agua bidestilada en una relación de 1:200 durante 72 horas. Posterior a eso se colocaron en una estufa a vacío (VaciotermT, JP

Selecta SA, Barcelona, España) durante 24 horas a 60°C y, posteriormente se trasladaron a un desecador con P₂O₅ a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante.

2.3.3. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA Y AL OXIGENO

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó a 25°C, siguiendo el método de la norma ASTM E-96-95 (ASTM,1995). Para ello, se colocó agua destilada en copas de permeabilidad Payne (3,5 cm de diámetro, Elcometer SPRL, Hermelle/Argenteau, Bélgica) para obtener el 100% de HR en un lado del film. La copa Payne se introdujo en un desecador con una solución saturada de nitrato-6-hidrato de magnesio (HR 53%) para controlar la humedad relativa en el otro lado del film. Se colocó un ventilador en la parte superior de la copa. Para poder obtener la permeabilidad que presentaba cada muestra, se realizaron controles de peso cada 24 horas con una balanza electrónica ($\pm 0,00001$) (ME36S Sartorius, Alemania) hasta alcanzar peso constante. La WVP se calculó a partir de la pendiente de las curvas de pérdida de peso frente al tiempo (Ortega-Toro *et al.*, 2016), teniendo en cuenta el espesor del film. El análisis se realizó por triplicado.

La permeabilidad al oxígeno (OP) se evaluó midiendo la tasa de permeabilidad al oxígeno siguiendo el método estándar ASTM D3985-05, 2002 empleando el equipo OX-TRAN 1/50 (Mocon, Minneapolis, EE. UU) a 53% de HR y 25°C. Los valores de transmisión se determinaron en intervalos de 15 minutos, hasta alcanzar el equilibrio. El área de exposición fue de 50 cm² para cada tratamiento. Para obtener la permeabilidad al oxígeno (OP), se consideró en todos los casos el espesor del film. El análisis se realizó por duplicado.

2.3.4. PROPIEDADES MECANICAS

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos Stable Micro Systems, TA.XT plus (Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar ASTM D882 (ASTM, 2001). A partir de los datos de fuerza-distancia se obtuvieron las curvas de tensión (σ)-deformación de Henky (ϵ_H) (Requena *et al.*,2015) y a partir de ellos se obtuvo la resistencia a la tracción en el punto de rotura (TS), el módulo elástico (EM) y el porcentaje de alargamiento a la rotura (%E) de los films. Para ello, muestras de 2,5 x 10 cm fueron colocadas en pinzas de extensión y se estiraron hasta la rotura a 50mm/min. El análisis se evaluó en 10 réplicas para cada tratamiento.

2.3.5. PROPIEDADES OPTICAS

Se determinaron las coordenadas L*, Cab* y hab* así como la transmitancia interna (Ti) de los films como medida de la transparencia. Para ello, los espectros de reflexión (400-700nm) sobre fondo blanco y

fondo negro se determinaron con un espectrocolorímetro Minolta, modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokyo, Japón) con un área de la muestra de 30mm, usando un iluminante D65/ observador de 10°. Estas determinaciones se realizaron por triplicado y sobre la cara del film que había estado en contacto con el aire durante la etapa de secado. La transparencia de los films se determinó aplicando la teoría de Kubelka-Munk para la dispersión múltiple de los espectros de reflexión (Hutchings, 1999)

2.3.6. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

El poder antioxidante de los films se midió mediante una determinación in vitro de la capacidad de eliminación de los radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este método se basa en la reducción del radical DPPH en una solución alcohólica en presencia de un compuesto antioxidante donador de hidrógeno, debido a la formación de la forma no radical de DPPH en reacción. En la forma radical, estas moléculas muestran absorbancias de 515nm, las cuales desaparecen al tomar un electrón o un radical hidrógeno proveniente de un compuesto antioxidante, dando lugar a una molécula estable (Brand-Williams *et al.*, 1995). Este análisis se realizó tanto en el residuo como en los films.

Para el residuo de horchata, se colocó en agitación 1 gr de residuo en 15 ml de metanol (Panreac Química, S.A. Castella del Valles, Barcelona) en condiciones de oscuridad y constante agitación durante 1,5 h. Para los films, estos se mezclaron con metanol en una relación 1g residuo/film: 15ml metanol, en condiciones de oscuridad y constante agitación por 10 días. Ambos extractos fueron filtrados con un filtro de 0,45 μm y el sobrenadante resultante se utilizó para realizar las mediciones de capacidad antioxidante y contenido en fenoles totales.

La actividad antioxidante se hizo siguiendo el protocolo de Brand-Williams *et al.*, (1995), donde se diluyo el extracto progresivamente entre 0.010 y 0.190ml (0.03 ml incremento del volumen) con el DPPH. La medida de la absorbancia se midió a una longitud de onda de 515 nm en un espectrofotómetro (ThermoScientific, Evolution 201 UV visible Spectrophotometer). La capacidad antioxidante se evalúa a partir del parámetro EC₅₀, que determina la cantidad de muestra necesaria para reducir la concentración de DPPH inicial al 50%, usando la curva de calibración adecuada ($\text{Abs}_{515\text{nm}} = 11,324 \cdot [\text{DPPH}] - 0,0038$; $R_2 = 0.9992$). Los análisis se realizaron por triplicado.

