

Caracterización y modificación química de pululano producido a partir de *Aureobasidium pullulans* ATCC 15233

Fabián Hernández Tenorio

Maestría en Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Resumen

En este trabajo se caracterizó y se modificó químicamente pululano producido en cultivo sumergido de *A. pullulans* ATCC 15233. La modificación química del pululano se realizó por reacción de acetilación y se obtuvo un grado de sustitución (GS) de 2.90. La elucidación estructural del pululano y su derivado hidrofóbico - acetato de pululano - se llevó a cabo mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR). Los datos espectroscópicos de estos mostraron las señales características de los grupos funcionales y enlaces glicosídicos α (1-4) y α (1-6) propios del pululano. El peso molecular (PM) del pululano producido presentó un valor de 93471 Da. En cuanto al análisis térmico, se logró aumentar la estabilidad térmica (T_d) y temperatura de transición vítrea (T_g) debido a la formación del enlace éster asociado al grupo acetato en comparación con el pululano nativo. A partir de los biopolímeros se formularon películas y se determinó la morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM), presentándose morfología lisa para las películas de pululano y de acetato de pululano. Las propiedades mecánicas como resistencia a la tracción (TS) y porcentaje de alargamiento a la rotura (% E) para la película de pululano mostró valores de TS 1.70 MPa \pm 0.48 y % E de 11.89 %. Las distribuciones de tamaño partícula evaluado en las muestras de acetato de pululano obtenidas por sonicación a 40 % y 60 % de amplitud fueron de 20.062 y 17.894 μ m, respectivamente. Los resultados sugieren que las propiedades fisicoquímicas del pululano producido a partir de *A. pullulans* ATCC 15233 y de su derivado - acetato de pululano - pueden ser consideradas para contribuir al desarrollo de materiales de carácter biológico (biopelículas, entre otros).

Palabras claves: Pululano, Acetato de pululano Modificación química, Caracterización, *Aureobasidium pullulans*.

1. Introducción

Los polisacáridos son polímeros naturales formados por la condensación de residuos de monosacáridos mediante enlaces hemiacetal o hemicetal. Se caracterizan por mostrar diversidad funcional asociada a sus estructuras químicas, pesos moleculares, composición y carácter iónico. Son utilizados en aplicaciones como productos alimenticios, administración

acetato de pululano es importante en la formulación de nanopartículas de autoagregación para la liberación controlada de fármacos (Saranya, Rajan, Suganthan, Murugeswari, & Nambi Raj, 2015; Singh, Kaur, & Kennedy, 2015; Zhang et al., 2009) . De igual forma, para el desarrollo de nanofibras con interés biomédico (Enomoto-Rogers, Iio, Takemura, & Iwata, 2015) y la preparación de biopelículas para el recubrimiento de alimentos (Danjo et al., 2017; Teramoto & Shibata, 2006).

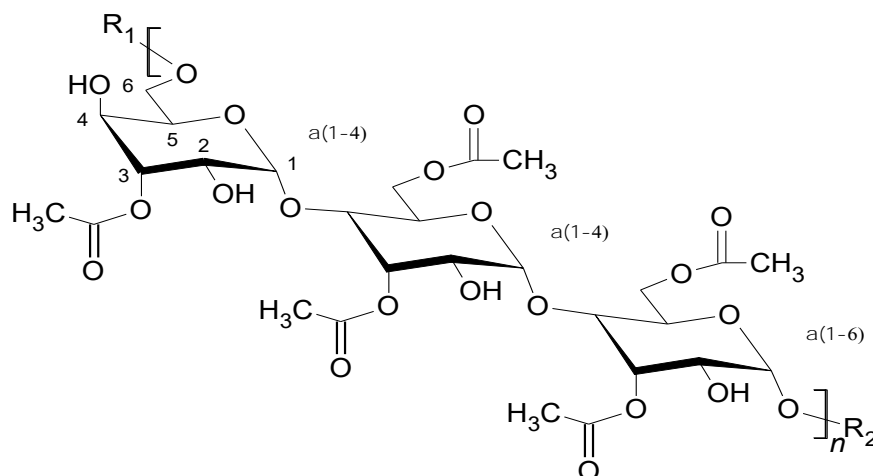


Fig. 2. Estructura molecular del acetato de pululano.

En el presente trabajo se obtuvo pululano a partir de la cepa *A. pullulans* ATCC 15233, la cual se ha utilizado en pruebas antifúngicas, producción de enzimas amilolíticas y análisis de biodegradabilidad (Aguilar-Palazuelos, Martínez-Bustos, Jiménez-Arévalo, Galicia-García, & Delgado-Rangel, 2007; Bae, Kim, & Ryu, 2016; Cappitelli, Sorlini, Pedemonte, Princi, & Vicini, 2006; Chung, Kim, Kim, Choi, & Chun, 2019; Chung, Kim, Choi, & Chun, 2018; Chung, Park, Choi, & Chun, 2018; El-Aghoury, Vasudeva, Banu, Elektorowicz, & Feldman, 2006; Hernández-Castillo et al., 2019; So, Jang, Lee, & So, 2016; Song, Oh, Roh, Kim, & Min, 2016). Sin embargo, la caracterización de pululano obtenido de *A. pullulans* ATCC 15233 no ha sido reportada en estos informes. Por lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en caracterizar y modificar químicamente pululano producido a partir de *A. pullulans* ATCC 15233, con el propósito de aprovechar sus propiedades para el posible desarrollo e innovación de materiales de interés industrial.

2. Materiales y métodos

2.1. Producción de pululano en cultivo sumergido

El microorganismo *A. pullulans* ATCC 15233 fue activado en agar PDA a 30°C. El inóculo se preparó en medio de cultivo constituido por: Sacarosa 30 g/L, K₂HPO₄ 4.0 g/L, Extracto de Levadura 2.7 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L y NaCl 0.5 g/L. El pH se ajustó a 5.5 y se incubó en un agitador orbital durante 48 horas a 30°C y 150 rpm.

La producción de pululano en cultivo sumergido se realizó en matraces Erlenmeyer de 2 L, en medio de cultivo compuesto por: Sacarosa 100 g/L, K₂HPO₄ 4.0 g/L, Extracto de

Levadura 2.7 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L y NaCl 0.5 g/L. El cultivo se incubó a 30°C y 150 rpm.

Al sobrenadante libre de células se le adicionó etanol (96 %v/v) y se almacenó a 4 °C. Las alícuotas incubadas se centrifugaron a 4500 rpm para obtener el polisacárido precipitado, que fue purificado por tratamiento térmico para la eliminación de proteínas (Wu, Jin, Kim, Tong, & Chen, 2009).

2.2. Modificación química de pululano

El pululado producido a partir de *A. pullulans* ATCC 15233 (PU) fue modificado por reacción de acetilación. La síntesis de acetato de pululano se llevó a cabo de la siguiente manera: se solubilizaron 2 g de PU en 20 ml de formamida (Panreac) a 54 °C. Posteriormente, se adicionaron 6 mL de piridina (J.T Baker) y 15 mL de anhídrido acético (Analytical, Carlo Erba). La mezcla de reacción fue sometida a 200 rpm y 54 °C durante 48 horas. El producto de síntesis se purificó con lavados en agua y precipitación con etanol (96 %v/v) hasta obtener un sólido blanco, el cual fue liofilizado por 24 horas (Sugumaran & Ponnusami, 2015; Zhang et al., 2009).

2.3. Caracterización

2.3.1. Espectroscopía FT-IR

El análisis FT-IR del pululano producido por *A. pullulans* ATCC 15233 y el acetato de pululano se realizó por medio de un espectrómetro FTIR-ATR (Spectrum two Perkin Elmer, EEUU) en la región espectral de 450 – 4000 cm⁻¹. La elucidación estructural se llevó a cabo por comparación de señales características, utilizando un estándar de pululano de peso molecular (PM) 100000 Da (Sigma – Aldrich).

2.3.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)

Los espectros de NMR se realizaron en un espectrómetro Bruker AVIII HD de 800 MHz (QANUC, Canadá). Las muestras de biopolímeros se solubilizaron en agua deuterada (D₂O) y cloroformo deuterado (CDCl₃) previo al análisis, y se registraron datos de ¹H, HMBC y HSQC-DEPT para el pululano producido por *A. pullulans* ATCC 15233, y ¹H (Bruker AVIII HD de 600 MHz) para el acetato de pululano. El grado de sustitución (GS) del pululano acetilado se calculó mediante la siguiente ecuación $GS = 10A/(3B + A)$ a partir de los valores de integración de los protones del grupo acetilo (*A*) y los protones asignados al pululano (*B*) (Ravi, Vats, Balija, Adapa, & Aditya, 2014; Zhang et al., 2009). Los datos espectroscópicos se procesaron con el software ACDLabs.

