



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias y Facultad de Veterinaria

Departamento de Química Inorgánica e
Ingeniería Química, Departamento de
Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Programa de Doctorado en Biociencias y
Ciencias Agroalimentarias

Lignocellulose nanofibers from agricultural waste for sustainable and functional food packaging formulation

Lignonanofibras de celulosa procedentes de residuos agrícolas para la
formulación de envases alimentarios sostenibles y funcionales

Tesis Doctoral presentada por

Isabel Bascón Villegas

Directores:

Dr. Alejandro Rodríguez Pascual

Dr. Fernando Pérez Rodríguez

Córdoba, Octubre 2022

TITULO: *Lignonanofibras de celulosa procedentes de residuos agrícolas para la formulación de envases alimentarios sostenibles y funcionales*

AUTOR: *Isabel Bascón Villegas*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Lignonanofibras de celulosa procedentes de residuos agrícolas para la formulación de envases alimentarios sostenibles y funcionales

DOCTORANDA: Isabel Bascón Villegas

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis doctoral que se presenta se ha realizado de manera interdisciplinar en los departamentos de Química Inorgánica e Ingeniería Química, y de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Esto ha permitido a la doctoranda adquirir conocimientos en disciplinas que pueden parecer distantes, pero que se han sabido coordinar y armonizar en el desarrollo de la tesis. De esto da fe los artículos que se presentan en la tesis, publicados en áreas diversas, pero justificado por los resultados que conforman cada artículo. Así, *Molecules*, DOI:10.3390/molecules25143275, FI: 4,927 Q2 en *Chemistry, multidisciplinary*, *Foods*, DOI:10.3390/foods10123043, FI: 5,561 Q1 en *Food Science and Technology*, *Journal of Cleaner Production*, DOI:10.1016/j.jclepro.2022.133597, FI: 11,072 Q1 en *Engineering, Environmental*.

La parte experimental de la tesis se ha desarrollado de manera lógica y coherente con los objetivos principales sobre los que ha girado, la sostenibilidad de los procesos y la valorización de residuos agroalimentarios. Se han empleado materias primas no utilizadas hasta la fecha en la obtención de nanofibras de celulosa, para posteriormente ser aplicadas en dos tipos de soluciones de envasado a fin de preservar la calidad de los alimentos el mayor tiempo posible.

La doctoranda efectuó una estancia de investigación en la Universidad de Concepción, Chile, que dio como resultado el tercer artículo de la tesis, publicado en una excelente revista internacional.

Puede por tanto concluirse que el aprovechamiento del tiempo de formación por parte de la doctoranda ha sido óptimo, así como el trabajo experimental realizado, que ha conducido a la tesis que se presenta.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 27 de septiembre de 2022

Firma de los directores

RODRIGUEZ
PASCUAL
ALEJANDRO -
30829580N

Firmado digitalmente por
RODRIGUEZ PASCUAL
ALEJANDRO - 30829580N
Fecha: 2022.10.03
14:23:13 +02'00'

Firmado por PEREZ RODRIGUEZ
FERNANDO - 30825948Z el día
03/10/2022 con un certificado emitido
por AC FNMT Usuarios

“La muerte es la luz bajo la que se evalúa
la sombra de todo el significado de la vida”

Mark Manson

A mis raíces, por sostenerme.

Agradecimientos

En el trayecto de una tesis doctoral participan muchas personas que ayudan a recorrerlo y a conseguir la meta. Es por ello por lo que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas ellas.

En primer lugar, al Profesor Dr. D. Alejandro Rodríguez Pascual por darme la oportunidad de comenzar los estudios de doctorado, abirme las puertas de una área totalmente desconocida para mí e iniciarme en el camino de la sostenibilidad. Gracias por enseñarme la importancia de la divulgación científica y sembrar esa semilla en mí, que floreció regalándome muy buenos momentos y abriéndome a un camino muy gratificante.

Al Profesor Dr. D. Fernando Pérez, por iniciarme en el camino de la investigación. Por confiar en mí cuando yo no lo hacía. Gracias por tu ayuda incondicional y apostar por mí cuando las cosas no estaban del todo fáciles. Gracias por valorar mi parte humana y respetar mis procesos. Sin tu dedicación, llegar a este punto no habría sido posible.

A la Profesora Dra. Dña. Elena Carrasco, por tus sabios consejos y tu abrazo cuando más lo necesitaba.

A todos mis amigos, compañeros y profesores del grupo Hibro de la Universidad de Córdoba, Rosita, Sofía, Ari, Jean, Laura, Adolfo, Cristina, Olga, el Profesor Dr. D. Antonio Valero, etcétera, por vuestra ayuda, bromas y abrazos. Gracias por componer un grupo de trabajo tan genial.

A Araceli, mi amiga y compañera. Comenzamos un camino juntas que no sabíamos que nos depararía, y aquí estamos, 11 años después disfrutando como siempre. No tengo palabras para agradecer tu presencia en mi vida. Gracias por estar siempre.

A Mónica, la mujer charlatana que entró en mi vida comenzando la tesis y se quedó a vivir en mi corazón. Gracias por cada consejo, abrazo, risa y lágrima. Gracias por confiar y apostar por mí siempre. Has sido un pilar clave en esta etapa de mi vida y no dudo que lo seguirás siendo. Lo mejor ha de venir aún (H).

A todos mis amigos y compañeros del área de Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba. En especial a Edu, por iniciarme en el camino de la biorrefinería. A Inma y Sixto por ayudar siempre en todo lo que estaba a su alcance. A Javi Reyes y Pedro, por hacer perdurar la amistad, dar un sentido más bonito a este camino y estar siempre dispuestos a pasarlo bien juntos.

A mis amigos, en especial a Rafa, Juande, Pilar y Doqui, por ser la mejor familia elegida que jamás hubiese soñado. Gracias por tanto.

A mi familia, en la que nací y a la que elegí, gracias a todos por aguantar mis vaivenes y ayudarme a seguir y confiar en mí.

A mis padres, por estar siempre detrás de mí, apoyándome en cada decisión y dándome sabios consejos. Gracias por apoyarme en cada apuesta de futuro sin juzgarme. Gracias por vuestra generosidad inagotable.

A mi hermana, mi mitad. Gracias por ser y estar. Gracias por ser compañera de risas y hombro en el que llorar. Gracias por comprender mi corazón como si fuese el tuyo. Sin ti nada sería.

A mis abuelos, por ser las raíces por las que me nutro y sostengo. A mi abuela Carmen, que ha querido acompañarme hasta el final de este proceso y deseo que por mucho tiempo más. A mi abuelo Paco, Titi te fuiste antes de comenzar, pero sé que allá donde estás me iluminas con tu sonrisa. A mi abuelo Alfonso, gracias por haber estado hasta el final y hacerme entender con tu partida que ella está bien. A ti, mi abuela Isabel, madre, confidente y amiga, no me podría imaginar una vida más bonita que la que he vivido a tu lado. Gracias por haberme regalado tu existencia y ganas de vivir. Has sido mi mayor lección de vida. Allá donde estés, abuela, el fruto de este trabajo te lo dedico a ti.

A Marijose y Juande, por vuestro amor y apoyo constante. Por creer en mí y animarme a no desistir, por tratarme como a una hija más. Sobre todo, por haber traído al mundo a un ser maravilloso.

Sergio, sin ti este camino no hubiese acabado como lo hace. Gracias por tu sonrisa inagotable y tus abrazos sanadores. Has sido mi aliciente. Gracias por tanto amor.

Al grupo LPF del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Concepción y la Unidad de Desarrollo Tecnológico de la Universidad de Concepción, en especial al Profesor Dr. Miguel Pereira, por facilitarme todos los recursos a su alcance y dedicarme su tiempo y amabilidad. También a mis compañeros Sergio, Andrea y Gregory, por la ayuda, las charlas y las risas.

Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por la concesión de la ayuda para la formación de profesorado universitario disfrutada durante el desarrollo de esta Tesis.

Índice

Resumen/Abstract	1
Introducción	5
1. Problemática medioambiental	5
1.1. Objetivos de Desarrollo Sostenible	5
1.2. Economía circular	6
2. Valorización de residuos agrícolas.....	7
2.1. Producción de biomasa vegetal	7
2.2. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos	8
3. Materiales lignocelulósicos	10
3.1. Composición y estructura.....	10
3.2. Celulosa.....	11
3.3. Hemicelulosa.....	13
3.4. Lignina	14
3.5. Componentes minoritarios	15
4. Nanocelulosa.....	16
4.1. Tipos de nanocelulosa	17
4.2. Obtención de nanofibras de celulosa a partir de biomasa lignocelulósica	20
5. Aplicación de lignonanofibras de celulosa.....	23
5.1. Refuerzo de papel.....	24
5.2. Desarrollo de envases alimentarios	25
6. Bibliografía	28
Materiales y métodos	37
1. Materiales.....	37
1.1. Materiales lignocelulósicos	37
1.2. Reactivos	37
2. Caracterización química de las materias primas y pastas celulósicas	37
2.1. Determinación del contenido en extraíbles en sosa.....	37
2.2. Determinación del contenido en extraíbles en agua	38
2.3. Determinación del contenido en extraíbles en etanol.....	38
2.4. Determinación del contenido en lignina.....	38
2.5. Determinación del contenido en holocelulosa.....	39
2.6. Determinación del contenido en α -celulosa	39
2.7. Determinación del contenido en cenizas	40
3. Producción de la pasta celulósica.....	40
4. Producción de lignonanofibras de celulosa	40
4.1. Pretratamiento mecánico	40
4.2. Pretratamiento de oxidación mediado por TEMPO	41
4.3. Pretratamiento enzimático.....	41

4.4.	Tratamiento a altas presiones	41
5.	Caracterización de las lignonanofibras de celulosa.....	41
5.1.	Rendimiento de nanofibrilación	41
5.2.	Demanda catiónica	42
5.3.	Contenido de carboxilos.....	42
5.4.	Estimación superficie específica y diámetro	43
5.5.	Grado de polimerización	43
5.6.	Longitud	43
6.	Otras técnicas analíticas	43
6.1.	Espectroscopía de infrarrojos en la transformada de Fourier (FTIR).....	43
6.2.	Difracción de Rayos X (DRX)	44
6.3.	Análisis termogravimétrico (TGA)	44
7.	Aplicación en refuerzo de papel.....	45
7.1.	Refinado PFI mecánico	45
7.2.	Dispersión de las lignonanofibras de celulosa en la suspensión papelera.....	45
7.3.	Grado Schopper–Riegler (°SR)	46
7.4.	Formación de las hojas de papel.....	46
7.5.	Caracterización física de las hojas de papel	46
7.6.	Caracterización mecánica de las hojas de papel.....	47
8.	Aplicación en formación de films alimentarios	48
8.1.	Técnicas analíticas comunes en la formación de films y envases alimentarios.	48
8.2.	Formación de films con PVA.....	50
8.3.	Producción de envases de ácido poliláctico (PLA), Ecoflex® y lignonanofibras de celulosa.....	50
8.4.	Análisis estadístico	53
9.	Bibliografía	54
	Objetivos	58
	Resultados y discusión	59
	Chapter 1: Horticultural Plant Residues as New Source for Lignocellulose Nanofibers Isolation: Application on the Recycling Paperboard Process.....	59
1.	Abstract	60
3.	Materials and Methods	62
3.1.	Materials.....	62
3.2.	Soda Pulping	62
3.3.	Pulp Characterization	62
3.4.	Lignocellulose Nanofibers (LCNF) Production	63
3.5.	LCNF Characterization	64
3.6.	Polymerization Degree and Length.....	65
3.7.	Spectroscopy Analysis	65
3.8.	X-ray Diffraction (XRD) Analysis.....	65

3.9.	Thermogravimetric Analysis.....	66
3.10.	Reinforcement of Industrial Pulp.....	66
4.	Results and Discussion.....	67
4.1.	Chemical Composition of Raw Materials and Obtained Cellulosic Pulps.....	67
4.2.	Lignocellulose Nanofiber Characterization.....	68
4.3.	Lignocellulose Reinforcement on Recycled Paperboard.....	72
5.	Conclusions.....	76
6.	References.....	77
Chapter 2. Lignocellulose nanofiber obtained from agricultural wastes of tomato, pepper and eggplants improves the performance of films of polyvinyl alcohol (PVA) for food packaging. 82		
1.	Abstract.....	83
2.	Introduction.....	83
3.	Materials and Methods.....	85
3.1.	Reagents.....	85
3.2.	Cellulose pulp obtention.....	85
3.3.	Lignocellulose nanofibers production.....	85
3.4.	Film formulation and production.....	86
3.5.	Film characterization.....	87
3.6.	Statistical Analysis.....	89
4.	Results.....	89
4.1.	Mechanical properties.....	89
4.2.	X-ray diffraction analysis.....	91
4.3.	Thermogravimetric analysis.....	92
4.4.	Spectroscopy analysis.....	94
4.5.	Antioxidant activity.....	95
4.6.	Water permeability.....	96
4.7.	Optical properties.....	97
5.	Conclusions.....	99
6.	References.....	99
Chapter 3: A new eco-friendly packaging system incorporating lignocellulose nanofibers from agri food residues applied to fresh-cut lettuce..... 109		
1.	Abstract.....	110
2.	Introduction.....	110
3.	Materials and methods.....	112
3.1.	Research framework.....	112
3.2.	Materials and reagents.....	113
3.3.	Lignocellulose nanofibers production.....	113
3.4.	Packaging formulation and production.....	114
3.5.	Packaging characterisation.....	115
3.6.	Application of the formulated bags in fresh-cut lettuce.....	118

3.7. Statistical analysis	119
4. Results	119
4.1. Film material characterization.....	120
4.2. Application and assessment in vegetables.....	127
5. Conclusions	131
6. References	132
Conclusiones/	142
Conclusions	142

Resumen/Abstract

Se prevé que la población mundial aumente en un 12,5% en los próximos 30 años, propiciando un consumo sin precedentes que generará un cambio climático irreversible. Por todo ello, en el año 2021, la Comisión Europea inició el Pacto Verde Europeo.

Según la Organización de las Naciones Unidas, los Objetivos de Desarrollo Sostenible constituyen un llamamiento universal a la acción para poner fin a la pobreza, proteger el planeta y mejorar las vidas y las perspectivas de las personas en todo el mundo. Fueron aprobados por todos los Estados Miembros de las Naciones Unidas como parte de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible.

Actualmente el modelo económico dominante conocido como “Economía Linear”, basado en la extracción, producción, consumo y desecho, es incompatible con la limitación de recursos y la capacidad de adaptación al impacto ambiental. De la insostenibilidad del modelo lineal surge un modelo de enfoque integrativo y regenerativo conocido como “Economía Circular”. Con este modelo se busca la preservación del capital natural mediante la selección de recursos naturales y su uso optimizado, para disminuir así los daños en el medio ambiente y ecosistemas.

La elevada producción agrícola en España conlleva la generación de una gran cantidad de residuos agrícolas que deben ser gestionados. Estas aplicaciones podrían mejorarse mediante una valorización del producto y un uso más eficiente de los residuos agrícolas generados. Con la valorización se podría extraer de los residuos más energía y subproductos, disminuyendo así tanto el coste de la producción agrícola como la propagación de plagas y las emisiones de gases de efecto invernadero, potenciando el sistema de economía circular.

La biomasa lignocelulósica la constituyen principalmente plantas o materiales de origen vegetal, suponiendo una fuente de carbono sostenible para la producción, mediante procesos de biorrefinería, de bioquímicos, bioetanol y biocombustibles, pudiendo sustituir a los polímeros derivados del petróleo. En este sentido, los residuos agrícolas lignocelulósicos suponen una fuente abundante y barata de fibras de celulosa, cuya composición principal (celulosa, hemicelulosa y lignina), estructura y propiedades las hacen aptas para su utilización.

Para la obtención de las fibras celulósicas y posterior obtención de nanocelulosa, la biomasa es sometida a un pretratamiento, eliminando los demás componentes no celulósicos. En los últimos años ha aumentado la producción de nanocelulosa para su aplicación en el sector industrial (dispositivos electrónicos, cosméticos, dispositivos biomédicos y envases alimentarios) debido a sus excelentes propiedades mecánicas y físicas.

En la presente Tesis Doctoral, en primer lugar, se identificaron los residuos de plantas hortícolas del tomate, pimiento y berenjena como nuevas fuentes de lignonanofibras de celulosa

(LNFC). La pulpa celulósica se obtuvo mediante un proceso medioambientalmente respetuoso, energéticamente sostenible, sencillo y con bajo consumo de reactivos. Se analizó la composición química de las pulpas para estudiar su influencia en el proceso de nanofibrilación. Además, las fibras celulósicas fueron sometidas a pretratamiento mecánico y oxidación mediada por TEMPO (2,2,6,6-Tetrametil-piperidina-1-oxilo) seguido de una homogeneización a alta presión. Las LNFC obtenidas se caracterizaron en términos de rendimiento de nanofibrilación, demanda catiónica, contenido en carboxilos, morfología, cristalinidad y estabilidad térmica. Por último, las LNFC se añadieron como agente de refuerzo en cartón reciclado y se realizó una comparación de mejora con el proceso de batido mecánico industrial.

Posteriormente, las LNFC obtenidas anteriormente se añadieron a una matriz polimérica de alcohol polivinílico (PVA) para la formulación de films. El objetivo principal fue mejorar las propiedades de los films obtenidos para el desarrollo de sistemas de envasado de alimentos más sostenibles y ecológicos. Se evaluaron las propiedades mecánicas, la cristalinidad, la resistencia térmica, la estructura química, la actividad antioxidante, las propiedades de barrera al agua y las propiedades ópticas.

Por último, se diseñó un prototipo de envase alimentario a escala piloto, formulado a partir de combinaciones de ácido poliláctico (PLA) y polibutileno adipato-co-tereftalato (Ecoflex®), e incorporando diferentes proporciones de nanofibras de lignocelulosa (LNFC) obtenidas a partir de un pretratamiento enzimático de residuos de paja de trigo. Se evaluaron las propiedades mecánicas, la cristalinidad, la resistencia térmica, la estructura química, la actividad antioxidante, las propiedades de barrera al agua y gases, y las propiedades ópticas.

Además, se estudió su posible aplicación en el envasado de lechuga recién cortada simulando condiciones reales de fabricación, envasado y almacenamiento a escala piloto.

The world's population is expected to increase by 12.5% in the next 30 years, leading to unprecedented consumption and irreversible climate change. Therefore, in 2021, the European Commission commenced the European Green Pact.

According to the United Nations (UN), the Sustainable Development Goals are a universal call to action to end poverty, protect the planet and improve the lives and prospects of people everywhere. They were adopted by all UN Member States as part of the 2030 Agenda for Sustainable Development.

Currently the dominant economic model known as the "Linear Economy", based on extraction, production, consumption and waste, is incompatible with resource limitation and resilience to environmental impact. From the unsustainability of the linear model emerges a model with an integrative and regenerative approach known as the "Circular Economy". This model seeks to preserve natural capital by selecting natural resources and optimising their use to reduce damage to the environment and ecosystems.

The high agricultural production in Spain leads to the generation of a large amount of agricultural waste that needs to be managed. These applications could be improved through product recovery and a more efficient use of the agricultural waste generated. With valorisation, more energy and by-products could be extracted from the waste, thus reducing both the cost of agricultural production and the spread of pests and greenhouse gas emissions, boosting the circular economy system.

Lignocellulosic biomass is mainly made up of plants or materials of plant origin, providing a sustainable source of carbon for the production, through biorefinery processes, of biochemicals, bioethanol and biofuels, which can replace petroleum-derived polymers. In this sense, lignocellulosic agricultural residues represent an abundant and cheap source of cellulose fibers, whose main composition (cellulose, hemicellulose and lignin), structure and properties make them suitable for use.

To obtain cellulosic fibers and subsequently obtain nanocellulose, the biomass is subjected to pre-treatment, eliminating the remaining non-cellulosic components. In recent years, the production of nanocellulose for its application in the industrial sector (electronic devices, cosmetics, biomedical devices and food packaging) has increased due to its excellent mechanical and physical properties.

In the present PhD thesis, firstly, vegetable plant residues from tomato, pepper and eggplant were identified as new sources of lignocellulose nanofibers (LCNF). The cellulosic pulp was obtained by an environmentally friendly, energy sustainable, simple and low reagent-consuming process. The chemical composition of the pulps was analysed to study its influence on the

nanofibrillation process. In addition, the cellulosic fibers were subjected to mechanical pre-treatment and TEMPO (2,2,6,6-Tetramethyl-piperidine-1-oxyl) mediated oxidation followed by high-pressure homogenisation. The obtained LCNF were characterised in terms of nanofibrillation yield, cation demand, carboxyl content, morphology, crystallinity and thermal stability. Finally, the LCNF were added as a reinforcing agent in recycled paperboard and an improvement comparison with the industrial mechanical beating process was performed.

Subsequently, the previously LCNF obtained, were added to polyvinyl alcohol (PVA) for film formulation. The main objective was to improve the properties of the obtained films for the development of more sustainable and environmentally friendly food packaging systems. Mechanical properties, crystallinity, thermal resistance, chemical structure, antioxidant activity, water barrier properties and optical properties were evaluated.

Finally, a pilot-scale food packaging prototype was designed, formulated from combinations of polylactic acid (PLA) and polybutylene adipate-co-terephthalate (Ecoflex[®]), and incorporating different proportions of lignocellulose nanofibers (LCNF) obtained from an enzymatic pre-treatment of wheat straw waste. Mechanical properties, crystallinity, thermal resistance, chemical structure, antioxidant activity, water and gas barrier properties, and optical properties were evaluated.

In addition, their potential application in fresh-cut lettuce packaging was studied by simulating real manufacturing, packaging and storage conditions at pilot scale.

Introducción

1. Problemática medioambiental

Se prevé que la población mundial aumente en un 12,5% en los próximos 30 años, pasando de 8.000 millones a 9.700 millones de personas en 2050 (1,2). En ese mismo año se estima que el consumo mundial de recursos (combustibles fósiles, metales, biomasa y minerales) se duplicará (3), lo que llevará a un incremento anual en la generación de residuos (4). Esta dinámica de consumo sin precedentes da lugar a una explotación masiva de los recursos naturales y pérdida de la biodiversidad, generando un cambio climático irreversible. Dicha explotación, extracción y transformación de los recursos ocasionando el 50% de las emisiones totales de gases de efecto invernadero (GEI) y al 90 % de la pérdida de biodiversidad (5). Por todo ello, en el año 2021, la Comisión Europea (CE) inició el Pacto Verde Europeo, cuyo objetivo es el uso eficiente de los recursos, eliminando las emisiones netas de gases de efecto invernadero, y disociando el crecimiento económico del uso de los recursos. Además, pretende proteger, mantener y mejorar el patrimonio natural, proteger la salud y el bienestar de los ciudadanos frente a los riesgos y efectos medioambientales y evolucionar hacia una economía circular (1).

1.1. Objetivos de Desarrollo Sostenible

Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU), los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) constituyen un llamamiento universal a la acción para poner fin a la pobreza, proteger el planeta, y mejorar las vidas y las perspectivas de las personas en todo el mundo. En el año 2015, fueron aprobados por todos los Estados Miembros de las Naciones Unidas como parte de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. Dentro de la Agenda 2030 se fijaron 17 objetivos que se relacionan entre sí e incluyen los desafíos globales a enfrentar (6).



Figura 1. Objetivos de Desarrollo Sostenible

De entre los desafíos globales incluidos, y en línea con la producción, utilización y gestión sostenible de los recursos disponibles, se encuentran los siguientes:

- Energía asequible y no contaminante (ODS 7): cuya misión es la descarbonización del sistema energético.

En España, la mayor parte de las emisiones de efecto invernadero se deben al sistema energético por la dependencia de éste a las energías fósiles, siendo el carbón y el petróleo los principales responsables de las emisiones de dióxido de carbono.

- Producción y consumo responsables (ODS 12): cuya misión es promover la gestión y uso sostenible de los recursos naturales. En este sentido, resulta fundamental la sensibilización de todas las partes implicadas para generar cambios a nivel estructural tanto en los patrones de producción como de consumo, orientados al desarrollo de estrategias de economía circular.

- Acción por el clima (ODS 13): cuya misión es la adopción de medidas para combatir el cambio climático y sus efectos, así como la adaptación al mismo. Se busca el establecimiento de unas bases para la mitigación de los efectos del cambio climático, así como el desarrollo de la resiliencia y adaptación de la población en el afrontamiento del impacto de los efectos del cambio climático.

- Vida submarina (ODS 14): cuya misión es la conservación y uso sostenible de los ecosistemas y recursos marinos. En este sentido, resulta fundamental la reducción significativa de la contaminación marina, así como la restauración de dichos ecosistemas.

- Vida de ecosistemas terrestres (ODS 15): cuya misión es la gestión y uso sostenible de los ecosistemas terrestres, así como el desarrollo de estrategias de prevención de la degradación de la tierra y la pérdida de la biodiversidad.

- Alianzas para lograr los objetivos (ODS 17): cuya misión es reforzar la alianza para el desarrollo sostenible, a nivel mundial, necesarios para la consecución de los demás objetivos.

Estos objetivos se enmarcan en las estrategias establecidas en la economía circular.

1.2. Economía circular

La globalización de los mercados y el desarrollo tecnológico en las últimas décadas, han impulsado numerosos cambios en los métodos de producción y consumo, que en términos de desarrollo económico y bienestar social han resultado ser beneficiosos para la sociedad. Sin embargo, este modelo económico dominante, conocido como “Economía Lineal”, basado en la extracción, producción, consumo y desecho, es incompatible con la limitación de recursos y la capacidad de adaptación al impacto ambiental (7). De la insostenibilidad del modelo lineal surge un modelo de enfoque integrador y regenerador conocido como “Economía Circular” (EC). La EC trata de maximizar los recursos materiales y energéticos, optimizando su utilización y

manteniendo su valor en el sistema, para que estos permanezcan el mayor tiempo posible en el ciclo productivo, reduciendo al mínimo la generación de residuos (5).

La Fundación Ellen MacArthur (2015) define la economía circular a partir de las siguientes características (8):

- Los residuos se eliminan del diseño.

Los materiales de origen biológico pueden volver al suelo mediante el compostaje o digestión anaeróbica y los materiales artificiales pueden diseñarse para ser recuperados, renovados y mejorados.

- La diversidad genera solidez siendo motor de la versatilidad y resiliencia.

La biodiversidad es fundamental para sobrevivir a los cambios medioambientales.

- Las fuentes de energías renovables impulsan la economía.

La energía debería ser renovable, reduciendo la dependencia de los recursos e incrementando la resiliencia de los sistemas frente a las finitud de los recursos.

- Pensar en sistemas.

Muchos elementos forman parte de sistemas complejos en los que las distintas partes están fuertemente vinculadas entre sí, por lo que cambios en alguna de las partes se refleja en consecuencias comunes.

- Los precios u otros mecanismo de retroalimentación deben reflejar los costes reales.

Los precios son un mensaje y por consiguiente deben ser transparentes con respecto a los costes totales reales.

En paralelo a lo anterior y con un objetivo en común, la Comisión Europea define el término de “bioeconomía” como “la producción de recursos biológicos renovables y la conversión de estos recursos y flujos de desechos en productos de valor añadido, como alimentos, piensos, productos biológicos y bioenergía”. Busca la transición social de la economía basada en los combustibles fósiles a una economía de base biológica. Dicha transición se basa en la sustitución de la energía, los plásticos, los materiales y productos químicos de base fósil por otros de base biológica (9).

2. Valorización de residuos agrícolas

2.1. Producción de biomasa vegetal

La biomasa vegetal es aquel material derivado de las plantas que se encuentra disponible de manera abundante en el medio natural. Debido a su bajo coste, supondría una fuente económica de biocombustibles y bioproductos alternativa a los combustibles fósiles (10). Además, existen distintas fuentes de esta que se diferencian en función de su origen en: cultivos forestales, residuos agrícolas, subproductos de la actividad industrial, residuos de origen urbano y cultivos con fines

energéticos. De éstas, la biomasa forestal y los residuos agrícolas son las más producidas y por tanto las más interesantes a valorizar.

En 2020 España fue el primer país europeo en producción de frutas y hortalizas (19,6 millones de toneladas) y el cuarto en producción de trigo (7,8 millones de toneladas). Con respecto a la producción hortícola, Andalucía fue la región de España con mayor producción de hortalizas, destacando en este sentido, la producción de tomate (1,74 millones de toneladas), pimiento (1,05 millones de toneladas) y berenjena (245 mil toneladas).

Esta elevada producción conlleva la generación de una gran cantidad de residuos agrícolas que deben ser gestionados. Dicha biomasa vegetal generada no se explota totalmente ni de manera eficiente, siendo sus usos tradicionales para; la protección del suelo, alimentación animal, quema, compostaje y ensilaje. Estas aplicaciones, de bajo valor añadido, podrían mejorarse aumentando dicho valor y haciendo un uso más eficiente de los mismos. Con la valorización se podría conseguir/obtener/generar de los residuos más energía y subproductos, disminuyendo tanto el coste de la producción agrícola y reduciendo su impacto ambiental a través de una menor propagación de plagas y una reducción en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), potenciando así el sistema de economía circular.

2.2. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos

La biomasa vegetal o lignocelulósica la constituyen plantas o materiales de origen vegetal. Esta biomasa es una fuente de carbono sostenible, siendo prometedor su uso para la producción sostenible de bioquímicos, bioetanol y biocombustibles, pudiendo sustituir a los polímeros derivados del petróleo (11).

El concepto de biorrefinería de materiales lignocelulósicos nace a partir de su analogía con la refinería de petróleo, que produce combustibles y subproductos a partir del petróleo. La biorrefinería de materiales lignocelulósicos se define como aquella industria integrada que, mediante el uso de biomasa lignocelulósica y la aplicación de diferentes tecnologías, produce: energía, biocombustibles, productos químicos, materiales, alimentos y piensos (12). Este sistema da lugar a la generación de productos de alto valor añadido, sin competir con las cadenas alimentarias humana y animal, mediante el uso eficiente de las materias primas y los procesos, integrando la energía generada en el proceso. Dentro de las ventajas de este sistema de valorización se destacan el aumento de la competitividad, la contribución al desarrollo sostenible y los beneficios sociales, mediante (13):

- Obtención de productos de valor añadido, cuyas características y propiedades equivaldrían a sus análogos tradicionales, basados en la industria petroquímica.
- Obtención de incrementos en la productividad e ingresos industriales.
- Diversificación de las materias primas y fuentes de energía.
- El medio ambiente y la salud poblacional se benefician de este sistema.

- Apuesta por materias primas renovables.
- Generación residuos biodegradables, fácilmente reciclables.
- Incremento del valor de las materia primas locales.
- Mejora de la calidad de vida.
- Incentivo para el mantenimiento del medio agrícola y forestal.
- Incentivo para el mantenimiento de la población en el medio rural.

El proceso de valorización de la biomasa llevado a cabo en la biorrefinería (Figura 2) varía en función de la materia prima utilizada y del producto final que se desee obtener. Las etapas de dicho proceso con las siguientes:

- Proceso primario:

Separación de los componentes de la biomasa en productos intermedios (ej. celulosa, almidón, azúcar, lignina, biogás, etc.). Normalmente, dicha separación incluye operaciones de pretratamiento, acondicionamiento y/o descomposición. Estos productos intermediarios generados se conocen como “plataformas de biorrefinería”. Estas plataformas seguirán siendo procesados en la siguiente etapa, siendo la materia prima del siguiente proceso, hasta obtener los productos finales como bioenergía y bioproductos.

- Proceso secundario:

Conversión y procesado que da lugar a productos obtenidos a partir de los productos intermediarios (plataformas).

En la primera etapa de conversión las plataformas son procesados total o parcialmente en precursores y otros productos intermedios. Posteriormente pueden realizarse distintas conversiones que darán lugar a productos parcial o totalmente refinados.

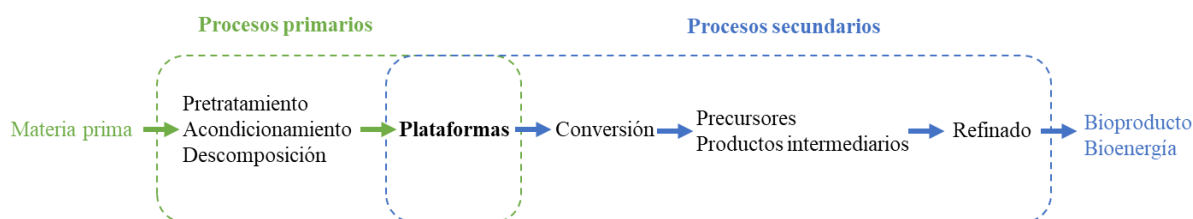


Figura 2. Esquema del proceso de biorrefinería.

En el caso particular de las biorrefinerías de materiales lignocelulósicos, se parte de una materia prima (residuos agrícolas, forestales, industriales, etc.), a partir de la cual y mediante procesos primarios físicos (fraccionamiento, molienda, secado, etc.), químicos (deslignificación, hidrólisis, etc.), termoquímicos (gasificación, pirólisis, etc.) y/o biotecnológicos (deslignificación biológica) se obtiene un co-producto y/o una plataforma lignocelulósica. Por un lado se obtienen

los co-productos, considerados unidades estructurales y elementos constitutivos a partir de los cuales y mediante procesos secundarios físicos, químicos, termoquímicos y/o biotecnológicos, se producen otros productos de mayor tamaño o complejidad. Y por otro lado se obtienen las plataformas lignocelulósicas, las cuales, mediante procesos secundarios físicos, químicos, termoquímicos y/o biotecnológicos, generan co-productos, bioproductos y/o bioenergía (Figura 3).

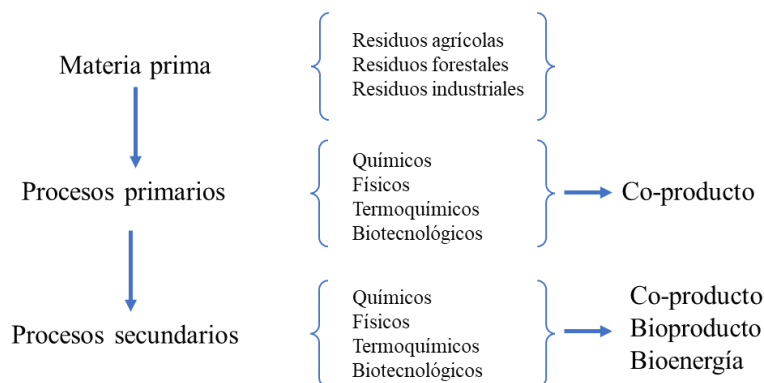


Figura 3. Esquema del proceso de biorrefinería de materiales lignocelulósicos

3. Materiales lignocelulósicos

3.1. Composición y estructura

Los residuos agrícolas lignocelulósicos suponen una fuente abundante y barata de fibras de celulosa, cuya composición, estructura y propiedades las hacen aptas para su aplicación tecnológica.

La célula vegetal posee una pared celular compuesta mayoritariamente por carbohidratos (celulosa y hemicelulosa), compuestos fenólicos (contenidos en la lignina) y una pequeña proporción de proteínas estructurales. Por tanto, la composición principal de los materiales lignocelulósicos son celulosa, hemicelulosa y lignina (14) (Figura 4). La proporción de cada uno de los componentes en la materia vegetal dependerá de la fuente de esta.

El principal componente estructural de la pared celular de la planta es la celulosa, constituida por una cadena de moléculas de glucosa, unidas entre sí por enlaces glicosídicos. El segundo es la hemicelulosa, polisacárido compuesto por unidades de monosacáridos de 5 y 6 carbonos. La lignina, tercer componente mayoritario, es un polímero tridimensional de unidades fenilpropanoides. Se considera el pegamento celular, aportando rigidez a la pared celular, además de actuar como barrera frente a los insectos y patógenos. Dichos componentes proporcionan resistencia estructural al tejido vegetal debido a la formación de microfibrillas (unión hemicelulosa-celulosa) que se entrecruzan con la lignina, creando una compleja red de enlaces (15).

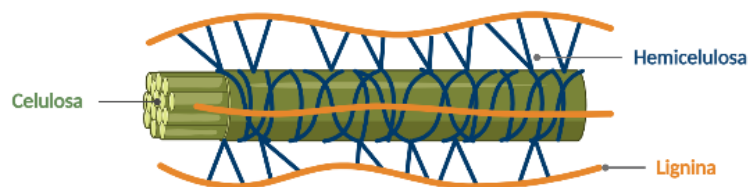


Figura 4. Ordenación espacial de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica.

3.2. Celulosa

La celulosa es un biopolímero constituido por cadenas lineales de celobiosa (D-glucopiranosil- β -1,4-D-glucopiranososa) unidas entre sí por un enlace glucosídico β (1-4) (Figura 5). Esta linealidad aportada por este enlace da lugar a una molécula rígida. Los grupos hidroxilo de la cadena de celulosa sobresalen de manera lateral de la molécula, facilitando su disponibilidad para enlaces de hidrógeno intramoleculares e intracadena. Estos enlaces dan lugar a agrupaciones de cadenas que generan una estructura cristalina muy ordenada.

La celulosa presenta regiones cristalinas y regiones amorfas (16). En las regiones cristalinas, los enlaces de hidrógeno intercadena generan fibras resistentes, insolubles en la mayoría de los disolventes y con puntos de fusión elevados. En las regiones amorfas, las cadenas están más separadas y disponibles para otras moléculas (ej. agua). Por este hecho, la celulosa es considerada higroscópica, debido a que puede absorber grandes cantidades de agua, pero hidrofóbica, porque no se disuelve en ella (17). Esta polaridad de la celulosa limita su compatibilidad con compuestos apolares (18).

En la celulosa proveniente de biomasa vegetal se encuentran dos formas cristalinas, celulosa I y celulosa II, aunque la celulosa tiene cuatro polimorfos cristalinos: I, II, III y IV. Al tratar la celulosa I con una solución acuosa de hidróxido de sodio se forma la celulosa II. Al tratar las celulosas I y II con amoníaco líquido se da lugar a la celulosa III cristalina. Por último, sometiendo a tratamiento térmico a la celulosa III se obtiene la celulosa IV cristalina (17).

El contenido de celulosa influye en las propiedades y aplicaciones de esta. En el caso de la biomasa vegetal con mayor contenido de celulosa serían preferibles para aplicaciones textiles y papeleras. Por otro lado, las fibras con mayor contenido en hemicelulosa serían preferibles para producir etanol y otros productos de fermentación por su fácil hidrólisis a azúcares fermentables. A pesar de esto, el valor del subproducto obtenido depende de la calidad de las fibras y de su uso final, no del contenido de celulosa en sí mismo (15).