El contenido de fenoles totales se desarrolló siguiendo el método de Folin Ciocalteu descrito por Menzel *et al.*, 2019. Se filtraron los extractos con filtros de 0,45 μm . A continuación 0,5 ml de extracto se mezclaron con 6 ml de agua destilada y se agregó 0,5 ml de reactivo Folin (2N). Después de un minuto, se añadieron 1,5 ml de disolución al 20 % de Na₂CO₃ y se enrasaron hasta 10 ml con agua destilada. Después se agitaron y se mantuvieron en oscuridad durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 725 nm usando un Espectrofotómetro UV-Vis (Evolution

201, Thermo Scientific), cuyos resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de residuo seco, empleando la recta de calibrado del ácido gálico correspondiente ($Abs_{725\text{ nm}} = 0.099 [\text{mg ácido gálico /L}] + 0.043$; $R_2=0,9991$). El análisis se realizó por triplicado.

2.3.7. ANALISIS TERMOGRAVIMETRICO

Se utilizó un analizador termogravimétrico (TGA/SDTA 851e Mettler - Toledo, Suiza) en un rango de temperatura entre 25 y 600°C y utilizando una velocidad de calentamiento de 10°C/min bajo una corriente de nitrógeno de 20mL/min. Las mediciones se realizaron por duplicado.

2.3.8. ANALISIS DE MICROESTRUCTURA

La microestructura de los films fue evaluada mediante un equipo FESEM del Servicio de Microscopia Electrónica de la UPV. Para ello, los films previamente deshidratados a 0% de HR en pentóxido de fosforo, fueron criofracturados usando nitrógeno líquido y recubiertos de oro. Se obtuvieron imágenes transversales de los films usando un voltaje de 1,5kV.

2.4. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el software Statgraphics Centurión XVIII (StatgraphicsTechnologies, Inc., Rockville, Md.) para un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método LSD (Método de la Mínima Diferencia Significativa) para el análisis de resultados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Espesor, contenido de humedad, solubilidad y propiedades de barrera

La Tabla 1 muestra el espesor, el contenido de humedad, la solubilidad y las propiedades barrera (permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno) de los films. En cuanto al espesor, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, a excepción del film que presenta un 20% de residuo de horchata (202.5 μm). La diferencia de espesor puede deberse a la fluidez del material durante el prensado en caliente, que depende de viscosidad y la presión para la obtención del film (Hernández -García *et al.*, 2021), así como al porcentaje de fibra que se encuentra en el residuo de horchata, en cual influye en la formación de la matriz polimérica, ya que éstas se dispersan o aglomeran según la tendencia de formar enlaces de hidrógenos entre sí (Tserki *et al.*, 2006). Cabe resaltar que resultados similares se obtuvieron en films a base de almidón y fibras de caña de azúcar (Ireno *et,al.*, 2020), films comestibles elaboradas a partir de fibra de

naranja (Valdez, 2018) y films de almidón y cascarilla de arroz y café (Ferrer, 2018)

TABLA 1. Espesor, contenido de humedad en equilibrio, solubilidad en agua y propiedades de barrera (permeabilidad al vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP)) de los films de PHBV y residuo de horchata. Valores medios \pm desviación estándar.

Formulación (%)	Espesor (μm)	Humedad (%) (bs)	Solubilidad (%)	WVP x 10¹² (g/m.s.Pa)	OP x 10¹² (cm ³ /m.s.Pa)
Control	178 \pm 22 ^a	0.9 \pm 0.2 ^a	3.4 \pm 0.3 ^a	18.5 \pm 0.6 ^a	0.4 \pm 0.0 ^a
10%	176 \pm 18 ^a	1.14 \pm 0.09 ^a	4.1 \pm 0.3 ^b	62 \pm 6 ^a	8.8 \pm 1.0 ^b
20%	202 \pm 11 ^b	1.8 \pm 0.2 ^b	4.3 \pm 0.2 ^{bc}	117 \pm 16 ^b	-
30%	182 \pm 20 ^a	2.1 \pm 0.1 ^c	4.8 \pm 0.2 ^c	206 \pm 37 ^c	-

Diferentes letras en superíndice (a - c) dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$).

Con respecto de la humedad, se observa que los films que contienen mayor contenido de residuo de horchata aumentaron significativamente la humedad ($p < 0.05$) con respecto al film control. Esto está relacionado al mayor carácter hidrofílico de los componentes del residuo de horchata frente el PHBV, altamente hidrofóbico, aumentando así la capacidad de retener agua de la matriz (Sánchez-Zapata *et al.*, 2009).