2.3.3. Cromatografía de exclusión por tamaño

El peso molecular del pululano obtenido de *A. pullulans* ATCC 15233 previo a la modificación química se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño usando dos

columnas en serie (una columna lineal y otra columna ultrahydrogel GPC 500 de 10 μ m 7.8 X 300 mm). Las condiciones del análisis fueron las siguientes: flujo de inyección 0.9 mL/min, detector índice de refracción (RID), fase móvil NaNO₃ 0.1N (Panreac), concentración de la muestra de 1.5 g/L y volumen de inyección de 50 μ L.

2.3.4. *Análisis termogravimétrico (TGA)*

Los análisis de estabilidad térmica se realizaron mediante un equipo TGA Q500 V20.13 Build 3 (TA Instruments, EEUU) bajo una atmósfera de nitrógeno. Las muestras (7 mg \pm 0.8) se calentaron con un programa térmico de 25 °C a 900 °C con velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura de descomposición (T_d) se determinó a partir del incremento de la curva de la primera derivada de TGA.

2.3.5. *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

La temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras se determinó por calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC), utilizando un equipo DSC Q200 (TA Instruments, EEUU). El MDSC se calibró previamente para la capacidad calorífica usando zafiro como referencia. Las muestras (11.0 mg \pm 1) se calentaron desde 50 °C a 200 °C con velocidad de calentamiento de 2 °C/min, amplitud de modulación de 0.35 °C y periodo de 60 s.

2.4. *Preparación de películas*

El pululano obtenido de *A. pullulans* ATCC 15233 se disolvió en agua bajo agitación constante a 60 °C hasta alcanzar una concentración de 10 % (p/v). Asimismo, se solubilizaron 2 g del éster de pululano en 50 mL de acetato de etilo (Protokimica) (Niu et al., 2019). Las soluciones formadoras de película se moldearon en recipientes de vidrio y se secaron a temperatura ambiente. Las películas formuladas fueron almacenadas a 23°C \pm 1 y humedad relativa de 50 % \pm 2.

2.4.1. *Medición de propiedades mecánicas*

Las propiedades mecánicas resistencia a la tracción (TS) y porcentaje de alargamiento a la rotura (%E) de las películas se determinó por medio de una máquina universal Instron serie 5900 con velocidad de medición de 10 mm/min (Enomoto-Rogers et al., 2015). Las muestras se cortaron en secciones rectangulares (100 mm x 50 mm) y se calcularon los grosores con un micrómetro digital con el fin de estimar el área de la sección transversal.

2.4.2. *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

La morfología superficial de las películas formuladas se caracterizó por microscopía electrónica de barrido empleando un equipo FEI modelo Phenom G2 pro (Eindhoven,

Holanda) con modo de operación en bajo vacío. Las muestras se fijaron con cinta de carbono y se recubrieron con aleación de Au-Pd con un espesor de 15 nm en presencia de gas Argón.

2.5. Evaluación de la formación de nanopartículas de acetato de pululano

El acetato de pululano se disolvió en 5 mL de diclorometano (Protokimica) y se adicionó la fase orgánica a través de una jeringa en 50 mL de alcohol polivinílico 0.5 %p/v (Protokimica). La mezcla se agitó y se sometió a sonicación (Branson 450, Marshall Scientific) durante 30 minutos modificando la amplitud entre 40 % y 60 %. Posteriormente, se centrifugó la emulsión a 4500 rpm para obtener un sólido que fue liofilizado (Sugumaran & Ponnusami, 2015). Las muestras de acetato se dispersaron en agua y se les determinó la distribución de tamaño de partícula mediante un Masterziser 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK).

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis FT-IR

Los espectros de infrarrojo (Fig. 3) mostraron señales muy similares de los grupos funcionales (Fig. 1) del pululano obtenido de *A. pullulans* ATCC 15233 (Fig. 3b) en comparación con el estándar de pululano (Fig. 3a). A partir de estos se encontró una banda ancha en los 3300 cm^{-1} atribuida al grupo -OH, de igual forma estiramiento de C-H a 2925 cm^{-1} y picos de absorción a 1175 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} correspondientes a enlaces C-O-C y C-O- respectivamente. Asimismo, se registraron bandas características que coinciden con investigaciones anteriores (Jiang et al., 2018; Sheng, Tong, & Ma, 2016), relacionadas a enlaces α -(1-6), α -(1-4) glucosídicos y configuración α a los 930 cm^{-1} , 850 cm^{-1} y 755 cm^{-1} . Además, con base en la estructura del acetato de pululano (Fig. 2), el espectro infrarrojo permitió identificar la formación del grupo acetato en la cadena polimérica del pululano por medio del estiramiento C=O a 1742 cm^{-1} , deformación CH_3 a 1369 cm^{-1} , vibración asimétrica C-O-C a 1216 cm^{-1} , grupo O-C=O a 601 cm^{-1} y disminución de la banda de -OH (Fig. 3c).

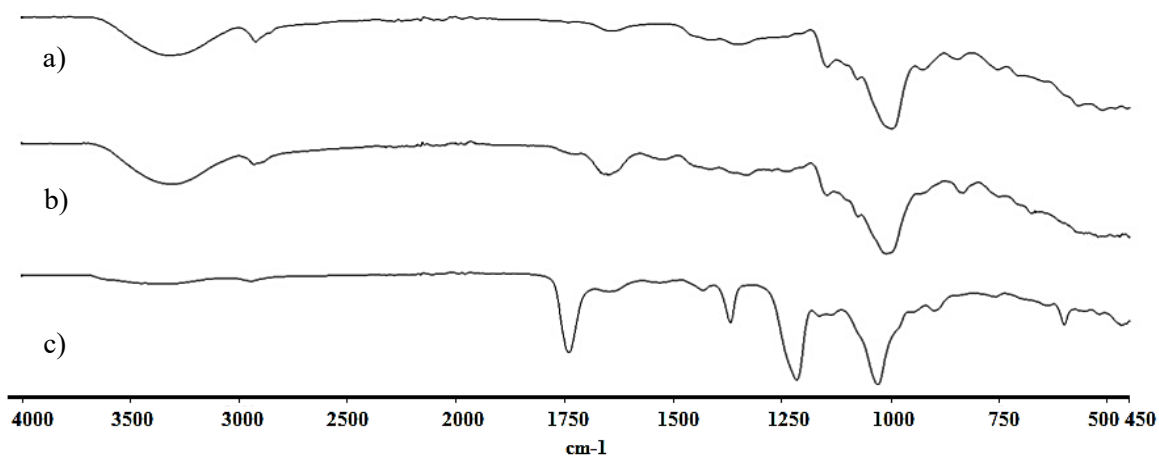


Fig. 3. Espectros IR de a) estándar de pululano, b) pululano producido por *A. pullulans* ATCC 15233, c) acetato de pululano.

3.2. Espectros de NMR

Para la elucidación estructural NMR del pululano se utilizó la estructura molecular descrita en la Fig. 1, denotada por los residuos A, B y C de anhidroglucosa enlazados α (1-4) y α (1-6). La confirmación de las características estructurales del pululano producido en cultivo sumergido de *A. pullulans* ATCC 15233 se realizó a partir de los datos espectroscópicos de NMR unidimensionales (1D) y bidimensionales (2D). El espectro de ^1H (Fig. 4) presentó desplazamientos químicos (δ) para H-1 de 5.32 y 5.28 ppm asignados a enlaces α (1-4), y 4.88 ppm debido a la presencia de protones anoméricos del enlace α (1-6). Las señales observadas a 3.78 y 3.81 ppm correspondieron a los H-6 de las unidades B y C de glucosa enlazadas α (1-4) (Fig. 1). Mientras que el pico 3.87 ppm fue atribuido al protón H-6 comprometido en el enlace α (1-6). Los desplazamientos de los H-2, H-3, H-4 y H5 (Fig. 1) se identificaron en la región comprendida desde 3.95 a 3.38 ppm (Fig. 4).

Los resultados de ^1H elucidados en la presente investigación para pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 están en concordancia con estudios preliminares, donde informaron δ de enlaces α (1-4) (5.36 y 5.32 ppm) y α (1-6) (4.96 ppm) para estándar de pululano (Sigma-Pfanstiehl Laboratories) (McIntyre, Vogel, & Canada Alberta, 1993).