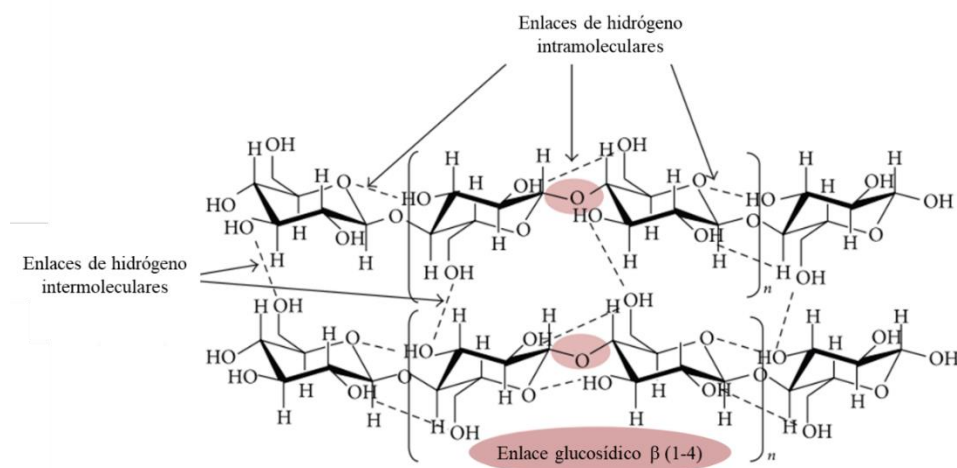


Figura 5. Estructura química de la celulosa (11)

Tradicionalmente, la celulosa se ha empleado en la fabricación de pasta de celulosa, papel, cartón, pasta de celulosa moldeada, ésteres de celulosa, etc. En la actualidad se están estudiando y desarrollando numerosas aplicaciones de esta para la obtención de productos con un mayor valor añadido como se observa en la Tabla 1 (13).

Tabla 1. Productos obtenidos a partir de la celulosa y su aplicación.

Recurso	Producto	Aplicación
Fibras celulósicas	Biofibras de celulosa	Industria papelera y envasado (agente de refuerzo y/o carga)
	Nanofibras de celulosa	
	Nanocristales de celulosa	
Celulosa de alto peso molecular	Celulosa microcristalina	Industria farmacéutica (aglutinante, diluyente, adsorbente)
	Carboximetilcelulosa	Aditivo industrial (propiedades reológicas)
Oligómeros y glucosa	Etanol, ácido láctico, sorbitol, glutamato monosódico, ácido glutámico	Biocombustibles y aditivos industria alimentaria (acidificador, endulzante, potenciador del sabor)
Productos de la degradación de la glucosa	5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido levulínico	Aplicación industrial

3.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polisacárido ramificado con grupos heterogéneos (heteropolisacárido) de hexosas y pentosas con bajo peso molecular ((Grado de polimerización (DP) 50 – 500)), sintetizadas por glicosiltransferasas localizadas en las membranas del Aparato de Golgi. Tienen una estructura amorfa, por lo que no son químicamente estables como la celulosa. Son hidrofóbicas, pero se disuelven en medio alcalino (13).

Se pueden clasificar en xilanos, xiloglucanos, mananos y glucomananos, en base a su cadena principal de glucosa, xilosa y/o manosa, con enlaces β (1-4) en posición C1 y C4 (19,20). Cadenas de 1 a 4 unidades en posición ecuatorial de los oligosacáridos: D-galactosa, D-manosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-fucosa, L-ramnosa y/o D-ácido glucurónico), constituyen las ramificaciones de las hemicelulosas (Figura 6).

Las unidades constituyentes, estructura y contenido total de la hemicelulosa varían en función del tipo de especie, dentro de la misma especie y según el tejido anatómico y la fisiología del vegetal.

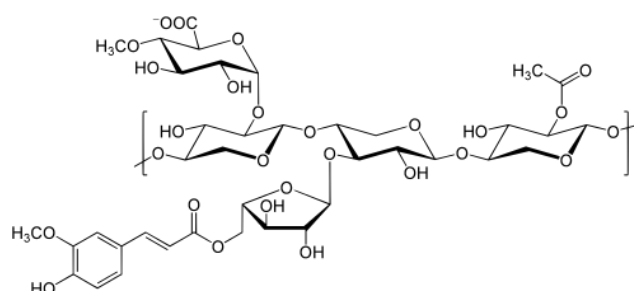


Figura 6. Estructura química de la hemicelulosa.

La función principal de la hemicelulosa es su interacción mediante enlaces covalentes y no covalentes con la celulosa, incluyendo puentes de hidrógeno, y lignina, para proporcionar rigidez a la pared celular.

En función de la finalidad y uso que quiera darse a las hemicelulosas, su tratamiento será distinto. En la fabricación de papel resultan fundamentales por su capacidad de enlace y naturaleza viscoelástica, ya que le aportan al papel propiedades como plasticidad, flexibilidad, rigidez y dureza, entre otras. En cambio, en los procesos de biorrefinería se trata de hidrolizar estas hemicelulosas con enzimas específicas (16).

Al igual que con la celulosa, actualmente se están estudiando y desarrollando diversas aplicaciones para la obtención de productos con un mayor valor añadido (Tabla 2) (13).

Tabla 2. Productos obtenidos a partir de la hemicelulosa y su aplicación.

Recurso	Producto	Aplicación
Hemicelulosas de alto peso molecular	Film polimérico	Industria envasado
	Etanol	Biocombustible
Oligómeros y xilosa	Xilitol	Industria alimentaria y cosmética (edulcorante y retenedor de humedad)
	Butanol	Biocombustible, solvente, plastificantes, etc.
	2,3-Butanodiol	Biocombustible, precursor de polímeros y resinas sintéticas
Productos de la degradación de la xilosa	Furfural	Aplicación industrial
	Ácido levulínico	(metal, insecticidas)

3.4. Lignina

La lignina es un polímero complejo, amorfo y tridimensional conformado por alcoholes aromáticos (monolignoles). El monolignol presenta tres tipos de monómeros en función del grado de metoxilación: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Estos lignoles se incorporan a la lignina en forma de los fenilpropanoides: p-hidroxifenilo (H), guayacol (G) y siringilo (S) (21) (Figura 7).

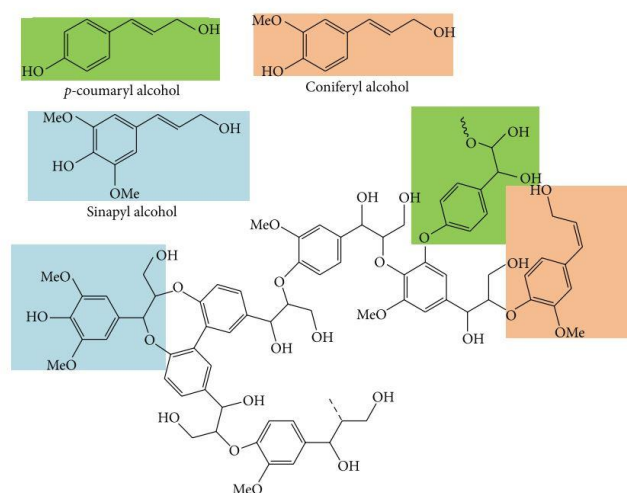


Figura 7. Estructura química de la lignina (alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico) (11)

Es el polímero aromático más abundante en el planeta y el segundo polímero orgánico después de la celulosa. Además, constituye el 15-40% del peso seco de las plantas leñosas (22).

Se localiza en la pared celular secundaria, ejerciendo de nexo de unión entre las fibras celulósicas. En este sentido, aporta rigidez a la planta, resistencia a la degradación e impermeabilidad a los materiales lignocelulósicos. Además, ejerce un papel protector de los polisacáridos de la pared celular frente al ataque microbiano, confiriéndole resistencia a la descomposición (23).

El estudio de este polímero, así como la mejora del proceso de obtención en biorrefinerías, han contribuido al avance en nuevas aplicaciones de la lignina, cuyo producto supondría materiales de mayor valor añadido (24)(13) (Tabla 3).

Tabla 3. Productos obtenidos a partir de la lignina y su aplicación.

Recurso	Producto	Aplicación
Licor residual (industria papelera)	Combustible	Biocombustible
Polímeros de lignina	Dispersantes	Industria cerámica, pigmentos, tratamiento de aguas, etc.
	Emulsificantes	Suelo, asfalto, cera, goma, jabón, látex, etc.
	Secuestrantes	Metales en aguas industriales, micronutrientes y agricultura.
	Aditivos	Cemento, limpiadores industriales, gomas, plásticos vinílicos, etc.
	Adhesivos	Paneles de madera
	Co-reactivo de polímeros y resinas	Adhesivos en la industria maderera
Monómeros de lignina	Vainillina	Industria alimentaria (saborizante)
Productos de degradación	Dimetilsulfuro (DMS)	Aplicación industrial
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Aplicación medicinal e industria farmacéutica.
	Gas, aceite y carbón	Energética

3.5. Componentes minoritarios

Además de los componentes estructurales que conforman la pared celular de la planta, existen otros compuestos no estructurales que representan un porcentaje reducido con respecto al peso del material lignocelulósico (1-12%). Aunque su concentración sea baja y no influyan en la estructura y morfología de la pared celular, desempeñan funciones fisiológicas vitales para la célula vegetal.

3.5.1. *Compuestos extraíbles*

En esta categoría se incluyen aquellos componentes extracelulares y/o que no forman parte de la estructura tridimensional de la pared celular. Además, son compuestos de bajo peso molecular y fácilmente extraíbles.

Estos compuestos se clasifican según su solubilidad, en compuestos lipofílicos e hidrofílicos (25). Los lipofílicos consisten principalmente en ácidos grasos, alcoholes, hidrocarburos, terpenoides, esteroides, glicéridos y ceras. Estos pueden determinar algunos parámetros organolépticos de las plantas como el olor, color y gusto. Además, aportan a la planta defensa frente a posibles patógenos. Los hidrofílicos consisten principalmente en compuestos fenólicos (estilbeno, lignanos, taninos, flavonoides, etc.).

3.5.2. *Proteínas*

En la pared celular de las plantas se encuentran proteínas cuya composición consta de uno o dos aminoácidos. Se clasifican según su función: i) proteínas estructurales, encargadas de una función estructural, ricas en extensina, prolina y/o glicina, que, interactúan con los carbohidratos presentes en la pared celular, y ii) proteínas activas, encargadas de llevar a cabo las funciones enzimáticas y de reconocimiento de la pared celular.

3.5.3. *Pectinas*

En la pared celular se encuentran unos polisacáridos que no forman fibras y se localiza entre los microfilamentos de celulosa, las pectinas. Su componente mayoritario es el ácido D-galacturónico. La lamela media de las células vegetales está compuesta principalmente por pectina, que forma una matriz porosa entre la que se colocan el resto de los componentes, y combina con células adyacentes favoreciendo la unión celular.

3.5.4. *Cenizas*

Además de los elementos mayoritarios de la célula vegetal (carbono, hidrógeno, oxígeno, etc.), existen otros indispensables como el nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc, manganeso, cloro, etc., algunos de ellos metales. Su concentración depende en gran medida de la parte anatómica, así como del tipo de suelo de cultivo.

Es importante determinar el contenido de metales para la evaluación de las fibras obtenidas para su procesamiento (biorrefinerías e industria papelera) como para su combustión (26). En este sentido, cuando la fibra vegetal se somete a combustión, los procesos de incineración o quema, los elementos no metálicos desaparecen, mientras que los elementos metálicos se incorporan al suelo en forma de óxidos.

4. **Nanocelulosa**

La nanocelulosa es un polímero extraído de las fibras de celulosa. Su diámetro es inferior a 100 nm y su longitud oscila entre 1 y 4 micrómetros, siendo su relación de aspecto (L/D) alta.

Posee bajo peso y densidad ($1,6 \text{ g/cm}^3$), y unas excelentes propiedades mecánicas. De estas últimas destaca principalmente su rigidez, alcanzando 220 GPa de módulo elástico y 10 GPa de resistencia a la tracción. Además, es transparente y se puede funcionalizar fácilmente debido a los grupos hidroxilo de su superficie, otorgándole así diversas propiedades (27–29).

Conocer el tamaño de las fibras de celulosa es importante para determinar su posible aplicación. En la Tabla 4, se clasifican las distintas estructuras de la fibra de celulosa, así como su diámetro, longitud y relación de aspecto (L/D)(30).

Tabla 4. Estructuras de la celulosa y su tamaño (diámetro, longitud y relación de aspecto).

Estructura	Diámetro (nm)	Longitud (nm)	Relación aspecto (L/D)
Microfibra	2-10	> 10000	> 1000
Celulosa microfibrilada	10-40	> 1000	100-150
Nanocristales de celulosa	2-20	100-600	10-100
Celulosa microcristalina	> 1000	> 1000	1
Nanofibras de celulosa	< 100	1000-4000	< 40

4.1. Tipos de nanocelulosa

La nanocelulosa se clasifica en función de la morfología, tamaño de partícula, densidad, fuente de obtención, método de extracción, etc., aunque los tres tipos de nanocelulosa mayoritarios son similares en cuanto a su composición química (31,32).

4.1.1. Nanocristales de celulosa

Los nanocristales de celulosa son nanocelulosas de alta resistencia que, mediante hidrólisis ácida, se extraen de las fibras de celulosa, hidrolizándose las regiones amorfas y manteniéndose las cristalinas (27,32) (Figura 8). Tienen forma de vara, su diámetro es de 2-20 nm y su longitud de 100-500 nm. Presentan una elevada cristalinidad (54-88%) y en estas regiones cristalinas se encuentra la totalidad de la composición química de la celulosa (31).

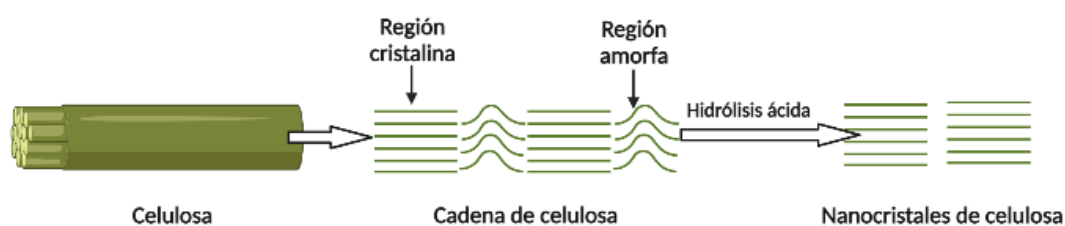


Figura 8. Obtención de nanocristales de celulosa mediante hidrólisis ácida.

4.1.2. *Nanocelulosa bacteriana*

La nanocelulosa bacteriana es generada por bacterias, las más conocida *Gluconacetobacter xylinus*, aunque hay otras como *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium*, que se produce por la acumulación de azúcares de bajo peso molecular, durante un periodo que puede comprender desde dos días a dos semanas. Tienen la misma composición química que los nanocristales y nanofibras de celulosas. Además, se presenta con una morfología de cintas retorcidas y su tamaño es de 20-100 nm de diámetro y longitudes micrométricas (33).

La diferencia con los otros tipos de nanocelulosa radica en su proceso de obtención. Tanto los nanocristales como las nanofibras de celulosa siguen un proceso descendente, en el que a partir de biomasa lignocelulósica se obtienen dichos nanocompuestos impuros, debido a la presencia de fracciones de otros componentes como la hemicelulosa, lignina, pectinas, etc. En cambio, la nanocelulosa bacteriana se obtiene a partir de un proceso ascendente, en el que la bacteria genera azúcares, los cuales, a partir de polimerización, organización y cristalización de las cadenas obtenidas, se ordenan dando lugar a este nanomaterial. Es por ello por lo que la nanocelulosa bacteriana siempre se encuentra en su estado puro, debido a la ausencia de otros constituyentes de los materiales lignocelulósicos (34,35).

4.1.3. *Nanofibras de celulosa*

La nanofibra de celulosa es larga, flexible y enredada que puede extraerse de las fibras de celulosa por métodos mecánicos (27). Tiene la misma composición química que la celulosa, con regiones cristalinas y amorfas. Presenta un diámetro de 1-100 nm y una longitud de 1000-4000 nm (34). Posee una elevada área superficial y gran cantidad de grupos hidroxilo en la superficie que son accesibles, permitiendo diversas modificaciones en la nanofibras (31).

Puede someterse a procesos de purificación, como en el caso de los nanocristales de celulosa, con el objetivo de eliminar el resto de los componentes del material lignocelulósico que pueden estar presentes. En este sentido, si no se realiza un proceso de blanqueo, los restos de lignina presentes en la fibra se mantendrán, obteniéndose así las lignonanofibras de celulosa (LNFC). Aunque la composición química de estas LNFC varíe en comparación con las nanofibras de celulosa por la presencia de lignina, poseen similares características.

La producción de las nanofibras de celulosa se realiza, como se cita posteriormente por métodos mecánicos, mediante la delaminación de las fibras celulósicas previamente sometidas a distintos pretratamientos para facilitar la desintegración.

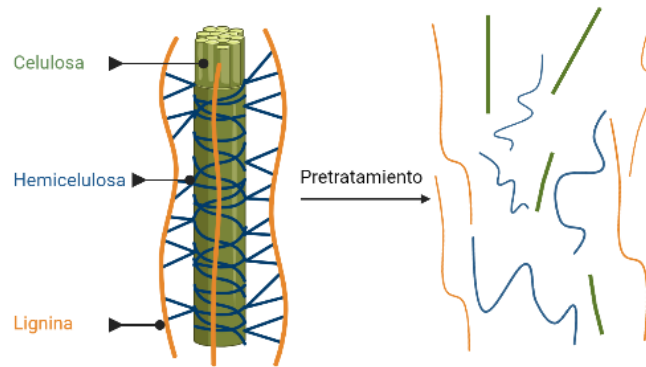


Figura 9. Desintegración del material lignocelulósico en celulosa, hemicelulosa y lignina mediante pretratamiento.

4.1.4. Otros tipos de nanocelulosas

- Nanocristales de celulosa vellosa (HCNC): se extraen de las fibras de celulosa a partir de un tratamiento químico, pero no siguiendo los métodos convencionales (tratamientos mecánicos o hidrólisis ácida). Mediante este tratamiento se solubilizan las regiones amorfas, aunque las cristalinas permanecen igual que en la extracción de los nanocristales de celulosa. Por tanto, tiene una elevada cristalinidad y su morfología es similar a la de los nanocristales de celulosa, pero conteniendo regiones amorfas, similares a la nanofibra de celulosa (36).

- Nanocristales de celulosa estabilizados estéricamente (SNCC): estos nanocristales son derivados de la HCNC, producidos mediante una reacción química con ion peryodato, con un posterior tratamiento térmico. Este ion rompe los enlaces C_2-C_3 de las unidades de glucosa, además de convertir los grupos hidroxilo de C_2-C_3 en aldehídos. Resultado de esta reacción, se crean cadenas de dialdehídos en los extremos de las regiones cristalinas, haciendo a estos nanocristales muy reactivos y fácilmente funcionalizables (37).

- Nanocristales de celulosa estabilizados electrostéricamente (ENCC): estos nanocristales son derivados de la HCNC, producidos mediante reacción de oxidación con ion peryodato/clorito. Con esta reacción, las regiones cristalinas se extraen y sobresalen por las cadenas dicarboxiladas. Estas dan lugar a una mayor estabilidad coloidal, en comparación con los nanocristales de celulosa (38).

4.2. Obtención de nanofibras de celulosa a partir de biomasa lignocelulósica

La obtención de nanocelulosa a partir de biomasa lignocelulósica consta de dos grandes etapas. En la primera etapa, purificación, se obtienen las fibras de celulosa, eliminando los componentes no celulósicos de la matriz: hemicelulosa, lignina y otro compuestos minoritarios. La segunda etapa consta de diversos métodos de extracción (pretratamiento mecánico, biológico y químico, y tratamiento) para la obtención de nanocelulosa a partir de las fibras de celulosa obtenidas (Figura 10).

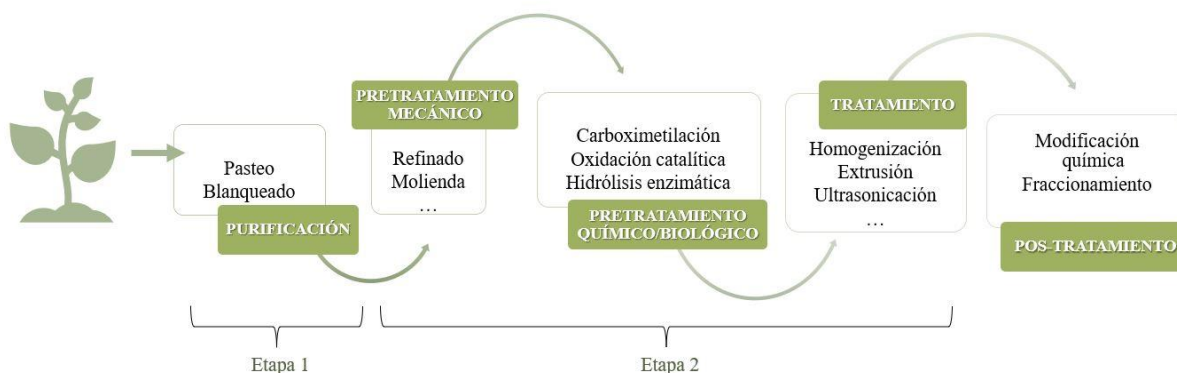


Figura 10. Diagrama de la producción de nanofibras de celulosa.

4.2.1. *Obtención de las fibras celulósicas*

Para la obtención de las fibras celulósicas y posterior obtención de nanocelulosa, la biomasa es sometida a un pretratamiento, eliminando los demás componentes no celulósicos.

La liberación de las fibras de celulosa de la matriz puede realizarse mediante métodos mecánicos o semimecánicos, o químicos o semiquímicos. Los métodos mecánicos dan lugar a un rendimiento mayor del proceso, debido a que aprovechan la biomasa casi en su totalidad, pero son muy costosos a nivel energético. Los métodos químicos presentan un rendimiento menor y son energéticamente más eficientes, debido a que el residuo resultante del proceso de pasteo se puede reciclar y/o quemar para obtener energía del mismo (39).

- Método mecánico: la pasta de celulosa se obtiene mediante el refinado de la biomasa vegetal en agua mediante la acción mecánica llevada a cabo en el centro de discos giratorios ranurados. Este método no permite eliminar por completo la cantidad de lignina.

- Método químico: el objetivo principal de este método de obtención de las fibras de celulosa es la eliminación de la lignina. Dicha deslignificación se lleva a cabo mediante la degradación de las moléculas de lignina, llevándolas a una solución y eliminándolas por lavado. En este proceso también se pierde celulosa y hemicelulosa debido a que no existen reactivos que sean totalmente selectivos con la lignina. Además, la eliminación completa de la lignina no se puede conseguir sin dañar gravemente a estos carbohidratos, por lo que después de este proceso

queda una cantidad de lignina en la pasta celulósica, determinada por el número Kappa. Existen varios métodos químicos para la obtención de las fibras celulósicas, entre los que se encuentran: el proceso Kraft, el proceso de sulfitación, el proceso alcalino, etc.

4.2.2. *Obtención de nanofibras de celulosa*

Los tratamientos de desintegración de las fibras de celulosa requieren un elevado consumo energético debido a los numerosos ciclos de tratamiento necesarios para dar lugar a una separación óptima de las nanofibras. Se han estudiado y desarrollado diversos pretratamientos para facilitar el tratamiento de nanofibrilación, así como para reducir el consumo energético del mismo.

4.2.2.1. Pretratamientos para la obtención de nanofibras de celulosa

El objetivo del pretratamiento es facilitar el tratamiento mecánico posterior para la obtención de nanofibras de celulosa, así como reducir el consumo energético derivado del tratamiento mecánico necesario para la obtención de esta. El tipo y propiedades de las nanofibras de celulosa obtenidas dependerá en gran medida, además de la materia prima, de la técnica de extracción utilizada. Se puede destacar:

4.2.2.1.1. Carboximetilación

La carboximetilación es un proceso que, mediante una reacción química entre la celulosa y el ácido monocloroacético, y en presencia de hidróxido sódico, se sustituyen los grupos hidroxilo de la cadena de celulosa por grupos carboximetilos (CH_2COOH). La presencia de hidróxido sódico da lugar a condiciones alcalinas que favorecen la hinchazón de la fibra y aumentan la reactividad de los grupos hidroxilos de la celulosa. Este proceso ocurre en dos etapas consecutivas de basificación y eterificación, utilizando isopropanol como solvente (40,41).

Este pretratamiento facilita la liberación de las fibrillas durante el tratamiento de desintegración y da lugar a fibrillas muy cargadas superficialmente ($0,5 \text{ meq}\cdot\text{g}^{-1}$). En el tratamiento posterior de desintegración se pueden lograr nanofibras con un diámetro de 5–15 nm de diámetro y una longitud mayor a $1 \mu\text{m}$.

4.2.2.1.2. Oxidación catalítica TEMPO

En la oxidación catalítica mediada por el radical 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-oxilo, junto con el oxidante, hipoclorito sódico (NaClO), se oxida a carboxilatos el grupo hidroxilo de la celulosa. La oxidación se lleva a cabo en medio acuoso con un elevado valor de pH, donde el reactivo TEMPO y el bromuro de sodio (NaBr) se disuelven, añadiendo posteriormente NaClO para que comience la oxidación.

Es el pretratamiento más efectivo y utilizado para la producción de nanofibras de celulosa, obteniéndose con un diámetro de 3-4 nm, longitud de 1-4 μm y elevada relación de aspecto (42,43).

4.2.2.1.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es el proceso de tratamiento biológico mediante el cual se utilizan enzimas para digerir o modificar las fibras de celulosa (44). Supone una alternativa ambientalmente favorable en comparación con el uso de pretratamiento químicos. Las celulasas son las enzimas encargadas de hidrolizar las fibras de celulosa y se clasifican en función de su actividad (45).

- Endoglucanasas o β -1,4-endoglucanasas: hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos accesibles de las regiones amorfas de la celulosa, generando fibras acortadas con nuevos extremos de cadena.
- Exoglucanasas o celobiohidrolasa: liberan celobiosa como producto mediante su actuación en los extremos de la cadena de celulosa.
- β -glucosidasas: hidrolizan la celobiosa en glucosa.

Este pretratamiento aumenta la hinchazón de la fibra de celulosa en agua, facilitando su desintegración y tratamiento posterior. Las nanofibras de celulosa obtenidas tienen un diámetro de 10–20 nm y son más homogéneas que las obtenidas mediante pretratamiento mecánico.

4.2.2.1.4. Refinado mecánico

Este proceso consiste en someter a las fibras de celulosa a fuerzas cizalla (refinado PFI, molino, etc.) para producir una separación mecánica de las mismas. Puede ser un pretratamiento en sí mismo o parte de alguno de los pretratamiento anteriormente descritos. El refinado mecánico incrementa los potenciales de unión de las fibras y favorece la capacidad de hinchazón debido a la exposición de las fibrillas de celulosa, facilitando su posterior desintegración (46).

El refinado PFI es un tipo de pretratamiento mecánico conformado por un molón cilíndrico y un sistema de carcasa que giran en el mismo sentido, pero con velocidades tangenciales diferentes. La diferencia de velocidades hace que las fibras se expongan a fricción, rozamiento y compresión. Tras un refinado mecánico severo (20.000–30.000 revoluciones) las fibras alcanzan un nivel de refinado suficiente (80–90 °SR) para someterlas a la desintegración (47).

4.2.2.2. Tratamientos para la obtención de nanofibras de celulosa

Con el objetivo de desintegrar y degradar la estructura de la fibra de celulosa y así convertirlas en nanofibras de celulosa, estas se someten a una desintegración mecánica.

Existen diversos tratamientos mecánicos para dar lugar dicha desintegración, entre los que se encuentran:

- Homogeneización a alta presión: se fuerza el paso de la suspensión de fibras de celulosa a través de una ranura a una presión elevada (100–2.000 bares), utilizando un pistón y un conjunto de válvulas. Con la apertura y cierre de las mismas, las fibras se someten a una gran caída de presión con elevadas fuerzas de cizallamiento e impacto. Estas fuerzas dan lugar a una elevada desintegración de fibras, produciéndose así las nanofibras de celulosa. Se hace pasar a la suspensión de fibras de celulosa, con una consistencia del 1% aproximadamente, durante 5-10 pases a través del homogeneizador a una presión entre 600–1.000 bares. Después dichos pases, la suspensión de nanofibras de celulosa da lugar a un gel viscoso y estable (48).

- Microfluidización: la suspensión de fibras de celulosa, con una consistencia del 1%, se bombea a través de un microfluidizador con cámaras de interacción donde son sometidas a elevadas fuerzas cizalla. Para una desintegración de las fibras completas, se estiman necesarios entre 10 y 20 pases a través del equipo, alcanzando hasta 2.760 bares, obteniendo unas fibras de un diámetro entre 5–20 nm (49).

- Extrusión: el proceso de desintegración de las fibras de celulosa puede llevarse a cabo en una extrusora de doble tornillo que genera fuerzas de fricción (50). A diferencia de los tratamientos anteriores, donde las suspensiones de las nanofibras de celulosa tienen una consistencia del 1–2%, la extrusión permite obtener consistencias del 20–40%, aumentando la eficacia y rapidez, suponiendo una bajada de costes del proceso.

- Ultrasonicación de alta intensidad: se genera un proceso de cavitación de gran poder mecánico-oscilante, que consiste en la formación, expansión e implosión de burbujas de gas microscópicas cuando las moléculas absorben energía ultrasónica. El resultado de este tratamiento es un producto heterogéneo, con mezcla de micro y nanofibras (51). Requiere un elevado consumo energético, disminuyen el rendimiento y acortan la longitud de la fibra.

5. Aplicación de lignonanofibras de celulosa

En los últimos años se ha mostrado un creciente interés en la producción de nanocelulosa debido a que juega un papel importante en el sector industrial, acompañado de un crecimiento económico. Dadas sus excelentes propiedades mecánicas y físicas, alta resistencia, elevado Módulo de Young, propiedades ópticas, propiedades reológicas, atracción electrostática, autoensamblaje ajustable, biocompatibilidad, entre otras (34), su uso puede abarcar diversas aplicaciones, como dispositivos electrónicos, cosméticos, dispositivos biomédicos y envases alimentarios (52) (Figura 11).

Como se ha detallado en la sección 4.1., la nanocelulosa se puede presentar en diferentes formas, siendo las mayoritarias: nanocristales de celulosa, nanofibras de celulosa y nanocelulosa bacteriana. Este hecho, unido a las distintas metodologías de obtención de la misma, da lugar a materiales con distintas estructuras y funciones, a partir de los cuales se podrían desarrollar diversas aplicaciones que generen productos de gran valor añadido (53,54).

Basándose en estas propiedades, la nanocelulosa se ha aplicado directamente para reforzar distintas matrices poliméricas y desarrollar nuevos materiales con propiedades funcionales mejoradas y/o novedosas.

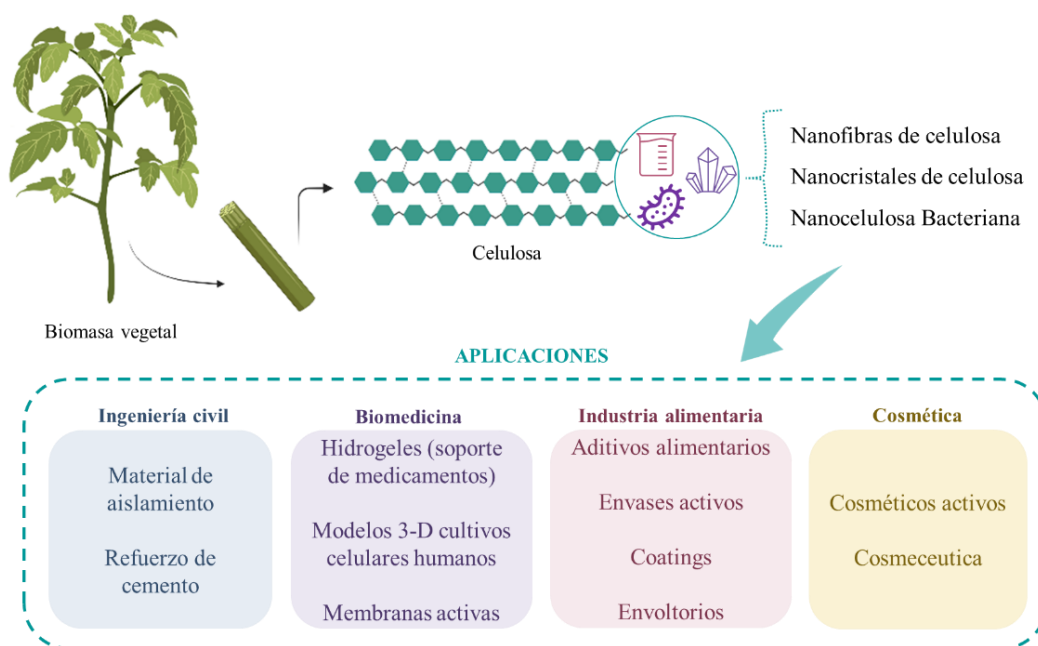


Figura 11. Aplicaciones de nanocelulosa.

5.1. Refuerzo de papel

En los últimos años, debido al aumento de las políticas destinadas al reciclaje, la industria papelería ha incrementado la producción de papel a partir de fibras de celulosa reciclada para producir envases de cartón. Estas fibras recicladas tienen peores propiedades fisicoquímicas que las fibras de celulosa original debido a un efecto conocido como “hornificación” de la fibra. La hornificación es una alteración de las capas externas de la celulosa que se produce en el proceso de secado del papel y durante su exposición a condiciones ambientales, afectando a las propiedades de resistencia del papel. Para mejorarlas, la tecnología más usada por su facilidad de operación y bajo coste es el batido mecánico. Sin embargo, aunque el batido mecánico aumenta la superficie específica, la capacidad de hinchamiento y las propiedades mecánicas de las fibras, también genera un daño estructural a largo plazo, así como la creación de finos. Éstos empeoran las propiedades de drenaje y disminuye la vida útil de estos productos (55).

Debido a estos inconvenientes, existe la posibilidad de usar otras tecnologías para disminuir la pérdida de propiedades mecánicas de los productos reciclados, como la adición de fibra virgen, la adición de productos químicos, o algunas más innovadoras, como el refinado enzimático o la adición de nanofibras de celulosa (56). Las nanofibras de celulosa presentan una elevada superficie específica, en comparación con la fibra original, lo que permite una alta capacidad de

adhesión con las fibras adyacentes, actuando como enlace entre las fibras y favoreciendo un aumento de sus propiedades mecánicas (57).

5.2. Desarrollo de envases alimentarios

Los envases alimentarios desempeñan un papel fundamental en la protección, mantenimiento y mejora de la calidad y la seguridad de los alimentos durante su transporte, distribución y almacenamiento (58). Tradicionalmente, los materiales utilizados para producir envases alimentarios han sido polímeros plásticos de origen petroquímico, siendo los más comunes: tereftalato de polietileno (PET), cloruro de polivinilo (PVC), poliamida (PA), poliestireno (PS), polipropileno (PP), polietileno (PE), etc., además de papel, metal y vidrio. El uso generalizado de estos envases de plástico se debe a una serie de ventajas tecnológicas (propiedades mecánicas, rigidez y flexibilidad, propiedades barrera al oxígeno y la humedad), económicas (bajo coste) y operativas (facilidad de producción) (59,60).

La producción de plásticos se ha multiplicado por 20 en los últimos 50 años y se espera que se duplique en los próximos 20. En 2019, la producción mundial de plástico alcanzó los 380 millones de toneladas. Los envases plásticos alimentarios suponen la principal aplicación de estos materiales, con el 39,7% del volumen total producido (61).

A pesar de los beneficios que los envases plásticos aportan a la industria alimentaria, el uso de estos materiales, no renovables y no biodegradables, plantea serias preocupaciones sobre su impacto medioambiental. Su producción representa alrededor del 6% del consumo mundial de petróleo. Si el crecimiento exponencial actual del uso de plásticos continúa al mismo ritmo, los recursos petrolíferos se agotarán considerablemente (62–65). Además, la salud humana pueden verse afectada negativamente debido a la posibilidad de migración de sustancias químicas de los envases plásticos a los alimentos (59). Por este motivo, se ha desarrollado un interés creciente en la búsqueda de sustitutos adecuados a dichos polímeros (66). El desarrollo y la utilización de recursos biológicos, abundantes y sostenibles, se propone como una de las alternativas a los materiales convencionales (67).

La industria de los biopolímeros representa sólo el 1% de todos los plásticos procesados a nivel mundial, aunque está experimentando un rápido crecimiento, con un aumento del 700% entre 2009 y 2018 (68). El uso de estas fuentes de materiales para la formulación de envases alimentarios está aún en desarrollo. La dificultad consiste en encontrar biopolímeros que presenten propiedades similares o comparables a las utilizadas comercialmente.

El origen de los biopolímeros puede ser natural como el almidón, quitosano, celulosa, etc., y sintético como el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), alcohol polivinílico (PVA), etc. (69). Los biopolímeros sintéticos tienen un potencial para mejorar las propiedades de los envases, como la durabilidad, biodegradabilidad, flexibilidad y alto brillo (70). A pesar de estas ventajas, estos materiales tienen peores propiedades mecánicas, térmicas y barrera, en

comparación con los materiales plásticos convencionales. Con el desarrollo de la nanotecnología, han surgido materiales alternativos para su aplicación en materiales de envasado de alimentos.

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético obtenido mediante la hidrólisis del acetato de polivinilo. Es biodegradable, biocompatible, semicristalino, no tóxico y soluble en agua. Debido a su gran capacidad de establecer puentes de hidrógeno con las superficies hidrofílicas de distintos biomateriales, sus propiedades físicas y ópticas, y su resistencia química, presenta un gran potencial tecnológico. Además, su combinación con otros componentes mejora su rendimiento y propiedades de barrera (71,72).

El ácido poliláctico (PLA) ha cobrado especial interés en los últimos años en su uso como material de envasado de alimentos (73–75). Es un poliéster alifático formado por unidades monoméricas de ácido láctico, derivado de fuentes renovables, biodegradable y biocompatible (76). Debido a sus propiedades mecánicas, térmicas y ópticas, podría sustituir a los polímeros plásticos comerciales como el polipropileno (PP), el poli(tereftalato de etileno) (PET) y el poliestireno (PS) (77,78). Este polímero proporciona rigidez y transparencia cuando se formula en materiales de envasado, aunque su aplicabilidad como material de envasado de alimentos se ve dificultada por su baja barrera al vapor de agua y moderada barrera a los gases (79,80). En este sentido, la adición de LNFC podría mejorar sus propiedades barrera aumentando la cristalinidad y actuando como regiones impermeables (81,82).

El Ecoflex[®] es un copoliéster alifático-aromático formado por monómeros 1,4-butanediol, ácido adípico y ácido tereftálico obtenido a partir de productos petroquímicos. Este material puede biodegradarse a los monómeros básicos 1,4-butanediol, ácido adípico y ácido tereftálico y, finalmente, a dióxido de carbono, agua y biomasa cuando se metaboliza en el suelo o en el compost, con un año de ciclo de vida, aproximadamente (83). Posee un comportamiento hidrofóbico, con gran capacidad de formación de películas, pero su baja estabilidad térmica y escasa resistencia mecánica lo hacen inadecuado para muchas aplicaciones. Por ello, debe combinarse con otros materiales como celulosa, almidón, PLA, etc. Su combinación con materias primas renovables como el PLA puede mejorar sus propiedades como material de envasado de alimentos (84), otorgándole estabilidad térmica, resistencia mecánica, flexibilidad y opacidad

Además, el uso de biomasa procedente de actividades agroalimentarias se propone como una fuente prometedora y sostenible para extraer biopolímeros. Las (ligno)nanofibras de celulosa desempeñan un papel eficaz en el refuerzo de polímeros (85). Este refuerzo se debe a la presencia de grupos hidroxilos aromáticos, que a través de los enlaces de hidrógeno, conducen a una buena interacción entre las matrices poliméricas (52,86,87). Además, se consideran una buena alternativa para desarrollar materiales de envasado de alimentos debido a su abundancia, propiedades mecánicas y barrera (88,89), biocompatibilidad y biodegradabilidad (90) y la posibilidad de modificar sus características químicas (91).