En cuanto a la solubilidad, tanto el control como las demás formulaciones presentaron muy baja solubilidad en agua, en coherencia con la naturaleza hidrófoba del PHBV (Ciudad, 2013). Así mismo se observó que, al incorporar el residuo la solubilidad aumentó significativamente ($p < 0.05$) respecto al control (sin residuo), especialmente al aumentar el contenido de residuo en los films incrementando hasta un 41% respecto del control.

Los valores de permeabilidad al agua del control coinciden con los obtenidos por Requena (2018) para films de PHBV plastificado con PEG1000. La incorporación de residuo empeoró significativamente ($p < 0.05$) las propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno de los films composite. Esto se debe en parte a la naturaleza más hidrofílica del residuo, que hace que la matriz sea más afín al vapor de agua, por otro lado, a la baja adherencia de las fibras con el PHBV, que interrumpen la continuidad de la matriz, creando canales preferentes para la difusión de agua y gases (Cano *et al.*, 2020). Resultados similares han sido encontrados por otros autores trabajando con films a base de PHBV y paja de arroz (Berthert *et al.*, 2015) y films de almidón y residuo de horchata (Santacreu, 2021).

3.2. Propiedades mecánicas

Los parámetros mecánicos de los films control y composites se muestran en la Tabla 2, y la Figura 1 muestra las curvas típicas tensión-deformación obtenidas en los ensayos de tracción.

TABLA 2. Propiedades de tracción (módulo elástico: EM, resistencia a la tracción: TS y deformación a la rotura: % E) de las de los films de PHBV y residuo de horchata. Valores medios \pm desviación Estándar.

Formulación (%)	EM (MPa)	TS (MPa)	E (%)
Control	1458 \pm 141 ^a	18 \pm 3 ^a	1.4 \pm 0.3 ^a
10%	1457 \pm 185 ^a	10 \pm 2 ^b	0.8 \pm 0.1 ^b
20%	1167 \pm 287 ^b	7.3 \pm 1.3 ^c	0.7 \pm 0.2 ^{bc}
30%	1353 \pm 243 ^{ab}	6.02 \pm 0.60 ^c	0.6 \pm 0.1 ^c

Diferentes letras en superíndice (a - c) dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$).

Como se observa en la Figura 1, la incorporación del residuo dio lugar a films que rompieron a menores esfuerzos y deformaciones, en comparación con el control, es decir, la matriz se debilitó mecánicamente. La muestra control mostró valores de los parámetros mecánicos similares a los encontrados por otros autores (Srithep *et al.*, 2013, Requena *et al.*, 2016 y Pracella *et al.*, 2021). La adición de residuo de horchata disminuyó significativamente la tensión de deformación en el punto de rotura entre un 32-50%, volviendo los films menos resistentes y deformables. En general, la adición del residuo de horchata no modificó significativamente el módulo de Young, excepto en los films con un 20% de residuo, que se volvieron menos rígidos (menores valores del módulo).

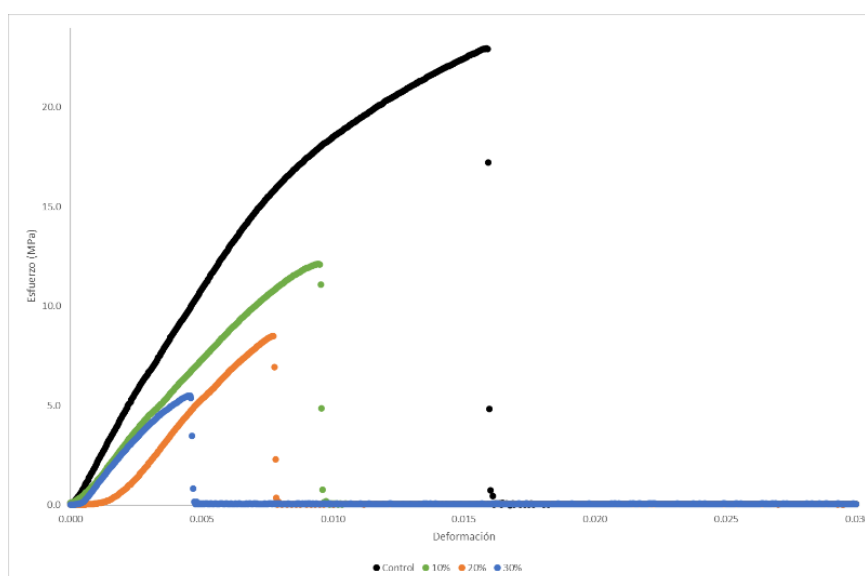


FIGURA 1. Curvas típicas de tensión-deformación de los films de PHBV puro y con residuo de horchata.

La debilitación mecánica de los films al incorporar el residuo rico en fibras ha sido también descrita por otros autores como Pascual y Pascual-Seva, (2017); Rojo *et al.*, (2015) y Agüero *et al.*, (2020), trabajando con otro tipo de films. Dicho efecto se acentúa al incrementar el contenido de residuo celulósico y depende de las propiedades superficiales de las partículas. Como ha sido descrito en la literatura, este efecto puede ser debido a la

falta de adhesión entre el PHBV y los componentes del residuo, rico en componentes lignocelulósicos o bien por el debilitamiento de la matriz al incorporar componentes inmiscibles, que interrumpen la continuidad de la matriz polimérica, debilitándola mecánicamente.