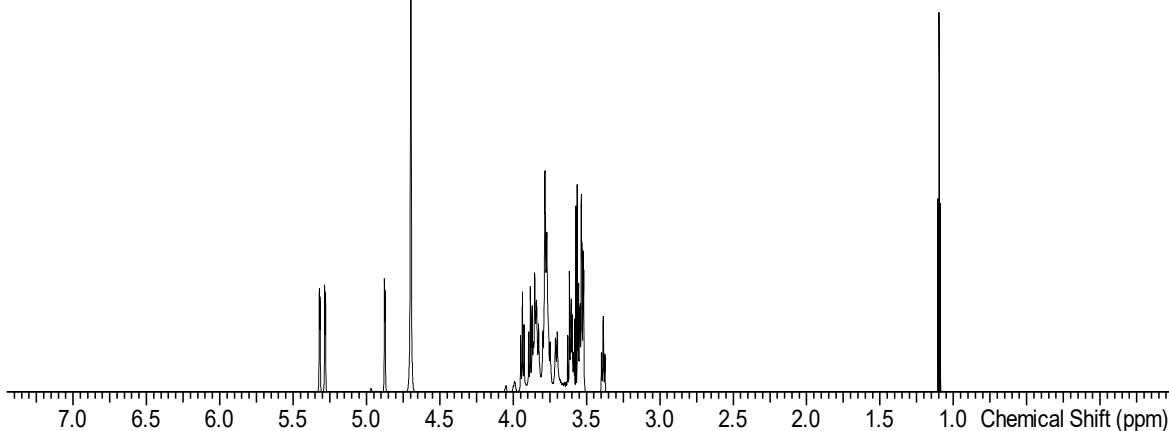


Fig. 4. Espectro ^1H NMR del pululano producido de *A. pullulans* ATCC 15233.

Las señales de los protones del acetato de pululano obtenido se presentaron a δ de 1.90 - 2.20 ppm, debido a los átomos de H del metilo (CH_3) asignados a los grupos acetilos (Fig. 5) y fueron similares a investigaciones anteriores con δ de 1.80 - 2.20 ppm para los CH_3 de los grupos acetilos (Sugumaran & Ponnusami, 2015; Teramoto & Shibata, 2006). Los picos correspondientes a los protones del pululano se observaron a δ 3.59 - 5.52 ppm. El grado de sustitución (GS) calculado indicó 2.90 grupos acetilos por unidad de anhidroglucosa del pululano (Zhang et al., 2010) y coincide con el GS (2.91) reportado por (Ravi et al., 2014).

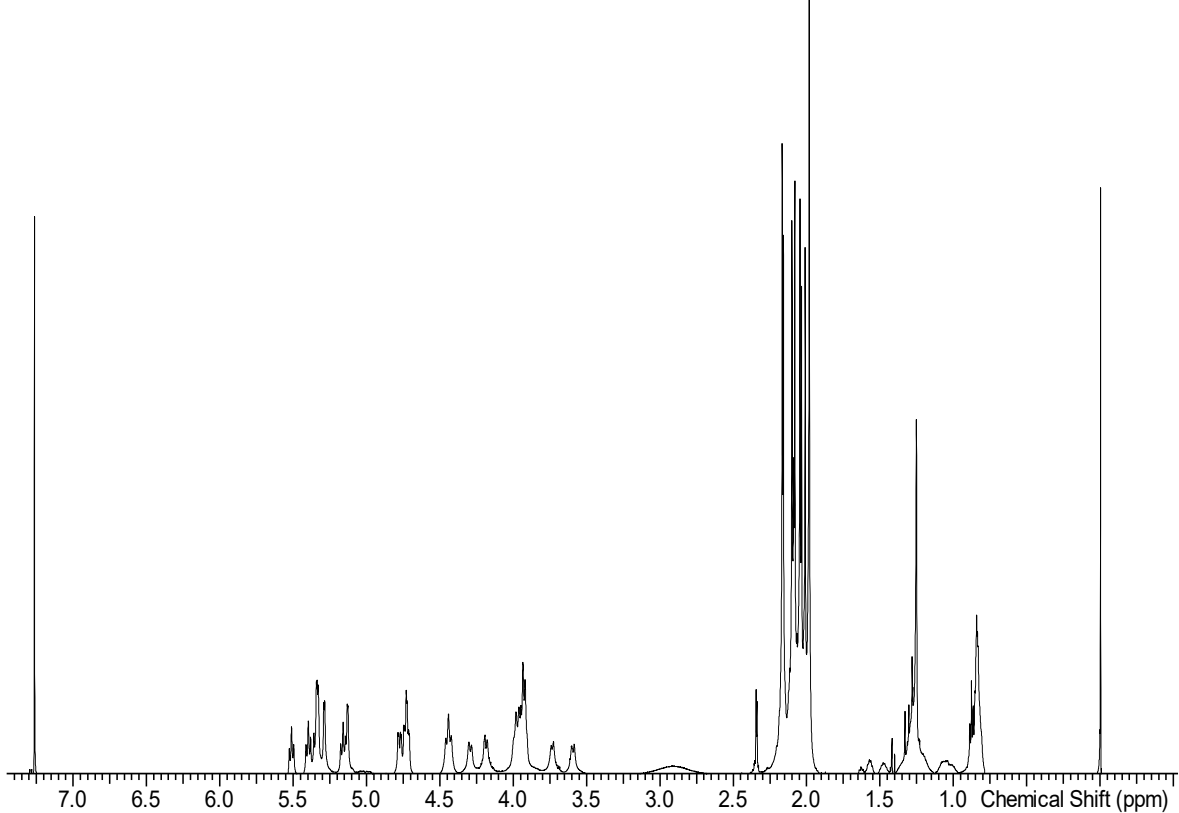


Fig. 5. Espectro H^1 NMR de acetato de pululano.

En la Fig. 6 se observan las correlaciones bidimensionales ^{13}C - 1H HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) para pululano de *A. pullulans* ATCC 15233. Los protones H-1 (5.32 ppm) de A (Fig. 1) mostraron correlación con C-4 (78.30 ppm) de B y los átomos H-1 (5.28 ppm) de B se correlacionaron con los átomos C-4 (77.95 ppm) de C a tres enlaces de distancia como consecuencia del enlace α (1-4). Igualmente, se evidenció la correlación de protones H-1 de C (4.88 ppm) con C-6 (67.04 ppm) de la unidad repetitiva A debido al enlace α (1-6). Las señales de H-4 (3.38 ppm) no enlazado α (1-4) del residuo A presentó correlación con C-6 (67.04 ppm) de A. De igual forma, se observaron correlaciones a dos y tres enlaces relacionados al resto de átomos de hidrógeno y carbono de las unidades α -glucosas del monómero de maltotriosa.

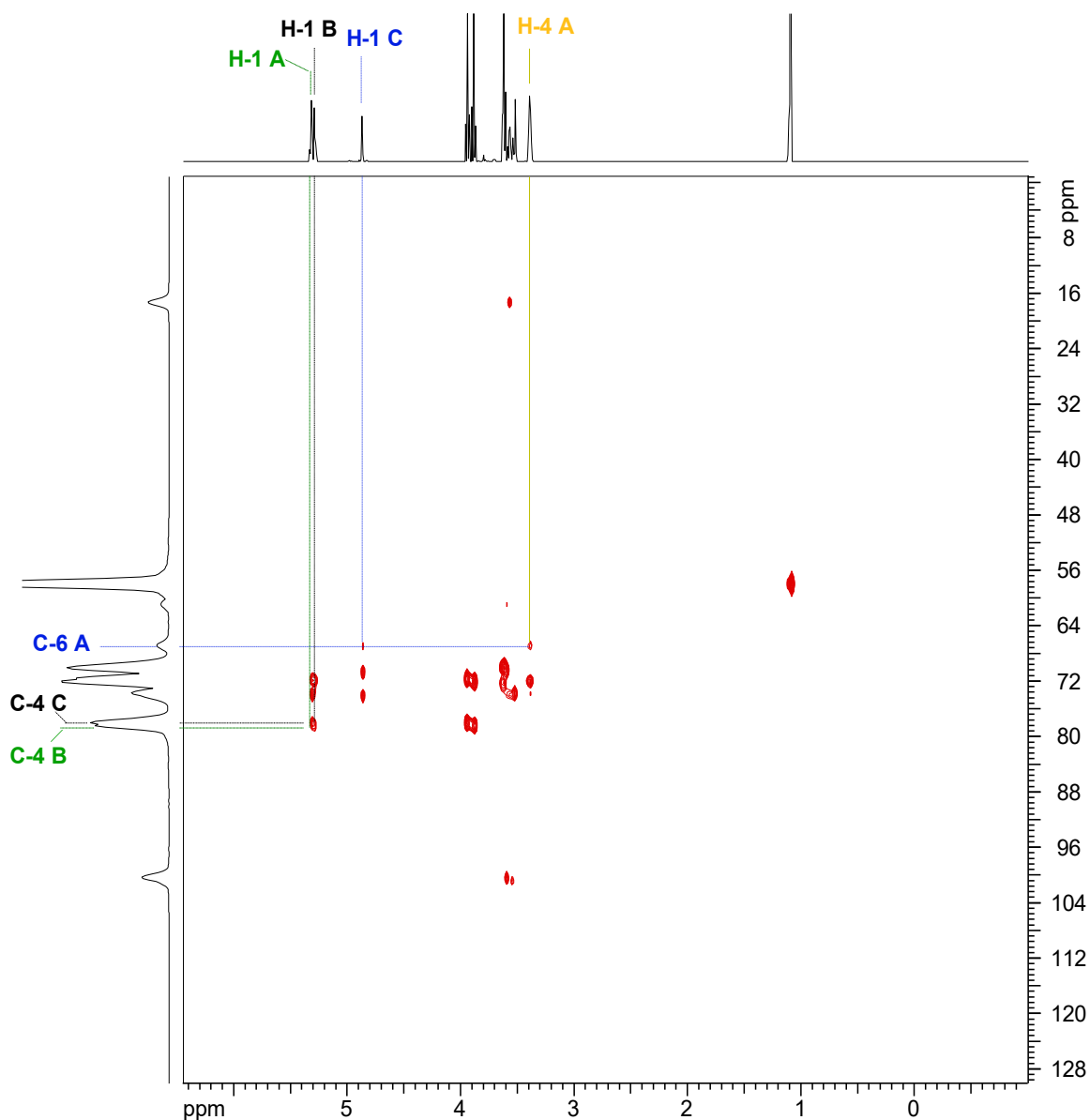


Fig. 6. Espectro HMBC de pululano obtenido de *A. pullulans* ATCC 15233.