Una de las herramientas utilizadas para el diseño de nuevos envases son los modelos

predictivos. Estos modelos matemáticos permiten detectar posibles situaciones futuras a través de técnicas computacionales. En el caso particular de los modelos cinéticos de crecimiento aplicados en la presente tesis, estudian la evolución de los microorganismos en un medio determinado en función de los factores que los afectan y a partir de los datos obtenidos, predecir lo que sucederá durante el almacenamiento. Los parámetros que controlan el crecimiento microbiano son: la densidad máxima de población, la tasa máxima de crecimiento, la fase de latencia y la concentración de inóculo inicial. Actualmente, el modelo de Baranyi y Roberts es uno de los más utilizados en la microbiología predictiva, que describe el crecimiento como una cinética de primer orden que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población microbiana (92,93).

6. Bibliografía

1. European Commission. Communication from the commission to the european parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions - Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe. Vol. 8, Official Journal of the European Union. 2012. 57-61 p.
2. Naciones Unidas. Desafíos, oportunidades y acciones en un mundo de 7 mil millones. Unfpa. 2011;1(0):1-3.
3. Kaza S, Yao L, Bhada-Tata P, Van Woerden F. What a Waste 2.0 Introduction -"Snapshot of Solid Waste Management to 2050." Overview booklet. Urban Dev Ser [Internet]. 2018;1-38. Disponible en: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317>
4. Global Material Resources Outlook to 2060. Glob Mater Resour Outlook to 2060. 2019;
5. Comisión Europea . Plan de acción para la economía circular. 2020.
6. España G de. Plan de Acción para la Implementación de la Agenda 2030. Hacia una Estrategia Española de Desarrollo Sostenible. Gobierno de España. 2018.
7. Fundación COTEC. Situación y Evolución De La Economía Circular En España [Internet]. 2017. 147 p. Disponible en: <http://cotec.es/media/informe-CotecISBN-1.pdf>
8. Ellen MacArthur Foundation. Towards a Circular Economy: Business rationale for an accelerated transition. [Internet]. 2015. Disponible en: https://www.ellenmacarthurfoundation.org/assets/downloads/TCE_Ellen-MacArthur-Foundation_9-Dec-2015.pdf
9. Birch K. Emergent imaginaries and fragmented policy frameworks in the Canadian bio-economy. Sustain. 2016;8(10).
10. Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. Renew Energy [Internet]. 2012;37(1):19-27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
11. H. V. Lee, S. B. A. Hamid and SKZ. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. Sci World J. 2014;20.
12. BioPlat., SusChem., Ministerio de Economía., Competitividad I y. Manual sobre Biorrefinerías en España. Minist Econ Ind Y Compet. 2017;1-92.

13. Area MC, Vallejos ME. Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor. Editor académica española. 2012;(October 2012):183.
14. Höfte H, Voxeur A. Plant cell walls. *Curr Biol* [Internet]. 2017;27(17):R865-70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.025>
15. Reddy N, Yang Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 2005;23(1):22-7.
16. Prinsen P. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Universidad de Sevilla; 2010.
17. Visakh PM, Thomas S. Preparation of bionanomaterials and their polymer nanocomposites from waste and biomass. *Waste and Biomass Valorization.* 2010;1(1):121-34.
18. Eero Sjöström. The structure of wood. En: SJÖSTRÖM E, editor. *Wood Chemistry.* Second edi. Academic Press; 1993. p. 1-20.
19. Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:263-89.
20. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(1):3-23.
21. Yue Z, Economy J. Carbonization and activation for production of activated carbon fibers. *Activated Carbon Fiber and Textiles.* 2017. 61-139 p.
22. Achparaki M, Thessalonikeos E, Tsoukali H, Mastrogianni O, Zaggelidou E, Chatzinikolaou F, et al. Lignin as Natural Antioxidant Capacity. En: *IntechOpen* [Internet]. 2012. p. 205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00172J>
23. Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 2010;153(3):895-905.
24. The Royal Society. Sustainable biofuels: prospects and challenges. *Sustain biofuels* [Internet]. 2008;(January):1-79. Disponible en: http://royalsociety.org/uploadedFiles/Royal_Society_Content/policy/publications/2008/7980.pdf
25. Sjöström E. Wood chemistry: Fundamentals and Applications. En: *Wood chemistry: Fundamentals and Applications.* Orlando: Academic Press,; 1981. p. 68-82.

26. Roger Samson BM. Strategies to reduce the ash content in perennial grasses. *Bioenergy: Expanding Bioenergy Partnerships*. Canada; 1998.
27. Dufresne A. Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Mater Today* [Internet]. 2013;16(6):220-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>
28. Dufresne A. Chapter 1. Nanocellulose: Potential Reinforcement in Composites. Vol. 2. 2012. 1-32 p.
29. Abdul Khalil HPS, Bhat AH, Ireana Yusra AF. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2012;87(2):963-79. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.078>
30. Siró I, Plackett D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. *Cellulose*. 2010;17(3):459-94.
31. Lavoine N, Desloges I, Dufresne A, Bras J. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2012;90(2):735-64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>
32. Moon RJ, Martini A, Nairn J, Simonsen J, Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. Vol. 40, *Chemical Society Reviews*. 2011. 3941-3994 p.
33. Jozala AF, de Lencastre-Novaes LC, Lopes AM, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Mazzola PG, Pessoa-Jr A, et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(5):2063-72.
34. Abitbol T, Rivkin A, Cao Y, Nevo Y, Abraham E, Ben-Shalom T, et al. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2016;39(I):76-88. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.002>
35. Nechyporchuk O, Belgacem MN, Bras J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2016;93:2-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>
36. T. van de Ven, A. Sheikhi. Hairy cellulose nanocrystalloids: a novel class of nanocellulose. *Nanoscale*. 2016;8:15101–15114.
37. Yang H, Chen D, van de Ven TGM. Preparation and characterization of sterically stabilized nanocrystalline cellulose obtained by periodate oxidation of cellulose fibers.

- Cellulose [Internet]. 2015;22(3):1743-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-015-0584-4>
38. Safari S, Sheikhi A, van de Ven TGM. Electroacoustic characterization of conventional and electrosterically stabilized nanocrystalline celluloses. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2014;432:151-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.061>
 39. Ek, M., Gellerstedt, G. & Henriksson G. *Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 2. Pulp and P.* Monica Ek GG, Henriksson G, editores. Standardization News. *Pulp and Paper Chemistry and Technology*; 2009.
 40. Yue L, Zheng Y, Xie Y, Liu S, Guo S, Yang B, et al. Preparation of a carboxymethylated bacterial cellulose/polyaniline composite gel membrane and its characterization. *RSC Adv.* 2016;6(73):68599-605.
 41. Xie Y, Qiao K, Yue L, Tang T, Zheng Y, Zhu S, et al. A self-crosslinking, double-functional group modified bacterial cellulose gel used for antibacterial and healing of infected wound. *Bioact Mater* [Internet]. 2022;17(January):248-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.018>
 42. Fukuzumi H, Saito T, Iwata T, Kumamoto Y, Isogai A. Transparent and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation. *Biomacromolecules.* 2009;10(1):162-5.
 43. Isogai A, Saito T, Fukuzumi H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale.* 2011;3(1):71-85.
 44. Abdul Khalil HPS, Davoudpour Y, Islam MN, Mustapha A, Sudesh K, Dungani R, et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;99:649-65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>
 45. Nadeem Akhtar, Aanchal, Dinesh Goyal, Arun Goyal. Biodiversity of cellulase producing bacteria and their applications (PDF Download Available). *Cellul Chem Technol.* 2014;(January 2017).
 46. Espinosa, Eduardo, Tarrés, Quim, Delgado-Aguilar, Marc, González, Israel, Mutjé, Pere, Rodríguez A. Suitability of wheat straw semichemical pulp for the fabrication of lignocellulosic nanofibres and their application to papermaking slurries. *Cellulose.* 2015;(November).

47. Quim Tarrés, Eduardo Espinosa, Juan Domínguez-Robles, Alejandro Rodríguez, Pere Mutjé MD-A. The suitability of banana leaf residue as raw material for the production of high lignin content micro / nano fibers : From residue to value-added products. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2017;99:27-33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.021>
48. A. D. Nanocellulose, From Nature to High Performance Tailored Materials. De Gruyter. 2012.
49. Zimmermann T, Pöhler E, Geiger T. Cellulose fibrils for polymer reinforcement. *Adv Eng Mater*. 2004;6(9):754-61.
50. Ho TTT, Abe K, Zimmermann T, Yano H. Nanofibrillation of pulp fibers by twin-screw extrusion. *Cellulose*. 2015;22(1):421-33.
51. Mishra SP, Manent AS, Chabot B, Daneault C. Production of nanocellulose from native cellulose - Various options utilizing ultrasound. *BioResources*. 2012;7(1):422-35.
52. Amara C, El Mahdi A, Medimagh R, Khwaldia K. Nanocellulose-based composites for packaging applications. *Curr Opin Green Sustain Chem* [Internet]. 2021;31:100512. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100512>
53. Ngwabebhoh FA, Mammadli N, Yildiz U. Bioinspired modified nanocellulose adsorbent for enhanced boron recovery from aqueous media: Optimization, kinetics, thermodynamics and reusability study. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2019;7(5):103281. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103281>
54. Thomas B, Raj MC, Athira BK, Rubiyah HM, Joy J, Moores A, et al. Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. *Chem Rev*. 2018;118(24):11575-625.
55. Delgado-Aguilar M, Tarrés Q, Pèlach MÀ, Mutjé P, Fullana-I-Palmer P. Are Cellulose Nanofibers a Solution for a More Circular Economy of Paper Products? *Environ Sci Technol*. 2015;49(20):12206-13.
56. Delgado-Aguilar M. Nanotecnología en el sector papelero: mejoras en calidad y permanencia de las fibras de alto rendimiento y secundarias en una economía circular mediante el uso de nanofibras y el refinado enzimático. Gerona; 2015.
57. Delgado-Aguilar M, González I, Pèlach MA, De La Fuente E, Negro C, Mutjé P.

- Improvement of deinked old newspaper/old magazine pulp suspensions by means of nanofibrillated cellulose addition. *Cellulose*. 2015;22(1):789-802.
58. Han JW, Ruiz-Garcia L, Qian JP, Yang XT. Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2018;17(4):860-77.
59. Sid S, Mor RS, Kishore A, Sharanagat VS. Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2021;115(May):87-104. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.026>
60. Asgher M, Qamar SA, Bilal M, Iqbal HMN. Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Res Int*. 2020;137(August).
61. Plastics – the Facts 2020. An analysis of European plastics production, demand and waste data. [Internet]. 2020. Disponible en: https://www.plasticseurope.org/application/files/8016/1125/2189/AF_Plastics_the_facts-WEB-2020-ING_FINAL.pdf
62. Zhu Y, Romain C, Williams CK. Sustainable polymers from renewable resources. 2016;
63. Thompson RC, Moore CJ, Saal FS, Swan SH. Plastics , the environment and human health : current consensus and future trends. 2010;(2009):2153-66.
64. Mahmood K, Noreen A, Zuber M, Tabasum S. International Journal of Biological Macromolecules Recent developments and future prospects on bio-based polyesters derived from renewable resources : A review. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;82:1028-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.040>
65. Zhu Y, Romain C, Williams CK. Sustainable polymers from renewable resources. *Nature*. 2016;540(7633):354-62.
66. Ahmed T, Shahid M, Azeem F, Rasul I, Shah AA, Noman M, et al. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environ Sci Pollut Res*. 2018;25(8):7287-98.
67. Bilal M, Gul I, Basharat A, Qamar SA. Polysaccharides-based bio-nanostructures and their potential food applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021;176:540-57. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.107>
68. Bioplastics E. 13th European Bioplastics Conference. 2018.

69. Rhim JW, Park HM, Ha CS. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog Polym Sci* [Internet]. 2013;38(10-11):1629-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008>
70. Othman SH. Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. *Agric Agric Sci Procedia* [Internet]. 2014;2:296-303. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.042>
71. Lee KY, Tammelin T, Schulfter K, Kiiskinen H, Samela J, Bismarck A. High performance cellulose nanocomposites: Comparing the reinforcing ability of bacterial cellulose and nanofibrillated cellulose. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012;4(8):4078-86.
72. Chiellini E, Cinelli P, Imam SH, Mao L. Composite films based on biorelated agro-industrial waste and poly(vinyl alcohol). Preparation and mechanical properties characterization. *Biomacromolecules*. 2001;2(3):1029-37.
73. Gürler N, Paşa S, Temel H. Silane doped biodegradable starch-PLA bilayer films for food packaging applications: Mechanical, thermal, barrier and biodegradability properties. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2021;123:261-71.
74. Dow AC. The Sustainability of NatureWorks™ Polylactide Polymers and Ingeo™ Polylactide Fibers a : an Update of the Future Initiated by the 1 st International Conference on Bio-based Polymers. 2004;551-64.
75. Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly (lactic acid) — Mass production, processing, industrial applications and end of life. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;107:333-66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.010>
76. Phattarateera S, Pattamaprom C. Comparative performance of functional rubbers on toughness and thermal property improvement of polylactic acid. *Mater Today Commun* [Internet]. 2019;19(February):374-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.02.012>
77. Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci*. 2004;4(9):835-64.
78. Vink ETH, Davies S. Life Cycle Inventory and Impact Assessment Data for 2014 Ingeo Polylactide Production. 2015;11(3):167-80.
79. Karkhanis SS, Stark NM, Sabo RC, Matuana LM. Water vapor and oxygen barrier

- properties of extrusion-blown poly (lactic acid)/ cellulose nanocrystals nanocomposite films. *Compos Part A* [Internet]. 2018;114(June):204-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.08.025>
80. Xing C, Matuana LM. Epoxidized soybean oil-plasticized poly(lactic acid) films performance as impacted by storage. *J Appl Polym Sci*. 2016;133(12):1-8.
 81. Yu HY, Zhang H, Song ML, Zhou Y, Yao J, Ni QQ. From Cellulose Nanospheres, Nanorods to Nanofibers: Various Aspect Ratio Induced Nucleation/Reinforcing Effects on Polylactic Acid for Robust-Barrier Food Packaging. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(50):43920-38.
 82. Stark NM. Opportunities for cellulose nanomaterials in packaging films: A review and future trends. *J Renew Mater*. 2016;4(5):313-26.
 83. Savadekar NR, Kadam PG, Mhaske ST. Studies on the effect of nano-alumina on the performance properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) composite films. *J Thermoplast Compos Mater*. 2015;28(11):1522-36.
 84. *Plastics B. Biodegradable polymers inspired by nature*. 2013.
 85. Lu J, Wang T, Drzal LT. Preparation and properties of microfibrillated cellulose polyvinyl alcohol composite materials. *Compos Part A Appl Sci Manuf*. 2008;39(5):738-46.
 86. Liu Y, Ahmed S, Sameen DE, Wang Y, Lu R, Dai J, et al. A review of cellulose and its derivatives in biopolymer-based for food packaging application. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2021;112(April):532-46. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.016>
 87. Dubief D, Samain E, Dufresne A. Polysaccharide microcrystals keinforced amorphous poly(/3-hydroxyoctanoate) nanocomposite materials. *Macromolecules*. 1999;32(18):5765-71.
 88. Jose J, Thomas V, Raj A, John J, Mathew RM, Vinod V, et al. Eco-friendly thermal insulation material from cellulose nanofibre. *J Appl Polym Sci*. 2020;137(2):3-7.
 89. Wang J, Gardner DJ, Stark NM, Bousfield DW, Tajvidi M, Cai Z. Moisture and Oxygen Barrier Properties of Cellulose Nanomaterial-Based Films. *ACS Sustain Chem Eng*. 2018;6(1):49-70.
 90. Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *Eur*

- Polym J [Internet]. 2014;59:302-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>
91. Sharip NS, Ariffin H. Cellulose nanofibrils for biomaterial applications. Mater Today Proc [Internet]. 2019;16:1959-68. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.074>
92. Buchanan RL, Whiting RC. Concepts in Predictive Microbiology. 50th Annu Reciprocal Meat Conf [Internet]. 1997;50:93-7. Disponible en: <http://www.meatscience.org/docs/defaultsource/publicationsresources/rmc/1997/concepts-in-predictive-microbiology.pdf?sfvrsn=2>
93. Garre A, Larrosa E, Fernandez PS. Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos Modelos microbiano de. Anu Jóvenes Investig [Internet]. 2016; 9:160-3. Disponible en: <http://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/5909/mmd.pdf?sequence=1>
94. Balköse PD, Can BD. Characterising BOPP Film Using TGA Decomposition Kinetics. 2015; (JANUARY 2014): 0-4.

Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Materiales lignocelulósicos

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado como materiales lignocelulósicos los residuos leñosos agrícolas originados en la producción del tomate (*Solanum lycopersicum*), pimiento (*Capsicum annuum*) y berenjena (*Solanum melongena*), así como los residuos generados (paja) de la producción del trigo (*Triticum spp.*).

Los materiales se limpian y secan a temperatura ambiente, previo a su corte (0,1-1 cm) y almacenado en bolsas de plástico.

1.2. Reactivos

Las matrices poliméricas, polivinil alcohol (PVA) (P.M.: 146,000-186,000 y grado de hidrólisis +99%), ácido poliláctico (PLA) y Ecoflex® (F Blend A1200) fueron suministradas por Sigma Aldrich (España) y BASF (Alemania).

El papel y los films fueron formulados y caracterizados usando los siguientes reactivos: hidróxido de sodio (Panreac, EEUU), Quimizime B (Quimipel, Chile), bromuro de sodio (Honeywell, EEUU), TEMPO (2,2,6,6-Tetrametil-piperidina-1-oxilo) (Sigma Aldrich, España), hipoclorito sódico (Panreac, EEUU), ABTS (Sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Sigma Aldrich, España), cloruro de calcio anhidro (Scharlab, España).

2. Caracterización química de las materias primas y pastas celulósicas

Para la determinación de los tratamientos a los que se someterán las materias primas y los efectos de dichos tratamientos en las mismas, así como sus posibles aplicaciones, se debe realizar una caracterización de estas para conocer su composición química.

En primer lugar, las muestras se muelen en frío utilizando un molino SM 200 de Retsch y posteriormente, se tamizan para clasificar la fracción comprendida entre 0,25 y 0,40 mm, acorde al estándar TAPPI T 264 cm-07. Por último, se secan a temperatura ambiente y se almacenan en bolsas de plástico.

La caracterización se realizó por triplicado siguiendo las normas estandarizadas y los resultados se expresaron en porcentaje sobre base seca.

2.1. Determinación del contenido en extraíbles en sosa

Esta determinación ayuda a conocer el rendimiento del proceso de pasteado, debido a su relación inversamente proporcional con el mismo.

Siguiendo la norma estandarizada TAPPI T 4 wd-75 para la realización de este análisis, en un vaso de precipitado se pesan 2 g secos de la muestra seca y se añaden 100 mL de una solución de

hidróxido sódico (NaOH) al 1%. La suspensión se calienta en un baño termostático a 100°C durante una hora con agitación manual. Posteriormente, la muestra se filtra en una placa del número 2, y se lava con 5 mL de una disolución de ácido acético 2N seguido de 200 mL de agua destilada. La placa que contiene la muestra se seca a 105°C durante 24 h.

El cálculo del contenido total de extraíbles se realiza por diferencia de pesada.

2.2. Determinación del contenido en extraíbles en agua

Esta extracción permite eliminar sales minerales, almidón, proteínas, gomas, taninos, etc., además de hidrolizar polisacáridos para facilitar su solubilización.

Siguiendo la norma estandarizada TAPPI T1 wd-75 para la realización de este análisis, en un vaso de precipitado se pesan 2 g de muestra seca y se añaden 100 mL de agua destilada. La suspensión se calienta en un baño termostático a 100°C durante 3 horas con agitación manual. Posteriormente, la muestra se filtra en una placa del número 2 y lava con 200 mL de agua caliente. La placa que contiene la muestra se seca a 105°C durante 24 h.

El cálculo del contenido total de extraíbles se realiza por diferencia de pesada.

2.3. Determinación del contenido en extraíbles en etanol

Esta extracción permite determinar sustancias no solubles en agua (grasas, aceites, resinas, ceras, etc.), cuyo contenido elevado en la muestra podría provocar precipitaciones de estos durante el proceso de pasteado y blanqueado.

Siguiendo la norma estandarizada TAPPI T 6 wd-73 para la realización de este análisis, se pesan 20 g de muestra seca en un cartucho cilíndrico de papel de filtro. El cartucho con la muestra se introduce en un extractor Soxhlet acoplado a un matraz erlenmeyer con 150 mL de etanol, y refrigeración con agua fría para evitar las pérdidas de solvente. El solvente se lleva hasta su punto de ebullición, el cual se condensa sobre el cartucho para dar lugar a la extracción. El proceso continúa hasta un máximo de 6 horas, o hasta que aparezca coloración del solvente. El matraz erlenmeyer que contiene el extracto se seca a 105°C durante 24 h.

El cálculo del contenido total de extraíbles se realiza por diferencia de pesada.

2.4. Determinación del contenido en lignina

Esta extracción permite diseñar un tratamiento adecuado de blanqueo/deslignificación para cada materia prima. La hidrólisis ácida que se produce durante el tratamiento permite solubilizar los carbohidratos de la muestra, sin alterar la lignina.

Siguiendo la norma estandarizada TAPPI T 222 om-15 para la realización de este análisis, se pesan 0,5 g de muestra seca en un tubo de ensayo y se añaden 5 mL de H₂SO₄ al 72%. La suspensión se calienta en un baño termostático a 30°C durante una hora con agitación manual. Posteriormente, el contenido del tubo de ensayo se transfiere a un bote ISO, añadiendo agua

destilada hasta llegar a un peso de 148,67 g y se autoclava a 121°C durante una hora. A continuación, el contenido del bote ISO se filtra en una placa del número 3, que se seca a 105°C durante 24 h.

El cálculo del contenido de lignina se realiza por diferencia de pesada.

2.5. Determinación del contenido en holocelulosa

Esta extracción permite conocer la aptitud de una materia prima en la producción de pastas celulósicas y extracción de hemicelulosas. La reacción del dióxido de cloro generado *in situ* permite disolver la lignina, sin alterar los carbohidratos.

Siguiendo la norma estandarizada TAPPI T 9 wd-75 para la realización de este análisis, se pesan 5 g de muestra seca en un erlenmeyer y se añaden 160 mL de agua destilada. La suspensión se calienta en un baño termostático a 80°C y se añade 1,5 g de clorito sódico (NaClO₂) y 1 mL de ácido acético glacial concentrado (C₂H₄O₂). Esta operación se repite cada hora hasta observar el blanqueamiento completo de la muestra. A continuación, se filtra el contenido del erlenmeyer en una placa del número 2 y se lava con 50 mL de acetona y 200 mL de agua destilada. La placa con la muestra se seca a 105°C durante 24 h.

El cálculo del contenido de holocelulosa se realiza por diferencia de pesada.

2.6. Determinación del contenido en α -celulosa

Esta extracción permite conocer la aptitud de una materia prima para la producción de pastas celulósicas y nanocelulosas. En esta determinación, la α -celulosa no se degrada en presencia de una solución de hidróxido sódico, mientras que la β -celulosa, γ -celulosa, y las hemicelulosas sí lo hacen.

Siguiendo la norma estandarizada TAPPI T 203 cm-09 para la realización de este análisis, se pesan 3 g de muestra seca, se introducen en un baño termostático a 20°C y se sigue una secuencia de adición de una disolución de hidróxido sódico al 17,5%:

- 15 mL y agitar 1 minuto
- 10 mL y agitar 45 segundos
- 10 mL y agitar 15 segundos, se deja reposar 1 minuto
- 10 mL y agitar durante 2,5 minutos
- 10 mL y agitar 2,5 minutos
- 10 mL y agitar 2,5 minutos
- 10 mL y agitar 2,5 minutos y se deja reposar 30 minutos.
- Adición de 100 mL de agua fría, se agita y se deja reposar 30 minutos.

Posteriormente el contenido se filtra en una placa del número 2 y se lava con 50 mL de ácido acético 2N y agua destilada. La placa con la muestra se seca a 105°C durante 24 h.

El cálculo del contenido de α -celulosa total se realiza por diferencia de pesada.

2.7. Determinación del contenido en cenizas

El contenido en cenizas es la medida de la composición mineral y de otros compuestos inorgánicos de la materia.

Siguiendo la norma estandarizada TAPPI T 211 om-16 para la realización de este análisis, se pesan 2 g de muestra seca en un crisol cerámico y se introducen en un horno de mufla a 575°C durante 3 horas, produciéndose la calcinación del material.

El cálculo del contenido total de cenizas se realiza por diferencia de pesada.

3. **Producción de la pasta celulósica**

El pasteado “a la sosa” se lleva a cabo para hacer más accesibles las fibras a los posteriores pretratamientos y mejorar por tanto el proceso de nanofibrilación. Se considera un proceso medioambientalmente favorable, debido a que se usa NaOH como reactivo, además de las bajas condiciones energéticas. Los materiales lignocelulósicos se pastean bajo las condiciones del proceso Specel[®], en un reactor batch de 15 L (Metrotec S.A., Lezo, España) con una disolución de NaOH al 7% sobre peso seco de materia prima, a 100 °C durante 150 min y con un ratio líquido/sólido de 10/1.

Posteriormente, se procede a una desfibración del material cocido a 1.200 rpm durante 30 min. Una vez desfibrada la pasta, se desintegra pasándola por un Refinador-Desintegrador Sprout-Bauer (Combustion Engineering, Viena, Austria).

El material resultante de la desintegración se vierte sobre el recipiente del tamiz Sommerville, con una luz de malla de 0,4 mm de espesor, y mediante agitación por vibración y un flujo continuo de agua, se consigue separar los materiales incocidos de los desfibrados.

Las fibras procedentes del tamiz contienen una gran cantidad de agua. Por tanto, esta suspensión de fibras se vierte sobre un separador de fibras y agua con una luz de malla de 0,16 mm, donde se retienen las fibras celulósicas y el agua se conduce hacia el desagüe.

Para la eliminación del exceso de agua, la pasta celulósica se introduce en una malla textil con una luz de malla de 0,16 mm, que deja escapar el agua retenida, y se centrifuga durante 5 minutos.

4. **Producción de lignonanofibras de celulosa**

La finalidad de los pretratamientos es facilitar la desintegración de las fibras, así como reducir el consumo energético requerido para la misma. En esta Tesis Doctoral se produjeron lignonanofibras de celulosa a partir de la pasta celulósica obtenida mediante pretratamientos diferentes: mecánica, oxidación mediada por TEMPO y enzimática; seguido de un tratamiento de homogeneización a alta presión.

4.1. Pretratamiento mecánico

La pasta celulósica (10% p/v) se refina en un PFI (Metrotec S.A., Lezo, España), según la

norma ISO 5264-2:2002, hasta obtener el grado de drenaje ($^{\circ}$ SR) cercano al 90° .

4.2. Pretratamiento de oxidación mediado por TEMPO

Este pretratamiento se lleva a cabo siguiendo la metodología descrita por Besbes et al. (1). Se suspenden 10 g de pasta celulósica en 500 mL de agua destilada que contiene disuelto 0,16 g del catalizador TEMPO y 1 g de bromuro de sodio (NaBr). A continuación, se añade una cantidad de suspensión de NaClO (equivalente a 5 mmols/g de celulosa) con agitación continua a temperatura ambiente. Se mantiene el valor del pH a 10,2 con la adición de NaOH 0,5 M hasta que el pH se mantiene estable a dicho valor. Para finalizar la reacción de oxidación, se añaden 100 mL de etanol, y posteriormente se filtran y lavan las fibras varias veces con agua destilada.

4.3. Pretratamiento enzimático

La pasta de celulosa se sometió a un pretratamiento enzimático con el sistema Quimizime B, preparado de enzimas celulíticas modificadas genéticamente, cuyo principal agente activo es la endo-1,4- β -D glucanasa, mostrando una actividad mínima de 84.000 CMU/g. La endoglucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces 1,4-glucosídicos accesibles en las regiones no cristalinas de la celulosa, generando fibras dañadas con nuevos extremos de cadena. En primer lugar, la suspensión de pasta celulósica (5% p/p) se batió previamente a 4.000 revoluciones en un refino PFI. La reacción enzimática se llevó a cabo añadiendo 0,075% de la enzima a la pasta pretratada mecánicamente, a 45°C durante 70 min con agitación constante. Para detener la reacción enzimática, la suspensión se calienta a 90°C durante 15 min para desnaturalizar las enzimas.

4.4. Tratamiento a altas presiones

Las suspensiones de fibras pretratadas, a una concentración del 1%, se pasaron por un homogeneizador de alta presión Panda GEA 2K (GEA Niro, Parma, Italia) como tratamiento de nanofibrilación. La homogeneización a alta presión se realiza a través de 10 ciclos (cuatro ciclos a 300 bares, tres ciclos a 600 bares y tres ciclos a 900 bares) (2). La presión creciente en cada ciclo evita los problemas de obstrucción en el equipo debido al tamaño inicial de las fibras.

5. **Caracterización de las lignonanofibras de celulosa**

5.1. Rendimiento de nanofibrilación

Para determinar el rendimiento de la nanofibrilación, se centrifuga la suspensión de lignonanofibras de celulosa (LNFC) al 0,1% a 10.000 rpm durante 12 minutos. La fracción precipitada, o material no nanofibrilado, se separa del material nanofibrilado y se seca a 100°C durante 24 h.

El rendimiento se calcula siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Peso del sedimento seco}}{\text{Peso de la muestra diluida} \cdot \text{Consistencia (\%)}}\right) \cdot 100$$

5.2. Demanda catiónica

La demanda catiónica (DC) se determina a partir de una adaptación de la metodología de Carrasco et al. (3). En primer lugar, se diluyen 0,20 g secos de LNFC en agua destilada hasta alcanzar 200 g de peso. Una vez homogeneizada la suspensión, se mezclan 10 mL de esta con 25 mL del polímero catiónico poly-DADMAC. Esta mezcla se centrifuga a 4.000 rpm durante 90 min. Una vez centrifugada, se introducen 10 mL del sobrenadante en un detector de cargas de partículas Mütek PCD-05 (BTG). Para la valoración, se añaden volúmenes controlados del polímero aniónico Pes-Na (0,001N) hasta obtener un valor de potencial de 0 mV.

La demanda catiónica se determina de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$DC = \frac{(C_{\text{polyD}} \cdot V_{\text{polyD}}) \cdot (C_{\text{PesNa}} \cdot V_{\text{PesNa}})}{m}$$

donde C_{polyD} y V_{polyD} corresponden a la concentración y el volumen del polímero catiónico Poly-DADMAC ($1 \text{ meq} \cdot \text{L}^{-1}$), respectivamente; C_{PesNa} y V_{PesNa} corresponden a la concentración y el volumen del polímero aniónico PesNa ($1 \text{ meq} \cdot \text{L}^{-1}$), respectivamente; m corresponde al peso seco de LNFC (g).

5.3. Contenido de carboxilos

El contenido de carboxilos (CC) se determina siguiendo la metodología descrita por Besbes et al. (4), mediante titulación conductimétrica. Se suspenden 50-100 mg de LNFC en peso seco en 15 mL de HCl (0,01 M) con el objetivo de intercambiar los cationes Na^+ unidos a los grupos COOH por iones H^+ . A continuación, se valoran las suspensiones con NaOH (0,01 M), añadiendo 0,1 mL de NaOH a las suspensiones de la muestra. Se registra la conductividad, observando una reducción, estabilización y aumento de esta.

El contenido en carboxilos se determina según la siguiente ecuación:

$$CC = \frac{(V_2 - V_1) \cdot [\text{NaOH}]}{m}$$

donde V_2 y V_1 son los volúmenes equivalentes añadidos de la solución de NaOH; $[\text{NaOH}]$ corresponde a la concentración de la solución de NaOH; m corresponde al peso seco de muestra (g).

5.4. Estimación superficie específica y diámetro

Considerando las asunciones y la metodología descrita por Carrasco et al. (5), los valores obtenidos de demanda catiónica y contenido de carboxilos se utilizan para realizar una estimación teórica de la superficie específica (σ_{LNFC}) y diámetro de las lignonanofibras de celulosa (ϕ_{LNFC}). El polímero catiónico Poly-DADMAC utilizado para la determinación de la demanda catiónica, interactúa con las fibras de celulosa mediante mecanismos de adsorción superficial. Este polímero tiene un área específica de $4,87 \cdot 10^{17} \text{ nm}^2/\mu\text{eq}\cdot\text{g}$, sirviendo este para calcular la superficie específica de las LNFC obtenidas (6) según la siguiente ecuación:

$$\sigma_{\text{LNFC}} = (\text{DC} - \text{CC}) \cdot \sigma_{\text{Poly-DADMAC}}$$

donde σ_{LNFC} corresponde a la superficie específica de las LNFC (nm^2/g); DC corresponde a la demanda catiónica ($\mu\text{eq}/\text{g}$); CC corresponde al contenido en carboxilos ($\mu\text{mols}/\text{g}$); $\sigma_{\text{Poly-DADMAC}}$ corresponde a la superficie específica del polímero catiónico ($\text{nm}^2/\mu\text{eq}\cdot\text{g}$).

5.5. Grado de polimerización

Para el cálculo del grado de polimerización (GP) se utiliza el valor de la viscosidad intrínseca (η) obtenido según la norma UNE-57-039-92.

El grado de polimerización (DP) se calcula de acuerdo con las ecuaciones:

$$\text{GP} (< 950): \text{GP} = \frac{\eta_s}{0,42}$$

$$\text{GP} (> 950): \text{GP}^{0.76} = \frac{\eta_s}{2,28}$$

5.6. Longitud

La longitud de las LNFC se calcula a partir del grado de polimerización (GP) utilizando la ecuación propuesta por Shinoda et al. (7):

$$\text{Longitud (nm)} = 4,286 \cdot \text{GP} - 757$$

6. **Otras técnicas analíticas**

6.1. Espectroscopía de infrarrojos en la transformada de Fourier (FTIR)

Es una técnica analítica que permite la identificación de los grupos funcionales que componen la molécula mediante la absorción específica de la radiación infrarroja por parte de esta.

Este análisis se realiza para determinar los posibles cambios en la estructura, la composición química, y los grupos funcionales, durante los procesos de aislamiento de las LNFC. Para ello se utilizó un espectrómetro FT-IR Spectrum Two (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) en el rango de 450-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , recogiendo un total de 40 mediciones (escaneos) por muestra.

6.2. Difracción de Rayos X (DRX)

Es una técnica analítica que permite la identificación de fases de un material cristalino y proporciona información sobre las dimensiones de las celdas unitarias del material.

Este análisis se realizó utilizando un Bruker D8 Discover (Bruker Corporation, Massachusetts, USA) con una fuente monocromática $\text{CuK}\alpha 1$ en un rango angular de 5-50° a una velocidad de barrido de 1,56°/min. Para calcular el índice de cristalinidad (CI), se utiliza el método de Segal et al. (8), siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{CI}(\%) = \left(\frac{I_{200} - I_{\text{am}}}{I_{200}} \right) \cdot 100$$

donde I_{200} corresponde a la intensidad del pico de difracción a $2\theta = 22.5^\circ$ de las regiones cristalinas de la celulosa; I_{am} , corresponde la intensidad mínima del valle entre los picos de los planos 200 y 110 ($2\theta = 16.5^\circ$ and 22.5°) de la región amorfa de la celulosa.

6.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Es una técnica analítica mediante la cual se miden los cambios de masa de una muestra en función de la temperatura.

Es una análisis con especial interés en las aplicaciones de la presenta Tesis Doctoral, debido a que el material será sometido a elevadas temperaturas. En este sentido, la temperatura de degradación de los materiales estudiados debe ser mayor a la temperatura de proceso para evitar la degradación de estos, que daría lugar a la pérdida de las propiedades del material.

La descomposición térmica de la biomasa vegetal ocurre generalmente en tres rangos de temperatura: i) Zona 1 ($T^a \leq 200^\circ\text{C}$), se observa una pequeña disminución del peso de las muestras relacionada con la evaporación y eliminación del agua absorbida y ligada a la fibra (9–11), ii) Zona 2 ($T^a 200\text{-}400^\circ\text{C}$) es donde ocurre la mayor degradación del material correspondiendo a la pirólisis activa de los componentes; iii) Zona 3 ($T^a > 400^\circ\text{C}$) tiene lugar la pirólisis pasiva de los componentes lignocelulósicos, este punto corresponde con la degradación de la lignina y cualquier descomposición de la materia carbonosa (11,12).

El análisis se llevó a cabo utilizando un equipo Mettler Toledo TGA/DSC 1 (Mettler Toledo, Ohio, USA). Las muestras se llevaron desde la temperatura ambiente hasta los 800°C con una

velocidad de calentamiento de 10 °C/min y un flujo de gas nitrógeno de 50 mL/min. Además, se realizó la derivada termogravimétrica (DTG) para analizar la tasa de degradación máxima (T_{\max}) de los materiales.

7. Aplicación en refuerzo de papel

En la presente Tesis Doctoral, una de las aplicaciones de las LNFC estudiadas fue su uso como agente de refuerzo en suspensiones papeleras. Se utilizó LNFC obtenida a partir del residuo leñoso generado de la poda del tomate, pimiento y berenjena mediante pretratamientos mecánicos y TEMPO.

En este caso, se aplicaron sobre papel virgen, utilizándose como sustrato estándar una pasta de papel suministrada por la empresa Smurfit Kappa localizada en Córdoba, España, y se comparó su efecto con el producido por el batido mecánico.

7.1. Refinado PFI mecánico

En primer lugar, el sustrato estándar utilizado fue dispersado en agua a una consistencia del 1,5% en peso por medio de un desintegrador de pasta, sometiéndolo a 3.000 rpm durante 20 min. Las fibras obtenidas fueron filtradas y ajustadas a una consistencia del 10% en peso para su posterior refinado mecánico. Las fibras se refinaron mecánicamente utilizando un refinador PFI (Metrotec S.A., Lezo, España), siendo sometidas a 1.000, 2.000 y 3.000 rpm para estudiar el efecto refuerzo producido mediante el refinado mecánico respecto el refuerzo producido por la adición de las LNFC.

7.2. Dispersión de las lignonanofibras de celulosa en la suspensión papelerá

Se añadieron distintas proporciones de las LNFC (1,5%, 3% y 4,5% p/p) al sustrato estándar. Para ello, el sustrato estándar y las LNFC fueron dispersadas en una suspensión de 1,5% en peso total del sustrato y las LNFC, usando agua de grifo y un desintegrador de pasta a 3.000 rpm durante 60 minutos. Posteriormente se adicionó 0,5% y 0,8% de almidón catiónico y sílice coloidal, respectivamente, calculado sobre el peso seco del total de fibra y se agitó mecánicamente durante 20 minutos.

Resulta necesaria la adición de almidón catiónico debido a que el tamaño de poro de la malla de formación de las hojas de papel no permite retener el material nanométrico (LNFC) durante el proceso de drenaje de la suspensión papelerá. En este sentido, el almidón catiónico es un agente de retención que permite fijar las LNFC en la suspensión papelerá sin comprometer el valor del grado de drenaje de la suspensión. Además, también es necesario añadir sílice coloidal como defloculante para prevenir la floculación y evitar problemas durante la formación de las hojas.