3.3. Propiedades ópticas

Los valores de transmitancia interna (Ti) de los films y los parámetros de color se muestran en la Tabla 3. Se observa que la muestra control tiene mayor valor de Ti. Esto se relacionan con una mayor homogeneidad del film y por tanto se corresponden con films más transparentes. Como era esperable, la incorporación y aumento del contenido del residuo aumentó la opacidad de los mismos, debido a una mayor heterogeneidad en la matriz (Marqués *et al.*, 2015).

TABLA 3. Transmitancia interna a 550 nm (Ti), luminosidad (L*), croma (C*), matiz (h*) y diferencia de color (ΔE) de las de los films de PHBV y residuo de horchata. Valores medios \pm desviación Estándar.

Formulación (%)	Ti 550nm	L*	C*	h*	ΔE
Control	49.86 \pm 1.09 ^a	69.19 \pm 0.27 ^a	17.84 \pm 0.2 ^a	81.06 \pm 0.16 ^a	-
10%	29.3 \pm 1.8 ^b	53.27 \pm 0.15 ^b	22.83 \pm 0.5 ^b	68.60 \pm 0.18 ^b	17.27 \pm 0.08
20%	15 \pm 2 ^c	48.9 \pm 0.6 ^c	21.6 \pm 0.2 ^b	64.2 \pm 0.3 ^c	21.3 \pm 0.5
30%	10.42 \pm 0.02 ^d	42.97 \pm 1.15 ^d	19.2 \pm 0.7 ^c	61.16 \pm 1.84 ^d	27.0 \pm 1.3

Diferentes letras en superíndice (a - d) dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$).

En cuanto al color, se observó que la adición de residuo de horchata dio lugar a films con menor claridad (menores valores de L*) y colores más saturados (mayores valores de croma) con tonalidades más marrones-rojizas (menores valores de tono), siendo estos cambios significativos.

Por otro lado, la diferencia de color (ΔE) fue aumentando a medida que se aumentó la cantidad de residuo.

3.4. Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales

La Tabla 4 muestra la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales del residuo de horchata y de los films de PHBV/residuo de horchata. Los valores correspondientes a los films estudiados se determinaron en el extracto correspondiente.

TABLA 4. Actividad antioxidante de los films de PHBV y residuo de horchata, expresada en términos de valores EC50, y su contenido total de fenoles. Valores medios \pm desviación estándar

Formulación (%)	Tiempo de reacción (min)	EC 50 (mg residuo/mg DPPH).	Fenoles totales (mg GAE/ g residuo seco)
10%	90	40 \pm 5 ^a	9.36 \pm 0.09 ^a
20%	90	36 \pm 2 ^a	5.48 \pm 0.06 ^b
30%	90	45 \pm 3 ^a	3.42 \pm 0.07 ^c
Residuo de horchata	180	84 \pm 2 ^b	1.61 \pm 0.01 ^d

Diferentes letras en superíndice (a - c) dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$).

La actividad antioxidante se determinó a través del parámetro EC50, expresado en termino mg residuo en la formulación por mg de DPPH. Cuanto menor es el valor, mayor es la actividad antioxidante de la muestra. Como se puede observar, tanto el residuo como el film exhibieron cierta capacidad antioxidante, aunque baja en comparación con el extracto de la paja de arroz (6.3 \pm 0.3 mg extracto seco/mg DPPH) (Freitas *et al.*, 2020) o con la de compuestos fenólicos puros (EC50 de extracto tomillo es de 0,65 mg compuesto/mg DPPH) (Talón *et al.*, 2017). Dicha capacidad antioxidante se debe a la presencia de compuestos fenólicos en el residuo, principalmente ácidos fenólicos y flavonoides (Roselló-Soto *et al.* 2018).

Como se puede observar, la capacidad antioxidante de los films fue significativamente mayor (menor EC50) que la del residuo. Esto podría deberse a la formación de los denominados productos de la reacción de Maillard (PRM) con actividad antioxidante (Tagliazucchi *et al.*, 2010), como las melanoidinas, durante el proceso de termoformado del film. Las temperaturas altas alcanzadas en dicho proceso pueden promover la formación de dichos compuestos y contribuir a la capacidad antioxidante total. Resultados similares fueron encontrados por Garrido (2021), trabajando con almidón termoconformado y residuo de horchata.

En cuanto al contenido de fenoles totales en el residuo, se obtuvo un valor de 1.61 mg GAE/g residuo seco, valor superior al encontrado en la bibliografía. Las diferencias de los resultados de fenoles totales pueden deberse al tipo de solvente que se empleó para la extracción, tiempo de extracción utilizado, así como aspectos relacionados con la variedad de chufa utilizada, ya que sus características pueden variar según la zona geográfica de procedencia, y del proceso previo al que fue sometida, de la temperatura y del tamaño de partícula, entre otros factores (Tan-Quoc, 2020; Guntero *et al.*, 2015, Karimi *et al.* 2015).