Las correlaciones entre carbonos y sus protones enlazados directamente se analizaron por 2D HSQC-DEPT (Heteronuclear Single Quantum Correlation). Las señales de ^{13}C se registraron por DEPT 135 con fase positiva (picos hacia arriba) para CH/CH₃ y fase negativa (picos hacia abajo) para CH₂. El espectro 2D (Fig. 7) presentó correlaciones en fase positiva de CH para los hidrógenos y carbonos asociados a los enlaces α (1-4). Los protones H-1 de los residuos A (Fig. 1) (5.32 ppm) y B (5.28 ppm) mostraron correlación con C-1 de A (100.13 ppm) y B (100.69 ppm), respectivamente. Así mismo, protones de H-1 (4.88 ppm) del residuo C con C-1 (98.32 ppm) de C correspondientes al enlace α (1-6). Las señales para H-4 y C-4 de los enlaces α (1-4) se correlacionaron mediante los δ H-4 (3.59 ppm) de B con C-4 (77.95) de B y H-4 (3.53 ppm) del residuo C con los átomos de C-4 (78.30 ppm) de C.

Además, se evidenció la correlación del H-4 (3.38 ppm) y C-4 (69.95 ppm) no involucrado en el enlace α (1-4) perteneciente al residuo A.

Las señales en fase negativa indicaron la presencia de los CH₂ ubicados en las posiciones 6 de los residuos de anhidroglucosa (Fig. 1). La correlación para el enlace α (1-6) se observó en H-6 (3.87 ppm) de A y su respectivo carbono C-6 (67.04 ppm). Del mismo modo se presentaron correlaciones H-C para el resto de átomos del monómero maltotriosa del pululano.

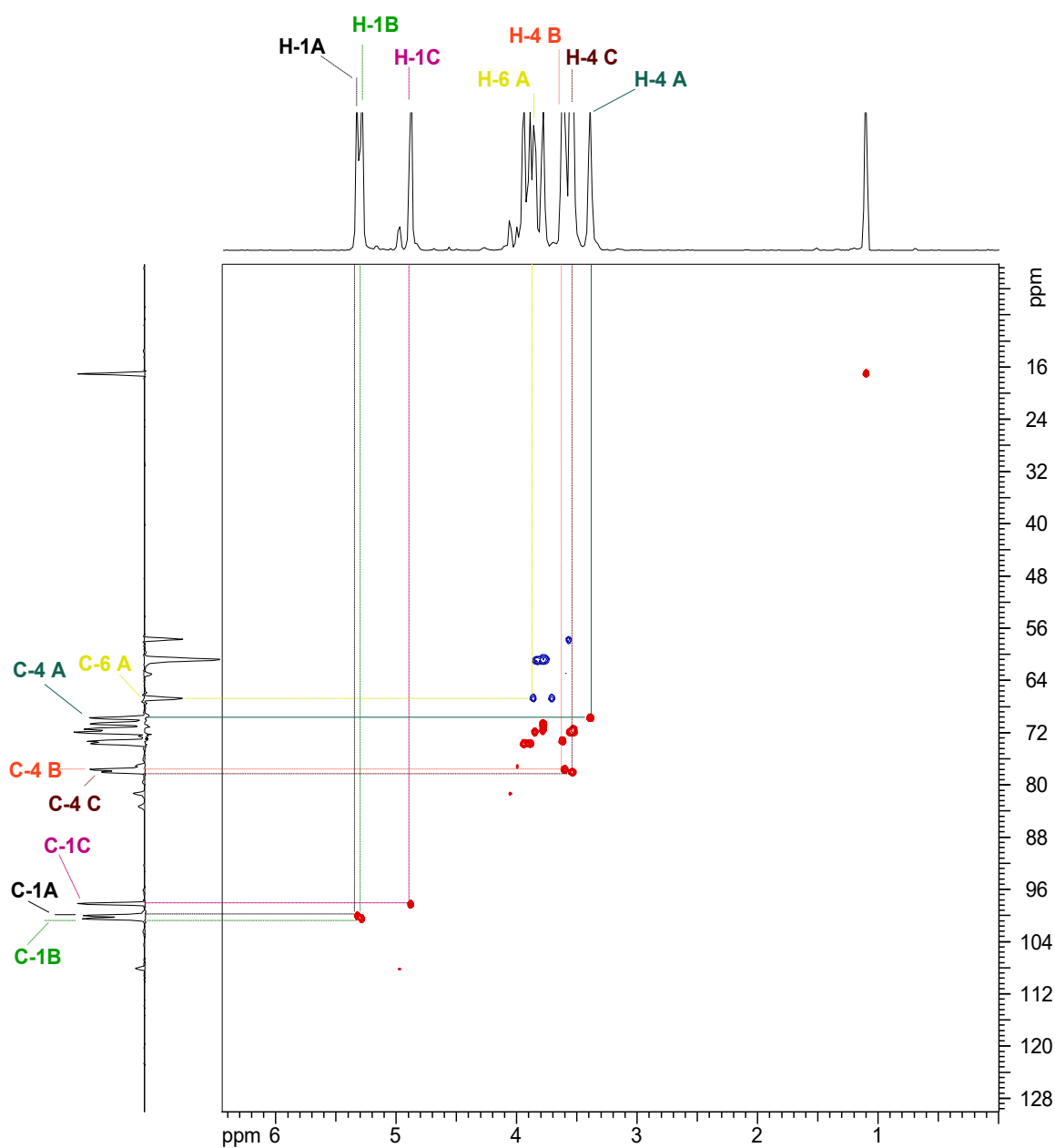


Fig. 7. Espectro HSQC-DEPT de pululano obtenido de *A. pullulans* ATCC 15233.

Existen algunos estudios de caracterización espectroscópica NMR de polisacáridos a partir del género *A. pullulans* que han reportado la presencia de moléculas constituidas por

β -glucanos con monómeros enlazados β (1-3) y ramificaciones β (1-6) con señales características de ^1H 4.51 ppm-4.24 ppm (Kono et al., 2017; Lotrakul, Unhapattaratitikul, Seelanan, Prasongsuk, & Punnapayak, 2013; Tada et al., 2008), diferentes a los resultados presentados en esta investigación.

Con base en lo anteriormente descrito, los datos espectroscópicos 1D y 2D elucidados en este trabajo permitieron confirmar por medio de las correlaciones ^1H - ^{13}C que el polisacárido biosintetizado por *A. pullulans* ATCC 15233 corresponde a la molécula del pululano.

En cuanto al peso molecular, se obtuvo un valor de PM 93471 Da para pululano producido de *A. pullulans* ATCC con tiempo de retención de 16.641 minutos. Aunque estuvo por debajo del estándar con PM de 100000 Da, es de resaltar que se logró cuantificar polisacárido de alto peso molecular (superior a 10000 Da).

3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas presentados en la Fig. 8, 9 y 10 indicaron una T_d de 200.80 °C para pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 (Fig. 9) atribuida al posible inicio de la desintegración de las cadenas macromoleculares y la degradación de los anillos de maltotriosas. El estándar de pululano (Fig. 8) mostró una T_d mayor (230.28 °C), probablemente debido a la diferencia de pesos moleculares entre las muestras analizadas, los cuales corresponden a 100000 Da para el estándar y 93471 Da para el producido. Calahorra *et al.* evaluaron el efecto del peso molecular en la estabilidad térmica de la celulosa, encontrando que el incremento del peso molecular aumentaba la estabilidad térmica con valores de PM 123000, 157000 y 201000 Da y T_d de 165, 185 y 210°C, respectivamente.