7.3. Grado Schopper–Riegler (°SR)

Mide la capacidad de drenaje de una suspensión de fibra celulósica sobre una malla estándar. Este valor está directamente relacionado con la capacidad de drenaje de las suspensiones papeleras, y se ve afectado por las características superficiales y de hinchazón de las fibras. El análisis se realizó acorde a la norma ISO 5267/1 con un equipo Schopper–Riegler de Metrotec, para determinar el nivel de refinado de las suspensiones de la fibra.

7.4. Formación de las hojas de papel

Se forman de acuerdo con el estándar ISO 5269-2 en un formador de hojas isotrópico (ENJO F-39.71) con un gramaje de 60 g/m².

7.5. Caracterización física de las hojas de papel

7.5.1. *Preparación y acondicionamiento de las hojas de papel*

Antes de proceder a su caracterización y siguiendo la norma TAPPI T402, las hojas de papel obtenidas se acondicionan en una sala a una temperatura (25°C) y humedad relativa (50%) controladas durante 48 horas.

7.5.2. *Gramaje*

Corresponde a la cantidad de masa por unidad de superficie en el plano. Se puede calcular siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Gramaje (m}^2/\text{g)} = \frac{\text{Peso hoja (g)}}{\text{Área del equipo}}$$

donde, Peso hoja (g) corresponde al peso de la hoja constante secada a 100°C; y el área del equipo corresponde al área del formador de hojas (0,0346 m²).

7.5.3. *Espesor*

La medición del espesor se realizó utilizando un micrómetro digital IP65 0–1”, Digimatic, (Mitutoyo, Neuss, Alemania) con una precisión de ± 0,001 mm. Se calcula el valor medio y la desviación estándar de las 5 medidas aleatorias tomadas que representan la totalidad del área de la hoja.

7.5.4. *Porosidad*

Corresponde al porcentaje de espacio vacío que hay entre las fibras que forman la hoja de papel. Se puede calcular utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porosidad (\%)} = 100 \cdot \left(1 - \frac{\rho_{\text{hoja de papel}}}{\rho_{\text{celulosa}}}\right)$$

donde $\rho_{\text{hoja de papel}}$ corresponde a la densidad de la hoja de papel, y ρ_{celulosa} corresponde a la densidad de la celulosa, que se asume como 1,5 g/cm³.

7.6. Caracterización mecánica de las hojas de papel

7.6.1. *Preparación hojas de papel*

Siguiendo el estándar TAPPI T220, las hojas de papel acondicionadas se cortan para obtener las probetas necesarias para los ensayos de propiedades mecánicas.

7.6.2. *Longitud de ruptura*

Es la longitud límite calculada de una probeta de papel de anchura uniforme, en la que, si dicha probeta estuviera suspendida por un extremo, se rompería por su propio peso.

Siguiendo el estándar ISO 1924-2, el ensayo se realizó con el equipo LF Plus (Lloyd Instruments) equipado con una célula de carga de 1 kN. Se mantuvieron constantes las dimensiones de la probeta (150 mm largo x 15 mm ancho) y el espesor fue variable en función de la muestra. Para calcular la fuerza de tracción (kN/m), se divide la fuerza de rotura entre la anchura de la probeta. Los valores fueron calculados por el NexyGen Plus 3[®] del equipo LF Plus teniendo en cuenta la tracción y el área específica.

7.6.3. *Módulo de Young*

Es un parámetro característico de cada material. Determina la relación existente, en la zona de comportamiento elástico del material, entre los incrementos de tensión aplicados en el ensayo de tracción, y los incrementos de deformación longitudinal unitaria en la región plástica de la curva esfuerzo-deformación. Los valores fueron calculados por el software NexyGen Plus 3[®] del equipo LF Plus teniendo en cuenta la tracción soportada y el área específica del ensayo.

7.6.4. *Índice de estallido*

Este ensayo determina la resistencia máxima (kPa) que ejerce una probeta de papel ante una presión creciente. El ensayo se realizó en el analizador de estallido modelo EM-50 (IDMTest) de acuerdo con el estándar ISO 2758.

7.6.5. *Índice de desgarro*

La resistencia al desgarro es la fuerza necesaria para continuar el desgarro de una grieta iniciada por un corte a través del papel, fundamentándose en el diferencial de energía antes y después del análisis. El ensayo se realizó con el instrumento de medición Elmendorf (modelo F53.98401 Frank PTI) de acuerdo con el estándar ISO 1974.

8. Aplicación en formación de films alimentarios

Otra de las aplicaciones de las LNFC fue su uso en la formulación de envases alimentarios. En este caso, se aplicó sobre una matriz polimérica de polivinil alcohol (PVA), y en una matriz polimérica constituida por ácido poliláctico (PLA) y Ecoflex® (polímero biodegradable obtenido a partir de productos petroquímicos).

8.1. Técnicas analíticas comunes en la formación de films y envases alimentarios.

8.1.1. *Propiedades mecánicas*

El análisis de las propiedades mecánicas de los films y envases es muy relevante para determinar su resistencia y durabilidad (13).

En primer lugar, las muestras con un tamaño de 65 × 15 mm, se acondicionaron a 25°C y 50% de humedad relativa durante 48 horas. El espesor de las muestras se midió con un micrómetro digital IP65 0-1", Digimatic, Mitutoyo (Neuss, Alemania).

Para determinar las propiedades mecánicas en términos de la resistencia a la tracción, el módulo de Young y la elongación, se siguió el método ASTM D638 utilizando el equipo Lloyd Instrument LF Plus (AMETEK Measurement & Calibration Technologies Division, Largo, FL, USA) equipado con una célula de carga de 1 kN y aplicando una velocidad de 100 mm/min.

8.1.2. *Actividad antioxidante*

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras se llevó a cabo el análisis ABTS (2, 2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-acido sulfónico). Para la preparación de la solución ABTS (7mM), se diluyeron 38 mg del reactivo ABTS en 10 mL de persulfato potásico (2,45 mM), manteniéndose en oscuridad durante 16 horas. Posteriormente, se preparó una solución de ABTS y etanol:agua (50:50 v/v) hasta obtener una absorbancia de 0,70±0,02 nm a 734 nm.

El análisis se llevó a cabo mezclando 1 cm² del film/envase con 2 mL de la solución ABTS-etanol en una cubeta óptica. Posteriormente se mezcló y dejó en reposo durante 6 minutos, antes de la medición a 734 nm en el espectrofotómetro Lambda 25 UV (PerkinElmer, US) (14,15).

Se usa la siguiente ecuación para determinar la actividad antioxidante (AOP %):

$$AOP = [A_{ABTS6'} - A_{film6'}] / A_{ABTS0'} \cdot 100$$

donde $A_{ABTS6'}$ corresponde a la absorbancia de la solución ABTS-etanol transcurridos los 6 minutos de reacción a 734 nm; $A_{film6'}$ corresponde a la absorbancia de la solución ABTS-etanol en presencia del film/envase transcurridos los 6 minutos de reacción a 734 nm; $A_{ABTS0'}$ corresponde a la absorbancia inicial de la solución ABTS-etanol a 734 nm.

8.1.3. *Permeabilidad al agua*

En el desarrollo de films y envases alimentarios, resulta fundamental que estos provean al alimento de una barrera frente el entorno externo. Estos films y envases deben proteger el alimento, y en este sentido, la permeabilidad al vapor de agua es muy relevante debido al papel que juega la humedad en la vida útil de los alimentos (16,17).

La tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) se determinó gravimétricamente por el método del desecante, siguiendo la norma ASTM E96/E96M-10. El análisis se desarrolla en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad relativa (50%). Se realiza un pesaje periódico del recipiente que incluye la sal desecante (cloruro de calcio anhidro) y la muestra de film o envase analizada. Dicho pesaje se realiza para controlar el aumento de peso de la muestra producido por la transferencia de vapor de agua hacia la sal desecante a través del film/envase. Se utiliza la siguiente ecuación para calcular la permeabilidad al vapor de agua (WVP):

$$WVP = WVTR \cdot x/P_{\text{sat}} \cdot (HR_{\text{ext}} - HR_{\text{int}})$$

donde WVTR corresponde al ratio de transmisión del vapor de agua; x corresponde al espesor del film/envase; HR_{ext} corresponde a la humedad relativa exterior (50%); HR_{int} corresponde a la humedad relativa del interior del recipiente (0%); P_{sat} corresponde a la presión del vapor saturado a la temperatura del análisis.

8.1.4. Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de los films y envases se caracterizaron determinando los espectros de absorción de luz y de transparencia en el rango de 200 a 800 nm, utilizando el espectrómetro Lambda 25 UV. La transparencia y las propiedades de barrera UV se cuantificaron mediante las siguientes ecuaciones (18):

$$\text{Transparencia} = \log T_{660} (\%)/x$$

donde T_{660} (%) corresponde al porcentaje de la transmitancia a 660 nm; x corresponde al espesor del film/envase (mm).

$$\text{Barrera UV} = 100 - (T_{280} (\%)/T_{660} (\%)) \cdot 100$$

donde T_{280} (%) y T_{660} (%) corresponden a los porcentajes de transmitancia a 280 nm y 660 nm, respectivamente.

8.2. Formación de films con PVA

El PVA es un polímero biodegradable con muy buena resistencia química, alta cristalinidad, capacidad para la formación de films, propiedades hidrofílicas y nula toxicidad (19). Este biopolímero tiene un gran potencial como envase alimentario dada su excelente resistencia a la tracción, flexibilidad y propiedades de barrera al oxígeno (20). Sin embargo, debido a la presencia de gran cantidad de grupos hidroxilos, tienen una naturaleza hidrofílica, que en ambientes húmedos provoca la penetración de moléculas de agua a través del film, lo que conlleva un deterioro de las propiedades mecánicas y de las propiedades de barrera al oxígeno (21). Por lo tanto, el uso del PVA como envase alimentario estaría restringido a productos alimentarios asociados a una baja humedad relativa.

Para la aplicación en films alimentarios estudiada en la presente Tesis Doctoral, se utilizó LNFC obtenida a partir del residuo leñoso generado de la poda del tomate, pimiento y berenjena mediante pretratamientos mecánicos y TEMPO.

8.2.1. *Formulación del film*

Se preparó una solución de PVA al 3% con agua destilada, calentándose a 90°C durante 4 horas con agitación mecánica constante. A esta suspensión de polímero PVA se añadieron distintas concentraciones (2, 5 y 7% p/p) de las diferentes LNFC obtenidas. Con el objetivo de conseguir la homogeneidad en las mezclas de polímero y LNFC, se sometieron a agitación mecánica constante durante 4 horas a temperatura ambiente. La formación del film se llevó a cabo siguiendo la metodología *solvent casting*, en la que las suspensiones resultantes se vertieron en placas Petri de polipropileno ($\varnothing = 9$ cm) secándose a temperatura ambiente. El peso seco total de la mezcla fue de 0,35 g.

8.3. Producción de envases de ácido poliláctico (PLA), Ecoflex® y lignonanofibras de celulosa.

El PLA es un polímero biodegradable que, aún presentado buenas propiedades mecánicas, térmicas y ópticas, su aplicación como material de envasado de alimentos es baja debido a su baja barrera al vapor de agua y gases (28,29). Por otro lado, el Ecoflex® es un polímero biodegradable que tiene gran capacidad para la formación de films, pero presenta peores propiedades mecánicas y baja estabilidad térmica. La adición de LNFC podría mejorar las propiedades de estos materiales para la formulación de films alimentarios (30,31).

Para su aplicación en envases alimentarios estudiada en la presente Tesis Doctoral, se empleó LNFC obtenida a partir de paja de trigo mediante pretratamiento enzimático, que se integró en la matriz polimérica de PLA y Ecoflex®.

8.3.1. *Formulación y producción del envase*

Se realizó a escala piloto utilizando diferentes proporciones de PLA (densidad 4032D), Ecoflex® (C1200, punto de fusión 170°C) y LNFC. En primer lugar, se sustituyó el agua presente en la suspensión de LNFC por el plastificante polietilenglicol (PEG) 1.500 g/mol (Millipore Corporation, Alemania). Para ello, el PEG se llevó a fusión (60°C) antes de añadir las LNFC. Una vez añadidas, se aumentó la temperatura con agitación constante hasta conseguir la condensación del agua en las paredes del vaso. Cuando la mayor parte del agua se evaporó, la mezcla se vertió en una placa Petri de vidrio y se secó a 40°C toda la noche.

Previamente, el PLA se modificó haciendo que las cadenas lineales del polímero fueran más ramificadas para obtener un material más amorfo, moldeable y flexible. Esto se consiguió calentando el pellet comercial de PLA hasta el punto de fusión, lo que se llevó a cabo controlando la disminución de la resistencia al flujo del material hasta su estabilización (165°C) mediante el reómetro Pair 0,2 – 150 U/min (Brabender GmbH & Co, Alemania). A continuación, las LNFC, el PEG, el PLA y e- Ecoflex® (pellet comercial) se mezclaron en una extrusora de película multicapa (LabTech Engineering Co. LF-400) utilizando diferentes proporciones de los componentes para obtener distintas formulaciones.

8.3.2. Permeabilidad a los gases

La permeabilidad a los gases se determinó en función de la tasa de transmisión de oxígeno (OTR) y dióxido de carbono (CO₂TR). Previo al análisis, las formulaciones se acondicionaron en un desecador durante 48 horas. El análisis se realizó a 23°C con una humedad relativa del 75%. La OTR se determinó con el analizador de OTR para películas de envase EQ195/ITN: Mocon Ox-tran 2/22L meter (Ametek Mocon, España) según el protocolo ASTM F1927-14; y la CO₂TR se midió con el analizador de CO₂TR para películas de envase CO₂TR EQ22/ITN: Mocon Permatran-C 4/41 MC (Ametek Mocon, España) según el protocolo ASTM F2476-20.

8.3.3. Aplicación de los envases en lechuga fresca cortada

Se evaluaron los distintos envases formulados mediante su aplicación en envasado de lechuga recién cortada simulando condiciones reales de envasado.

El análisis se realiza con lechuga iceberg fresca cortada comercial (*Lactuca sativa* var. *capitata*) almacenada a 4°C hasta el comienzo del análisis. Los envases comerciales de lechuga fresca cortada se abrieron en condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad, y el contenido se recogió en un recipiente de plástico previamente desinfectado.

Se envasaron 50 g de lechuga en los envases formulados (12 x 12 cm), utilizando una termoselladora MSSL 400 (Retractil y Embalaje Pablo S. L., España). La relación peso/volumen resultante fue de 1/3 p/v, siendo equivalente a la relación comercial utilizada para estos productos (250 g en bolsas de 23x30 cm). El número total de muestras por formulación de envase fue de n=50. Las muestras se almacenaron en refrigeración (4°C) durante 10 días, simulando las

condiciones típicas de almacenamiento durante la vida útil de la lechuga fresca cortada.

Los resultados obtenidos de los envases formulados se compararon con el envase comercial de este tipo de producto.

8.3.3.1. Análisis de gases en el espacio de cabeza del envase

Se midieron las concentraciones de oxígeno (%) y dióxido de carbono (%) en el interior del envase durante el almacenamiento del producto a 4°C en diferentes momentos de muestreo (0, 2, 4, 6 y 10 días) utilizando el equipo analizador de gases Dansensor CheckMate 3 (Ametek Mocon, USA). Las mediciones se realizaron a 25°C introduciendo la sonda de medición a través de un septum previamente colocado en la cara externa de la bolsa.

8.3.3.2. Análisis sensorial

La calidad sensorial de la lechuga fresca cortada envasada fue evaluada durante su almacenamiento por un panel sensorial formado por 10 panelistas entrenados del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba (España). Los atributos sensoriales evaluados correspondieron a frescura visual, pardeamiento superficial, deshidratación, presencia de líquido en el interior del envase, y mal olor. Previo al análisis, los panelistas fueron entrenados para permitir una evaluación estandarizada de los atributos sensoriales propuestos, que se basó en definiciones de cada atributo acordadas por los panelistas(34–36).

Los atributos sensoriales se puntuaron con una escala hedónica de 5 puntos, representando el 5 el valor máximo de calidad en cada uno de los atributos y el 1 el valor de peor calidad asociada a dichos atributos.

8.3.3.3. Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se toman asepticamente 25 g de lechuga del interior de los envases, en diferentes momentos de muestreo (0, 2, 4, 6 y 10 días). La muestra se introduce en una bolsa de stomacher con 225 mL de agua de peptona al 0,1% (Oxoid, Reino Unido) , procediéndose posteriormente a la homogenización en stomacher (IUL Instruments, España) a 1.500 rpm durante 60 segundos. Se realizaron diluciones decimales con solución salina al 0,85% a las muestras homogeneizadas y se analizaron para determinar diferentes parámetros microbiológicos. Los parámetros microbiológicos se enumeran siguiendo los métodos estandarizados: bacterias aerobias mesófilas (ISO 4833-1:2013), bacterias ácido-lácticas (ISO 15214 1998), enterobacterias (ISO 21528-2:2017) y *Pseudomonas* spp. (UNE EN ISO 13720-2008).

8.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de comparación de medias (prueba t), un modelo lineal general multivariante y un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar el efecto de la composición de los diferentes films y envases, tanto en las propiedades de los films y envases, como en su aplicación en el envasado del producto alimentario. El análisis estadístico se desarrolló con el software SPSS® versión 25 (IBM Corporation, Nueva York, NY, USA).

9. Bibliografía

1. Besbes I, Alila S, Boufi S. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres : Effect of the carboxyl content. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2011;84(3):975-83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.052>
2. Espinosa, Eduardo, Tarrés, Quim, Delgado-Aguilar, Marc, González, Israel, Mutjé, Pere, Rodríguez A. Suitability of wheat straw semichemical pulp for the fabrication of lignocellulosic nanofibres and their application to papermaking slurries. *Cellulose*. 2015; 23(1); 837-852 .
3. Carrasco F, Mutjé P, Pelach MA. Control of retention in paper-making by colloid titration and zeta potential techniques. *Wood Sci Technol*. 1998;32(September):145-55.
4. Besbes I, Alila S, Boufi S. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2011;84(3):975-83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.052>
5. Carrasco F, Mutjé P, Pelach MA. Refining of bleached cellulosic pulps : characterization by application of the colloidal titration technique. *Wood Sci Technol*. 1996;30:227-36.
6. Espinosa E, Tarrés Q, Delgado-Aguilar M, González I, Mutjé P, Rodríguez A. Suitability of wheat straw semichemical pulp for the fabrication of lignocellulosic nanofibres and their application to papermaking slurries. *Cellulose*. 2016;23(1):837-52.
7. Shinoda R, Saito T, Okita Y, Isogai A. Relationship between length and degree of polymerization of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils. *Biomacromolecules*. 2012;13(3):842-9.
8. Segal, L., J.J Creely, A.E Martin C. C. Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text Res J*. 1959;29:786-94.
9. Yousefi H, Faezipour M, Hedjazi S, Mazhari M. Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibers and fibers / ground cellulose nanofibers of canola straw. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2013;43:732-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.030>
10. Tao P, Zhang Y, Wu Z, Liao X, Nie S. Enzymatic pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from bagasse pulp : Transition of cellulose crystal structure. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2019;214(March):1-7. Disponible en:

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.012>
11. Alemdar A, Sain M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. 2008;99:1664-71.
 12. Zhang H, Nie S, Qin C, Wang S. Removal of hexenuronic acid to reduce AOX formation in hot chlorine dioxide bleaching of bagasse pulp. *Ind Crops Prod.* 2019;128(November 2018):338-45.
 13. Sarwar MS, Niazi MBK, Jahan Z, Ahmad T, Hussain A. Preparation and characterization of PVA/nanocellulose/Ag nanocomposite films for antimicrobial food packaging. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2018;184(July 2017):453-64. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.068>
 14. García A, González M, Spigno G, Labidi J. Lignin as natural radical scavenger . Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. *Biochem Eng J* [Internet]. 2012;67:173-85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.013>
 15. Gonc I, Nunes C, Mendes S, Martins LO, Ferreira P, Coimbra MA. CotA laccase-ABTS / hydrogen peroxide system : An efficient approach to produce active and decolorized chitosan-genipin films. 2017;175:628-35.
 16. Aleksandra R. Nestic SIS. The influence of nanofillers on physical–chemical properties of polysaccharide-based film intended for food packaging. En: *Food Packaging*, Academic Press. 2017. p. 637-97.
 17. Markus Schmid KM. Chapter 11 - Whey Protein-Based Packaging Films and Coatings. En: Hilton C. Deeth NB, editor. *Whey Proteins From Milk to Medicine*. Academic Press; 2019. p. 407-37.
 18. Han JH. Chapter 9 - Edible Films and Coatings: A Review. En: Han JH, editor. *Innovations in Food Packaging* [Internet]. Second. 2014. p. 213-55. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123946010000096>
 19. Zhang H, Wang Q, Li L. Dehydration of water-plasticized poly(vinyl alcohol) systems: Particular behavior of isothermal mass transfer. *Polym Int.* 2009;58(1):97-104.
 20. Rudra R, Kumar V, Kundu PP. Acid catalysed cross-linking of poly vinyl alcohol (PVA) by glutaraldehyde: effect of crosslink density on the characteristics of PVA membranes

- used in single chambered microbial fuel cells. *RSC Adv.* 2015;5(101):83436-47.
21. Paralikar SA, Simonsen J, Lombardi J. Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanocrystal barrier membranes. *J Memb Sci.* 2008;320(1-2):248-58.
 22. Gürler N, Paşa S, Temel H. Silane doped biodegradable starch-PLA bilayer films for food packaging applications: Mechanical, thermal, barrier and biodegradability properties. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2021;123:261-71.
 23. Dow AC. The Sustainability of NatureWorks™ Polylactide Polymers and Ingeo™ Polylactide Fibers a : an Update of the Future Initiated by the 1 st International Conference on Bio-based Polymers. 2004;551-64.
 24. Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly (lactic acid) — Mass production, processing, industrial applications and end of life. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;107:333-66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.010>
 25. Phattarateera S, Pattamaprom C. Comparative performance of functional rubbers on toughness and thermal property improvement of polylactic acid. *Mater Today Commun* [Internet]. 2019;19 (February):374-82. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.02.012>
 26. Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci.* 2004;4(9):835-64.
 27. Vink ETH, Davies S. Life Cycle Inventory and Impact Assessment Data for 2014 Ingeo Polylactide Production. 2015;11(3):167-80.
 28. Karkhanis SS, Stark NM, Sabo RC, Matuana LM. Water vapor and oxygen barrier properties of extrusion-blown poly (lactic acid)/ cellulose nanocrystals nanocomposite films. *Compos Part A* [Internet]. 2018;114(June):204-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.08.025>
 29. Xing C, Matuana LM. Epoxidized soybean oil-plasticized poly(lactic acid) films performance as impacted by storage. *J Appl Polym Sci.* 2016;133(12):1-8.
 30. Yu HY, Zhang H, Song ML, Zhou Y, Yao J, Ni QQ. From Cellulose Nanospheres, Nanorods to Nanofibers: Various Aspect Ratio Induced Nucleation/Reinforcing Effects on Polylactic Acid for Robust-Barrier Food Packaging. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(50):43920-38.

31. Stark NM. Opportunities for cellulose nanomaterials in packaging films: A review and future trends. *J Renew Mater*. 2016;4(5):313-26.
32. Savadekar NR, Kadam PG, Mhaske ST. Studies on the effect of nano-alumina on the performance properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) composite films. *J Thermoplast Compos Mater*. 2015;28(11):1522-36.
33. Plastics Basf. Biodegradable polymers inspired by nature. 2013.
34. Koseki S, Isobe S. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *Int J Food Microbiol*. 2005;104(3):239-48.
35. Kretschmar U. LWT - Food Science and Technology Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2009;42(3):686-93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>
36. Oliveira M, Wijnands L, Abadias M, Aarts H, Franz E. Pathogenic potential of Salmonella Typhimurium DT104 following sequential passage through soil, packaged fresh-cut lettuce and a model gastrointestinal tract. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2011;148(3):149-55. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.013>

Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la valorización de diversos residuos agroindustriales mediante la obtención y caracterización de lignonanofibras de celulosa (LNFC) y su aplicación en suspensiones papeleras y desarrollo de envases alimentarios.

Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral se detallan a continuación:

- 1) Estudio de la idoneidad los residuos lignocelulósicos de tomate, pimiento y berenjena, como nuevas fuentes para la producción de lignonanofibras de celulosa (LCNF) y su aplicación como agente de refuerzo del cartón. Este objetivo se desarrolla mediante procesos respetuosos con el medio ambiente, energéticamente sostenibles y con bajo consumo de reactivos químicos, tanto para la obtención de las pastas celulósicas como posteriormente las lignonanofibras de celulosa. Las pastas celulósicas obtenidas se caracterizaron y se utilizaron para la producción de LCNF. Las LCNF se caracterizaron y se aplicaron para la mejora de las propiedades mecánicas durante la formación del cartón, comparándose con el batido mecánico industrial (**Publicación I**).

- 2) Estudio del efecto del pretratamiento y la concentración de LCNF procedentes de la residuos leñosos de la poda de tomate, pimiento y berenjena en una matriz polimérica (PVA). Para la consecución de este objetivo se estudió el efecto sobre las propiedades mecánicas, la cristalinidad, la resistencia térmica, la estructura química, la actividad antioxidante, las propiedades de barrera y las propiedades ópticas en los films desarrollados con potencial aplicación en el envasado de alimentos (**Publicación II**).

- 3) Diseño de un prototipo de envase alimentario novedoso y ecológico, combinando ácido poliláctico (PLA), Ecoflex® y LNFC procedentes de la paja de trigo. Para la consecución de este objetivo se estudió el efecto sobre las propiedades mecánicas, la cristalinidad, la resistencia térmica, la estructura química, la actividad antioxidante, las propiedades de barrera al vapor de agua y gases, y las propiedades ópticas. Además, para la validación del prototipo en un entorno alimentario, se realizó un estudio de la idoneidad de éste mediante el envasado de un producto vegetal (**Publicación III**).

Resultados y discusión

Chapter 1: Horticultural Plant Residues as New Source for Lignocellulose Nanofibers Isolation: Application on the Recycling Paperboard Process

Isabel Bascón-Villegas ^{1,2}, Eduardo Espinosa ¹, Rafael Sánchez ³, Quim Tarrés ⁴,
Fernando Pérez-Rodríguez ² and Alejandro Rodríguez ¹

¹ Chemical Engineering Department, Bioagres group, Universidad de Córdoba, 14014 Córdoba, Spain; a.rodriiguez@uco.es

² Department of Food Science and Technology, Universidad de Córdoba, 14014 Córdoba, Spain; b42perof@uco.es

³ Technological Institute of Packaging, Transport and Logistic (ITENE), 46980 Paterna, Spain; rafael.sanchez@itene.com

⁴ Group LEPAMAP, Department of Chemical Engineering, Universidad de Girona, 17071 Girona, Spain; joaquimagusti.tarres@udg.edu

Article published in:

Molecules 2020, 25, 3275
Doi:10.3390/molecules25143275

1. Abstract

Horticultural plant residues (tomato, pepper, and eggplant) were identified as new sources for lignocellulose nanofibers (LCNF). Cellulosic pulp was obtained from the different plant residues using an environmentally friendly process, energy-sustainable, simple, and with low-chemical reagent consumption. The chemical composition of the obtained pulps was analyzed in order to study its influence in the nanofibrillation process. Cellulosic fibers were subjected to two different pretreatments, mechanical and TEMPO (2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyl)-mediated oxidation, followed by high-pressure homogenization to produce different lignocellulose nanofibers. Then, LCNF were deeply characterized in terms of nanofibrillation yield, cationic demand, carboxyl content, morphology, crystallinity, and thermal stability. The suitability of each raw material to produce lignocellulose nanofibers was analyzed from the point of view of each pretreatment. TEMPO-mediated oxidation was identified as a more effective pretreatment to produce LCNF, however, it produces a decrease in the thermal stability of the LCNF. The different LCNF were added as reinforcing agent on recycled paperboard and compared with the improving produced by the industrial mechanical beating. The analysis of the papersheets' mechanical properties shows that the addition of LCNF as a reinforcing agent in the paperboard recycling process is a viable alternative to mechanical beating, achieving greater reinforcing effect and increasing the products' life cycles.

Keywords: lignocellulose nanofibers; horticultural residues; paperboard; recycling.

2. Introduction

The 21st century industrial revolution boosted changes in methods of production and consumption thanks to several factors, such as technological development, globalization of markets and resources, availability of energy, etc. In terms of development and welfare, the linear economic system had been beneficial. However, this model, based on taking, making, and discarding [1], is not compatible with the limited resources and capacity to adapt to environmental impact [2]. As a consequence, nowadays, modern societies are affected by an alarming resource depletion and overproduction of materials which are very difficult to manage. As an alternative, it is proposed that the system takes a regenerative approach, using “the circular economy” concept, with the aim of keeping the resource value, and restricting the raw materials and energy inputs. This is generally known as the “bioeconomy”.

The bioeconomy is an economic system in which biomass is converted into value-added materials [3], such as chemicals [4], food and feed, and fuels and energy [5,6], among others. It is based on two assumptions: i) The biomass is not being totally exploited, its main destination being soil protection, animal feed, burning, composting and silage; and ii) the use of the biomass could be

improved. This can be attained by a product valorization and a more efficient use of the agricultural residues mentioned, extracting more energy and byproducts from them, and decreasing both the cost of agricultural production and the spread of pests and greenhouse gas (GHG) emissions. In addition, the biomass application could be improved, increasing the process yields through innovative technological solutions [7].

The lignocellulosic biomass from agro-industrial activity provides cheap raw materials for the extraction of biopolymers, such as cellulose, hemicellulose, and lignin. Some advantages of these vegetal fibers are their natural abundance, low density, high specific stiffness, and biodegradability [8].

In recent years, with the rise of recycling policies, the paper industry has increased the production of paper from recycled cellulose fiber to produce cardboard packaging. These fibers have poorer physicochemical properties than the original cellulose fiber due to the hornification effect of the fiber. This effect is an alteration of the external layers of the cellulose that occurs in the drying process of paper and during its exposure to the environment, affecting the resistance properties of the paper. Mechanical beating is the most widely used technology at the industrial level, due to its cost and simplicity, to improve the properties of the recycled products that require it. However, even though the mechanical beating increases the specific surface area, swelling capacity, and mechanical properties of the fibers, there is also long-term structural damage and the creation of fines, thus reducing the drainage properties and life span of these products [9]. There are other technologies for dealing with the loss of mechanical properties of recycled products, such as the addition of virgin fiber, the addition of chemical products, or some more innovative ones, such as enzymatic refining or the addition of cellulose nanofibers [10]. Cellulose nanofibers present a high specific surface, compared to the original fiber, which allows a high adhesion capacity with adjacent fibers, acting as a link between fibers and favoring an increase in their mechanical properties [11].

Spain is the largest producer of vegetables in Europe, with a total of 12,629,447 tonnes in 2018, representing over 14% of total European production. In Spain, three of the most representative products are tomatoes, peppers, and eggplants which constitute 37.73%, 10.15%, and 1.89% of the vegetable production, respectively [12]. This production involves the generation of a high amount of waste that needs to be managed properly for its use in the production of high value-added products. The valorization of the lignocellulosic residues from these crops has been studied by several authors as a raw material to produce compost [13], biogas [14], particleboards [15], and cellulosic pulp for paperboard [16].

The aim of this work was to study the suitability of biomass residues from tomato, pepper, and eggplant as new sources for lignocellulosic nanofibers (LCNF) production and their application as a paperboard reinforcing agent. Cellulose pulps were obtained using an environmentally friendly process, energy-sustainable, simple, and with low-chemical reagent consumption. The

obtained pulps were physicochemical characterized and used for LCNF production by mechanical and TEMPO-mediated oxidation pretreatment followed by high-pressure homogenization treatment. The LCNF obtained was submitted to a physical-chemical characterization and used to improve the mechanical properties during the paperboard formation and compared with industrial mechanical beating.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

The greenhouse residues of tomato (*Solanum lycopersicum*), pepper (*Capsicum annuum*), and eggplant (*Solanum melongena*) were used in this work, which corresponded to the entire plants being completely uprooted from the ground (this allows for planting seeds for a new crop), after harvesting the fruits. These greenhouse residues were provided by Aguadulce Cooperative from Aguadulce, Almería (Spain). First, vegetable materials were cleaned and dried at room temperature. Then, they were cut into pieces of 0.1–1 cm and stored in plastic bags for preservation until use. As the paperboard substrate, a suspension of cellulose fiber from recycled paper and cardboard was used. This was not subjected to any mechanical refining, or the addition of chemicals or virgin fiber cellulose. This suspension was kindly supplied by the firm Smurfit Kappa Container 100 S.L. (Mengíbar, Jaén, Spain).

3.2. Soda Pulping

The soda pulping process is carried out to make the cellulose fiber more accessible for the pretreatments performed, also to improve the efficiency of the nanofibrillation process. The raw materials were pulped, according to proper conditions of Specel[®] process, in a 15 L batch reactor (Metrotec S.A., Lezo, Spain) with 7% NaOH over dried material (o.d.m) at 100 °C for 150 min and a liquid/solid ratio 10/1. The cellulosic pulp was dispersed in a pulp disintegrator (Metrotec S.A., Lezo, Spain) at 1200 rpm for 30 min, and this disintegrated pulp was passed through a Sprout-Bauer beater (Combustion Engineering, Vienna, Austria). The pulp suspension was separated by sieving through a 0.14 mm mesh to retain uncooked material [17,41].

3.3. Pulp Characterization

The chemical characterization of raw materials and cellulosic pulps was done in terms of their content in ethanol extractables, ash, holocellulose, lignin, and α -cellulose, according to TAPPI standards T-204, T-211, T-222, T-203os61, and T-9m54, respectively. In addition, the pulping yield was calculated according to Equation (1):

$$Yield (\%) = \frac{W_1}{W_0} \cdot 100 \quad (1)$$

where W_1 corresponds to the dry weight of the samples after removing the uncooked material and W_0 corresponds to the initial dry weight of raw materials.

3.4. Lignocellulose Nanofibers (LCNF) Production

Lignocellulose nanofibers were produced from the obtained cellulosic pulp by using two different pretreatments: mechanical and TEMPO-mediated oxidation, followed by high-pressure homogenization treatment.

3.4.1. *Mechanical Pretreatment*

The cellulosic pulp was refined in PFI beater (Metrotec S.A., Lezo, Spain), according to ISO 5264-2:2002, until obtaining the drainage degree ($^{\circ}\text{SR}$) closest to 90° . For all samples, 30,000 revolutions were required to obtain the above $^{\circ}\text{SR}$ value.

3.4.2. *TEMPO-Mediated Oxidation Pretreatment*

The cellulosic fibers were subjected to TEMPO-mediated oxidation pretreatment following the methodology described by Besbes et al. [42]. An amount of NaClO suspension (equivalent at 5 mmols/g cellulose) was added with continuous stirring at room temperature. Then, the pH value was maintained at 10.2 with the addition of 0.5 M NaOH until no pH decrease was observed. Finally, the fibers were filtered and washed several times with distilled water.

3.4.3. *High-Pressure Homogenization*

Both pretreated fibers suspensions (1% concentration) were passed through a high-pressure homogenizer Panda GEA 2K (GEA Niro, Parma, Italy) as nanofibrillation treatment. The high-pressure homogenization was made through 10 cycles (four cycles at 300 bar, three cycles at 600 bar, and three cycles at 900 bar) [24]. This increasing pressure avoids problems of clogging in the equipment because of the initial fiber size. Table 1 shows the codification used for the different samples.

Table 1. Codification of the different lignocellulose nanofibers.

Raw Material	Pretreatment	Treatment	Codification
Tomato	Mechanical	High-pressure homogenization	TM-LCNF
	TEMPO-mediated oxidation		TT-LCNF
Pepper	Mechanical		PM-LCNF
	TEMPO-mediated oxidation		PT-LCNF
Eggplant	Mechanical		EM-LCNF
	TEMPO-mediated oxidation		ET-LCNF

3.5. LCNF Characterization

To determine the nanofibrillation yield, a 0.1% LCNF suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 12 min. The precipitated fraction or non-nanofibrillar material was separated from the nanofibrillar material, and it was dried at 100 °C for 24 h [42].

The cationic demand (CD) was determined through the adaptation of the methodology followed by Carrasco et al. [43]. First, 0.20 dried grams of LCNF were diluted in distilled water until 200 g. When the suspension was homogenized, 10 mL of this solution was mixed with 25 mL of a cationic polymer (poly-DADMAC). The suspension was centrifuged at 4000 rpm for 90 min. Then, 10 mL of supernatant was introduced to a Mütek PCD 05 particle charge detector and back-titrated with the anionic polymer (PesNa) until the detector indicated zero conductivity. The CD was determinate according to Equation (2):

$$CD = \frac{(C_{polyD} \cdot V_{polyD}) \cdot (C_{PesNa} \cdot V_{PesNa})}{m} \quad (2)$$

where C_{polyD} and V_{polyD} correspond to Poly-DADMAC concentration and volume, respectively; C_{PesNa} and V_{PesNa} correspond to PesNa concentration and volume, respectively; and m is the weight of the dried product (g).

According to the methodology of Besbes et al. [42], the carboxyl content (CC) was determined by conductometric titration. First, 50–100 mg of dry fiber was suspended in 15 mL of HCl (0.01 M) to exchange the Na^+ cations attached to COOH groups by H^+ ions. Then, the suspensions were titrated with NaOH (0.01 M), adding 0.1 mL of NaOH to the sample suspensions and recording the conductivity, observing a reduction, stabilization and increase in the conductivity. The CC was determined according to the Equation (3):

$$CC = \frac{(V_2 - V_1) \cdot [NaOH]}{m} \quad (3)$$

where V_2 and V_1 are the equivalent volumes of added NaOH solution; $[NaOH]$ corresponds to NaOH solution concentration and m stands for the weight of the dried product (g).

Considering the assumptions and methodology described by Carrasco et al. [44], the obtained values of the cationic demand and carboxyl content were used for the theoretical estimation of the specific surface (σ_{LCNF}) and diameter of the LCNF.

The cationic polymer (Poly-DADMAC) used for the cationic demand determination interacts with cellulose fibers through surface adsorption mechanisms. The Poly-DADMAC has a specific area of $4.87 \times 10^{17} \text{ nm}^2/\mu\text{eq} \cdot \text{g}$; based on this value, the specific surfaces of the LCNF obtained were calculated according to Equation (4) [39]:

$$\sigma_{LCNF} = (CD - CC) \cdot \sigma_{Poly-DADMAC} \quad (4)$$

where σ_{LCNF} is the specific surface of LCNF (nm^2/g); CD is the cationic demand ($\mu\text{eq}/\text{g}$); CC is the carboxyl rate ($\mu\text{mols}/\text{g}$); and $\sigma_{\text{Poly-DADMAC}}$ corresponds to the specific surface of this cationic polymer ($\text{nm}^2/\mu\text{eq}$).

Assuming the cylindrical geometry of the LCNF, the value of the specific surface was used to determine its diameter.

All measurements were made in triplicate and mean, and standard deviations were calculated.