Los valores de fenoles encontrados para los films, expresado por gramo de residuo, no concuerdan con la cantidad de residuo utilizado. Algunos autores han sugerido que el método espectrofotométrico de medida de fenoles por Folin puede verse alterado por la presencia de otros compuestos (Muñoz *et al.*, 2017), en este caso, posiblemente formados durante el proceso de termoconformado del film, como pueden ser los compuestos de Maillard, aunque habría que realizar un análisis más en profundidad para poder confirmarlo.

3.5. Análisis termogravimétrico

La degradación térmica de los films de PHBV, PHBV/residuo de horchata y residuo de horchata se observan en la Figura 2 y los parámetros característicos de dicha degradación en la Tabla 5.

TABLA 5. Parámetros de degradación térmica de los films de PHBV y residuo de horchata. Valores medios \pm desviación Estándar.

Formulación (%)	T on set (°C)	T end set (°C)	T peak (°C)	Peso del residuo a 600°C	Δ Masa
Control	234.2 \pm 0.8 ^a	475 \pm 12 ^a	289.2 \pm 1.7 ^a	2.5 \pm 2.3 ^a	97 \pm 2 ^a
10%	231.7 \pm 0.8 ^a	533 \pm 0 ^b	287 \pm 0 ^a	1.1 \pm 0.1 ^a	98.2 \pm 0.1 ^a
20%	232.5 \pm 1.7 ^a	536.7 \pm 1.7 ^b	291.7 \pm 0.8 ^a	1.03 \pm 0.14 ^a	97.6 \pm 0.2 ^a
30%	224 \pm 3 ^a	546 \pm 2 ^{bc}	290.0 \pm 0.8 ^a	0.6 \pm 0.5 ^a	98.1 \pm 0.3 ^a
Residuo de horchata	196 \pm 10 ^b	561 \pm 0 ^c	312.5 \pm 1.7 ^b	1.7 \pm 1.2 ^a	88.6 \pm 1.4 ^b

Diferentes letras en superíndice (a - b) dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$).

El PHBV sigue un mecanismo de degradación térmica típica de poliésteres en 2 etapas (Figura 2): en primer lugar, se produce una escisión aleatoria de cadenas mediante la eliminación de enlaces cis, reacción intramolecular que causa una drástica reducción del peso molecular del polímero y la formación de nuevos terminales ácido; en segundo lugar, se produce una transesterificación entre cadenas poliméricas, aunque esta última reacción ocurre en menor medida (Berthet *et al.*, 2015). Así, la degradación térmica del PHBV plastificado con PEG empezó alrededor de 234°C y tuvo su máxima degradación sobre los 289°C (Tabla 5), en coherencia con lo encontrado por otros autores (Berthet *et al.*, 2015; Requena *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2021 y Agüero *et al.*, 2020).

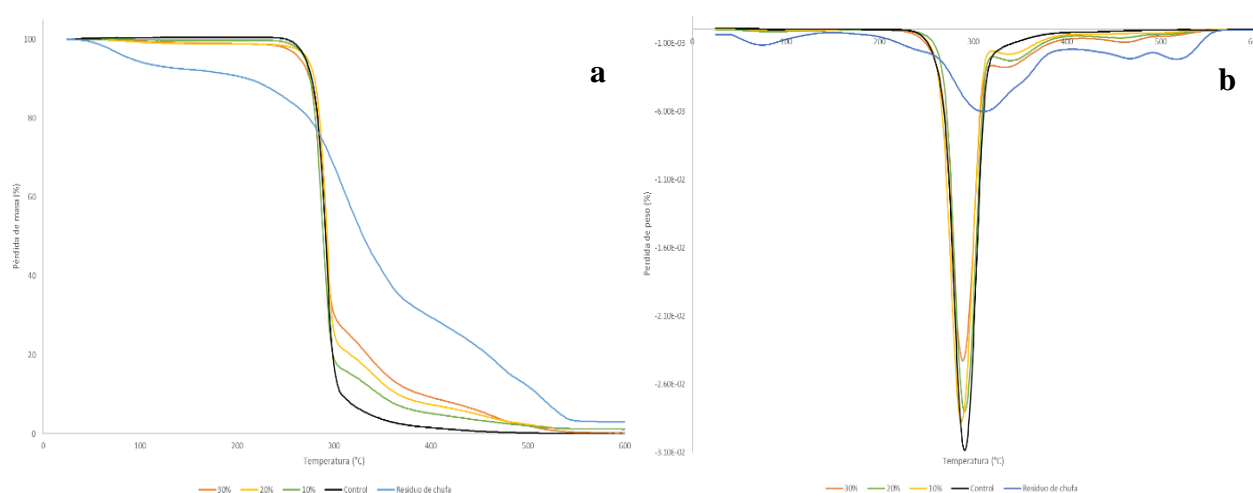


FIGURA 2. Curvas termogravimétricas de las de los films de PHBV y residuo de horchata. a) Curvas del inicio de la degradación b) Curvas del primer derivado termogravimétrico

Comparando las curvas de TGA del control con las diferentes formulaciones se observa que la adición del residuo de horchata modificó ligeramente el comportamiento térmico de los films, pero solo a partir de los 300°C. A esa temperatura ha tenido lugar la máxima degradación térmica y los eventos posteriores se corresponden con la descomposición de los compuestos secundarios formados. Las diferencias encontradas se deben entonces a la formación de diferentes metabolitos secundarios en presencia de residuo, que hace que el rango de degradación térmica aumente hasta superar los 500°C.