Por otro lado, la esterificación del pululano logró aumentar la estabilidad térmica con una T_d de 250.78 °C (Fig. 10), en comparación con el pululano no modificado. Este incremento de T_d coincide con lo reportado por Teramoto & Shibata (2006) para pululano (PM 191000 Da) con T_d 295°C y acetato de pululano (GS 3.0) de T_d 363 °C. Adicionalmente, estos valores son mayores a los determinados para pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 y su derivado -acetato de pululano- probablemente por el elevado peso molecular del polisacárido usado en el estudio mencionado (aproximadamente el doble).

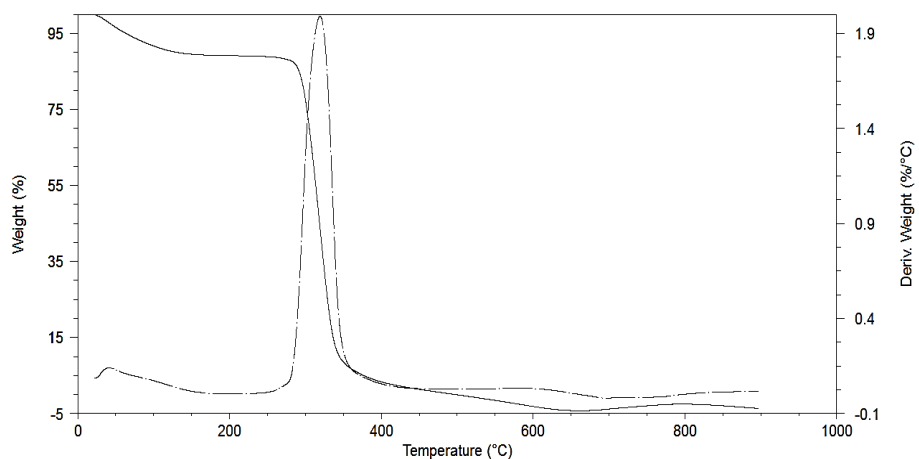


Fig. 8. TGA del estándar de pululano.

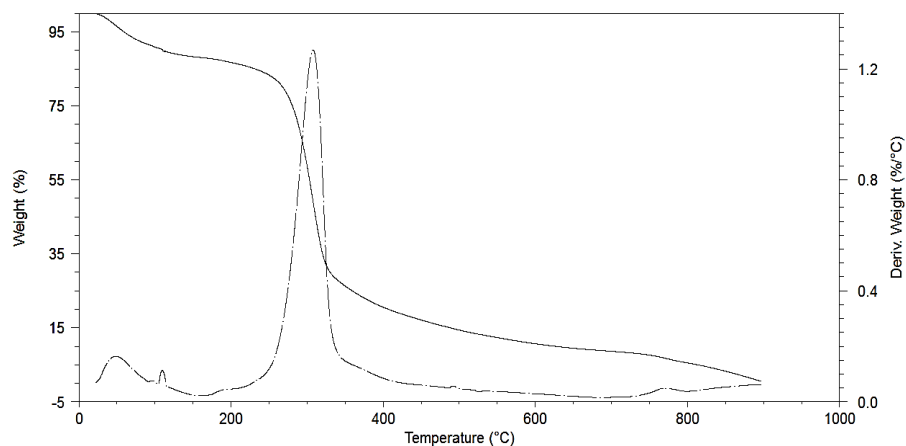


Fig. 9. TGA de pululano producido por *A. pullulans* ATCC 15233.

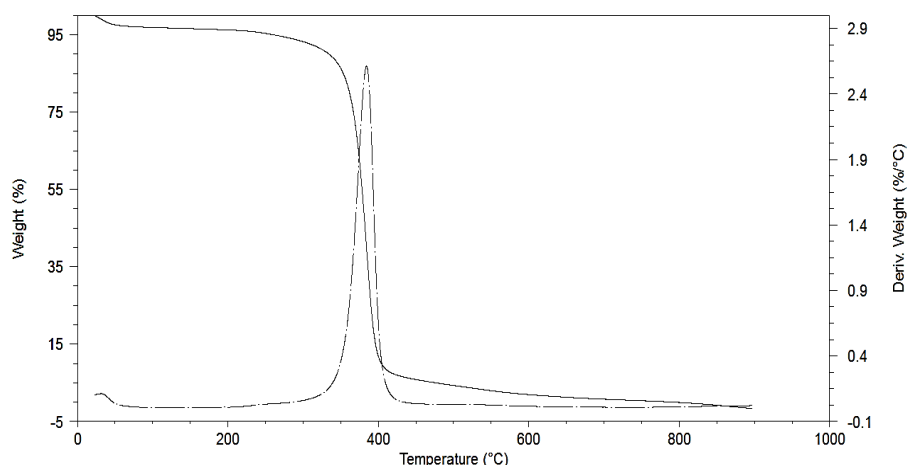


Fig. 10. TGA del acetato de pululano.

A partir de investigaciones anteriores de polímeros derivados del petróleo y otros tipos de biopolímeros, se encontró que la T_d (200.80 °C) de pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 y el acetato de pululano (250.80 °C) fue mayor a la T_d (191.79 °C) reportada por Huang *et al.* (Huang *et al.*, 2019) para el alcohol polivinílico (PVA 1792) de peso molecular de 74800 Da. De igual manera, el poliéster poliálcool altamente ramificado (Ararat & Murillo, 2016) presentó una T_d (232 °C) menor en contraste con el acetato de pululano (250.78 °C). Igualmente, para valores de temperatura de descomposición de otros tipos de biopolímeros como el ácido poliláctico (PLA) (T_d de 213.2 °C) (Chen, Liang, Xu, Zhou, & Nie, 2018), el poli 3-hidroxibutirato (PBH) (T_d de 212 °C - 263 °C) (Iulianelli, David, dos Santos, Sebastião, & Tavares, 2018) y la hemicelulosa (T_d de 190 °C) (Shen, Gu, & Bridgwater, 2010), se evidenció que pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 y su derivado presentaron estabilidad térmica dentro del rango de los compuestos de origen biológico previamente descritos (T_d 190 °C – 263 °C). Esto indica que el pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 y su derivado esterificado pueden ser considerados como materiales resistentes a la temperatura, debido a la estabilidad térmica que presentaron.

Adicionalmente, la mejora de la estabilidad térmica del pululano con la introducción de grupos iónicos en la cadena polimérica a través de la derivatización adecuada, permite

incrementar el rango de trabajo y de aplicaciones del polisacárido, por ejemplo, mediante el desarrollo de dispositivos electroquímicos, donde el flujo de electrones asociado a la corriente eléctrica colisiona con los átomos del material polimérico, provocando el aumento de la temperatura de este por la transformación de la energía cinética en calor. Por lo tanto, altas temperaturas de descomposición posibilitan que los electrolitos poliméricos se usen en sistemas electroquímicos sin ser degradados (Farhana, Yahya, & Arof, 2016; Rathore, 2004; Samsudin, Lai, & Isa, 2014).

3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las temperaturas de transición vítrea de los biopolímeros se muestran en la Fig. 11. El pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 presentó T_g de 127.33 °C (Fig. 11b), valor que fue menor en comparación con la T_g del acetato de pululano de 132.40 °C (Fig. 11a) y el estándar de pululano de 137.35 °C (Fig. 11c). Probablemente, estos resultados sean debidos a la posible divergencia de volúmenes libres en las cadenas poliméricas que pueden estar asociadas a la diferencia de pesos moleculares y la introducción de grupos acetatos en el pululano. De modo que, las cadenas poliméricas con mayor volumen libre podrán deslizarse a temperaturas bajas (Sharma, Tewari, & Arya, 2017).

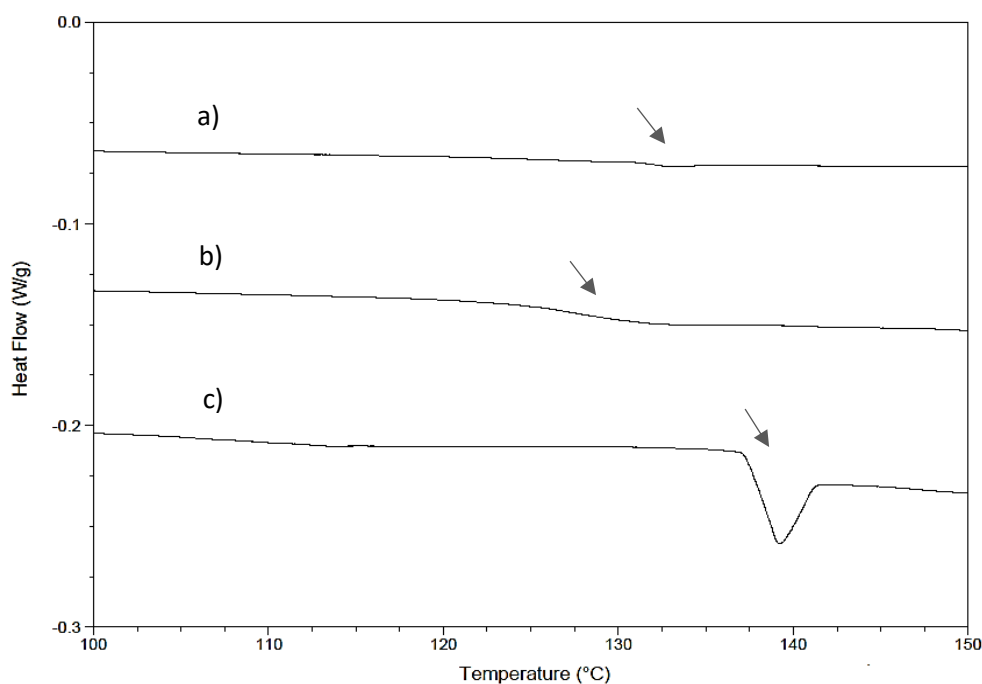


Fig. 11. Curvas MDSC. Las flechas indican la T_g de a) acetato de pululano, b) pululano de *A. pullulans* ATCC 15233, c) estándar de pululano.