3.6. Polymerization Degree and Length

The intrinsic viscosity (η) was obtained according to UNE-57-039-92 and used for the calculation of the degree of polymerization. The degree of polymerization (DP) was calculated using Equations (5) and Equation (6) [45]:

$$DP (< 950): DP = \frac{\eta_s}{0.42} \quad (5)$$

$$DP (> 950): DP^{0.76} = \frac{\eta_s}{2.28} \quad (6)$$

The length of the nanofibers was calculated from the polymerization degree (DP) using the Equation (7) proposed by Shinoda et al. [46]:

$$\text{Length (nm)} = 4.286 \cdot DP - 757 \quad (7)$$

3.7. Spectroscopy Analysis

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was applied to determine possible changes in the structure, chemical composition, and functional groups during LCNF isolation processes. A Spectrum Two FT-IR Spectrometer (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) was used in the range of $450\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ with a resolution of 4 cm^{-1} , collecting a total of 40 scans per sample.

3.8. X-ray Diffraction (XRD) Analysis

XRD was used to study the crystal structures of the cellulosic pulps and LCNF. This analysis was performed using a Bruker D8 Discover (Bruker Corporation, Massachusetts, USA) with a monochromatic source $\text{CuK}\alpha 1$ over an angular range of $5\text{--}50^\circ$ at a scan speed of $1.56^\circ/\text{min}$. The Segal method was used to calculate the crystallinity index (CI)(Equation (8)) [47]:

$$CI(\%) = \left(\frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

where I_{200} is the diffraction peak intensity at $2\theta = 22.5^\circ$ of the crystalline cellulose regions, and I_{am} , is the intensity minimum between two diffraction peaks ($2\theta = 16.5^\circ$ and 22.5°) of the amorphous cellulose region.

3.9. Thermogravimetric Analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed to evaluate the thermal stability of the LCNF. The derivative thermogravimetric (DTG) was used to analyze the maximum degradation rate (T_{max}). The analysis was carried out using a Mettler Toledo TGA/DSC 1 (Mettler Toledo, Ohio, USA). The samples were taken from room temperature to 800°C with a heating rate of $10^\circ\text{C}/\text{min}$ and a $50\text{ mL}/\text{min}$ nitrogen gas flow rate.

3.10. Reinforcement of Industrial Pulp

LCNF was used as a reinforcing agent on a paperboard industrial pulp (Smurfit Kappa) and compared its effect with that produced by mechanical beating. The industrial cellulose pulp was submitted at different mechanical refining intensities (1000 rev, 2000 rev, and 3000 rev). Lignocellulose nanofibers (mechanical and TEMPO) of tomato, pepper, and eggplant were added at 1.5%, 3%, and 4.5% (o.d.m.) to the industrial cellulose suspension. The process started disintegrating 30 g dry weight pulp for 30 min. Then, LCNF was added in the established proportion and disintegrated for 1 h. After that, 0.5% (w/w) cationic starch (Vector SC 20157) and 0.8% (w/w) colloidal silica (LUDOX[®] HS-40) were added to improve the retention of LCNF by improving the bonding of the fibers, based on the dry weight of the pulp and LCNF and kept in constant mechanical agitation. The papersheet formation was carried out in a sheet former ENJO-F-39.71 (Metrotec S.A., Lezo, Spain) according to TAPPI T205ps-95. Before the mechanical testing, the papersheets were conditioned at 25°C and 50% relative humidity for 48 h. The mechanical characterization was performed using an Instron universal testing machine (Lloyd Instruments, Bognor Regis, United Kingdom) provided with 1 kN load cell, in terms of breaking length and tensile index, elongation, Burst index, and tear index, according to TAPPI standard (T-494-om96, T-494, T-403-om97 and T-414-om98, respectively). The physical properties of the papersheets were analyzed for their thickness, density, and porosity. The thickness was determined according to the standard ISO 534. The density was calculated from the weight of the sheets and their dimensions. The porosity of the sheets was calculated using Equation (9):

$$Porosity (\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\rho_{sample}}{\rho_{cellulose}}\right) \quad (9)$$

where ρ_{sample} is the density of the sheet, and $\rho_{cellulose}$ is the density of cellulose, assumed as $1.5\text{ g}/\text{cm}^3$.

4. Results and Discussion

4.1. Chemical Composition of Raw Materials and Obtained Cellulosic Pulps

The first objective of this study is the production of cellulose pulps from horticultural plant residues (tomatoes, peppers, eggplants), which was accomplished by subjecting the raw materials to a soft conditions' soda pulping process. This treatment has previously been successfully applied to produce cellulosic pulps with optimal characteristics for the isolation of lignocellulose nanofibers from herbaceous biomass [17]. The yields from the pulping process were 25.73%, 24.76%, and 20.50% for eggplant, pepper, and tomato plants, respectively.

Figure 1 shows the differences in the chemical composition of the raw materials and that presented by the cellulosic pulps obtained. How the non-structural components (extractables and ashes) are reduced almost entirely after treatment is observed. The cellulose fraction was purified, especially in cellulosic pulps from tomatoes and pepper plants, increasing from 20.9% and 27.91% to 66.4% and 56.77%, respectively. In the case of eggplant, this important purification does not take place, however, and unlike the rest, an increase in the content of hemicellulose up to 30.35% was produced. The hemicellulose content is of special interest in the production of cellulose nanofibers through mechanical treatments acting as a barrier against the aggregation of the fibrillated microfibers. Chaker et al. determined that a hemicellulose content 25% produces a yield twice as high as that presented by fibers with 12% hemicellulose content [18]. The lignin content in the cellulosic pulp is high in comparison with other agri-residues used for lignocellulose nanofiber production [17,19–21]. Lignin acts as binding agent in the lignocellulosic matrix, promoting integrity and impeding its deconstruction. Despite its high lignin content, the pulping process may break ether and ester linkages between lignin and carbohydrates (cellulose and hemicellulose), allowing fiber defibrillation [22]. In addition, the presence of lignin in the fiber can exert an antioxidation action during nanofibrillation, preventing the union of links already broken during nanofibrillation treatment [23].

The crystallinity structure of the different cellulose pulps was analyzed by the X-ray diffraction technique (Figure 2). It is possible to observe two major reflection peaks at $2\theta = 16.1^\circ$ and 22.5° , corresponding to 110 and 200 typical reflection planes of cellulose I. The crystallinity index shows values of 31.24%, 44.16%, and 53.21% for eggplant, pepper, and tomato plants, respectively. The crystallinity index (CI) values shown by the cellulosic pulps are low compared to those shown by purified cellulose [20]. This is due to the presence of amorphous components, mainly lignin and hemicellulose, in fiber. These values coincided with the lower values of cellulose in fiber for eggplant and pepper pulp and, therefore, higher contents of hemicellulose and lignin.

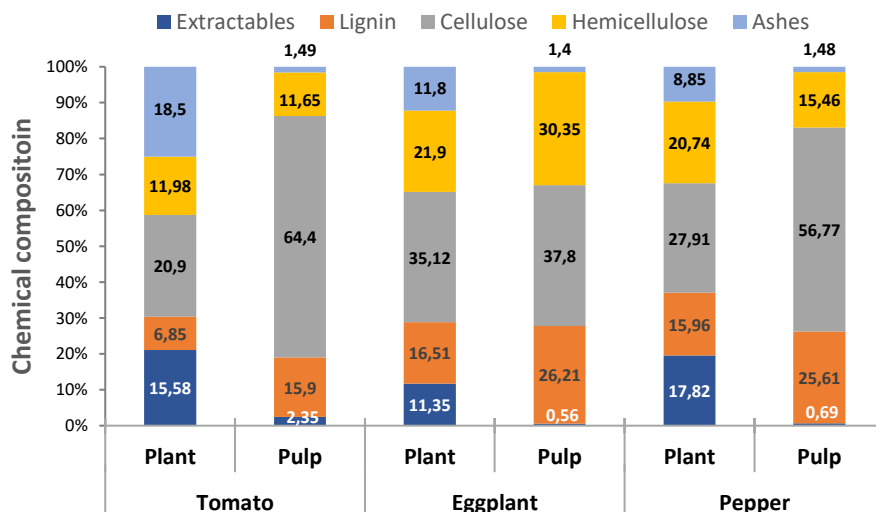


Figure 1. Chemical composition of horticultural plant residues and cellulosic pulps.

Figure 2. XRD patterns of horticultural residues pulps.

4.2. Lignocellulose Nanofiber Characterization

In order to investigate the effect of the chemical composition of cellulosic pulps and of the different pretreatments on the production of lignocellulose nanofibers, the LCNF obtained were characterized in terms of nanofibrillation yield, cationic demand, carboxyl content, and morphology (Table 2). In general, it is observed that LCNF obtained by TEMPO-mediated oxidation presents a higher nanofibrillation yield (49–70%) compared to those obtained by mechanical pretreatment (18–33%). The nanofibrillation yields of LCNF obtained by mechanical pretreatment are similar to those presented by other cellulose nanofibers produced by the same process [24–28], however, those obtained by TEMPO-mediated oxidation show a slightly lower yield than those shown by other authors, which usually exceed 90% [29–31]. This behavior is also observed in the cationic demand where the TEMPO-oxidized LCNF present considerably higher values of cationic demand. This is mainly due to the greater specific surface (σ_{LCNF}) that

these nanofibers present in comparison with those obtained by means of mechanical pretreatment. This greater specific surface results in a greater exposure of the -OH and -COOH groups of the surface of the nanofibers, resulting in higher cationic demand. Regarding the carboxyl content, a slight increase is observed after catalytic oxidation. These values are very low in comparison with other nanofibers obtained by TEMPO-mediated oxidation that present carboxyl content values of 600–1000 $\mu\text{mol}/\text{g}$ [26,29–31] This is due to the conversion of primary C6 alcohol groups from the surface of the crystalline regions of the cellulose into carboxyl groups produced during pretreatment. In this case, the low crystallinity, and the high presence of lignin (which may partially or totally consume the NaClO used as a catalytic reaction activator), means that this conversion is not as effective as for bleached pulps.

Regarding the morphology, some differences are observed between the different pretreatments. The diameters obtained vary significantly between the TEMPO-oxidized LCNF and those obtained by mechanical pretreatment. On the one hand, the nanofibers obtained by TEMPO-mediated oxidation show very similar diameter values (12–17 nm) despite the differences shown in the chemical composition. However, in LCNF obtained by mechanical pretreatment, large differences were observed between the different raw materials. It is observed that for LCNF obtained mechanically from eggplant residues, show much smaller diameter than the rest. This is due to their high hemicellulose content, which acts as a key component in the nanofibrillation process [18]. The nanometric size of the LCNF was confirmed by direct observation by SEM (Figure 3). It is observed how significant differences exist between the different pretreatments, observing in the case of those obtained mechanically a large proportion of non-nanofibrillated macro/microfibers, as indicated by their low nanofibrillation yield compared to TEMPO-oxidized LCNF. Regarding the length of the lignocellulose nanofibers, a generalized decreased is observed after catalytic oxidation, showing a decrease of 60.07%, 55.94%, and 53.60% for the LCNF obtained from eggplant, pepper, and tomato plants. It is produced by the depolymerization and β -elimination of the cellulose amorphous regions into gluconic acid or cellulose-derived small fragments [32].

Table 2. Characterization of the different lignocellulose nanofibers.

LCNF Sample	η (%)	CD ($\mu\text{eq}/\text{g}$)	CC ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	σ_{LCNF} (m^2/g)	Diameter (nm)	Length (nm)
TM-LCNF	17.81 ± 2.59	298.39 ± 48.30	247.35 ± 6.14	24.86	112	5440
PM-LCNF	18.34 ± 3.37	166.46 ± 0.00	148.71 ± 1.66	8.64	278	4317
EM-LCNF	32.61 ± 3.48	248.30 ± 10.89	127.25 ± 3.99	58.95	42	5132
TT-LCNF	48.77 ± 1.30	707.86 ± 18.54	299.96 ± 48.76	198.65	12	2524
PT-LCNF	69.66 ± 6.11	513.37 ± 37.23	205.81 ± 5.86	148.78	17	1902
ET-LCNF	66.39 ± 1.52	563.38 ± 37.06	186.61 ± 63.78	183.48	14	2049

η : nanofibrillation yield; CD: Cationic demand; CC: Carboxyl content; σ_{LCNF} : Specific surface area of LCNF.

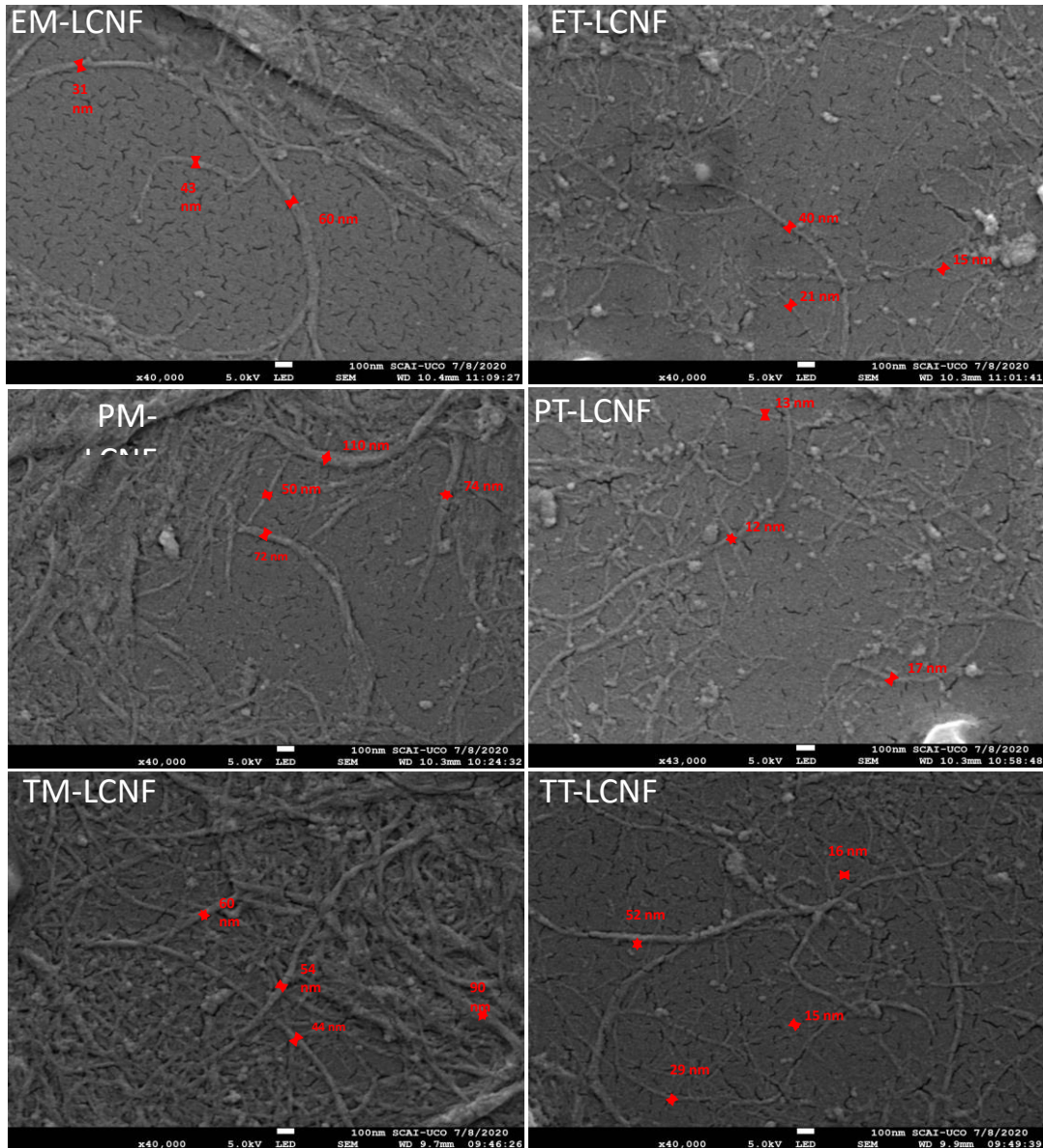


Figure 3. SEM microphotography of the different LCNF.

Figure 4 shows the effect of the different pretreatments on the crystallinity of the lignocellulose nanofibers. In the different patterns crystalline reflection peaks are observed in the planes (110) and (200) as in the case of the cellulose pulps, indicating that LCNF also presents a crystalline structure typical of cellulose I. These observations suggest that the crystalline structure of the fiber is maintained after the different pretreatments and the nanofibrillation treatment. Both pretreatments present similar values for the different lignocellulose nanofibers (56%–60%), all higher than the initial values shown in the cellulose pulps. This may be due to the degradation of the amorphous regions by the action of both pretreatments, maintaining the crystalline regions of cellulose and increasing the crystallinity index of the samples [32].

Figure 4. XRD patterns of LCNF obtained by mechanical (a) and TEMPO-oxidation (b) pretreatments.

The thermal stability of the cellulose nanofibers is also an important parameter to study their suitability in their final application. Figure. 5 shows the thermal behavior of the different cellulose nanofibers. The analysis of the different curves, identifies that the thermal decomposition is carried out in three zones, indicating the presence of distinct components decomposing at different temperatures. The first zone (up to 200 °C), shows a small decrease in the weight of samples related to the evaporation and removal of absorbed and bounded water in fiber [33–35]. The second zone (200–400 °C) corresponds to the active pyrolysis of the lignocellulosic components and is where the main degradation of the samples, including the maximum degradation temperature (T_{max}) shown by the DTG curve. In the third zone (temperature above 400 °C) the passive pyrolysis of the lignocellulosic components takes places, where the low degradation ratio stands out and is identified with the lignin degradation and any carbonaceous matter decomposition [35,36].

The main peak observed in the DTG analysis (Figure 5b,d) shows the temperature where the thermal degradation is maximum, known as T_{max} . The analysis shows that the cellulose nanofibers obtained by mechanical pretreatment show very similar values, being these 356.2 °C, 355.5 °C, and 357.5 °C for eggplant, pepper, and tomato plants. A similar behavior is observed for the lignocellulose nanofibers obtained by TEMPO-mediated oxidation, where they show a very similar value, being 308.8 °C, 317.8 °C, and 306.5 °C for eggplant, pepper and tomato, respectively. The lower stability shown by TEMPO-oxidized nanofibers is due to two main factors: i) The higher specific surface that results in a larger surface area exposed to heat; and ii) the introduction of carboxyl groups on the surface that produces a high number of free ends [24].

Figure 5. TGA and DTG curves of mechanical **(a,b)** and TEMPO-oxidation **(c,d)** LCNF.

4.3. Lignocellulose Reinforcement on Recycled Paperboard

The recycling process subjects the fibers to dispersion-drying cycles that reduce the binding capacity of the fibers, hornification process and, therefore, the mechanical properties shown by the final products. To correct this decrease, the industry uses different processes in order to increase the union between fibers, such as mechanical beating and the addition of chemical or virgin fiber [9]. The reinforcement effect on the recycled paperboard suspension of the lignocellulose nanofibers obtained in this work was compared with the effect produced by mechanical beating in order to analyze the suitability of the addition of LCNF as an alternative to mechanical beating. Figure 6 shows the evolution of the mechanical properties (breaking length, Young's modulus, tear index, and burst index) of recycled paperboard after the different treatments. In a generalized way, it is observed how both treatments, mechanical beating and LCNF addition, produce an increase in the mechanical properties compared to the values obtained from the original recycled fiber (baseline). The mechanical properties shown by the original recycled fiber were 2726 m for breaking length, 0.73 GPa for the Young's modulus, 26.71 Nm/g for the tear index, and 1.42 KN/g for the burst index. A linear increase is observed as the intensity of the mechanical refining of the amount of LCNF added increases, obtaining the highest values

at the most severe conditions (3000 rev and 4.5% LCNF). The addition of LCNF produces a similar increase to the mechanical beating in breaking length and tear index parameters, however, it produces a more pronounced reinforcing effect on the Young's modulus and burst index. The differences in the reinforcing effect were analyzed depending on the raw material used to produce lignocellulose nanofibers. In general terms, it is observed that the addition of LCNF produces a similar effect regardless of the raw material used. Regarding the pretreatment, it is observed that there are no major differences in the reinforcing effect between LCNF obtained by mechanical or TEMPO-mediated oxidation pretreatment. Although all LCNF produce a similar effect, the reinforcement produced by TEMPO-oxidized nanofibers from eggplant residue (ET) stands out. The addition of 4.5% ET produces an increase of 30.63%, 53.42% 19.88%, and 62.68%, compared to 16.18%, 11.00%, 16.21%, and 36.62% produced by mechanical beating for the breaking length, Young's modulus, tear index, and burst index, respectively.

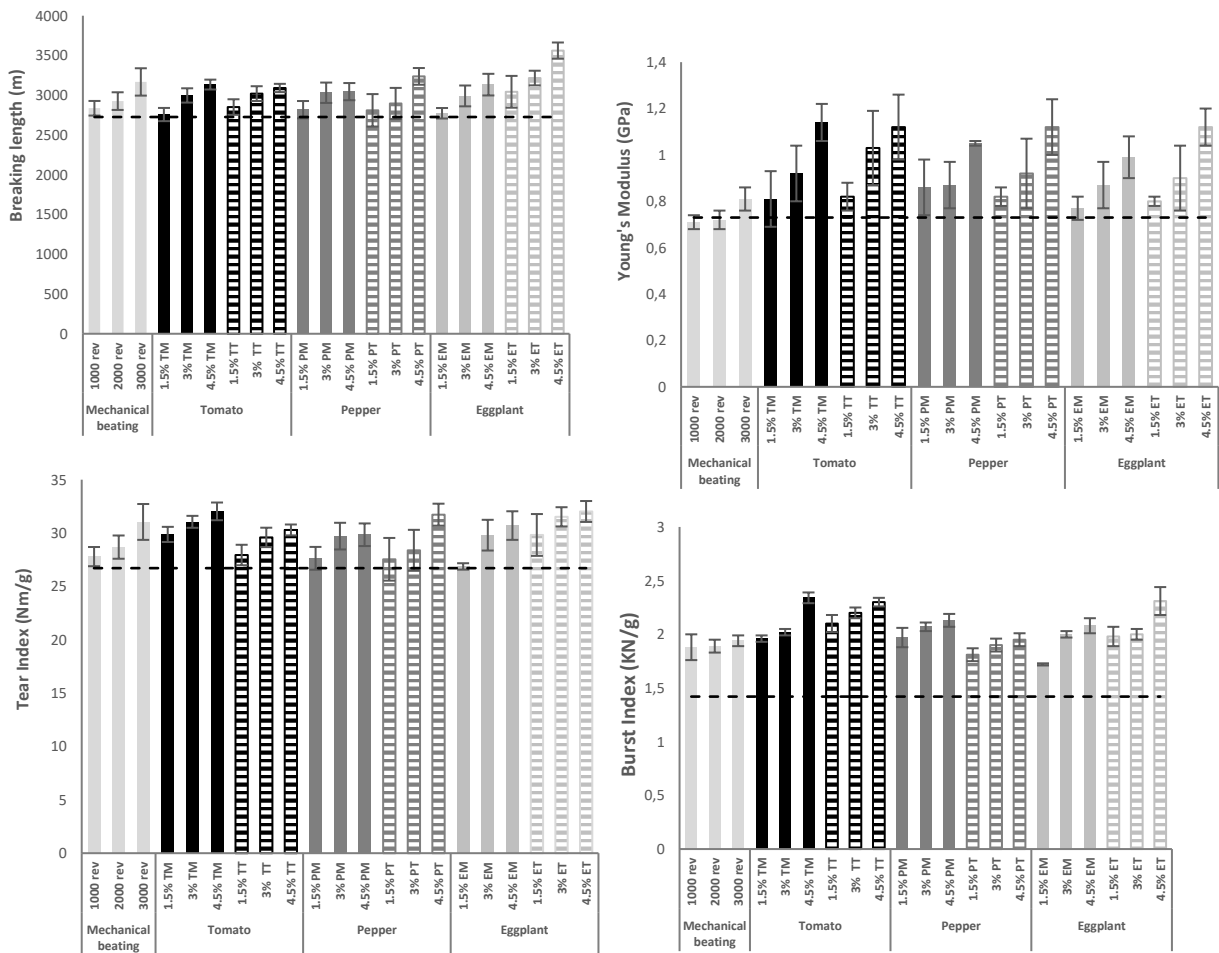


Figure 6. Evolution of the mechanical properties of recycled paperboard after different treatments.

The increase in Elongation at break was also analyzed (Figure 7). For this parameter, as with the other mechanical properties, a linear increase is observed as the treatment becomes more severe, and the reinforcement effect is more effective with the addition of LCNF than with mechanical beating.

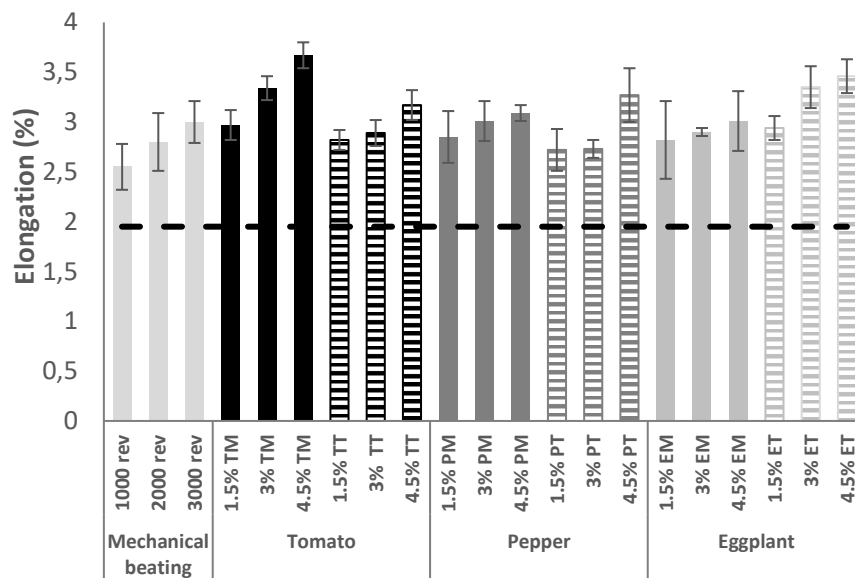


Figure 7. Evolution of the elongation at break of recycled paperboard after different treatments.

The increase in the mechanical properties due to the different treatments is given by: i) the increase in the specific surface area of fibers which facilitate the bonding with adjacent fibers produced by the mechanical beating, or ii) the generation of a network embedded between the paperboard substrate fibers and the LCNF added, increasing the bonding capacity and facilitating the interfiber bonding [37].

The industrial paperboard presents a breaking length value of 5656 m. Considering that in the industrial papermaking process formation is produced in an isotropic way, it is necessary to perform a conversion of the isotropic-anisotropic values to compare them with those obtained in an anisotropic laboratory papersheet former. For this, the anisotropic ratio of 1.65 is considered, obtaining that the industrial cardboard shows a breaking length value of 3443 m [38]. According to the data obtained, under the conditions studied in this work, only the addition of 4.5% ET would reach this value (3561 m), fully correcting the loss of the mechanical properties during the recycling process. The use of LCNF, in addition to producing a greater reinforcing effect, would make it possible to increase the recycling cycles of the same fibers from three to 10 or more [37]. The low number of recycling cycles limit when using mechanical beating is due to the structural damages caused by the effect of shearing during the beating. Previous studies have confirmed that

the use of this technology can be energy-efficient depending on the nanofibrillation treatment [38]. This phenomenon also explains the increase in density compared to untreated recycled paperboard, as well as the decrease in the porosity.

The influence of the different treatments on the evolution of the physical properties was also analyzed, as shown in Table 3. A decrease in thickness is observed as the severity of the different treatments increases. This is due to the greater bonding strength between the adjacent fibers, resulting in greater compaction of the fibrillar network [39]. These observations are more intense in the addition of LCNF compared to those shown by the mechanical beating treatment. This is due to the fact that in addition to the higher bonding strength, the nanometric size of the LCNF allowing them to fill the gaps between the fiber matrix, increasing the density and decreasing the porosity [39].

Table 3. Evolution of the physical properties of recycled paperboard after different treatments.

Treatment	Sample	Thickness (μm)	Density (g/cm^3)	Porosity (%)
	Recycled paperboard	150.3 ± 2.9	0.36 ± 0.01	75.55 ± 0.79
Mechanical beating	1000 rev	147.8 ± 6.5	0.37 ± 0.01	75.10 ± 1.01
	2000 rev	147.2 ± 8.0	0.38 ± 0.02	74.93 ± 1.49
	3000 rev	146.8 ± 6.6	0.38 ± 0.01	74.75 ± 0.91
Tomato LCNF	1.5% TM	139.9 ± 4.2	0.39 ± 0.01	73.72 ± 0.93
	3% TM	136.6 ± 3.8	0.40 ± 0.02	73.06 ± 1.61
	4.5% TM	134.9 ± 2.7	0.41 ± 0.02	72.72 ± 1.38
	1.5% TT	142.4 ± 5.4	0.39 ± 0.01	74.53 ± 0.57
	3% TT	142.6 ± 1.9	0.39 ± 0.03	74.23 ± 0.74
	4.5% TT	138.4 ± 4.3	0.40 ± 0.02	73.38 ± 1.63
Pepper LCNF	1.5% PM	136.0 ± 4.9	0.40 ± 0.01	72.94 ± 1.34
	3% PM	134.2 ± 7.6	0.41 ± 0.02	72.82 ± 0.69
	4.5% PM	133.1 ± 5.6	0.41 ± 0.02	72.78 ± 0.72
	1.5% PT	147.5 ± 3.0	0.38 ± 0.02	75.08 ± 1.42
	3% PT	147.8 ± 2.1	0.38 ± 0.03	74.86 ± 1.06
	4.5% PT	147.4 ± 5.3	0.39 ± 0.01	74.04 ± 0.36
Eggplant LCNF	1.5% EM	146.0 ± 3.9	0.38 ± 0.01	74.91 ± 0.78
	3% EM	145.3 ± 4.5	0.39 ± 0.02	74.00 ± 1.83
	4.5% EM	138.7 ± 9.2	0.40 ± 0.02	73.43 ± 1.54
	1.5% ET	143.7 ± 8.1	0.38 ± 0.01	74.94 ± 0.83
	3% ET	146.7 ± 4.4	0.38 ± 0.02	74.51 ± 1.23
	4.5% ET	144.5 ± 6.1	0.39 ± 0.01	74.37 ± 0.66

Figure 8 Shows the evolution of the drainage properties of the paperboard slurries after the addition of the different LCNF. As expected, the addition of lignocellulose nanofibers, due to their specific surface area and their hydrophilic nature, results in a high water-holding capacity, thus increasing the viscosity of the suspension and decreasing the drainage capacity of the slurries. The mechanical beating treatment, due to the large generation of fines during the process, also produces a decrease in the drainage capacity showing a drainage degree of 47°SR, 49°SR, and 54°SR for 1000 rev, 2000 rev, and 3000 rev, respectively. These values are lower compared to those obtained by the addition of LCNF; however, this property is not a key parameter when evaluating the suitability of this technology for use in the recycling paperboard industry since this property can be corrected by the combination of nanofibers and electrolytes [40].

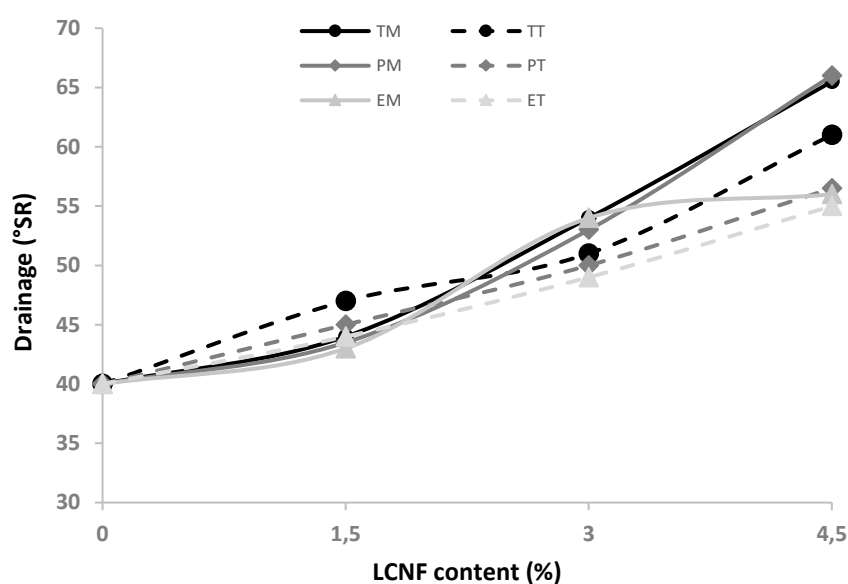


Figure 8. Evolution of drainability properties of cardboard suspension with different LCNF amount.

5. Conclusions

Horticultural plant residues, as lignocellulosic source for the isolation of lignocellulose nanofibers, were analyzed. The cellulosic pulps obtained were subjected to two different pretreatments, mechanical and TEMPO-mediated oxidation, and a subsequent high-pressure homogenization process for lignocellulose nanofiber isolation. The different LCNF were added as a reinforcing agent on recycled paperboard and compared with the improvement produced by industrial mechanical beating. The addition of 4.5% TEMPO-oxidized LCNF from eggplant residues produces the greater increase in comparison with the other LCNF. It produces an increase of 30.63%, 53.42%, 19.88%, and 62.68%, compared to 16.18%, 11.00%, 16.21%, and 36.62% produced by mechanical beating for breaking length, Young's modulus, tear index, and burst index, respectively. The use of LCNF produces a decrease in the papersheet thickness and

porosity, and an increase in the density. This is due to the greater bonding strength between the adjacent fibers and the gap filling resulting in greater compaction of the fiber matrix. The use of LCNF in the paperboard recycling process as an alternative to mechanical beating produces a greater reinforcing effect and would make it possible to increase the recycling cycles of same fibers from three to 10 or more.

6. References

1. Ellen MacArthur Foundation, Towards a Circular Economy: Business rationale for an accelerated transition., 2015. Available online: https://www.ellenmacarthurfoundation.org/assets/downloads/TCE_Ellen-MacArthur-Foundation_9-Dec-2015.pdf. (accessed on 13 April 2020)
2. Fundación COTEC, Situación y Evolución De La Economía Circular En España, 2017. Available online: <http://cotec.es/media/informe-CotecISBN-1.pdf>. (accessed on 22 April 2020)
3. European Commission, Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe, (2012). Available online: <https://ec.europa.eu/research/bioeconomy/index.cfm> (accessed on 22 April 2020)
4. Sheldon, R.A. Chemicals from renewable biomass: A renaissance in carbohydrate chemistry. *Green Sustain Chem* 2018, 14, 89–95.
5. Teja, K; Sowlati, T. Biomass logistics: A review of important features, optimization modeling and the new trends. *Renew Sustain Energy Rev* 2018, 94, 587–599.
6. Pang, S. Advances in thermochemical conversion of woody biomass to energy, fuels and chemicals, *Biotechnol Adv* 2019, 37, 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.004>.
7. European Commission, Sustainable Agriculture, Forestry and Fisheries in the Bioeconomy. A Challenge for Europe. 4th SCAR Foresight Exercise, 2015. Available online: http://ec.europa.eu/research/scar/pdf/feg4-draft-15_may_2015.pdf (accessed on 22 April 2020)
8. M. George, M. Chae, D. C. Bressler. Composite materials with bast fibers : Structural , technical , and environmental properties. *Prog Mater Sci* 2016, 83, 1–23.

9. M. Delgado-Aguilar, Q. Tarrés, M.À. Pèlach, P. Mutjé, P. Fullana-I-Palmer. Are Cellulose Nanofibers a Solution for a More Circular Economy of Paper Products? *Environ Sci Technol* 2015, 49, 12206–12213.
10. Delgado-Aguilar, M. Nanotecnología en el sector papelerero: mejoras en calidad y permanencia de las fibras de alto rendimiento y secundarias en una economía circular mediante el uso de nanofibras y el refinado enzimático; University of Girona: Girona, Spain, 2015.
11. M. Delgado-Aguilar, I. González, M. A. Pélach, E. De La Fuente, C. Negro. Improvement of deinked old newspaper/old magazine pulp suspensions by means of nanofibrillated cellulose addition. *Cellulose* 2015, 22, 789–802.
12. Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018. Available online: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx> (accessed on 23 April 2020)
13. M. Toledo, P. Márquez, J.A. Siles, A.F. Chica, M.A. Martín. Co-composting of sewage sludge and eggplant waste at full scale: Feasibility study to valorize eggplant waste and minimize the odoriferous impact of sewage sludge. *J Environ Manage* 2019, 247, 205–213.
14. K. Hamraoui, A. Gil, H. El Bari, J.A. Siles, A.F. Chica, M.A. Martín. Evaluation of hydrothermal pretreatment for biological treatment of lignocellulosic feedstock (pepper plant and eggplant). *Waste Manage* 2020, 102, 76–84.
15. E. Guntekin, B. Karakus. Feasibility of using eggplant (*Solanum melongena*) stalks in the production of experimental particleboard. *Ind Crop Prod* 2008, 27, 354–358.
16. C. Covino, A. Sorrentino, P. Di Perro, G. Roscigno, A.P. Vece, P. Masi. Lignocellulosic fibers from enzyme-treated tomato plants: Characterisation and application in paperboard manufacturing. *Int J Biol Macromol* 2020, 161, 787–796.
17. E. Espinosa, R. Sánchez, R. Otero, J. Domínguez-Robles, A. Rodríguez. A comparative study of the suitability of different cereal straws for lignocellulose nanofibers isolation. *Int J Biol Macromol* 2017, 103, 990–999.
18. A. Chaker, S. Alila, P. Mutje, M. Rei, V. Sami. Key role of the hemicellulose content and the cell morphology on the nanofibrillation effectiveness of cellulose pulps. *Cellulose* 2013, 20, 2863–2875.

19. A. Mandal, D. Chakrabarty. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. *Carbohydr Polym* 2011, 86, 1291–1299.
20. M.D. Alotaibi, B.A. Alshammari, N. Saba, O.Y. Alothman, M.R. Sanjay, Z. Almutairi, M. Jawaid. Characterization of natural fiber obtained from different parts of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.). *Int J Biol Macromol* 2019, 135, 69–76.
21. K. Rajan, A. Djioleu, G. Kandhola, N. Labbé, J. Sakon, D.J. Carrier, J.W. Kim. Investigating the effects of hemicellulose pre-extraction on the production and characterization of loblolly pine nanocellulose. *Cellulose* 2020, 8, 3693–3706.
22. M. El Achaby, N. El Miri, A. Aboulkas, M. Zahouily, E. Bilal, A. Barakat, A. Solhy. Processing and properties of eco-friendly bio-nanocomposite films filled with cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse. *Int J Biol Macromol* 2017, 96, 340–352.
23. E. Rojo, M.S. Peresin, W.W. Sampson, I.C. Hoeger, J. Vartiainen, J. Laine, O.J. Rojas. Comprehensive elucidation of the effect of residual lignin on the physical, barrier, mechanical and surface properties of nanocellulose films. *Green Chem* 2015, 17, 1853–1866.
24. E. Espinosa, R. Sánchez, Z. González, J. Domínguez-Robles, B. Ferrari, A. Rodríguez. Rapidly growing vegetables as new sources for lignocellulose nanofiber isolation: Physicochemical, thermal and rheological characterisation. *Carbohydr Polym* 2017, 175, 27–37.
25. Q. Tarrés, N. Pellicer, A. Balea, N. Merayo, C. Negro, A. Blanco, M. Delgado-Aguilar, P. Mutjé. Lignocellulosic micro/nanofibers from wood sawdust applied to recycled fibers for the production of paper bags. *Int J Biol Macromol* 2017, 105, 664–670.
26. R. Sánchez, E. Espinosa, J. Domínguez-robles, J. Mauricio, A. Rodríguez. Isolation and characterization of lignocellulose nanofibers from different wheat straw pulps. *Int J Biol Macromol* 2016, 92, 1025–1033.
27. Q.Tarrés, E. Espinosa, J. Domínguez-Robles, A. Rodríguez, P. Mutjé, M. Delgado-Aguilar. The suitability of banana leaf residue as raw material for the production of high lignin content micro/nano fibers : From residue to value-added products. *Ind Crop Prod* 2017, 99, 27–33.
28. Q. Tarrés, N. Vanesa, M. Evangelina, M. Cristina, M. Delgado-aguilar, P. Mutjé. Lignocellulosic nanofibers from triticale straw: The influence of hemicelluloses and lignin in their production and properties. *Carbohydr Polym* 2017, 163, 20–27.