Analizar cómo se ven afectados los mecanismos de degradación del polímero debido a la incorporación del residuo es importante a la hora de asegurar su procesabilidad a través de su estabilidad térmica. Como se puede observar en la Tabla 5, la incorporación del residuo de horchata no afectó significativamente ($p > 0.05$) a la estabilidad térmica del polímero (T° on set, T° peak) y, por tanto, tampoco afectó a la procesabilidad del mismo. Eso es seguramente debido a que el residuo presentó valores de inicio de degradación (T° on set) y de temperatura de degradación máxima (T° peak) similares a los del PHBV.

3.6. Análisis microestructural

La figura 3, muestra las micrografías obtenidas por SEM de la sección transversal de los films. El film de PHBV plastificado muestra la estructura típica de un material semicristalino, donde también se observa la formación de hilos de material deformado en la superficie fracturada del film, promovido por el efecto plastificante en la región amorfa del material, tal y como ha sido observado por Requena (2018) trabajando con PHBV plastificado.

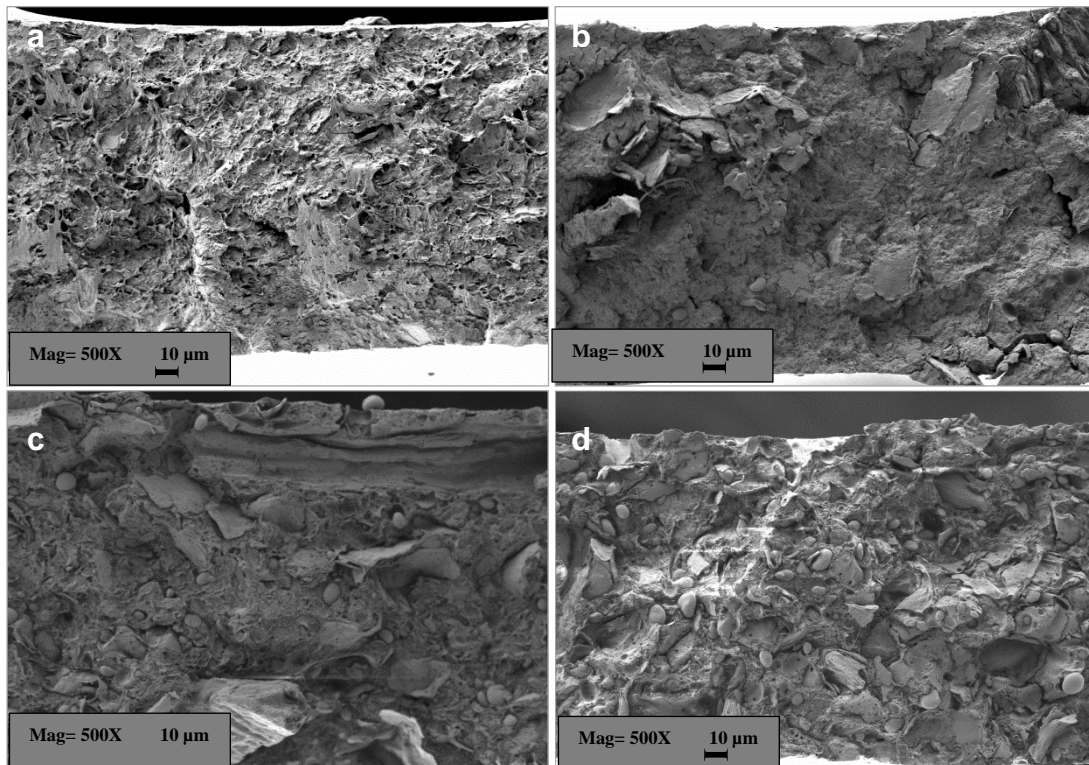


FIGURA 3. Imágenes de microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM) de las superficies de fractura de los films de PHBV y residuo horchata (a) film control, (b) film con 10% de residuo, (c) film con 20% de residuo, (d) film con 30% de residuo. Las imágenes se tomaron a una magnitud de 500X.

La incorporación del residuo de horchata dio lugar a una estructura heterogénea, tanto más cuanto mayor fue la cantidad de residuo incorporado. A parte de fibras y material celulósico agregado, llama la atención la presencia de una gran cantidad de gránulos de almidón sin alterar, intactos. Esto pone de manifiesto que las temperaturas empleadas durante el termoprocesado no fueron suficientes para provocar la gelatinización del mismo, seguramente por la baja cantidad de agua presente en la matriz, que hace que esta aumente. En general, la compatibilidad entre el residuo y la matriz polimérica fue buena, dando lugar, por ejemplo, a la presencia de pocos huecos interfaciales alrededor de los gránulos de almidón y fibras. Sin embargo, esto no se tradujo en una adecuada adherencia entre materiales que reforzara la estructura formada, tal y como se observó a partir del análisis de las propiedades mecánicas de los films composite.