Los resultados mostraron que la acetilación del pululano aumentó la T_g . Además, la T_g obtenida para pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 fue mayor a la encontrada por Xiao et al (2012) con valor de 58.67 °C. Esto indica que por encima de 60 °C el pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 no presenta cambios físicos macroscópicos y está constituido como

un sólido rígido. En cuanto al éster de pululano se determinó una T_g menor a la informada por Teramoto & Shibata (2006) la cual estuvo entre 153-193 °C. La curva MDSC no mostró pico relacionado a la temperatura de fusión, lo que indica que los biopolímeros en estudio son amorfos como lo reportan Singh *et al.* (2019) y Teramoto & Shibata (2006).

3.5. Medición de propiedades mecánicas

Los parámetros mecánicos TS y % E relacionados con la tensión máxima y el alargamiento máximo soportado por el material antes de romperse, se determinaron a partir de la curva esfuerzo-deformación (Fig. 12). La película de pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 presentó una TS de 1.70 MPa \pm 0.48 y % E de 11.89 %. En comparación con películas de PLA, estas presentaron mayores valores en las propiedades mecánicas con TS de 48.61 MPa \pm 1.22 y % E de 55.70 % (C. Yang *et al.*, 2019). Por otro lado, se encontró que el % E (11.89 %) fue mayor al parámetro reportado por Chu *et al.*(2019) con % E de 2.28-5.35 % para películas de pululano preparadas con concentraciones de aceite esencial de canela y tween 80. Por lo que se puede inferir que la película de pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 mostró mayor movilidad y flexibilidad entre sus cadenas poliméricas.

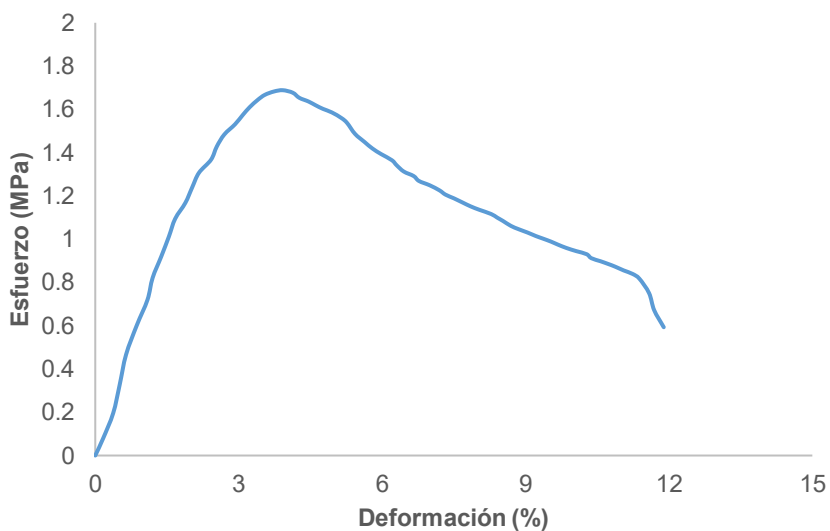


Fig. 12. Curva de esfuerzo – deformación de la película de pululano de *A. pullulans* ATCC 15233.

Estas propiedades mecánicas se pueden mejorar al seguir otras estrategias de formulación de películas, por ejemplo empleando pululano de mayor peso molecular, con la adición de otras sustancias como plastificantes o mezclando con otros biopolímeros, como se presenta en otros estudios.

Vuddanda *et al.* (2017) emplearon glicerol como plastificante a diferentes concentraciones, obteniendo mayores valores de TS, siendo estos de 5.67, 13.89 y 88.70 MPa (Vuddanda *et al.*, 2017). De igual forma, utilizando pululano de mayor peso molecular (200000 Da) se llegó a una TS de 15.99 MPa (Liu *et al.*, 2019). Por otro lado, López *et al.*

(2019) determinaron valores de TS y % E para películas de pectina entre $4.31 \pm 0.86 - 18.72 \pm 0.96$ MPa y $3.08 - 15.79$ %, respectivamente y Galus & Lenart. (2013) encontraron parámetros mecánicos para películas comestibles de alginato/pectina con TS entre $22.5 \pm 2.4-39.6 \pm 8.2$ y % E entre $5.9 - 14.9$ %.

A pesar de que el % E para la película de pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 se encuentra dentro del rango previamente descrito, es necesario mejorar la preparación de las películas con el fin de aumentar la resistencia a la tracción del material sin disminuir el % E.

3.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías de SEM a 2500X de las películas formuladas se observan en la Fig. 13. Para la película de pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 se encontró morfología lisa-homogénea con estructura superficial compacta. Mientras que la película del acetato de pululano mostró superficie lisa con partículas discretas separadas entre sí, que se formaron posiblemente por falta de homogeneidad en la solución formadora de película. De igual forma, los resultados indicaron que no se formaron poros en las superficies de las películas, lo que posiblemente permite su aplicación en el recubrimiento y conservación de alimentos, dado que la presencia de estos incide en la disminución de la calidad del producto recubierto debido al incremento en la transferencia de masa de vapor de agua y dióxido de carbono (CO₂) a través de los poros (K. Yang et al., 2019). Los resultados de SEM concuerdan con estudios anteriores donde reportaron morfología lisa para películas de pululano y acetato de pululano (Niu et al., 2019; Singh et al., 2019).

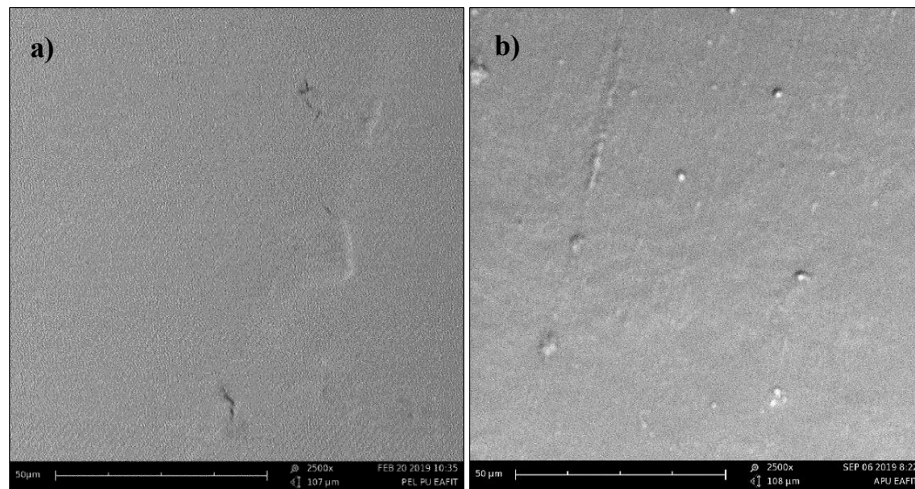


Fig. 13. Micrografías en SEM a 2500X (108 µm) de películas de a) pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 b) acetato de pululano.

3.7. Distribución de tamaño de partícula

Con el propósito de evaluar la formación de nanopartículas a partir de acetato de pululano, se realizó el análisis de distribución de tamaño de partícula de este compuesto al ser sometido a sonicación con amplitudes de 40% y 60%, presentando valores de 20.062 y 17.894 μm , respectivamente (Fig. 14). Estos valores indican que no se obtuvieron nanopartículas mediante el procedimiento empleado. Es posible que se hubiera presentado la formación de aglomerados a través de fuerzas intermoleculares débiles, lo que pudo ocasionar el incremento de tamaño de partícula en las mediciones (Coulson & Richardson, 2019; Skoglund et al., 2017). Adicionalmente, es probable que las condiciones de operación usadas en el sonicador no hayan sido adecuadas para alcanzar tamaños de orden nano.