29. Q. Tarrés, M. Delgado-Aguilar, M.A. Pèlach, I. González, S. Boufi, P. Mutjé. Remarkable increase of paper strength by combining enzymatic cellulose nanofibers in bulk and TEMPO-oxidized nanofibers as coating. *Cellulose* 2016, 23, 3939–3950.
30. A. Serra, I. González, H. Oliver-Ortega, Q. Tarrés, M. Delgado-Aguilar, P. Mutjé. Reducing the amount of catalyst in TEMPO-oxidized cellulose nanofibers: Effect on properties and cost. *Polymers (Basel)* 2017, 9, 557.
31. Q. Tarrés, S. Boufi, P. Mutjé, M. Delgado-Aguilar. Enzymatically hydrolyzed and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers for the production of nanopapers: morphological, optical, thermal and mechanical properties. *Cellulose* 2017, 24, 3943–3954.
32. X. Sang, C. Qin, Z. Tong, S. Kong, Z. Jia. Mechanism and kinetics studies of carboxyl group formation on the surface of cellulose fiber in a TEMPO-mediated system. *Cellulose* 2017, 24, 2415–2425.
33. H. Yousefi, M. Faezipour, S. Hedjazi, M. Mazhari. Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibers and fibers/ground cellulose nanofibers of canola straw. *Ind Crop Prod* 2013, 43, 732–737.
34. P. Tao, Y. Zhang, Z. Wu, X. Liao, S. Nie. Enzymatic pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from bagasse pulp: Transition of cellulose crystal structure. *Carbohydr Polym* 2019, 214, 1–7.
35. Alemdar, A; Sain, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. *Bioresour Technol* 2008, 99, 1664–1671.
36. H. Zhang, S. Nie, C. Qin, S. Wang. Removal of hexenuronic acid to reduce AOX formation in hot chlorine dioxide bleaching of bagasse pulp. *Ind Crops Prod* 2019, 128, 338–345.
37. S. Boufi, I. González, M. Delgado-Aguilar, Q. Tarrés, M.À. Pèlach, P. Mutjé. Nanofibrillated cellulose as an additive in papermaking process: A review. *Carbohydr Polym* 2016, 154, 151–166.
38. E. Espinosa, F. Rol, J. Bras, A. Rodríguez. Production of lignocellulose nanofibers from wheat straw by different fibrillation methods. Comparison of its viability in cardboard recycling process. *J Clean Prod* 2019, 239, 118083.

39. E. Espinosa, Q. Tarrés, M. Delgado-Aguilar, I. González, P. Mutjé, A. Rodríguez. Suitability of wheat straw semichemical pulp for the fabrication of lignocellulosic nanofibers and their application to papermaking slurries. *Cellulose* 2015, 23, 837–852.
40. A.F. Lourenço, J.A.F. Gamelas, P. Sarmiento, P.J.T. Ferreira. Enzymatic nanocellulose in papermaking – The key role as filler flocculant and strengthening agent. *Carbohydr Polym* 2019, 224, 115200.
41. F. Vargas, Z. González, R. Sánchez, L. Jiménez, A. Rodríguez. Cellulosic pulps of cereal straws as raw material. *BioResources* 2012, 7, 4161–4170.
42. I. Besbes, S. Alila, S. Boufi. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibers: Effect of the carboxyl content. *Carbohydr Polym* 2011, 84, 975–983.
43. F. Carrasco, P. Mutjé, M.A. Pelach. Control of retention in paper-making by colloid titration and zeta potential techniques. *Wood Sci Technol* 1998, 32, 145–155.
44. F. Carrasco, P. Mutjé, M.A. Pelach. Refining of bleached cellulosic pulps: characterization by application of the colloidal titration technique. *Wood Sci Technol* 1996, 30, 227–236.
45. Marx-Figini, M. The acid-catalyzed degradation of cellulose linters in distinct ranges of bacterial nano-cellulose reinforced fiber-cement composites. *Constr Build Mater* 1987, 101, 958–964.
46. R. Shinoda, T. Saito, Y. Okita, A. Isogai. Relationship between length and degree of polymerization of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils. *Biomacromolecules* 2012, 13, 842–849.
47. L. Segal, J.J. Creely, A. E. Martin, C. M. Conrad. Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text Res J* 1959, 29, 786–794.

Chapter 2. Lignocellulose nanofiber obtained from agricultural wastes of tomato, pepper and eggplants improves the performance of films of polyvinyl alcohol (PVA) for food packaging.

Isabel Bascón-Villegas^{1,2}, Mónica Sánchez-Gutiérrez¹, Fernando Pérez-Rodríguez^{1*}, Eduardo Espinosa², Alejandro Rodríguez².

¹ Department of Food Science and Technology, Faculty of Veterinary, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), University of Cordoba, 14014 Córdoba, Spain

² BioPrEn Group (RNM940) Inorganic Chemistry and Chemical Engineering Department, Faculty of Science, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), University of Cordoba, 14014 Córdoba, Spain.

Article published in:

Foods 2021, 10, 3043.

Doi: 10.3390/foods10123043

1. Abstract

Films formulated with polyvinyl alcohol (PVA) (synthetic biopolymer) were reinforced with lignocellulose nanofibers (LCNF) from residues of vegetable production (natural biopolymer). The LCNF were obtained by mechanical and chemical pretreatment by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical (TEMPO) and added to the polyvinyl alcohol (polymer matrix) with the aim of improving the properties of the film for use in food packaging. The mechanical properties, crystallinity, thermal resistance, chemical structure, antioxidant activity, water barrier properties and optical properties (transparency and UV-barrier), were evaluated.

In general, with the addition of LCNF, an improvement of the studied properties of the films was observed. In terms of mechanical properties, in general, the films reinforced with 7% LCNF TEMPO showed the best results in terms of tensile strength, Young's modulus and elongation at break. At the same LCNF proportion, the thermal stability (T_{max}) increased in the range of 5.5% and 10.8%, and the antioxidant activity increased between 90.9% and 191.8%, depending on the raw material and the pre-treatment used to obtain the different LCNF. Finally, a large increase in UV blocking was also observed with the addition of 7% LCNF. In particular, the films with 7% of eggplant-LCNF showed better results in terms of Young's modulus, elongation at break, thermal stability, and UV-barrier. Overall, results demonstrated that the use of LCNF generated from agricultural residues represents for a suitable bioeconomy approach able to enhance film properties for its application in the development of more sustainable and eco-friendly food packaging systems.

Keywords

Plastic package; biorefinery; agri-food by-products; valorisation; films

2. Introduction

Food packaging plays a major role in protecting, maintaining and improving the quality and safety of food during transport, distribution and storage [1]. Conventionally, the materials used to produce food packaging have been plastic polymers of petrochemical origin, (polyethylene terephthalate (PET), polyvinyl chloride (PVC), polyamide (PA), polystyrene (PS), polypropylene (PP), polyethylene (PE), etc.), paper, metal, and glass. The widespread use of such plastic packaging is due to their mechanical properties, rigidity and flexibility, barrier properties against oxygen and moisture, low cost, and ease of production [2,3]. In 2018, plastics production reached 51.2 million tonnes, accounting for 39.9% of food packaging production [4].

Despite the technological advantages of using plastic packaging, environmental and human health can be negatively affected due to its non-biodegradable nature and the possibility of migration of chemicals from plastic packaging into food [2]. For this reason, there is an increasing interest in

searching for a suitable substitute of such synthetic polymers [5]. The development and use of bio-based, abundant and sustainable resources is proposed as one of the alternatives to conventional materials [6].

The origin of biopolymers can be natural (starch, chitosan, cellulose, etc.), and synthetic (polylactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA), polyvinyl alcohol (PVA), etc.) [7]. Synthetic biopolymers present potential to improve packaging properties such as durability, biodegradability, flexibility and high brightness [8]. Despite these advantages, these materials have poorer mechanical, thermal and barrier properties compared to conventional plastic materials. With the development of nanotechnology, it has arisen several nanofiller for application in food packaging materials. Among them, nanocellulose have shown excellent performance, so when added into the polymer can improve the mechanical and barrier properties of the synthetic biopolymer [9].

PVA is a biodegradable polymer with very good chemical resistance, high crystallinity, good film formation, hydrophilic properties and no toxicity [10]. This biopolymer has great potential as food packaging due to its excellent tensile strength, flexibility, and oxygen barrier properties [11]. However, due to the presence of large amount of hydroxyl groups, they have a hydrophilic nature, which in wet environments cause penetration of water molecules through the film, leading to a deterioration in mechanical properties and oxygen barrier properties [12]. Therefore, the use of PVA as food packaging would be restricted to food products associated with low relative humidity. Nonetheless, the addition of cross-linkers compounds (dialdehydes, dicarboxylic acids, dianhydrides) may decrease the hydrophilic behaviour of the material, making it more suitable for high water content environments [13–15].

Cellulose nanofibers (CNF) play an effective role in polymer reinforcement [16]. This reinforcement is due to the presence of aromatic hydroxyl groups, which through hydrogen bonding, lead to a good interaction between the polymeric matrices [17–19]. These CNF could be obtained from plant biomass proceeding from agricultural by-products, making it a highly available and very low-cost resource. The CNFs could be used for the manufacture of food packaging, resulting in value-added materials produced in a sustainable and environmentally friendly way [20]. In 2020, vegetable production in Spain reached almost 16 million tonnes, with Andalusia being the region with the highest vegetable production (33% of the total) [21]. This high production leads to the generation of a large amount of agricultural waste that needs to be managed. An alternative way of managing agricultural waste would be its use in the production of value-added materials, avoiding its traditional applications (burning, composting, animal feed, etc.), thus enhancing the circular economy system [22]. In a previous study of our laboratory, the production of lignocellulose nanofibers (LCNF) from woody residues from tomato, pepper and eggplant were optimised and characterised [23].

The aim of this study was the development of films with potential food application, studying the effect of pre-treatment and concentration of lignocellulose nanofibers (LCNF) from woody residues from tomato, pepper and eggplant plants in a polymeric matrix (PVA). The effect on the mechanical properties (Tensile strength, Young's modulus and elongation at break), crystallinity (XRD), thermal resistance (TGA), chemical structure (FT-IR), antioxidant activity (ABTS assay), barrier properties (WVP) and optical properties (transparency and UV-barrier) were studied in the developed films.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents

The woody by-products used for this study, tomato (*Solanum lycopersicum*), pepper (*Capsicum annuum*) and eggplant (*Solanum melongena*) crops were provided by Cooperativa Aguadulce (Almería, Spain). The material was cleaned and dried at room temperature prior to cutting (0.1-1 cm) and storage in plastic bags.

The polymeric matrix, polyvinyl alcohol (P.M.: 146,000 - 186,000, and hydrolysis degree +99%) was supplied by Sigma Aldrich, Spain. Films were generated and characterized using different methods with the use of Sodium hydroxide (Panreac, Germany), sodium bromide (Honeywell, US), TEMPO (2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-oxyle) (Sigma Aldrich, US), sodium hypochlorite (Panreac, US), ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate acid) (Sigma Aldrich, Germany), calcium chloride anhydrous (Scharlab, Spain).

3.2. Cellulose pulp obtention

The raw materials were subjected to an environmentally friendly soda pulping process, in a 15 L batch reactor with a liquid: solid ratio of 10:1, 7% NaOH on dry material (o.d.m) at 100°C for 150 min. The cellulosic pulp was disintegrated at 1,200 rpm for 30 min and passed through a Sprout-Bauer refiner. The resulting pulp was sieved through a 0.14 mm mesh to retain uncooked material [23]. To remove excess water from the pulp, it was centrifuged and allowed to dry at room temperature.

3.3. Lignocellulose nanofibers production

Cellulose pulp was submitted to mechanical and TEMPO-mediated pre-treatments, followed by a high-pressure homogenisation treatment to obtain lignocellulose nanofibers [24].

3.3.1. *Mechanical pre-treatment*

The cellulose pulp obtained was beaten with a PFI beater until the degree of drainage ($^{\circ}\text{SR}$) closest to 90° was obtained. All samples required 30,000 revolutions to obtain the highest SR value, according to ISO 5264-2:2002.

3.3.2. TEMPO-mediated oxidation pre-treatment

The cellulose pulp was subjected to mechanical beating in a PFI beater (4,000 revolutions), prior to chemical treatment. To the pulp obtained, a suspension of NaClO (12%) (5 mmol sodium hypochlorite) was added at room temperature with continuous stirring. To stabilise and maintain the pH of 10.2, NaOH (0.5 M) was added. Finally, the fibers were filtered and washed several times with distilled water [25].

3.3.3. High-pressure homogenization

The pre-treated fiber suspensions (1% w/v) were homogenised at high pressure with a Panda GEA 2 K NIRO homogeniser (GEA, Germany). This process was carried out in 10 cycles (4 cycles at 300 bar, 3 cycles at 600 bar and 3 cycles at 900 bar) [26].

3.4. Film formulation and production

The PVA solution (3 wt.%) was prepared in distilled water at 90°C for 4 hours with constant mechanical stirring. To this polymer suspension, the different LCNF obtained at various concentrations of 2, 5 and 7% (w/w) were added. The mixtures were stirred at room temperature for 4 h. The resulting suspensions were poured into polypropylene Petri dishes ($\phi = 9$ cm) and allowed to dry at room temperature. The total dry weight of the mixture was 0.35 g per slide.

Table 1. Composition, pre-treatment, and codification of the different film formulations.

Raw material	Pre-treatment	Codification	PVA: LCNF concentration (%)	Codification
PVA		PVA	100	PVA
Tomato plant	Mechanical	MT	98:2	2% MT-LCNF
			95:5	5% MT-LCNF
			93:7	7% MT-LCNF
	TEMPO-mediated oxidation	TT	98:2	2% TT-LCNF
			95:5	5% TT-LCNF
			93:7	7% TT-LCNF
Pepper plant	Mechanical	MP	98:2	2% MP-LCNF
			95:5	5% MP-LCNF
			93:7	7% MP-LCNF
	TEMPO-mediated oxidation	TP	98:2	2% TP-LCNF
			95:5	5% TP-LCNF
			93:7	7% TP-LCNF
Eggplant plant	Mechanical	ME	98:2	2% ME-LCNF
			95:5	5% ME-LCNF

		93:7	7% ME-LCNF
		98:2	2% TE-LCNF
TEMPO-mediated oxidation	TE	95:5	5% TE-LCNF
		93:7	7% TE-LCNF

3.5. Film characterization

3.5.1. *Mechanical properties*

The analysis of the mechanical properties of films is relevant to determine their strength and durability [27].

Prior to the measurements, the films with size (65 × 15 mm) were conditioned for 48 hours at 25°C and 50% relative humidity. The thickness of the films was measured using a Digital Micrometre IP65 0-1", Digimatic, Mitutoyo (Neuss, Germany). The ASTM D638 test method was followed to determine the tensile strength, Young's modulus and elongation at break of PVA and LCNF-PVA films. A Lloyd Instrument LF Plus testing machine (AMETEK Measurement & Calibration Technologies Division, Largo, FL, USA) equipped with a 1 kN load cell was used applying a speed of 100 mm/min. Ten replicates of each sample were measured.

3.5.2. *X-Ray Diffraction (XRD) analysis*

XRD was used to know and characterize the crystal structure of films formulated, and the changes observed with the addition of LCNF to the polymeric matrix. This analysis was performed using a Bruker D8 Discover with a monochromatic source CuK α 1 over an angular range of 5–50° at a scan speed of 1.56°/min.

3.5.3. *Thermogravimetric analysis (TGA)*

TGA was performed to evaluate the thermal stability of the different films obtained. In addition, the maximum degradation rate (Tmax) was calculated from the thermogravimetric derivative (DTG). The analysis was performed with a Mettler Toledo TGA/DSC 1 (Mettler Toledo, Spain). The samples were brought from room temperature to 600°C with a heating rate of 10°C/min under nitrogen atmosphere (50 mL/min gas flow).

3.5.4. *Spectroscopy analysis*

To compare the changes generated in the polymer matrix by the addition of different concentrations of LCNF, the FTIR spectra of each of the films obtained were analysed. The spectra were obtained using the FTIR-ATR Perkin-Elmer Spectrum Two (Waltham, MA, US) with a resolution of 4 cm⁻¹ in the range 450-4000 cm⁻¹, registering 40 scans per sample.

3.5.5. *Antioxidant activity*

The evaluation of the antioxidant capacity or power of the films was performed by the ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate acid) assay.) For the preparation of the ABTS solution (7mM), 38 mg of the ABTS reagent was diluted in 10 mL of potassium persulphate (2.45 mM) and kept in the dark for 16 hours. Then, an ABTS-ethanol solution (50% v/v) was prepared to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 nm at 734 nm [28]. For the sample measurement, 5 mg of sample with 2 mL of ABTS-ethanol solution was placed in the measuring cuvette, shaken, and allowed to stand for 6 minutes before measurement at 734 nm.

The following equation was used to determine the antioxidant capacity:

$$AOP = (A_{ABTS6'} - A_{ABTSfilm6'}) / A_{ABTS0'} \cdot 100 \quad (2)$$

where $A_{ABTS6'}$ is the absorbance at 734 nm of the radical solution after 6 min; $A_{ABTSfilm6'}$ is the absorbance at 734 nm of the sample after 6 min; and $A_{ABTS0'}$, the absorbance at 734 nm of the radical solution before 6 min. ABTS scavenging activity was expressed as %AOP per mg of the film. All assays were performed in triplicate.

3.5.6. Water permeability

The provision of a barrier between the external environment and the food is a fundamental requirement in the development of films for food use. This film must protect the food, and in this respect, water vapour permeability is very relevant due to the role moisture plays in the shelf life of food [29,30].

The standard test method for water vapour transmission of materials (ASTM E96/E96M-10) was used for this analysis. Periodic weighing was carried out to monitor the mass increase of the sample, produced by the passage of water vapour through the film into the desiccant material consisting of calcium chloride anhydrous. The test was performed at 25°C and 50% relative humidity.

To calculate the water vapor permeability (WVP) the following formula was used:

$$WVP = (WVTR \cdot I) / (P_{sat} \cdot (RH_{out} - RH_{in})) \quad (3)$$

where WVTR is the water vapour transmission rate; I is the thickness; RH_{out} is the external relative humidity (50%) and RH_{in} is the internal relative humidity (0%); and the P_{sat} is the saturation vapor pressure at the test temperature.

3.5.7. Optical properties

The light transmittance of the film in the UV-VIS regions (200-800 nm) was determined with a Perkin Elmer UV/VIS Lambda 25 spectrophotometer (Waltham, Massachusetts).

The following equations were used to determine the transparency and UV barrier properties:

$$\text{Transparency} = \log \%T660/I \quad (4)$$

where %T660 is the percent transmittance at 660 nm, and I is the film thickness (mm).

$$\text{UV-barrier} = 100 - (\%T280\%T660) \cdot 100 \quad (5)$$

where %T280 is the percent transmittance at 280 nm, and %T660 is the percent transmittance at 660 nm.

3.6. Statistical Analysis

To evaluate the influence of raw material used, pre-treatment and LCNF concentration on film formulation, Univariate Analysis of Variance (ANOVA) and t-test for independent samples were carried out using the IBM® SPSS® version 25 statistical software (IBM Corporation, New York, NY, USA).

4. **Results**

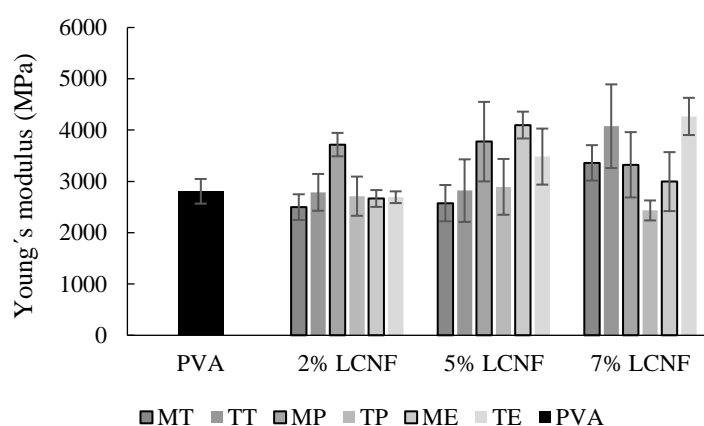
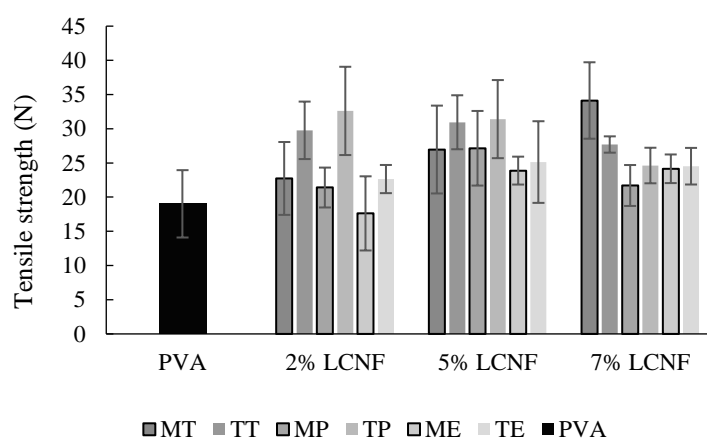
4.1. Mechanical properties

Figure 1 shows the effect of the addition of different proportions of LCNF in the polymer matrix on the mechanical properties (tensile strength, Young's modulus, and elongation at break) of the films. According to results, mechanical properties could be significantly improved for some of the tested conditions. The better performance observed could be due to different mechanisms: i) the compact structure of PVA, ii) the stiffness of the LCNF chain, iii) the homogeneous distribution of LCNF in the polymeric matrix and, iv) the strong interaction between the OH groups of LCNF and PVA [31].

In the tensile strength, a significant increase was reported for samples with LCNF from tomato and pepper ($p < 0.05$) compared to the PVA films. The TEMPO pre-treatment applied to obtain the LCNF also showed an improvement for this property, except for the 7% TT-LCNF sample. Moreover, the addition of LCNF to the polymer matrix had a significant impact on this LCNF property ($p < 0.05$) compared to PVA films. In this sense, a decrease in tensile strength was observed for most of the samples, except for the MT-LCNF and ME-LCNF, when increasing the LCNF concentration from 5% to 7%. This slight decrease in film tensile strength at higher LCNF concentration may be due to the rate of LCNF agglomeration in films formulated with PVA. This agglomeration may lead to a breakdown of the interaction of the two matrices and result in weaker areas in the film [27,32].

For Young's modulus, the addition of 7% LCNF led to a remarkable rise on this parameter although it was only apparent for tomato and eggplant ($p < 0.05$). However, overall, raw material and pre-treatment had no significant effect on the improvement of this property.

The elongation at break of the films was statistically higher in TEMPO-treated samples excepting for tomato, in which at 7% LCNF, values were similar ($p < 0.05$). The highest increase (80%) was found in 7% TE-LCNF samples. This improvement with the addition of TEMPO LCNF could be due to the partial loss of lignin from the fibers due to oxidation, which leads to stronger hydrogen bonds, resulting in an improvement of this property. This partial loss of lignin can be seen in Figure S1. According to the results obtained, the raw material used and the concentration of LCNF added to the polymeric matrix did not have a statistically significant effect ($p > 0.05$) on the improvement of this property.



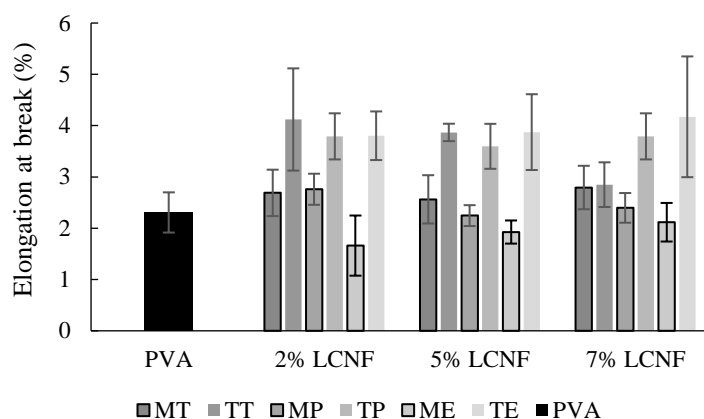


Figure 1. Mechanical properties of PVA film, PVA films containing mechanical LCNF from tomato (MT), pepper (MP), and eggplant (ME) and PVA films containing TEMPO LCNF from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

4.2. X-ray diffraction analysis

Figure 2 shows the X-ray diffraction patterns of the PVA films and the PVA films with 7% of different LCNFs. The PVA film showed the typical strong semi-crystalline structure typical of such a polymer. The diffractogram shows the highest intensity peak at 19.7° , due to the hydrogen bonds between the hydroxyl groups of the PVA chains [33]. The diffractograms obtained from the films with 7% LCNF showed higher intensity signals between 19.45° and 19.71° , very similar to the PVA films, therefore, the addition of LCNF to the polymeric matrix did not modify the semi-crystalline structure of PVA. The typical signals associated with cellulose: 14.7° plane

(101), 20.4° plane (102), and 22.7° plane (200) [34] were very dimly observed in the diffractogram.

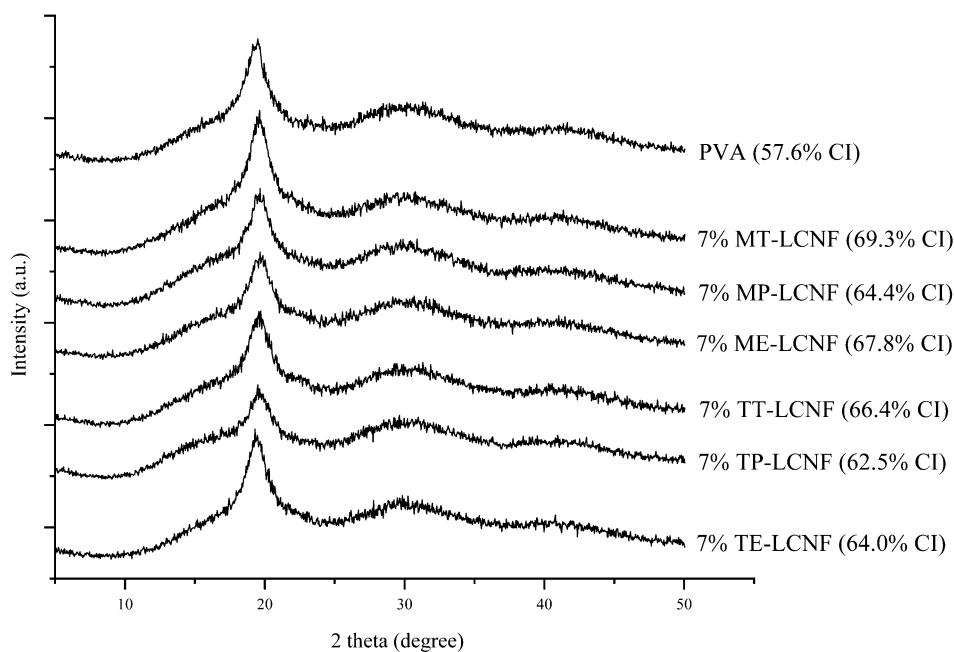


Figure 2. X-ray diffractograms of PVA film, PVA films containing 7% mechanical LCNF from tomato (MT), pepper (MP), and eggplant (ME) and PVA films containing 7% TEMPO LCNF from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

4.3. Thermogravimetric analysis

Thermal stability is one of the most important properties because of its influence on other properties such as mechanical strength, durability and shelf-life. Thermal degradation can lead to these properties gradually deteriorate [35].

The thermal stability of PVA films and PVA-LCNF films was assessed by calculating degradation onset temperature (T_{onset}) and the maximum degradation temperature (T_{max}) using the derivative of the TGA (DTG). Three stages of degradation were observed as shown in Figure 3, which were attributed to the decomposition of the PVA matrix, as it is the major component of the film. The first stage (100°C) corresponds with the water evaporation. The most pronounced losses occurred in the second ($200\text{-}400^\circ\text{C}$) and third stages ($400\text{-}500^\circ\text{C}$) due to the loss of the PVA structure [36].

Table 2 shows the T_{onset} and T_{max} of formulated films. The film formulated with only PVA had the lowest T_{max} (250.32°C) of all formulated films. The highest T_{max} values were found in films formulated with 7% LCNF, with a maximum increase of 10.80% reached in 7% ME-LCNF samples, as compared to samples with only PVA (Table 2). This fact signals that the addition of LCNF in the polymer matrix improved its thermal resistance [37]. An effect of raw material on T_{max} could be confirmed, which was more evident in formulations with mechanical LCNF, and

particularly, higher in samples with eggplant mechanical LCNF (Table 2). The higher thermal stability of mechanical samples may be because of a major presence of lignin as compared to TEMPO pre-treatment, which usually leads to a partial loss of lignin content. Lignin establishes covalent bonds with cellulose, conferring a higher thermal stability [38,39].

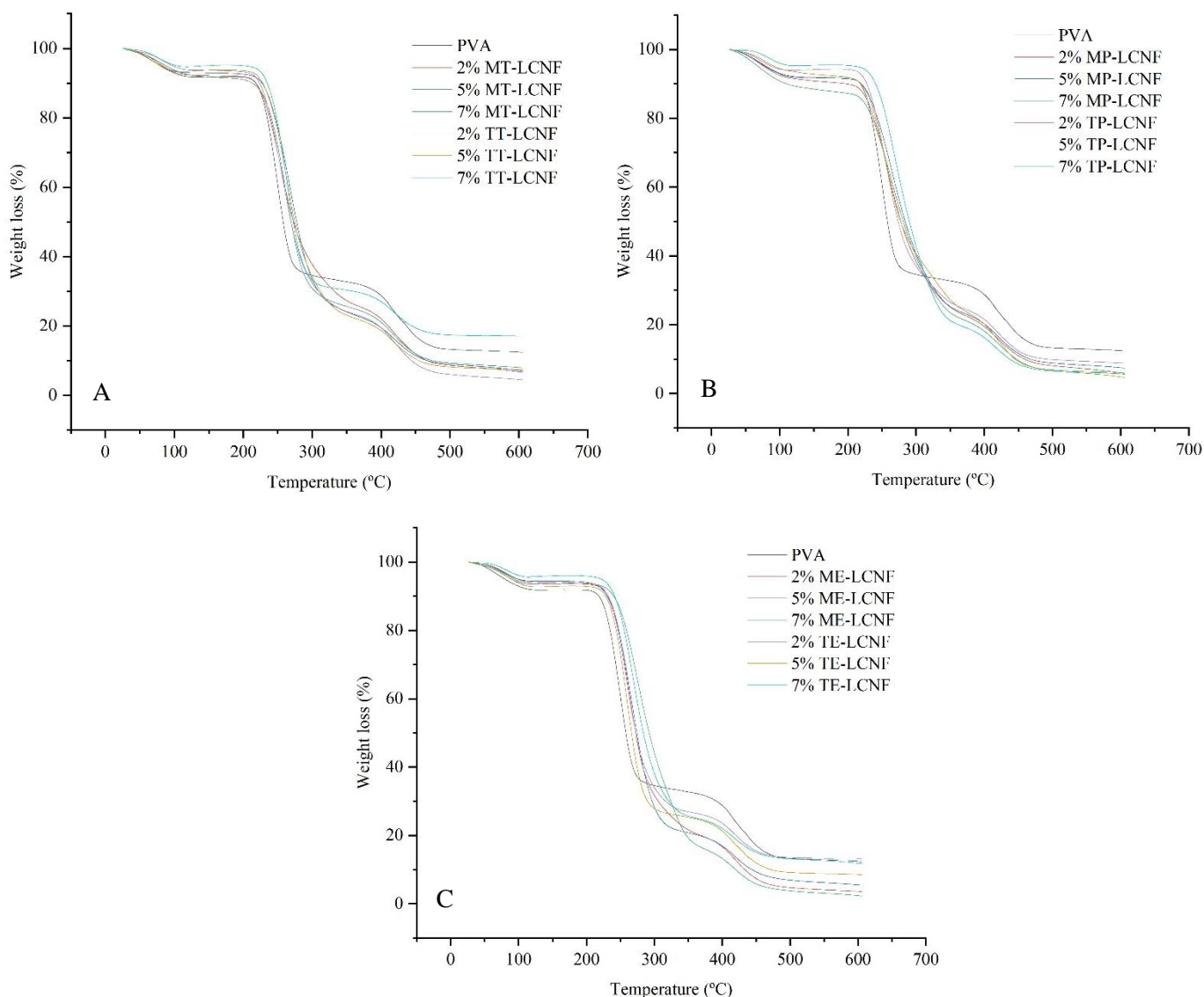


Figure 3. Thermogravimetry analysis (TGA) of PVA films, PVA films containing mechanical and PVA films containing TEMPO LCNF from tomato (MT, TM) (A), pepper (MP, TP) (B), and eggplant (ME, TE) (C).

Table 2. Degradation temperatures from TGA of PVA films, PVA films containing mechanical and PVA films containing TEMPO LCNF from tomato, pepper, and eggplant.

Formulation	LCNF concentration (%)	T_{onset} (°C) ^a	T_{max} (°C) ^b
PVA		210.0	250.32

Mechanical pretreatment	Tomato	2	213.5	256.14
		5	217.4	262.88
		7	217.6	269.55
	Pepper	2	209.7	261.87
		5	212.4	266.14
		7	217.6	271.74
	Eggplant	2	216.0	263.76
		5	221.5	268.01
		7	231.3	277.36
Tempo pretreatment	Tomato	2	214.0	259.19
		5	218.1	262.06
		7	221.2	269.14
	Pepper	2	208.7	256.11
		5	211.2	264.33
		7	224.1	269.73
	Eggplant	2	218.5	258.20
		5	220.5	261.76
		7	223.6	264.14

^a T_{onset} (°C) is the temperature at which degradation of the material begins which is calculated as the point of intersection of the starting-mass baseline and the tangent to the TGA curve at the point of maximum gradient.

^b T_{max} (°C) is the maximum degradation rate temperature calculated as the derivative of TGA (DTG).

4.4. Spectroscopy analysis

Figure 4 shows the FT-IR spectra of PVA and PVA-LCNF films with different percentages of LCNF. Both types of film showed a peak at 3259.6 cm^{-1} indicating free hydroxyl groups due to the strong intermolecular and intramolecular bonds. The peak at 2930 cm^{-1} corresponds to the C-H stretching vibrations of methyl or methylene groups. The peak detected at 1425 cm^{-1} corresponds with the bending mode of CH₂ bonds. The C-O stretching was observed at 1330 cm^{-1} . At 920 cm^{-1} , a peak characteristic of the structure of CH₂ groups was observed. The absorption band at 840 cm^{-1} correspond to the stretching vibration of the C-C groups [27,40–43]. Nonetheless, the FT-IR analysis results did not indicate drastic changes in the chemical structure of PVA with the addition of LCNF. Other authors reported that the spectra obtained did not show any new chemical structures or chemical reactions between the components used for film formation [44]. In our study, the similar structure observed among formulations could be due to the low concentration of LCNF added to the PVA polymer matrix. Furthermore, no changes were observed in the spectra as a function of the pretreatment applied to LCNF.

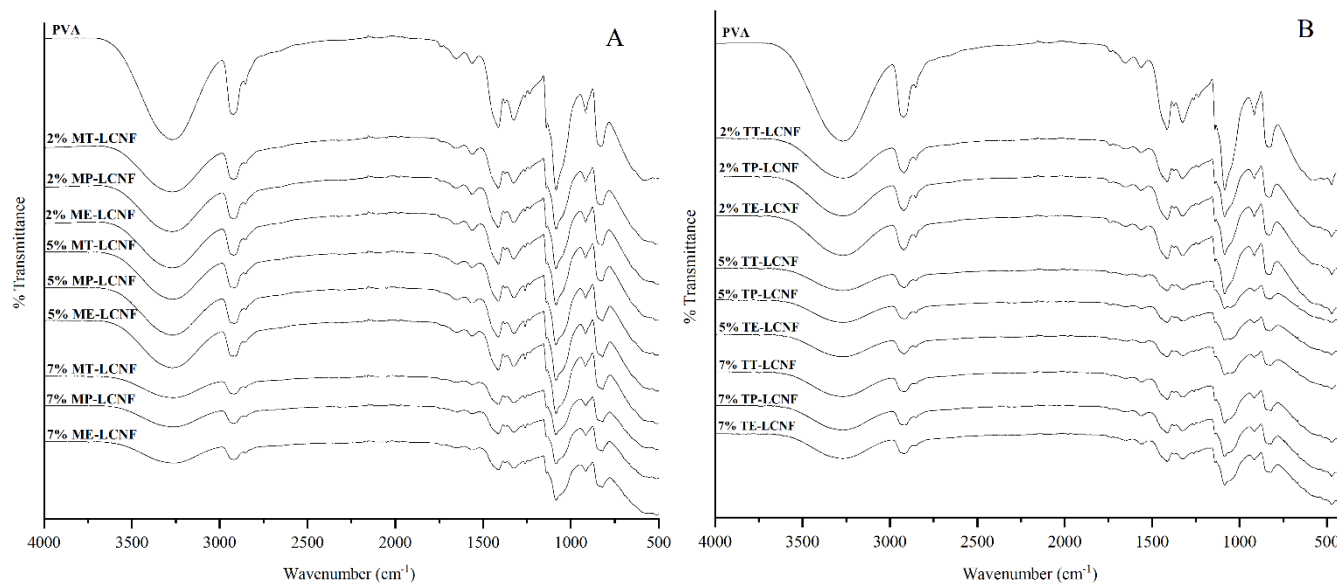


Figure 4. FT-IR spectra of PVA films, PVA containing mechanical LCNF (A) from tomato (MT), pepper (MP), and eggplant (ME) and PVA films containing TEMPO LCNF (B) from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

4.5. Antioxidant activity

Figure 5 shows the antioxidant activity of PVA and PVA films with LCNF measured by the ABTS assay and expressed as percentage of antioxidant power (AOP) per mg of film.

The effect of LCNF and pre-treatment on AOP was statistically significant ($p < 0.05$). In turn, no remarkable differences were detected for type of raw material ($p > 0.05$).

An increase in AOP was observed when the concentration of LCNF increased, exhibiting the greatest AOP value at 7% MP-LCNF, consisting of a rise from 1.1% AOP/mg registered in only PVA film to 3.21% AOP/mg for this MP-LCNF formulation.

As shown in Figure 5, the films formulated with mechanical-LCNF showed higher AOP values than those presented by TEMPO-LCNF. This was because the mechanical pre-treatment does not affect the oxidation state of the fibers, compared to TEMPO pre-treatment, preserving more of their antioxidant capacity [45]. The AOP of the LCNF was determined in previous research (Table S1) and a higher antioxidant capacity of the mechanical LCNF was also observed.