4. CONCLUSIONES

El residuo de la producción de horchata ha sido utilizado con éxito para la obtención de films biodegradables a base de PHBV por termoconformado. Su incorporación dio lugar a cambios en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los films, que se volvieron mecánicamente menos resistentes y deformables, con menor capacidad de barrera al vapor de agua y solubilidad

en agua, mayor opacidad y menor brillo. Por otro lado, la incorporación del residuo no modifico la estabilidad térmica de los films, asegurando así la adecuada procesabilidad de los mismos. La incorporación del residuo en la producción de estos films podría contribuir a revalorizar este subproducto, a la vez que abarata los costes de producción de los films, en coherencia con un sistema de producción más sostenible y los principios de una economía circular. Adicionalmente, el uso de residuo de horchata en la producción de estos films le podría estar confiriendo cierto carácter antioxidante de potencial interés para su aplicación en la conservación de alimentos. Futuros trabajos irán encaminados a determinar la capacidad antioxidante de los films a través de ensayos in vivo.

5. REFERENCIAS

- Aguero, A., Garcia-Sanoguera, D., Lascano, D., Rojas-Lema, S., Ivorra-Martinez, J., Fenollar, O., Torres-Giner, S. 2020. Evaluation of different compatibilization strategies to improve the performance of injection-molded green composite pieces made of polylactide reinforce with short flaxseed fibers. *Polymers*. 12, 821. <http://doi:10.3390/polym12040821>
- ASTM, 1995. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard designations: E96-95 ASTM, Annual book of ASTM standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (1995), pp. 406-413
- ASTM, 2001. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard designations: D882 Annual book of ASTM standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (2001), pp. 162-170
- ASTM, 2002. Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. Standard designations: 3985-95. Annual book of ASTM standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (2002), pp. 472-477
- Beltrami, L.V.R., Bandeira, J.A.V., Scienza, L.C. Zattera, A.J. 2014. Biodegradable Composites: Morphological, Chemical, Thermal, and Mechanical Properties of Composites of Poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) with Curaua Fibers After Exposure to Simulated Soil. *J. APPL. POLYM. SCI.* <http://doi:10.1002/APP.40712>.
- Berthet, M.A., Angellier-Coussy, H., Chea, V., Guillard, V, Gastaldi, E., Gontard, N. 2015. Sustainable food packaging: Valorizing wheat straw fibers for tuning PHBV-based composites properties. *Composites*. 72, 139-147
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 28.25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Cano, a., Andres, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. 2020. Use of tannins to enhance the functional properties of protein-based films. *Food hydrocolloids*. 100, 105443. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105443>
- Ciudad, A. 2013. Desarrollo de polímeros biodegradables compuestos para aplicaciones en la industria electrónica. Tesis de Grado. Universidade da Coruña.
- Ecoembes 2009. Proyecto de Análisis de bioplásticos - Resumen ejecutivo. Dirección URL https://www.ecoembes.com/sites/default/files/archivos_estudios_idi/proyecto_bioplásticos_-_resumen_ejecutivo.pdf
- Ferrer, D.S. 2018. Obtención de celulosa de cascarilla de arroz y café e incorporación a films de almidón termoplástico. Tesis de Grado. Universidad politécnica de valencia.
- Freitas, P.A.V., González-Martínez, C., Chiralt, A. 2020. Application of ultrasound pre-treatment for enhancing extraction of bioactive compounds from rice straw. *Foods* 2020.9,1657. <https://doi:10.3390/foods9111657>.
- Garrido, G. 2021. Caracterización composicional y actividad antioxidante del residuo obtenido en la elaboración de la horchata. Tesis de Grado. Universidad Politècnica de València.