Estudios previos han reportado el uso del acetato de pululano como material hidrofóbico para la administración de fármacos con tamaños de partícula a escala nano. Ravi *et al.* (2014) determinaron distribución de tamaño de partícula de $197 \text{ nm} \pm 4$ para nanopartículas de acetato de pululano empleado para la encapsulación de Lopinavir (fármaco inhibidor de la proteasa del virus VIH), las cuales fueron obtenidas con un homogeneizador de alta velocidad. Sugumarán & Ponnusami (2015) determinaron nanopartículas con tamaño de 203.8 y 219.5 nm para el acetato de pululano. Igualmente, Zhang *et al.* (2009) formularon nanopartículas del éster de pululano con tamaño de 187 y 423 nm para la administración de epirubicina. Lo anterior sugiere que es necesario desarrollar más investigaciones en relación con el proceso de formación de nanopartículas a partir del acetato de pululano obtenido.

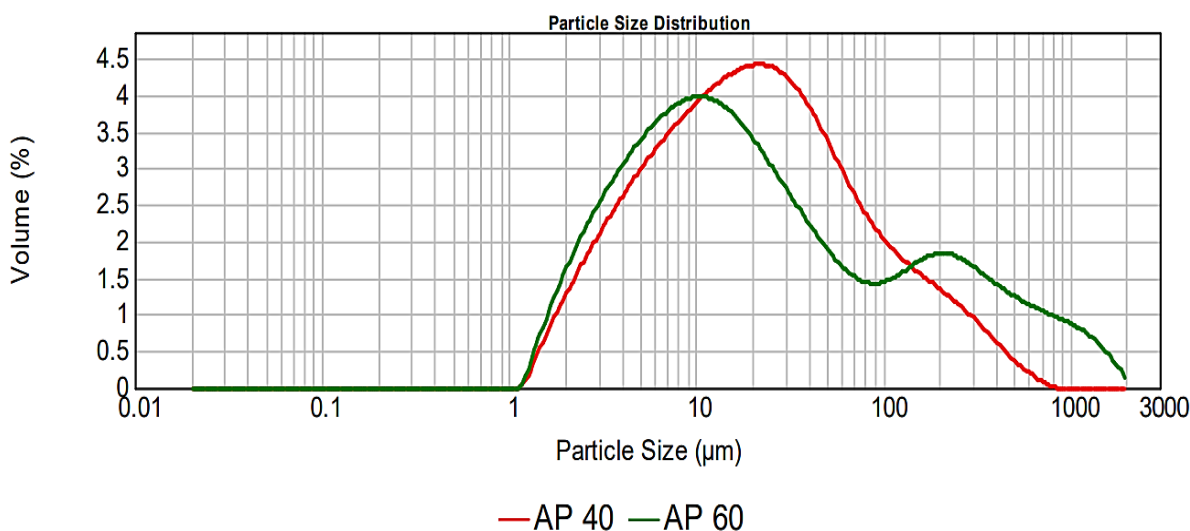


Fig. 14. Distribución de tamaño de partícula para acetato de pululano.

4. Conclusiones

En la presente investigación se logró elucidar la estructura molecular del pululano producido por *A. pullulans* ATCC 15233. Asimismo, fue posible derivatizar el pululano hacia el compuesto hidrofóbico acetato de pululano y los resultados de FT-IR y NMR permitieron confirmar la estructura obtenida.

También se estableció la incidencia de la modificación química del pululano sobre las propiedades térmicas mediante el aumento de la estabilidad térmica y la temperatura de transición vítrea. Además, se logró la formulación de películas de pululano compactas a partir de los resultados de las propiedades mecánicas.

Igualmente, se logró obtener morfologías lisas sin porosidad que permitiría proponer el uso de las películas de pululano y su derivado como material de recubrimiento para la conservación de alimentos.

En cuanto a las distribuciones de tamaño de partícula no fue posible obtener partículas en escala nano, por lo que es necesario desarrollar más investigaciones en relación con el proceso de formación de nanopartículas del acetato de pululano.

En general, los resultados obtenidos pueden ser considerados para contribuir al desarrollo de materiales de carácter biológico como películas de recubrimiento de alimentos. Asimismo, las mejoras de las propiedades descritas en la presente investigación pueden permitir explorar aplicaciones mediante el uso de pululano de *A. pullulans* ATCC 15233 y sus derivados.

Agradecimientos

Agradecimientos a la Universidad EAFIT – Colombia por financiar esta investigación.

Referencias

- Aguilar-Palazuelos, E., Martínez-Bustos, F., Jiménez-Arévalo, O. A., Galicia-García, T., & Delgado-Rangel, J. A. (2007). Potentiality of some natural fibres and native starch for making biodegradable materials. *Food Engineering Research Developments*, 279–294.
- Ahmad, N. H., Mustafa, S., & Man, Y. B. C. (2015). Microbial polysaccharides and their modification approaches: A review. *International Journal of Food Properties*, 18(2), 332–347. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.693561>
- Ararat, C. A., & Murillo, E. A. (2016). Polietileno de baja densidad funcionalizado con un poliéster polioli altamente ramificado maleinizado. *Ingeniería y Ciencia*, 12(23), 127–144. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.12.23.7>
- Bae, M. H., Kim, J. K., & Ryu, S. C. (2016). Analyzing antibacterial and antifungal properties of polypropylene/hydroxyapatite composites. *Journal of Ceramic Processing Research*, 17(5), 518–522.
- Calahorra, M. E., Cortázar, M., Eguiazábal, J. I., & Guzmán, G. M. (1989). Thermogravimetric analysis of cellulose: Effect of the molecular weight on thermal decomposition. *Journal of Applied Polymer Science*, 37(12), 3305–3314. <https://doi.org/10.1002/app.1989.070371203>
- Cappitelli, F., Sorlini, C., Pedemonte, E., Princi, E., & Vicini, S. (2006). Effectiveness of graft synthetic polymers in preventing biodeterioration of cellulose-based materials. *Macromolecular Symposia*, 238, 84–91. <https://doi.org/10.1002/masy.200650612>
- Chen, P., Liang, X., Xu, Y., Zhou, Y., & Nie, W. (2018). Enhanced thermal and mechanical properties of PLA/MoS₂ nanocomposites synthesized via the in-situ ring-opening polymerization. *Applied Surface Science*, 440, 1143–1149. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.01.260>

- Chu, Y., Xu, T., Gao, C. C., Liu, X., Zhang, N., Feng, X., ... Tang, X. (2019). Evaluations of physicochemical and biological properties of pullulan-based films incorporated with cinnamon essential oil and Tween 80. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 388–394. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.194>
- Chung, Y. C., Kim, G. Y., Kim, D. E., Choi, J. W., & Chun, B. C. (2019). Grafting of niclosamide and salicylanilide onto hydrophilic polyurethane for the control of fungal and barnacle growth. *Polymer Bulletin*, 76, 2041–2060. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2481-0>
- Chung, Y. C., Kim, H. Y., Choi, J. W., & Chun, B. C. (2018). Graft polymerization of 4-imidazole acrylic acid onto polyurethane for the improvement of water compatibility and antifungal activity. *Polymer Engineering and Science*, 58(11), 2088–2097. <https://doi.org/10.1002/pen.24820>
- Chung, Y. C., Park, J. E., Choi, J. W., & Chun, B. C. (2018). Synthesis and characterizations of antifungal polyurethanes with enhanced tensile and shape recovery performances. *Advances in Polymer Technology*, 37, 3392–3400. <https://doi.org/10.1002/adv.22123>
- Coulson, & Richardson. (2019). Chemical Engineering. In *Particulate Systems and Particle Technology* (pp. 1–32). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101098-3.00001-9>
- Cunha, A. G., & Gandini, A. (2010). Turning polysaccharides into hydrophobic materials: A critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates. *Cellulose*, 17(6), 1045–1065. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9435-5>
- Danjo, T., Enomoto, Y., Shimada, H., Nobukawa, S., Yamaguchi, M., & Iwata, T. (2017). Zero birefringence films of pullulan ester derivatives. *Scientific Reports*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep46342>
- El-Aghoury, A., Vasudeva, R. K., Banu, D., Elektorowicz, M., & Feldman, D. (2006). Contribution to the study of fungal attack on some plasticized vinyl formulations. *Journal of Polymers and the Environment*, 14(2), 135–147. <https://doi.org/10.1007/s10924-006-0004-9>
- Enomoto-Rogers, Y., Iio, N., Takemura, A., & Iwata, T. (2015). Synthesis and characterization of pullulan alkyl esters. *European Polymer Journal*, 66, 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.007>
- Farhana, S. N., Yahya, R., & Arof, A. K. (2016). Ionic Liquid Enhancement of Polymer Electrolyte Conductivity and their Effects on the Performance of Electrochemical Devices. *Intech*, 157–183. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Galus, S., & Lenart, A. (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.006>
- Hernández-Castillo, M. I., Hernández-Navarrete, A., Jiménez-Montejo, F. E., Cruz-López, M. del C., Hidalgo-Lara, M. E., & López y López, V. E. (2019). Aprovechamiento de almidón de mala calidad para la producción de enzimas amilolíticas por *Aureobasidium pullulans*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(2), 435–446. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.02.14>
- Hezarkhani, M., & Yilmaz, E. (2019). Pullulan modification via poly (N-vinylimidazole) grafting. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.022>
- Huang, D., Hu, Z. De, Ding, Y., Zhen, Z. C., Lu, B., Ji, J. H., & Wang, G. X. (2019). Seawater