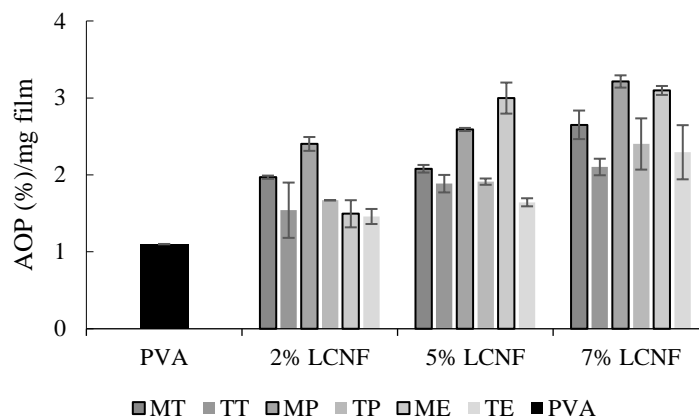


Figure 5. Antioxidant power (AOP) of PVA film, PVA films containing mechanical LCNF from tomato (MT), pepper (MP), and eggplant (ME) and PVA films containing TEMPO LCNF from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

4.6. Water permeability

The water vapour permeability of PVA and 7% PVA-LCNF films was evaluated. Films with 7% of LCNF were selected for this test based on the good results obtained for other parameters previously shown.

Figure 6 shows that the addition of 7% LCNF to the polymeric matrix decreased the water vapour permeability (WVP) with respect to only-PVA films, though values were not statistically different ($p > 0.05$). This apparent reduction could be due to the network formed between PVA and LCNF via hydrogen bonds, which reduces the free space in the PVA polymeric matrix, making it more difficult for water vapour to pass through the film [46].

Pre-treatment statistically influenced the WVP of films ($p < 0.05$). In this respect, films with TEMPO LCNF showed a lower WVP value as compared to mechanical LCNF. This reduction could be caused by the partial loss of lignin due the oxidation process related to TEMPO pre-treatment. Lignin could hinder the formation of hydrogen bonds between the polymer matrix and the LCNF, resulting in a film with lower WVP, hence the partial elimination of lignin in TEMPO would lead to better water vapour barrier properties [47].

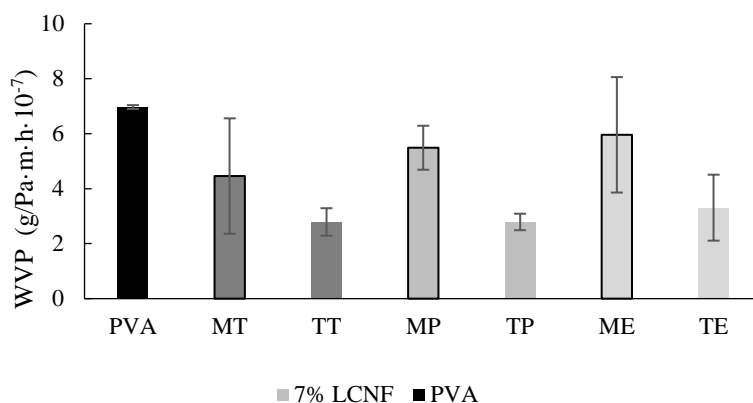


Figure 6. Water vapor permeability (WVP) of PVA films, PVA films containing 7% mechanical LCNF from tomato (MT), pepper (MP) and eggplant (ME) and PVA films containing 7% TEMPO LCNF from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

4.7. Optical properties

The transparency and UV barrier of only PVA and PVA-LCNF films were determined by measuring the light transmittance in the UV and Visible range (200-800 nm).

The effect of LCNF on UV barrier and transparency was statistically significant ($p < 0.05$). This was not the case for the type of raw material and the pre-treatment, for which the differences were not significant ($p > 0.05$).

The optical transmittance of the films is highly dependent on the dispersion of LCNF in the PVA polymer matrix.

As can be seen in Figure 7, films with LCNF had lower transparency than the one shown by the film with only PVA. Films became opaquer with increasing LCNF content, with transparency values decreasing by 66.9% in 7% MT-LCNF films in comparison with only-PVA film. In general, except for the 2% ME and TE samples, the LCNF oxidized by TEMPO pre-treatment increased the transparency of films. This increase could be related to a better nanofibrillation yield of these samples, which led to a higher dispersion in the polymeric matrix, thereby increasing light transmittance [23].

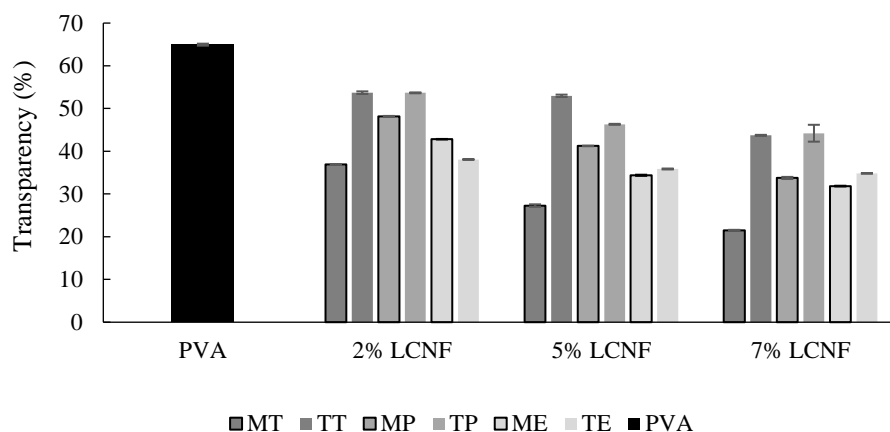


Figure 7. Transparency of PVA film, PVA films containing mechanical LCNF from tomato (MT), pepper (MP), and (ME) and PVA containing TEMPO LCNF from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

By contrast, as shown in Figure 8, the only-PVA film exhibited lower UV barrier capacity (9.98%) than LCNF films. The highest UV light blocking value (55.88%) was found in 7% ME-LCNF packages, while the lowest value (22.36%), excluding only-PVA film, corresponded with 2% MT-LCNF samples. This increasing trend in the capacity of blocking UV light as LCNF content rises can be clearly seen in Figure 8. However, the pre-treatment did not show any clear effect on this property and some results were contradictory. As indicated above, the optical transmittance of the films is highly dependent on the dispersion of nanofibers (i.e. LCNF) in the PVA polymer matrix. The same phenomenon could explain for the increased UV light blocking of films with LCNF.

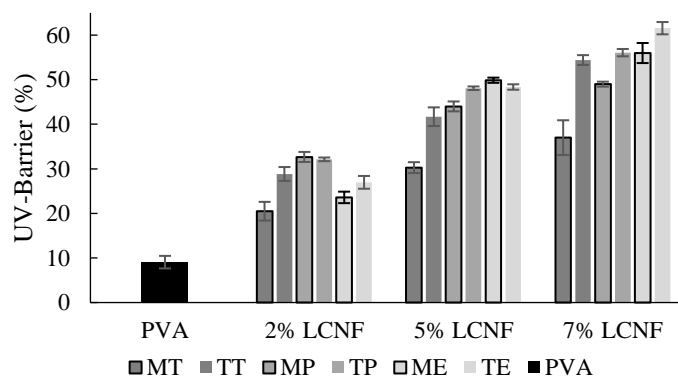


Figure 8. UV-barrier of PVA film, PVA containing mechanical LCNF from tomato (MT), pepper (MP), and eggplant (T, MP, ME) and PVA containing TEMPO LCNF from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

5. Conclusions

In this study, lignocellulose nanofibers (LCNF) obtained from agricultural waste of tomato, pepper, and eggplant crops were proved to be a suitable reinforcement of PVA films, improving several properties of the film such as thermal resistance, water vapor permeability and mechanical parameters, among others, in addition to conferring antioxidant capacity, which was not present in the non-reinforced film. Particularly, films formulated with 7% of LCNF from eggplant agricultural residues showed better results in terms of Young's modulus, elongation at break, thermal stability, and UV-barrier. Results demonstrated that agri-food residues can be satisfactorily valorised generating innovative nanomaterials able to enhance food packaging systems from a more sustainable and eco-friendly perspective. Nonetheless, further research is needed to assess and validate the performance and safety of the LCNF-reinforced PVA films on actual foods, simulating typical distribution and storage conditions.

6. References

1. European Commission. Communication from the commission to the european parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions - Innovating for Sustainable Growth: A Bioeconomy for Europe. Vol. 8, Official Journal of the European Union. 2012. 57-61 p.
2. Naciones Unidas. Desafíos, oportunidades y acciones en un mundo de 7 mil millones. Unfpa. 2011;1(0):1-3.
3. Kaza S, Yao L, Bhada-Tata P, Van Woerden F. What a Waste 2.0 Introduction -"Snapshot of Solid Waste Management to 2050." Overview booklet. Urban Dev Ser [Internet]. 2018;1-38. Disponible en: <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317>
4. Global Material Resources Outlook to 2060. Glob Mater Resour Outlook to 2060. 2019;
5. Comisión Europea. Plan de acción para la economía circular. 2020.
6. España G de. Plan de Acción para la Implementación de la Agenda 2030. Hacia una Estrategia Española de Desarrollo Sostenible. Gobierno de España. 2018.
7. Fundación COTEC. Situación y Evolución De La Economía Circular En España [Internet]. 2017. 147 p. Disponible en: <http://cotec.es/media/informe-CotecISBN-1.pdf>
8. Ellen MacArthur Foundation. Towards a Circular Economy: Business rationale for an accelerated transition. [Internet]. 2015. Disponible en: https://www.ellenmacarthurfoundation.org/assets/downloads/TCE_Ellen-MacArthur-

Foundation_9-Dec-2015.pdf

9. Birch K. Emergent imaginaries and fragmented policy frameworks in the Canadian bio-economy. *Sustain.* 2016;8(10).
10. Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy* [Internet]. 2012;37(1):19-27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
11. H. V. Lee, S. B. A. Hamid and SKZ. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *Sci World J.* 2014;20.
12. BioPlat., SusChem., Ministerio de Economía., Competitividad I y. Manual sobre Biorrefinerías en España. *Minist Econ Ind Y Compet.* 2017;1-92.
13. Area MC, Vallejos ME. Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor. *Editor académica española.* 2012;(October 2012):183.
14. Höfte H, Voxeur A. Plant cell walls. *Curr Biol* [Internet]. 2017;27(17):R865-70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.025>
15. Reddy N, Yang Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 2005;23(1):22-7.
16. Prinsen P. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Universidad de Sevilla; 2010.
17. Visakh PM, Thomas S. Preparation of bionanomaterials and their polymer nanocomposites from waste and biomass. *Waste and Biomass Valorization.* 2010;1(1):121-34.
18. Eero Sjöström. The structure of wood. En: Sjöström E, editor. *Wood Chemistry.* Second edi. Academic Press; 1993. p. 1-20.
19. Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:263-89.
20. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(1):3-23.
21. Yue Z, Economy J. Carbonization and activation for production of activated carbon fibers. *Activated Carbon Fiber and Textiles.* 2017. 61-139 p.

22. Achparaki M, Thessalonikeos E, Tsoukali H, Mastrogianni O, Zaggelidou E, Chatzinikolaou F, et al. Lignin as Natural Antioxidant Capacity. En: IntechOpen [Internet]. 2012. p. 205. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA00172J%0Ahttps://www.intechopen.com/books/advance-d-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
23. Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 2010;153(3):895-905.
24. The Royal Society. Sustainable biofuels: prospects and challenges. *Sustain biofuels* [Internet]. 2008;(January):1-79. Disponible en: http://royalsociety.org/uploadedFiles/Royal_Society_Content/policy/publications/2008/7980.pdf
25. Sjöström E. Wood chemistry: Fundamentals and Applications. En: *Wood chemistry: Fundamentals and Applications*. Orlando: Academic Press,; 1981. p. 68-82.
26. Roger Samson BM. Strategies to reduce the ash content in perennial grasses. *Bioenergy: Expanding Bioenergy Partnerships*. Canada; 1998.
27. Dufresne A. Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Mater Today* [Internet]. 2013;16(6):220-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>
28. Dufresne A. Chapter 1. Nanocellulose: Potential Reinforcement in Composites. Vol. 2. 2012. 1-32 p.
29. Abdul Khalil HPS, Bhat AH, Ireana Yusra AF. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2012;87(2):963-79. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.078>
30. Siró I, Plackett D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. *Cellulose.* 2010;17(3):459-94.
31. Lavoine N, Desloges I, Dufresne A, Bras J. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2012;90(2):735-64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>
32. Moon RJ, Martini A, Nairn J, Simonsen J, Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. Vol. 40, *Chemical Society Reviews*. 2011.

- 3941-3994 p.
33. Jozala AF, de Lencastre-Novaes LC, Lopes AM, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Mazzola PG, Pessoa-Jr A, et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(5):2063-72.
 34. Abitbol T, Rivkin A, Cao Y, Nevo Y, Abraham E, Ben-Shalom T, et al. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2016;39(I):76-88. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.002>
 35. Nechyporchuk O, Belgacem MN, Bras J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2016;93:2-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>
 36. T. van de Ven, A. Sheikhi. Hairy cellulose nanocrystalloids: a novel class of nanocellulose. *Nanoscale*. 2016;8:15101–15114.
 37. Yang H, Chen D, van de Ven TGM. Preparation and characterization of sterically stabilized nanocrystalline cellulose obtained by periodate oxidation of cellulose fibers. *Cellulose* [Internet]. 2015;22(3):1743-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-015-0584-4>
 38. Safari S, Sheikhi A, van de Ven TGM. Electroacoustic characterization of conventional and electrosterically stabilized nanocrystalline celluloses. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2014;432:151-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.061>
 39. Ek, M., Gellerstedt, G. & Henriksson G. *Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 2. Pulp and P. Monica Ek GG, Henriksson G, editores. Standardization News. Pulp and Paper Chemistry and Technology; 2009.*
 40. Yue L, Zheng Y, Xie Y, Liu S, Guo S, Yang B, et al. Preparation of a carboxymethylated bacterial cellulose/polyaniline composite gel membrane and its characterization. *RSC Adv*. 2016;6(73):68599-605.
 41. Xie Y, Qiao K, Yue L, Tang T, Zheng Y, Zhu S, et al. A self-crosslinking, double-functional group modified bacterial cellulose gel used for antibacterial and healing of infected wound. *Bioact Mater* [Internet]. 2022;17(January):248-60. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.018>
 42. Fukuzumi H, Saito T, Iwata T, Kumamoto Y, Isogai A. Transparent and high gas barrier

- films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation. *Biomacromolecules*. 2009;10(1):162-5.
43. Isogai A, Saito T, Fukuzumi H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*. 2011;3(1):71-85.
 44. Abdul Khalil HPS, Davoudpour Y, Islam MN, Mustapha A, Sudesh K, Dungani R, et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;99:649-65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>
 45. Nadeem Akhtar, Aanchal, Dinesh Goyal, Arun Goyal. Biodiversity of cellulase producing bacteria and their applications (PDF Download Available). *Cellul Chem Technol*. 2014;(January 2017).
 46. Espinosa, Eduardo, Tarrés, Quim, Delgado-Aguilar, Marc, González, Israel, Mutjé, Pere, Rodríguez A. Suitability of wheat straw semichemical pulp for the fabrication of lignocellulosic nanofibres and their application to papermaking slurries. *Cellulose*. 2015;(November).
 47. Quim Tarrés, Eduardo Espinosa, Juan Domínguez-Robles, Alejandro Rodríguez, Pere Mutjé MD-A. The suitability of banana leaf residue as raw material for the production of high lignin content micro / nano fibers : From residue to value-added products. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2017;99:27-33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.021>
 48. A. D. Nanocellulose, From Nature to High Performance Tailored Materials. De Gruyter. 2012.
 49. Zimmermann T, Pöhler E, Geiger T. Cellulose fibrils for polymer reinforcement. *Adv Eng Mater*. 2004;6(9):754-61.
 50. Ho TTT, Abe K, Zimmermann T, Yano H. Nanofibrillation of pulp fibers by twin-screw extrusion. *Cellulose*. 2015;22(1):421-33.
 51. Mishra SP, Manent AS, Chabot B, Daneault C. Production of nanocellulose from native cellulose - Various options utilizing ultrasound. *BioResources*. 2012;7(1):422-35.
 52. Amara C, El Mahdi A, Medimagh R, Khwaldia K. Nanocellulose-based composites for packaging applications. *Curr Opin Green Sustain Chem* [Internet]. 2021;31:100512.

- Disponibile en: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100512>
53. Ngwabebhoh FA, Mammadli N, Yildiz U. Bioinspired modified nanocellulose adsorbent for enhanced boron recovery from aqueous media: Optimization, kinetics, thermodynamics and reusability study. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2019;7(5):103281. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103281>
 54. Thomas B, Raj MC, Athira BK, Rubiyah HM, Joy J, Moores A, et al. Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. *Chem Rev*. 2018;118(24):11575-625.
 55. Delgado-Aguilar M, Tarrés Q, Pèlach MÀ, Mutjé P, Fullana-I-Palmer P. Are Cellulose Nanofibers a Solution for a More Circular Economy of Paper Products? *Environ Sci Technol*. 2015;49(20):12206-13.
 56. Delgado-Aguilar M. Nanotecnología en el sector papelerero: mejoras en calidad y permanencia de las fibras de alto rendimiento y secundarias en una economía circular mediante el uso de nanofibras y el refinado enzimático. Gerona; 2015.
 57. Delgado-Aguilar M, González I, Pèlach MA, De La Fuente E, Negro C, Mutjé P. Improvement of deinked old newspaper/old magazine pulp suspensions by means of nanofibrillated cellulose addition. *Cellulose*. 2015;22(1):789-802.
 58. Han JW, Ruiz-Garcia L, Qian JP, Yang XT. Food Packaging: A Comprehensive Review and Future Trends. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2018;17(4):860-77.
 59. Sid S, Mor RS, Kishore A, Sharanagat VS. Bio-sourced polymers as alternatives to conventional food packaging materials: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2021;115(May):87-104. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.026>
 60. Asgher M, Qamar SA, Bilal M, Iqbal HMN. Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Res Int*. 2020;137(August).
 61. *Plastics – the Facts 2020*. An analysis of European plastics production, demand and waste data. [Internet]. 2020. Disponible en: https://www.plasticseurope.org/application/files/8016/1125/2189/AF_Plastics_the_facts-WEB-2020-ING_FINAL.pdf
 62. Zhu Y, Romain C, Williams CK. Sustainable polymers from renewable resources. 2016;

63. Thompson RC, Moore CJ, Saal FS, Swan SH. Plastics , the environment and human health : current consensus and future trends. 2010;(2009):2153-66.
64. Mahmood K, Noreen A, Zuber M, Tabasum S. International Journal of Biological Macromolecules Recent developments and future prospects on bio-based polyesters derived from renewable resources: A review. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016;82:1028-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.040>
65. Zhu Y, Romain C, Williams CK. Sustainable polymers from renewable resources. Nature. 2016;540(7633):354-62.
66. Ahmed T, Shahid M, Azeem F, Rasul I, Shah AA, Noman M, et al. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. Environ Sci Pollut Res. 2018;25(8):7287-98.
67. Bilal M, Gul I, Basharat A, Qamar SA. Polysaccharides-based bio-nanostructures and their potential food applications. Int J Biol Macromol [Internet]. 2021;176:540-57. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.107>
68. Bioplastics E. 13th European Bioplastics Conference. En 2018.
69. Rhim JW, Park HM, Ha CS. Bio-nanocomposites for food packaging applications. Prog Polym Sci [Internet]. 2013;38(10-11):1629-52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008>
70. Othman SH. Bio-nanocomposite Materials for Food Packaging Applications: Types of Biopolymer and Nano-sized Filler. Agric Agric Sci Procedia [Internet]. 2014;2:296-303. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.042>
71. Lee KY, Tammelin T, Schulfter K, Kiiskinen H, Samela J, Bismarck A. High performance cellulose nanocomposites: Comparing the reinforcing ability of bacterial cellulose and nanofibrillated cellulose. ACS Appl Mater Interfaces. 2012;4(8):4078-86.
72. Chiellini E, Cinelli P, Imam SH, Mao L. Composite films based on biorelated agro-industrial waste and poly(vinyl alcohol). Preparation and mechanical properties characterization. Biomacromolecules. 2001;2(3):1029-37.
73. Gürler N, Paşa S, Temel H. Silane doped biodegradable starch-PLA bilayer films for food packaging applications: Mechanical, thermal, barrier and biodegradability properties. J Taiwan Inst Chem Eng. 2021;123:261-71.

74. Dow AC. The Sustainability of NatureWorks™ Polylactide Polymers and Ingeo™ Polylactide Fibers a : an Update of the Future Initiated by the 1st International Conference on Bio-based Polymers. 2004;551-64.
75. Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly (lactic acid) — Mass production, processing, industrial applications and end of life. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;107:333-66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.010>
76. Phattarateera S, Pattamaprom C. Comparative performance of functional rubbers on toughness and thermal property improvement of polylactic acid. *Mater Today Commun* ; 2019; 19(February):374-82. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.02.012>
77. Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci*. 2004;4(9):835-64.
78. Vink ETH, Davies S. Life Cycle Inventory and Impact Assessment Data for 2014 Ingeo Polylactide Production. 2015;11(3):167-80.
79. Karkhanis SS, Stark NM, Sabo RC, Matuana LM. Water vapor and oxygen barrier properties of extrusion-blown poly (lactic acid)/ cellulose nanocrystals nanocomposite films. *Compos Part A* [Internet]. 2018;114(June):204-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.08.025>
80. Xing C, Matuana LM. Epoxidized soybean oil-plasticized poly(lactic acid) films performance as impacted by storage. *J Appl Polym Sci*. 2016;133(12):1-8.
81. Yu HY, Zhang H, Song ML, Zhou Y, Yao J, Ni QQ. From Cellulose Nanospheres, Nanorods to Nanofibers: Various Aspect Ratio Induced Nucleation/Reinforcing Effects on Polylactic Acid for Robust-Barrier Food Packaging. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(50):43920-38.
82. Stark NM. Opportunities for cellulose nanomaterials in packaging films: A review and future trends. *J Renew Mater*. 2016;4(5):313-26.
83. Savadekar NR, Kadam PG, Mhaske ST. Studies on the effect of nano-alumina on the performance properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) composite films. *J Thermoplast Compos Mater*. 2015;28(11):1522-36.
84. *Plastics B*. Biodegradable polymers inspired by nature. 2013.
85. Lu J, Wang T, Drzal LT. Preparation and properties of microfibrillated cellulose polyvinyl

- alcohol composite materials. *Compos Part A Appl Sci Manuf*. 2008;39(5):738-46.
86. Liu Y, Ahmed S, Sameen DE, Wang Y, Lu R, Dai J, et al. A review of cellulose and its derivatives in biopolymer-based for food packaging application. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2021;112(April):532-46. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.016>
87. Dubief D, Samain E, Dufresne A. Polysaccharide microcrystals reinforced amorphous poly(3-hydroxyoctanoate) nanocomposite materials. *Macromolecules*. 1999;32(18):5765-71.
88. Jose J, Thomas V, Raj A, John J, Mathew RM, Vinod V, et al. Eco-friendly thermal insulation material from cellulose nanofibre. *J Appl Polym Sci*. 2020;137(2):3-7.
89. Wang J, Gardner DJ, Stark NM, Bousfield DW, Tajvidi M, Cai Z. Moisture and Oxygen Barrier Properties of Cellulose Nanomaterial-Based Films. *ACS Sustain Chem Eng*. 2018;6(1):49-70.
90. Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *Eur Polym J* [Internet]. 2014;59:302-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>
91. Sharip NS, Ariffin H. Cellulose nanofibrils for biomaterial applications. *Mater Today Proc* [Internet]. 2019;16:1959-68. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.074>
92. Buchanan RL, Whiting RC. Concepts in Predictive Microbiology. 50th Annu Reciprocal Meat Conf [Internet]. 1997;50:93-7. Disponible en: <http://www.meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/rmc/1997/concepts-in-predictive-microbiology.pdf?sfvrsn=2>
93. Garre A, Larrosa E, Fernandez PS. Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos Modelos microbiano de. *Anu Jóvenes Investig* [Internet]. 2016;9:160-3. Disponible en: <http://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/5909/mmd.pdf?sequence=1>
94. Balköse PD, Can BD. Characterising BOPP Film Using TGA Decomposition Kinetics. 2015;(JANUARY 2014):0-4.

Supplementary material

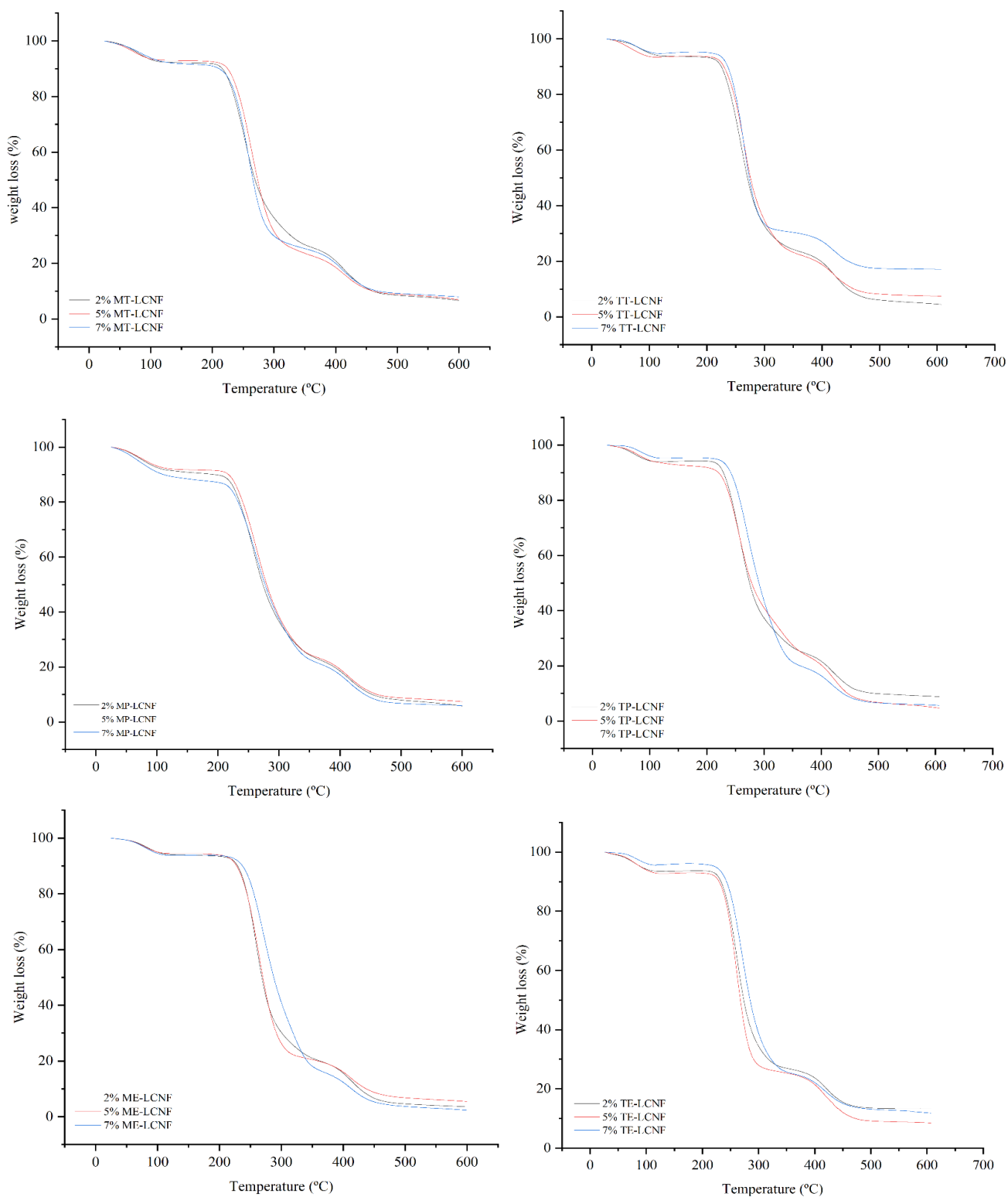


Figure S1. TGA analysis of PVA films and PVA-LCNF films containing mechanical LCNF from tomato (MT), pepper (MP), and eggplant (ME) and PVA containing TEMPO LCNF from tomato (TT), pepper (TP), and eggplant (TE).

Chapter 3: A new eco-friendly packaging system incorporating lignocellulose nanofibers from agri food residues applied to fresh-cut lettuce

Bascón-Villegas, Isabel^{1,2}, Pereira, Miguel³, Espinosa, Eduardo², Sánchez-Gutiérrez, Mónica¹, Rodríguez, Alejandro², Pérez-Rodríguez, Fernando¹

¹ Department of Food Science and Technology, Faculty of Veterinary, Agrifood Campus of International Excellence (CeIA3), Universidad de Córdoba, 14014 Córdoba, Spain.

² Biopren Group (RNM940), Chemical Engineering Department, Faculty of Science, Agrifood Campus of International Excellence (CeIA3), Universidad de Córdoba, 14014 Córdoba, Spain.

³ Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción, Chile.

Article published in:

Journal of Cleaner Production 372 (2022) 133597
Doi: 10.1016/j.jclepro.2022.133597

1. Abstract

The present work explored the design and testing, at pilot scale, of a new food packaging prototype, based on biodegradable polymers and eco-materials obtained from agri-food residues using an environmentally friendly process for its application in vegetable products. For this purpose, several film formulations were developed with combinations of polylactic acid (PLA) and polybutylene adipate-co-terephthalate (Ecoflex®), incorporating different proportions of lignocellulose nanofibers (LCNF) obtained from an enzymatic pre-treatment of wheat straw waste. The production of the LCNF-reinforced packaging (i.e., bag) was carried out at pilot scale. The assessment of its physico-chemical properties showed an improvement of the optical properties, water vapour permeability and antioxidant capacity as compared to a fresh-cut lettuce commercial package. The improvement was more evident in formulations of 70:30 PLA:Ecoflex® with 0.5 and 1% LCNF. The application of the new formulated packaging in a product of fresh-cut lettuce was also tested by simulating real manufacturing, packaging and storage conditions at pilot scale. Results demonstrated levels of microbiological and sensory quality comparable to those observed in the commercial formulation. This work demonstrates that the development of packaging systems obtained from biodegradable materials and valorised with plant biomass from agri-food activity could be the basis for the creation of a more environmentally sustainable food packaging strategy.

2. Introduction

The change in the lifestyle of the population have led to an increase in the consumption of packaged fresh foods. As result, there is a need to develop packaging materials in line with the current consumption trends and food safety and quality requirements. Plastic packaging represents one of the main tools to assure food quality and safety. Their use has several advantages such as its ease of production, affordability, their barrier properties against water vapour and oxygen, the delay of oxidation processes and the control of microbial growth (Ferrer et al., 2017a). These properties improve storage, handling, transport and preservation of food, as well as providing physical protection against external contaminants (Stoica et al., 2020). In 2019, the world production of plastic reached 380 million tons, packaging being the largest application of these materials, with 39.7 per cent of the total volume produced (Plastics Europe, 2020). Despite the benefits, around 97% packaging becomes waste that is not recycled. The lack of recycling together with the final end-of-life treatment (i.e., incineration or landfilling) represent a prime environmental problem (Nemat et al., 2022).

The modern societies are now more aware of the negative impact of plastic packaging, demanding more sustainable and environmental friendly alternatives while maintaining the stability and quality of food (Azeredo et al., 2017). The strategies to tackle with this problem include banning

and/or restricting the use of single-use plastic products and/or replacing them with biodegradable materials and biopolymers (Crane, 2019).

Biopolymer industry accounts for only 1% of all processed plastics worldwide, even though it is undergoing a rapid growth, with a 700% increase between 2009 and 2018 (Bioplastics, 2018). The use of these sources of materials for food packaging is still under development. The difficulty lies in finding biopolymers having similar or comparable properties to those used commercially (e.g., low cost, easy to combine, optical properties, gas and moisture permeability, mechanical properties, processability, etc.).

The use of biomass from agri-food activities is proposed as a promising and sustainable source to extract biopolymers. Lignocellulose nanofibers (LCNF) are bio-based materials obtained from cellulose fiber by mechanical, chemical or enzymatic pre-treatments. They are considered a good alternative for developing food packaging materials due to their abundance, mechanical and barrier properties (Jose et al., 2020; Wang et al., 2018), biocompatibility and biodegradability (Lin and Dufresne, 2014) as well as the possibility of modifying their chemical characteristics (Sharip and Ariffin, 2019). In previous research of authors, cellulose nanofibers were proved to improve film properties, using different polymeric materials. In particular, it increased the mechanical, optical and antioxidant performance of different types of films (Espinosa et al., 2019; Bascón-Villegas et al., 2021; Sánchez-Gutiérrez et al., 2021). Other authors have also reported the benefits of reinforcing with cellulose nanofibers, specifically, on the mechanical properties of the film (Avérous and Le Digabel, 2006; Spiridon et al., 2020).

The biopolymer of polylactic acid (PLA) has gained special interest in recent years as food packaging material (Gürler et al., 2021). It is an aliphatic polyester formed by monomeric units of lactic acid. It is a biodegradable and biocompatible polymer derived from renewable resources (Castro-Aguirre et al., 2016; Phattarateera and Pattamaprom, 2019; Dow, 2004). Traditionally, its use was limited to medical applications, though due to its mechanical, thermal and optical properties, it could replace commercial plastic polymers such as polypropylene (PP), poly(ethylene terephthalate) (PET) and polystyrene (PS) (Auras et al., 2004a; Vink and Davies, 2015). PLA provides rigidity and transparency when formulated in packaging materials. However, the applicability of PLA as a food packaging material is hampered due to its low water vapour barrier and, in general, moderate gas barrier (Karkhanis et al., 2017; Xing and Matuana, 2016). However, LCNF can be added to PLA matrices to improve its barrier properties by increasing crystallinity and acting as impermeable regions (Stark, 2016; Yu et al., 2017).

Ecoflex® is an aliphatic-aromatic copolyester, obtained from petrochemicals, based on the monomers 1,4-butanediol, adipic acid and terephthalic acid. This material can be biodegraded to basic monomers of 1,4-butanediol, adipic acid and terephthalic acid and eventually to carbon dioxide, water and biomass when metabolized in soil or compost, with 1 year of life cycle, approximately (Savadekar et al., 2015). This is a hydrophobic polyester with high film-forming

capacity, but its low thermal stability and poor mechanical strength make it unsuitable for many applications. For that reason, Ecoflex® must be combined with other materials such as cellulose, starch, lignin, PLA, etc. Its combination with renewable raw materials such as PLA can improve its properties as food packaging material (BASF Plastics, 2013), providing thermal stability, mechanical resistance, flexibility and opacity.

However, despite the advances in the field of sustainable food packaging materials, the number of studies addressing a complete cycle process from agri-food residue to real food packaging applications are still scarce. This fact motivated us to develop a proof of concept based on the current knowledge in biopolymers and LCNF, taking these technologies to a practical dimension and high technological readiness level. Therefore, the objective was to design a new and eco-friendly food packaging prototype, combining PLA and Ecoflex® along with LNFC extracted from agri-food residues and validate the prototype in a food environment, using a vegetable product.

3. Materials and methods

3.1. Research framework

The research was developed in 4 steps, consisting of i) the generation of LCNF, ii) the formulation and production of sustainable packaging bags, iii) the characterisation of the packaging material and iv) its application and validation in a fresh-cut lettuce product. A schematic overview of the 4-step experimental process developed in this study is shown in Fig. 1.

First, LCNF was obtained, by enzymatic pre-treatment with endoglucanase, from cellulose pulp generated under environmentally friendly conditions, using, as starting material, wheat straw (Section

2.3). Next, the production of different formulations was carried out at pilot scale employing a rheometer and multilayer film extruder with different proportions of PLA, Ecoflex®, LCNF and polyethylene glycol as plasticiser (Section 2.4). The formulations obtained were characterised for relevant parameters (mechanical parameters, barrier properties, thermal analysis, etc.) following the golden standard methods described in Section 2.5.

In the last step, the produced packaging bags were applied for packaging fresh-cut lettuce. The packaged lettuces were incubated simulating commercial shelf-life conditions in order to evaluate the

performance of the formulated packaging bags by comparing them with control lettuce samples employing commercial packaging bags. During product shelf-life, relevant quality parameters were tested in the packaged product, consisting of gas composition in the headspace, organoleptic attributes and microbial quality (Section 2.6). Results were then analysed statistically to determine differences with respect to those based on commercial bag (control samples) (Section 2.7).

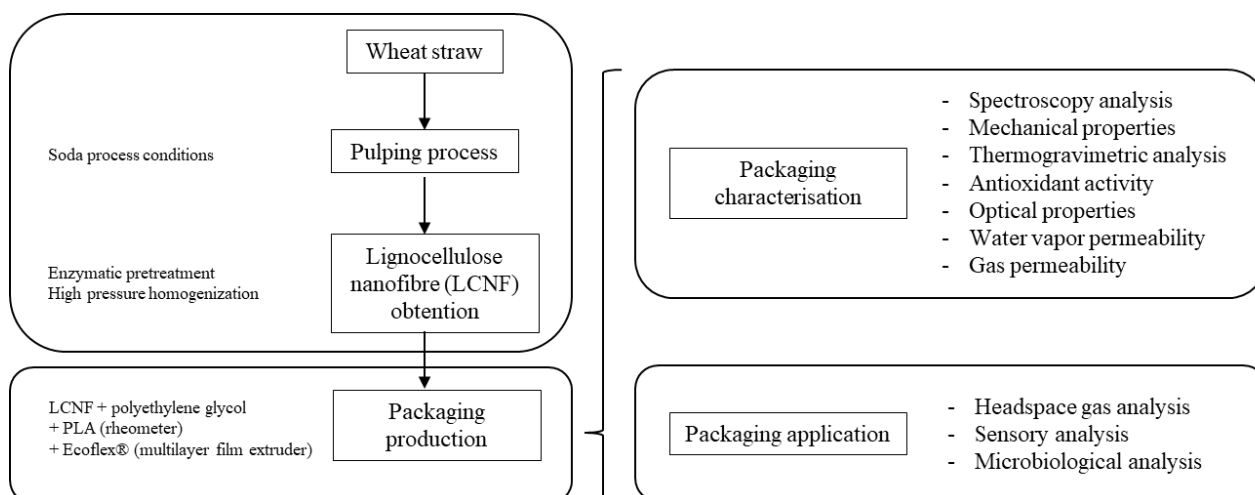


Fig. 1. A schematic overview of the research strategy followed to develop an eco-friendly food packaging system, from agri-food residues to final validation in fresh-cut lettuce.

3.2. Materials and reagents

Wheat straw (*Triticum* spp.) was provided by an independent farmer from Córdoba (Spain). The raw material was manually cleaned to remove unwanted items, dried at room temperature, and stored in plastic bags until use.

The polymeric matrix, PLA and Ecoflex® F Blend A1200 were provided by BASF (Germany). The enzyme used to cellulose pre-treatment, Quimizime B, was provided by Quimipel (Chile). Other reagents used were: ABTS diammonium salt (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) (Sigma-Aldrich, Spain), sodium hydroxide (Panreac, Spain) and sodium hypochlorite (Honeywell, US), calcium chloride anhydrous (Scharlab, Spain).