- Guntero, V.A., Longo, M.B., Ciparicci, S.A., Martini, R.E., Andreatta, A.E. 2015. Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. *VII congreso argentino de ingeniería química. Centro para la seguridad de los procesos químicos*.
- Hernández-García, E., Vargas, M., Chiralt, A. 2021. Thermoprocessed starch-polyester bilayer films as affected by addition of gellan or xanthan gum. *Food Hydrocolloids*. 113, 106509 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106509>
- Hutchings, J.B. 1999. Food and colour appearance, Chapman and Hall food Science, segunda edición, Aspen Publication, Gaithersburg, MD.
- Ireno, P. C., Leiva de Faria, M., Bilck, A.P., Soares, E, A. 2020. Atividade antimicrobiana e caracterização de filmes de amido de mandioca/quitosana, reforçados com fibras de cana de açúcar. *Brazilian Journal of development*. 6(2), 8766-8779. <https://doi:10.34117/bjdv6n2-257>
- Karimi, A., Min, B., Brownmiller, C., Lee, S.O. 2015. Effects of Extraction Techniques on Total Phenolic Content and Antioxidant Capacities of Two Oregano. *Leaves. Journal of Food Research*. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n1p112>
- Marqués, J.A., Requena, R., Jiménez, A., Chiralt, A. 2015. Incorporación de aceites esenciales en films bicapa de PHBV y análisis de su propiedades físicas y antimicrobianas.
- Menzel, C., González-Martínez, C., Chiralt, A., Vilaplana, F. 2019. Antioxidant starch films containing sunflower hull extracts. *Carbohydrate Polymers* 214, 142–151.
- Muñoz 2013. Utilización de los subproductos de la horchata de chufa en la industria cárnica. Tesis de Grado. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Muñoz- Bernal, O.A., Torres-Aguirre, G.A., Nuñez-Gastelum, J.A., de la Rosa, L., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, F., Alvarez-Parrilla, E. 2017. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28. <http://doi:10.1016/j.recqb.2017.04.003>.
- Ortega-Toro, R., Collazo-Bigliardi, S., Talens, P. Chiralt, A. 2016. Influence of citric acid on the properties and stability of starch-polycaprolactone based films. *Journal of applied polymer science*. <https://doi.org/10.1002/APP.42220>.
- Pascual, B., Pascual-Seva, N. 2017. Cultivos hortícolas al aire libre. Chufa. Cajamar Caja Rural – Serie Agricultura. España.
- Pracella, M., Mura, C., Galli, G. 2021. Polyhydroxyalkanoate Nanocomposites with Cellulose Nanocrystals as Biodegradable Coating and Packaging Materials. *ACS Appl. Nano Mater*, 4, 260–270. <https://dx.doi.org/10.1021/acsanm.0c02585>.
- Requena, R., Vargas, M., Chiralt, A. 2015. Propiedades mecánicas de films de almidón obtenidos por moldeo por compresión. Efecto de los plastificantes.
- Requena, R. Jiménez, A., Chiralt, A. 2016. Effect of plasticizers on thermal and physical properties of compression-moulded poly[(3- hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] films. *Polymer Testing*, 56, 45-53.
- Requena, R. 2018. Multilayer biodegradable active films based on PHBV for food packaging. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Rojo, E., Peresin, M.S., Sampson, W.W., Hoeger, I.C., Vartiainen, J., Laine, J., Rojas, O.J. 2015 Comprehensive elucidation of the effect of residual lignin on the physical, barrier, mechanical and surface properties of nanocellulose films. *Green Chem*, 17, 1853–1866.
- Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Putnik, P., Bursac, D., Lorenzo, J. M., Cantavella-Ferrero, Y. 2018. Enhancing Bioactive Antioxidants' Extraction from Horchata de Chufa" By-Products. *Foods*. 7, 161. <https://doi.org/10.3390/foods7100161>
- Sánchez-Zapata, E., Fuentes-Zaragoza, E., Fernández-López, J., Esther Sendra, E. S., Navarro, C., Pérez-Álvarez, J. A. 2009. Preparation of dietary fiber powder from tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk ("horchata") byproducts and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7719–7725. <https://doi.org/10.1021/jf901687r>.
- Santacreu, N. 2021. Revalorización del residuo de horchata para desarrollar films biodegradables a base de almidón. Tesis de Grado. Universidad Politécnica de Valencia.

- Srithep, Y., Ellingham, T., Peng, J., Sabo, R., Clemons, C., Turng, L.S., Pilla, S. 2013. Melt compounding of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/nanofibrillated cellulose nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, 98, 1439-1449.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Conte, A. 2010. Effect of dietary melanoidins on lipid peroxidation during simulated gastric digestion: their possible role in the prevention of oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(4), 2513-2519.
- Talón, E., Trifkovic, K.T., Nedovic, V.A., Bugarski, B.M., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. 2017. Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate polymers*, 157, 1153-1161.
- Tan-Quoc, L.P. 2020. Research on polyphenols extraction from *Polygonum multiflorum* Thunb. Roots. *International journal edited by the Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants*, 66(1), 9-17. <https://doi:10.2478/hepo-2020-0002>
- Tserki, V., Matzinos, P., Zafeiropoulos, N. E., Panayiotou, C. 2006. Development of biodegradable composites with treated and compatibilized lignocellulosic fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 100,4471-4703.
- Valdez, B. A. 2018. Efecto de un bioempaque eco-friendly con características antimicrobianas y antioxidantes a base de fibra de cítricos y extracto de orégano, sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de *Cyprinus carpio*. Tesis de Grado. Universidad Autonoma del Estado de Mexico.
- Zhou, Y., Katsou, E., Fan, M. 2021. Estructura interfacial y propiedad de carboximetilcelulosa ecológica / poli (3-hidroxibutirato-co-Biocompuestos de 3-hidroxivalerato). *Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas*, 179, 550-556
- Zucco, F., Borsuk, Y., & Arntfield, S. D. 2011. Physical and nutritional evaluation of wheat cookies supplemented with pulse flours of different particle sizes. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.06.007>