- degradable PVA/PCL blends with water-soluble polyvinyl alcohol as degradation accelerator. *Polymer Degradation and Stability*, 163, 195–205.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.03.011>
- Iulianelli, G. C. V., David, G. dos S., dos Santos, T. N., Sebastião, P. J. O., & Tavares, M. I. B. (2018). Influence of TiO₂ nanoparticle on the thermal, morphological and molecular characteristics of PHB matrix. *Polymer Testing*, 65(November 2017), 156–162.
<https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.11.018>
- Jiang, H., Xue, S., Li, Y., Liu, G., Chi, Z., & Hu, Z. (2018). Efficient transformation of sucrose into high pullulan concentrations by *Aureobasidium melanogenum* TN1-2 isolated from a natural honey. *Food Chemistry*, 257(5), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.003>
- Jindal, N., & Khattar, J. S. (2018). Chapter 4 - Microbial Polysaccharides in Food Industry. In *Biopolymers for Food Design* (pp. 95–123). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811449-0/00004-9>
- Kırtel, O., Avsar, G., Erkorkmaz, B. A., & Öner, E. T. (2017). Microbial Polysaccharides as Food Ingredients. In *Microbial Production of Food Ingredients and Additives* (pp. 347–383). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811520-6/00012-X>
- Kono, H., Kondo, N., Hirabayashi, K., Ogata, M., Totani, K., Ikematsu, S., & Osada, M. (2017). Two-dimensional NMR data of a water-soluble β -(1→3, 1→6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Data in Brief*, 15, 382–388.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.09.067>
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., ... Lin, Y. (2016). Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 237–250. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12161>
- Liu, Y., Liu, Y., Han, K., Cai, Y., Ma, M., Tong, Q., & Sheng, L. (2019). Effect of nano-TiO₂ on the physical, mechanical and optical properties of pullulan film. *Carbohydrate Polymers*, 218(December 2018), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.073>
- López, D. F., Osorio, O., & Checa, O. E. (2019). Propiedades Mecánicas de un Material de Pectina para Revestimiento de Fibras Naturales Utilizadas en Aplicaciones Agrícolas. *Información Tecnológica*, 30(3), 189–198. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642019000300189>
- Lotrakul, P., Unhapattaratitkul, P., Seelanan, T., Prasongsuk, S., & Punnapayak, H. (2013). An aubasidan-like β -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* in Thailand. *ScienceAsia*, 39, 363–368. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.363>
- McIntyre, D. D., Vogel, H. J., & Canada Alberta. (1993). *Structural Studies of Pullulan by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2–6. <https://doi.org/10.1002/star.19930451108>
- Meng, X., & Edgar, K. J. (2016). “Click” reactions in polysaccharide modification. *Progress in Polymer Science*, 53, 52–85. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.07.006>
- Niu, B., Shao, P., Chen, H., & Sun, P. (2019). Structural and physicochemical characterization of novel hydrophobic packaging films based on pullulan derivatives for fruits preservation. *Carbohydrate Polymers*, 208, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.070>
- Rathore, A. S. (2004). Joule heating and determination of temperature in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography columns. *Journal of Chromatography A*, 1037(1–2), 431–443. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.062>

- Ravi, P. R., Vats, R., Balija, J., Adapa, S. P. N., & Aditya, N. (2014). Modified pullulan nanoparticles for oral delivery of lopinavir: Formulation and pharmacokinetic evaluation. *Carbohydrate Polymers*, *110*, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.099>
- Samsudin, A. S., Lai, H. M., & Isa, M. I. N. (2014). Biopolymer materials based carboxymethyl cellulose as a proton conducting biopolymer electrolyte for application in rechargeable proton battery. *Electrochimica Acta*, *129*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.02.074>
- Saranya, D., Rajan, R., Suganthan, V., Murugeswari, A., & Nambi Raj, N. A. (2015). Synthesis and Characterization of Pullulan Acetate Coated Magnetic Nanoparticle for Hyperthermic Therapy. *Procedia Materials Science*, *10*, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2015.06.017>
- Sharma, J., Tewari, K., & Arya, R. K. (2017). Diffusion in polymeric systems—A review on free volume theory. *Progress in Organic Coatings*, *111*(April), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.05.004>
- Shen, D. K., Gu, S., & Bridgwater, A. V. (2010). The thermal performance of the polysaccharides extracted from hardwood: Cellulose and hemicellulose. *Carbohydrate Polymers*, *82*(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.018>
- Sheng, L., Tong, Q., & Ma, M. (2016). Why sucrose is the most suitable substrate for pullulan fermentation by *Aureobasidium pullulans* CGMCC1234? *Enzyme and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.06.016>
- Singh, R. S., Kaur, N., & Kennedy, J. F. (2015). Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. *Carbohydrate Polymers*, *123*, 190–207. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.032>
- Singh, R. S., Kaur, N., Sharma, R., & Rana, V. (2018). Carbamoyl ethyl pullulan: QbD based synthesis, characterization and corneal wound healing potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 2245–2255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.107>
- Singh, R. S., Kaur, N., Singh, D., & Kennedy, J. F. (2019). Investigating aqueous phase separation of pullulan from *Aureobasidium pullulans* and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, *223*(July), 115103. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115103>
- Skoglund, S., Hedberg, J., Yunda, E., Godymchuk, A., Blomberg, E., & Odnevall Wallinder, I. (2017). Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions - Four case studies. *PLoS One*, *12*(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181735>
- So, H. S., Jang, H. S., Lee, B. R., & So, S. Y. (2016). Antifungal performance of BFS mortar with various natural antifungal substances and their physical properties. *Construction and Building Materials*, *108*, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.12.022>
- Song, A. Y., Oh, Y. A., Roh, S. H., Kim, J. H., & Min, S. C. (2016). Cold Oxygen Plasma Treatments for the Improvement of the Physicochemical and Biodegradable Properties of Poly(lactic Acid) Films for Food Packaging. *Journal of Food Science*, *81*(1), E86–E96. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13172>
- Sugumaran, K. R., & Ponnusami, V. (2015). Statistical modeling of pullulan production and its application in pullulan acetate nanoparticles synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 867–876. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.025>
- Tada, R., Tanioka, A., Iwasawa, H., Hatashima, K., Shoji, Y., Ishibashi, K. I., ... Ohno, N. (2008). Structural characterisation and biological activities of a unique type β -D-glucan obtained from

- Aureobasidium pullulans. *Glycoconjugate Journal*, 25, 851–861.
<https://doi.org/10.1007/s10719-008-9147-3>
- Teramoto, N., & Shibata, M. (2006). Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. *Carbohydrate Polymers*, 63, 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.008>
- Tiwari, S., Patil, R., Dubey, S. K., & Bahadur, P. (2019). Derivatization approaches and applications of pullulan. *Advances in Colloid and Interface Science*, 269, 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.014>
- Vuddanda, P. R., Montenegro-Nicolini, M., Morales, J. O., & Velaga, S. (2017). Effect of plasticizers on the physico-mechanical properties of pullulan based pharmaceutical oral films. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.011>
- Wu, S., Jin, Z., Kim, J. M., Tong, Q., & Chen, H. (2009). Downstream processing of pullulan from fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*, 77, 750–753. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.023>
- Xiao, Q., Lim, L. T., & Tong, Q. (2012). Properties of pullulan-based blend films as affected by alginate content and relative humidity. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.040>
- Xu, Y., Wu, Y. ji, Sun, P. long, Zhang, F. ming, Linhardt, R. J., & Zhang, A. qiang. (2019). Chemically modified polysaccharides: Synthesis, characterization, structure activity relationships of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 970–977. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.213>
- Yang, C., Tang, H., Wang, Y., Liu, Y., Wang, J., Shi, W., & Li, L. (2019). Development of PLA-PBSA based biodegradable active film and its application to salmon slices. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100393. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100393>
- Yang, K., Dang, H., Liu, L., Hu, X., Li, X., Ma, Z., ... Ren, T. (2019). Effect of syringic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antibacterial properties of chitosan film for quail eggs preservation. *International Journal of Biological Macromolecules, In Press*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.045>
- Zhang, H., Li, X. M., Gao, F. P., Liu, L. R., Zhou, Z. M., & Zhang, Q. Q. (2010). Preparation of folate-modified pullulan acetate nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Drug Delivery*, 17(1), 48–57. <https://doi.org/10.3109/10717540903508979>
- Zhang, H. zhu, Gao, F. ping, Liu, L. rong, Li, X. min, Zhou, Z. min, Yang, X. du, & Zhang, Q. qing. (2009). Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.12.039>