3.3. Lignocellulose nanofibers production

3.3.1. *Soda pulping*

Wheat straw was pulped under soda process conditions. The material was put into 15 L batch reactor with 7% over dried material (o.d.m) NaOH at 100°C for 150 min and a liquid:solid ratio 10:1 (Vargas et al., 2012). The cellulose pulp obtained was disintegrated for 30 min at 1200 rpm and passed through Sprout-Bauer beater. The suspension was sieved through a 0.14 mm mesh to retain the uncooked material. The resulting pulp was centrifuged to remove excess water and allowed to dry at room temperature (Espinosa et al., 2017b).

3.3.2. *Lignocellulose nanofibers production*

The cellulose pulp was subjected to enzymatic pre-treatment. The enzymatic system used was Quimizime B (Quimipel, Chile), which is a genetically modified cellulose enzyme preparation,

whose principal active agent is endo-1,4- β -D glucanase, showing a minimum activity of 84,000 CMU/g. The endoglucanase randomly hydrolyses accessible-1,4- glucosidic bonds in non-crystalline regions of cellulose, generating damaged fibers with new chain ends. In a preparation step, the pulp suspension (5% w/w) was pre-beated at 4000 revolutions in a PFI Beater (Angels Instruments, India). The enzymatic reaction was carried out adding 0.075% of the enzyme to the pre-treated pulp at 45 °C for 70 min with constant shaking. To halt the enzymatic reaction, the suspension was heated at 90 °C for 15 min to denature the enzymes. The pre-treated fibers were filtered and resuspended to obtain 10% consistency. Then, the suspension was beaten at 16,000 revolutions in PFI beater.

Finally, the suspensions of pre-treated fibers (1% w/v) were homogenised at high pressures using 10 passes at 300, 600 and 900 bar, employing a Panda GEA 2 K NIRO homogeniser (GEA, Germany), thus generating lignocellulose nanofibers (LCNF) (Espinosa et al., 2017a).

3.4. Packaging formulation and production

The production of food bio-packaging was performed at pilot scale using different proportions of LCNF, polylactic acid (PLA, 4032D density) and Ecoflex® (C1200, 170 °C melting point). First, the water present in the LCNF suspension was replaced by the plasticiser polyethylene glycol (PEG) 1500 g/mol (Millipore Corporation, Germany). To that end, PEG was taken to fusion (60 °C) prior to the addition of LCNF. Once added, the temperature was increased, with constant agitation, until condensation of water on the beaker walls. When most of the water evaporated, the mixture was poured into a glass Petri dish and placed in stove (JP Selecta, Spain) at 40 °C overnight.

PLA was modified by rendering the linear chains of the polymer more branched to obtain a more amorphous material, more mouldable and flexible. This was accomplished by heating PLA pellet until the melting point, which was carried out by monitoring the decrease of the flow resistance of the material until stabilisation (165 °C) through using the Pair rheometer 0.2–150 U/min (Brabender GmbH & Co, Germany).

Then, LCNF, PEG, PLA and Ecoflex® (presented as a commercial pellet) were mixed in a multilayer film extruder (LabTech Engineering Co. LF- 400) using different proportions of the components to obtain distinct formulations, as described in Table 1. A summary of the production process applied to generate the different packaging formulations at pilot scale is represented in Fig. 2.

Besides, a commercial packaging solution typically employed by Spanish producers in fresh-cut lettuce was used as control to enable to assess the performance of the new formulations with respect to such a packaging. The materials and composition of the commercial packaging system are also reported in Table 1.

Table 1. Composition of the different packaging formulations.

Codification	Composition
A	99.5% (80:20 PLA: Ecoflex®) + 0.5% LCNF
B	99.0% (80:20 PLA: Ecoflex®) + 1.0% LCNF
C	99.5% (70:30 PLA: Ecoflex®) + 0.5% LCNF
D	99.0% (70:30 PLA: Ecoflex®) + 1.0% LCNF
E	Biaxially Oriented Polypropylene (BOPP) (Commercial formulation)

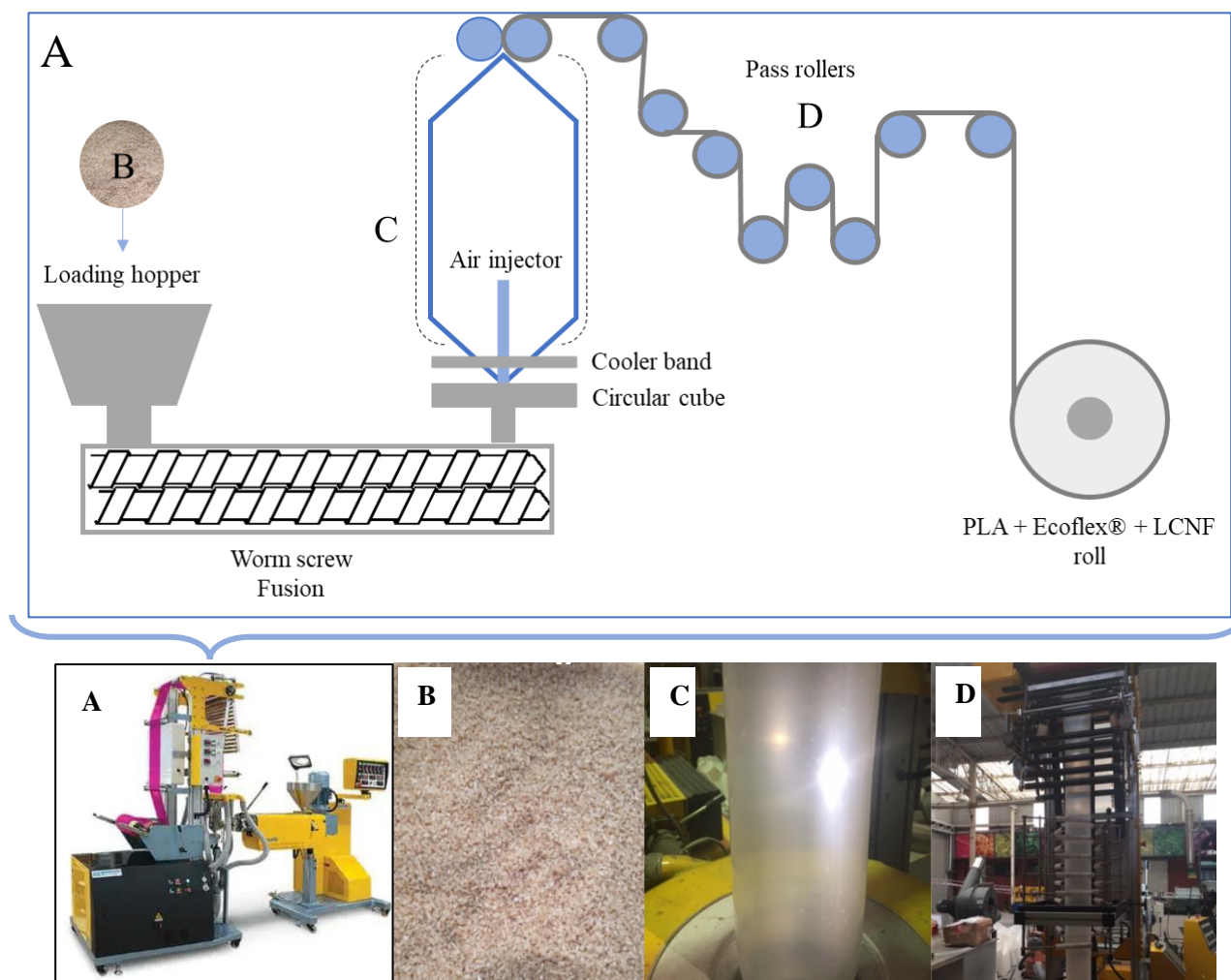


Figure 2. Graphical scheme of the production process used to obtain different packaging formulations based on a mixture of lignocellulose nanofiber (LCNF), polylactic acid (PLA) and Ecoflex® depicting images of a multilayer film extruder (A), pellet of the mixture of PLA, Ecoflex® and LCNF (B), packaging bag formation in air injector (C) and pass rollers (D).

3.5. Packaging characterisation

3.5.1. *Spectroscopy analysis (FTIR)*

FTIR (Fourier-Transform Infrared) spectra were obtained by Attenuated total reflection with the equipment Perkin-Elmer Spectrum 2 (PerkinElmer, US). The spectrum resolution was 4 cm^{-1} in the range $450\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, collecting 40 scans for each formulation (Espinosa et al., 2019). FTIR spectra were analysed to compare the possible changes generated by the addition of the different percentages of LCNF in the polymeric matrix (PLA and Ecoflex®).

3.5.2. Mechanical properties

The Young modulus, tensile strength, and elongation at break of the films were determined following the ASTM D638 test method and using a LF Plus Lloyd Instrument testing machine equipped with a 1 kN load cell (Lloyd Instruments Ltd, UK). Prior to measurements, the thickness of the formulated packaging films was determined by Digital Micrometre IP65 0–1", (Mitutoyo, Neuss, Germany), then, cut to $65 \times 15\text{ mm}$ size and conditioned for 48 h at 25°C and 50% relative humidity. Ten replicates of each package were used.

3.5.3. Thermal analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) was used to evaluate the thermal stability and degradation profiles of the different formulations (e.g., decomposition and combustion). Besides, the derivative of the TGA curve (DTG) was estimated to assess T_{max} , standing for the temperature causing the maximum degradation rate. The analysis was carried out using a Mettler Toledo TGA/DSC 1 (Mettler Toledo, US), for which films were taken from room temperature to $600\text{ }^\circ\text{C}$ with a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ under a nitrogen environment ($50\text{ mL}/\text{min}$ gas flow rate).

3.5.4. Antioxidant activity

The ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate acid)) assay was carried out as described by Sánchez-Gutiérrez et al. (2021) to determine the antioxidant activity power (AOP) of films. The analysis was achieved mixing 1 cm^2 of film with 2 mL ABTS-ethanol solution in the optical cuvette, shaken and left to stand for 6 min before measurement at 734 nm using the spectrometer Lambda 25 UV-Spectrometer (PerkinElmer, US) (García et al., 2012b; Gonc et al., 2017). The following equation was applied to determine this parameter:

$$\text{AOP} = [A_{\text{ABTS6}'} - A_{\text{film6}'}] / A_{\text{ABTS0}'} \cdot 100$$

where $A_{\text{ABTS6}'}$ is the absorbance at 734 nm of the ABTS solution without film after 6 min; $A_{\text{film6}'}$ is the absorbance at 734 nm for the ABTS solution in presence of film after 6 min; and $A_{\text{ABTS0}'}$ is the initial absorbance at 734 nm of the ABTS solution.

3.5.5. Optical properties

The optical properties of the films were characterized determining the spectra of light absorption and transparency in the range from 200 to 800 nm, using the spectrometer Lambda 25 UV-Spectrometer. Transparency and UV-barrier property were quantified using the following equations (Han, 2014):

$$\text{Transparency} = \log T_{660} (\%) / x$$

where $T_{660} (\%)$ is the percent transmittance at 660 nm and x is the film thickness (mm).

$$\text{UV - barrier} = 100 - (T_{280} (\%) / T_{660} (\%)) \cdot 100$$

where $T_{280} (\%)$ and $T_{660} (\%)$ are the transmittance percentages at 280 nm and 660 nm, respectively.

3.5.6. Water permeability

Water vapour transmission rate (WVTR) was measured gravimetrically by the desiccant method, following the ASTM E96/E96M-10 standard. The analysis was developed under controlled conditions of temperature (25°C) and relative humidity (50%). Periodic weighing of the container with desiccant salt and each specific packaging film formulation was carried out to monitor the weight gain of the formulation, which is caused by the transfer of water vapour towards the desiccant salt through the film.

The following formula was used to calculate the water vapour permeability (WVP):

$$WVP = WVTR \cdot x / P_{\text{sat}} \cdot (RH_{\text{out}} - RH_{\text{in}})$$

where WVTR is water vapour transmission rate (Karkhanis et al., 2018); x is film thickness; RH_{out} is external relative humidity; RH_{in} is internal relative humidity; and P_{sat} is saturation vapour pressure at the test temperature.

3.5.7. Gas permeability

Gas permeability of films was determined based on the rate of transmission of oxygen (OTR) and carbon dioxide (CO₂TR). Formulations were conditioned in a desiccator for 48 h prior to analysis. The analysis was carried out at 23 °C with 75% relative humidity. OTR was determined by the OTR analyser for packaging films EQ195/ITN: Mocon Ox-tran 2/22 L meter (Ametek Mocon, Spain) according to the protocol ASTM F1927-14(AENOR, s. f.), while CO₂TR was measured with the CO₂TR analyser for packaging films CO₂TR EQ22/ITN: Mocon Permatran-C 4/41 MC (Ametek Mocon, Spain) according to the protocol ASTM F2476-20 (AENOR, s. f.).

3.6. Application of the formulated bags in fresh-cut lettuce

The performance of the different formulated packaging bags was assessed under simulated real conditions by applying them to package fresh-cut lettuce. For that, fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa*) was purchased from a local supermarket in Córdoba (Spain) and stored at 4°C until experiments. The commercial packagings of fresh-cut lettuce were opened under aseptic conditions in a biosafety cabinet and the contents were collected in a plastic container previously disinfected with 70% ethanol and allowed to dry before use. The formulated and commercial bags, with dimensions of 12 × 12 cm, were used to package 50 g of fresh-cut lettuce using MSSL 400 heat sealer (Retractil y Embalaje Pablo S. L., Spain). The resultant weight/volume ratio was 1/3, being equivalent to the commercial ratio used for these products (250 g in 23 × 30 cm bags). The total number of samples per packaging formulation was n = 50. The samples were stored under refrigeration (4°C) for 10 days, simulating typical storage conditions of fresh-cut lettuce.

3.6.1. *Headspace gas analysis*

The concentrations of oxygen and carbon dioxide (%) inside the bag were measured during product storage at 4°C at different sampling times (0, 2, 4, 6 and 10 days) using the gas analyser equipment Dansensor CheckMate 3 (Ametek Mocon, USA). Measurements were performed at 25°C by inserting the multi-gas measuring probe through a septum previously placed onto the external side of the bag.

3.6.2. *Sensory analysis*

The sensory quality of the packaged fresh-cut lettuce was evaluated during storage by a sensory panel formed by a minimum of 5 trained panelists of the Department of Food Science and Technology of the University of Córdoba (Spain). The sensory attributes evaluated corresponded to visual freshness, surface browning, dehydration, presence of liquid inside the packaging and off-odour. Before analyses, the panelists were trained to enable a standardized assessment of the proposed sensory attributes, which was based on definitions of each attribute agreed by the panelists (Koseki and Isobe, 2005; Kretzschmar, 2009; Oliveira et al., 2011) (Table 2). The attributes were scored with a 5-point hedonic scale as shown in Table 2.

Table 2. Description of the attributes used in the sensory analysis of the fresh-cut lettuce packaged with the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging bags.

Attribute	Definition	Scale
Visual freshness	Degree of visual freshness of the leaves at first sight.	5: Intense brightness and firmness; 4: Good brightness and firmness; 3: Slight loss of brightness and

		firmness; 2: Low brightness and high loss of firmness; 1: Opaque and total loss of firmness.
Browning	Extent of browning in surface of the leaves.	5: No browning; 4: Slight browning (<30% surface); 3: Moderate browning (50% surface); 2: Severe browning (70% surface); 1: Very severe browning (80-100% surface).
Dehydration	Degree of dehydration of the leaves, giving a sensation of brittleness.	5: No dehydration; 4: Slight dehydration; 3: Moderate dehydration; 2: Severe dehydration; 1: Very severe dehydration
Liquid in product/bag	Degree of liquid inside the bag	5: No humidity; 4: Few waters drop in some part of the bag; 3: Water drops in several parts of the bag; 2: High level of humidity in the bag; 1: Water inside the bag.
Off-odour	Intensity of unpleasant odours, not typical of lettuce aroma.	5: none off-odour; 4: little off-odour; 3: quite some off-odour; 2: a lot off-odour; 1: severe off-odour

3.6.3. Microbiological analysis

For microbiological analysis, 25 g samples were aseptically taken from inside of the packages, at different sampling times (0, 2, 4, 6 and 10 days), using sterile pincers and placed in stomacher bag with 225 mL 0.1% peptone water (Oxoid, UK) and homogenised in stomacher (IUL Instruments, Spain) at 1500 rpm for 60 s. Homogenised fresh-cut lettuce samples were serially diluted 10-fold in saline solution (0.85%) and analysed for different microbiological parameters. Aerobic mesophilic bacteria (ISO 4833–1:2013), lactic acid bacteria (ISO 15214 1998), Enterobacteriaceae (ISO 21528–2:2017) and *Pseudomonas* spp. (UNE EN ISO 13720–2008) were enumerated according to golden standard methods.

3.7. Statistical analysis

Mean comparison analysis (t-test), multivariate general linear model and Analysis of Variance (ANOVA) were performed to determine the effect of the composition of films on the parameters and properties tested in packaging films and food product. The statistical analysis was developed with the software SPSS® version 25 (IBM Corporation, New York, NY, USA).

4. Results

4.1. Film material characterization

4.1.1. *Spectroscopic analysis*

FTIR spectra from the different packaging films are shown in Fig. 3. Due to the low LCNF content used in the formulations, no effect could be evidenced in FTIR spectra. However, results did reflect the composition of the major polymers used in the formulations, that is, PLA and Ecoflex®. The most characteristic peak wavelengths of PLA were observed at 2944 and 2995 cm^{-1} , which are attributed to symmetrical and asymmetrical stretching of axial CH groups in saturated hydrocarbons (CH_3). Other relevant peaks were detected at 1359, 1380 and 1451 cm^{-1} which also corresponded to symmetrical and asymmetrical stretching of the CH bond in the CH_3 of PLA (Molinaro et al., 2013; Pamuła et al., 2001). The peak at 1750 cm^{-1} corresponds to carbonyl ester $\text{C}=\text{O}$ stretching (Sepulveda et al., 2020). The peaks at 1042, 1082 and 1128 cm^{-1} correspond to $\text{C}-\text{O}$ of polymer stretch bond. The peaks at 749 and 870 cm^{-1} are due to the stretching of the $\text{C}-\text{C}$ bond of the crystalline and amorphous phases of PLA (Auras et al., 2004b; Siracusa et al., 2010). As regards Ecoflex®, a remarkable peak was observed at 3065 cm^{-1} corresponding to stretching mode of $=\text{C}-\text{H}$ that can be part of the composition of this polymer. An elevated signal was detected at 2958 and 2875 cm^{-1} related to stretching of CH_3 and CH_2 groups. The peak wavelength observed at 1710 cm^{-1} is due to stretching vibration of $\text{C}=\text{O}$. Moreover, peaks at 1578 and 1504 cm^{-1} correspond to skeleton stretching of the benzene ring. Finally, the peak at 730 cm^{-1} corresponds to stretching from methylene groups (Cai et al., 2013).

In addition, based on the recorded FTIR spectra, the carbonyl index (CI) and hydrogen bond intensity (HBI) were calculated as the ratio between the absorbances at 1712 cm^{-1} and 1456 cm^{-1} and the ratio between the absorbances at 3400 cm^{-1} and 1362 cm^{-1} , respectively (Spiridon et al., 2020) (Table 3). According to the obtained values, the highest CI was observed in formulations with 0.5% LCNF content (A and C). Although other works reported an increase in CI with the addition of lignin (Spiridon et al., 2020) and cellulose nanocrystals (Frone et al., 2020) due to a cross-linking, these studies only looked at the effect of nanocellulose, without evaluating the influence of distinct percentages as performed in our study. In our case, the slight decrease in CI in formulations with higher LCNF content could be caused by a major interaction between the nanofibers, resulting in less cross-linking with the polymer matrix. For, HBI, results did not show any clear pattern, without any remarkable tendency for the different proportions of LCNF.

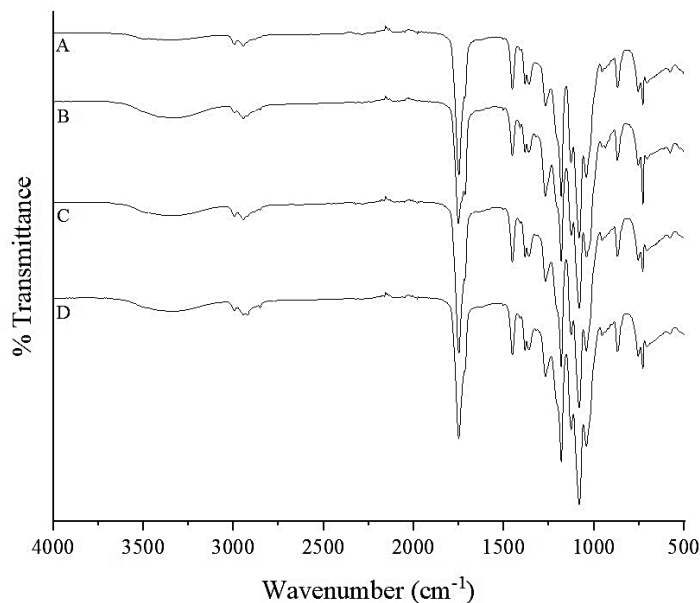


Figure 3. FTIR Spectra from the different formulated packaging films (A, B, C and D).

Table 3. Carbonyl and hydrogen bond intensities calculated for the formulated packaging films (A, B, C and D) based on the recorded FTIR spectra.

Formulation	Carbonyl index (CI)	Hydrogen bond intensity (HBI)
A	2.568	0.238
B	2.348	0.375
C	2.692	0.320
D	2.682	0.321

4.1.2. Mechanical properties

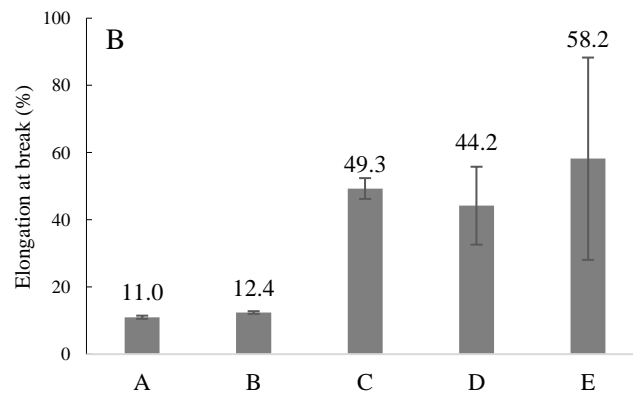
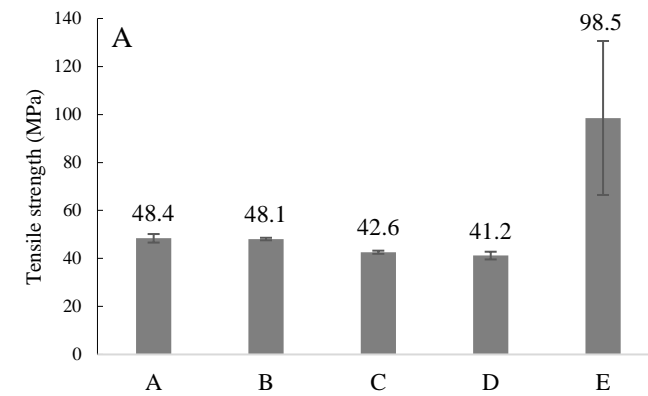
Fig. 4 shows the effect of the addition of different LCNF and polymer proportions on the mechanical properties of the different tested packages materials. The percentages of LCNF added in this study did not exert a significant effect on the mechanical properties tested ($p > 0.05$). Although it was not specifically investigated, a positive contribution of the use of LCNF to the mechanical properties cannot be discarded as pointed out by several authors (Babae et al., 2015; Benito-González et al., 2018; Jonoobi et al., 2012; Trifol et al., 2021).

The percentage of lignocellulose nanofibers (LCNF) added to the formulations was established based on previous tests where levels above 1% LCNF resulted in breakage of the formulated packaging film. Keeping in line with this, other works have reported similar proportions of nanocrystals formulated in the packaging material (Andrade et al., 2022; Frone et al., 2020).

On the contrary to LCNF, the proportions of polymeric materials did exert a statistical effect on the mechanical properties. In the case of tensile strength, a significant effect of the content of polymer was observed, being higher in packages with higher PLA content ($p < 0.05$), which could

be due to the rigid nature of this polymer. In contrast, the elongation at break was significantly improved in formulations with higher Ecoflex® content and/or lower PLA proportion ($p < 0.05$). The higher values registered for this parameter could be because Ecoflex® is a more flexible material with better elongation properties than PLA.

The commercial packaging (E) due to its different nature showed, in general, a better performance for all tested mechanical properties compared to the formulated packages (A-D), except for the elongation at break, where values were similar to those obtained for formulations C and D. Despite aforementioned, tensile strength and Young's modulus values recorded for packages A-D were comparable to other used packaging materials such as poly (ethylene terephthalate) (PET) and poly (styrene) (PS) (Auras et al., 2004c).



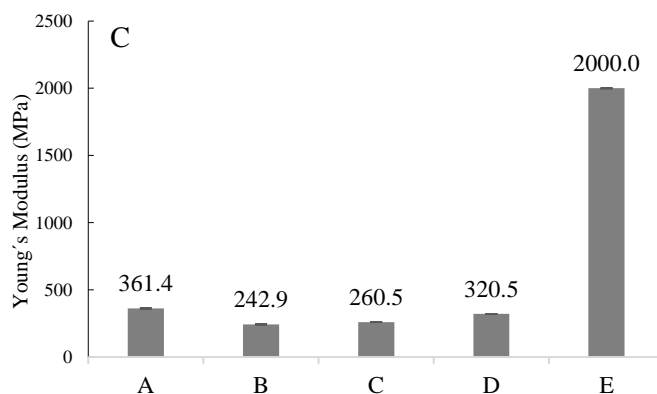


Figure. 4. Bar plots representing the values of tensile strength (A), elongation at break (B) and Young's modulus (C) obtained from the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging films.

4.1.3. Thermal analysis

Table 4 shows the results of the TGA for the different formulated and commercial packages.

As shown by the DTG graph in Fig. 5B and Table 4, the augment of LCNF content did not cause any remarkable rise of T_{max} . Nonetheless, the best heat resistance was observed for formulation A, with the highest percentage of PLA. In contrast, the formulation with the lowest T_{max} corresponded to those formulations with higher Ecoflex® content (C and D). This worse heat resistance is due to this copolymer (Ecoflex®) is formed by rigid butylene terephthalate and soft butylene adipate units presenting a common crystal structure with a combined structural organization. The mixture of both units creates a disordered structure, resulting in a low crystallinity (de Felix de Andrade et al., 2020) which leads to a lower heat resistance.

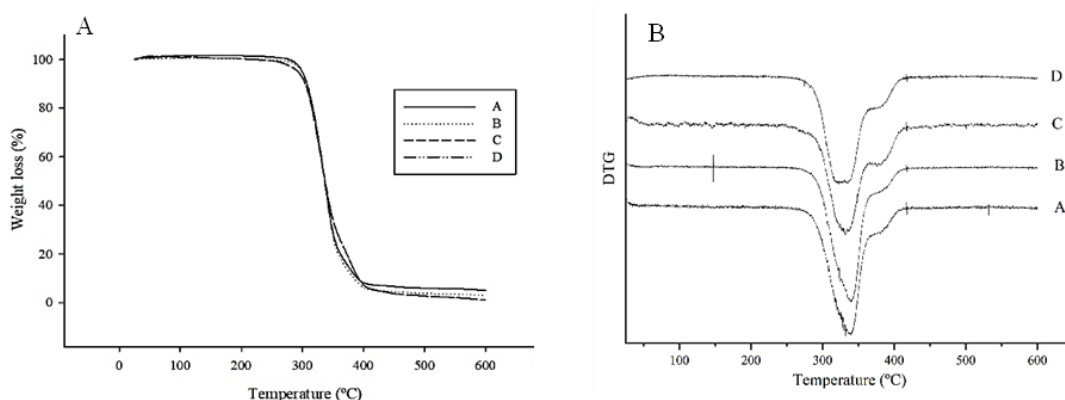


Figure 5. Thermogravimetric analysis (TGA) (A) and derivative of the TGA (DTG) (B) curves obtained from the formulated packaging films (A, B, C and D).

Table 4. Thermogravimetric analysis (TGA) parameters from the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging films.

Formulation	T _{max} (°C) ^a	Mass loss (%) ^b	Residue (%)
A	339.75	95	5
B	338.75	97	3
C	332.25	99	1
D	322.50	94	6
E ^c	404.67	95	-

^a Maximum degradation rate temperature (T_{max}) calculated as the derivative of TGA curve.

^b Total mass loss of the formulation (Mass loss).

^c Results reported by Balköse y Can, 2015 (94).

4.1.4. Antioxidant activity

The AOP values (%) expressed per mg of film are presented in Table 5. The statistical analysis of results showed a significant effect of the LCNF addition ($p = 0.047$) showing high AOP values in samples with the highest LCNF concentration. This improved AOP may be due to the presence of LCNF lignin, which includes chemical structures and aromatic compounds that can act as antioxidant agents that prevent or delay oxidation processes, usually related to the inductive effect of oxidative species (García et al., 2012a). Formulation E, the commercial film, did not show any antioxidant activity. To the best of our knowledge, formulation E does not present any significant compound exhibiting antioxidant activity and no data have been reported, in literature, in this respect.

Table 5. Antioxidant power (AOP) of the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging films measured by the ABTS (2,2' -Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate acid)) assay.

Formulation	AOP (%) /mg film
A	0.42±0.03
B	0.56±0.01
C	0.53±0.02
D	0.58±0.01
E	0.00±0.01

4.1.5. Optical properties

Excessive exposure to UV radiation increases biological damage and degradation of organic compounds (Teramura, 1983; Moorhead and Callaghan, 1994). In addition, such a radiation is responsible for yellowing of plastic materials and loss of mechanical properties which could lead

to cracking of plastics (Sadeghifar et al., 2017). Furthermore, UV light is one of the initiators of food degradation since it can trigger different chemical reactions (e.g., oxidative discoloration). Therefore, this parameter should be assessed when new formulations are tested. As can be seen in Table 6, the UV-barrier effect improved in all formulations compared to the commercial formulation (E), exhibiting better effect in those with higher LCNF content. Keeping in line with this, formulation D showed the highest barrier effect on UV light, achieving almost 100%. This is bound to the lignin structure in LCNF containing aromatic rings that may incorporate functional UV-absorbing groups such as phenolic compounds, ketones and other chromophores (Sadeghifar et al., 2017).

All developed formulations, excepting the commercial one (E), showed low transparency levels (<36%). These low levels were because of opaque nature of Ecoflex® polymer, which was at higher concentrations in formulations C and D together with the reduced transparency associated with LCNF owing to the colouring imparted by the lignin content.

Table 6. Optical properties of the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging films.

	UV-barrier	Transparency (%)
A	92.87	32.35
B	96.43	31.84
C	99.65	35.60
D	99.88	30.87
E	76.78	92.05

4.1.6. Water permeability

From a chemical standpoint, water vapour permeability (WVP) can influence the integrity of film matrix, crystallinity, thickness, polymeric chain mobility, and the interactions between the functional groups of polymers (Iahnke et al., 2016). WVP is also critical for the sensory attributes of packaged vegetables since plant respiration and transpiration continues post-harvest. Thus, films with high WVP values could cause important water losses in the produce if the transpiration rate of the vegetable tissue is equally high. In these cases, water loss could result in a negative effect on the texture, turgor and brightness of the vegetable product (i.e. dehydration), among other attributes (Holcroft, 2015).

Similarly, packaging materials showing low WVP values alongside high transpiration rates of plant could lead to an excess of humidity inside the package, affecting negatively the quality of product and favouring microbial growth (Holcroft, 2015; Vermeulen and Devlieghere, 2018).

Therefore, the selection of the film and polymeric material should be done considering the type of produce to be packaged, based on both the characteristic of the vegetable and the WVP

exhibited by the film. In the case of fresh-cut lettuce, being a product with a high-water content, it is important to maintain a high relative humidity (90–100%) to maintain firmness and to prevent loss of mass and dehydration of the leaves (Oliveira et al., 2016).

As shown in Table 7, the commercial packaging showed the lowest WVP while the highest value was measured in formulation A. WVP values increased in those formulations with higher PLA content and decreased when increasing LCNF content from 0.5% to 1%. The values recorded for WVP were lower for formulations B ($5.70 \text{ g/Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{h}\cdot 10^{-7}$) and D ($4.48 \text{ g/Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{h}\cdot 10^{-7}$) as compared to the values obtained for formulations A ($7.08 \text{ g/Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{h}\cdot 10^{-7}$) and C ($5.11 \text{ g/Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{h}\cdot 10^{-7}$), where LCNF concentration was lower. In this sense, a small increase (0.5%) in the LCNF concentration resulted in a 27% improvement of formulations B over formulation A, and a 13% improvement of formulation D over formulation C. The addition of LCNF in the formulation could result in an increase of the number of entanglements in the polymer matrix due to the formation of complex and small pores by the LCNF. This fact could lead to a high film density as well as a more tortuous diffusion path of the gas molecules as observed in our study (Espinosa et al., 2019; Ferrer et al., 2017b). Other authors have also reported a decrease in water vapour permeability (WVP) at increasing concentrations of LCNF (Karkhanis et al., 2018; Wang et al., 2021). As previously mentioned, the impact of these WVP values on the sensory attributes of food product should be assessed considering the type of vegetable and storage conditions (see Section 3.2).

Table 7. Mean and standard deviation of the water vapor permeability (WVP) values of the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging films.

Formulation	WVP ($\text{g/Pa}\cdot\text{m}\cdot\text{h}\cdot 10^{-7}$)
A	7.08 ± 0.77
B	5.70 ± 0.73
C	5.11 ± 0.48
D	4.48 ± 0.71
E	1.16×10^{-3}

4.1.7. Gas permeability

The oxygen transmission rate (OTR) and the carbon dioxide transmission rate (CO₂TR) of the formulated packages were very similar and comparable to the rates reported for the commercial formulation (E) (Rezaei et al., 2016; Siracusa and Ingrao, 2017) (Table 8). The oxygen permeability of insulated PLA and Ecoflex® was reported, in literature, to be equal to 44.4 and 1200 $\text{cm}^3/\text{m}^2\text{day}$, respectively. Considering the proportions of each polymer in the formulations, a higher-than-expected

OTR value was obtained. This high OTR values could be due to the mobility of the polymer chains produced by the presence of plasticiser (PEG), thus reducing the resistance of the formulation materials to oxygen transmission (Arrieta, 2014). In this sense, it is noteworthy that oxygen permeability is affected by relative humidity, the type polymeric matrix and its attendant WVP (Kunanusont et al., 2014). High WVP values can favour the penetration of water molecules into the polymer structure affecting gas permeability. In our case, in conditions of high environmental relative humidity, OTR could be higher in the formulations A, B, C and D because of their increased WVP values. The effect of WVP on gas permeability is more remarkable for hydrophilic polymers, such as PLA, in comparison to plastic polymers like BOPP, which was the polymeric compound used in the commercial formulation (E). Nonetheless, the obtained values for formulations A-D were similar to those reported for other commercial packaging films such as polyurethane, Nylon-11 and laminated polyvinyl chloride (Imbernón Mora, s. f.).

Table 8. Oxygen (OTR) and Carbon dioxide (CO₂TR) transmission rates of the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging films.

Formulation	OTR (cm ³ /m ² day)	CO ₂ TR (cm ³ /m ² day)
A	NA	NA
B	NA	NA
C	604±19	2512±180
D	595±188	2492±618
E	566±17 ^a	3293±68 ^b

^a Rezaei, M., Mohseni, M., Yahyaei, H., 2016. A study on water and oxygen permeability of BOPP coated with hybrid UV cured nanocoatings. *Prog. Org. Coatings* 99, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.05.006> (Rezaei et al., 2016).

^b Siracusa, V., Ingrao, C., 2017. Correlation amongst gas barrier behaviour, temperature and thickness in BOPP films for food packaging usage: A lab-scale testing experience. *Polym. Test.* 59, 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.02.011> (Siracusa and Ingrao, 2017).

4.2. Application and assessment in vegetables

4.2.1. *Headspace gas analysis*

In this assay, a passive atmosphere was applied to package fresh-cut lettuce samples; hence the gaseous composition inside bags just after packaging corresponded to the composition of atmospheric air (78% N₂, 20% O₂, and 0.03% CO₂). Fig. 6 shows the gas composition of % O₂ (Fig. 6A) and % CO₂ (Fig. 6B) inside the bags during storage at 4°C for the different formulations. As can be seen in Fig. 6, a rise of % CO₂, during storage, was observed (<1%). Probably, this

augment was produced as result of the respiration of plant tissues. In contrast, % O₂ did not undergo any remarkable change, showing similar levels over the whole storage period, with a slight decrease in day 2 for formulations A, D and E.

The recommended environmental composition for packaging leafy vegetables is 1–3% O₂ and 5–10% CO₂, which helps to maintain longer an adequate sensory quality of the product (Gross et al., 2016). High CO₂ concentrations are associated with the delay of enzymatic reactions in glycolysis and the Kerb's cycle (Peppelenbos & Van 't Leven, 1996).

While keeping O₂ levels lower than those under atmospheric conditions reduces respiration rate, thus retarding the attendant biochemical reactions which are closely related to product decay. Although, in this study, O₂ and CO₂ concentrations inside bags were not in the recommended concentration range, no significant differences were found between the formulated films and the commercial film in terms of sensory quality (see Section 3.2.2).

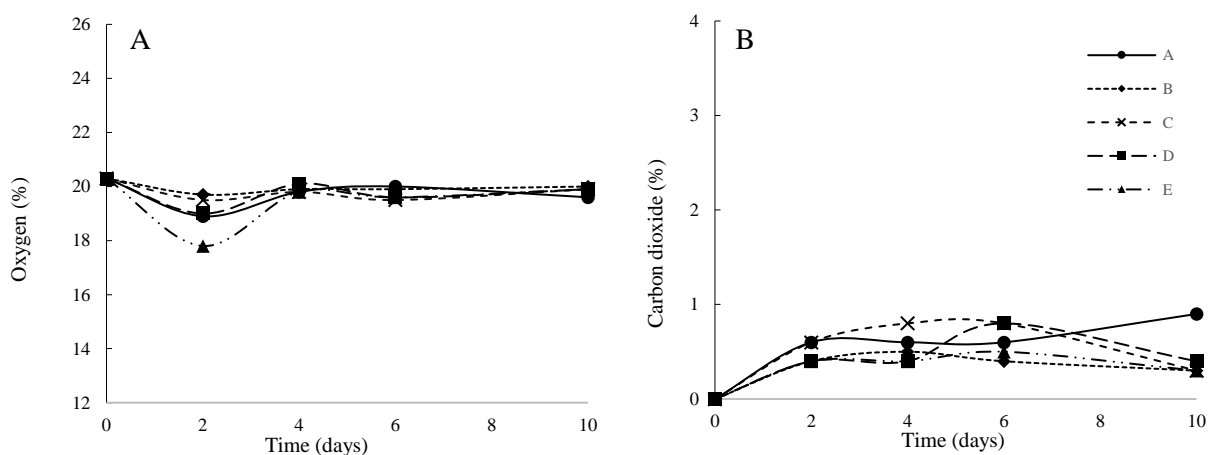


Figure 6. Evolution of the atmosphere composition (%O₂ and %CO₂) inside the formulated (A, B, C, D) and commercial (E) packaging bags containing fresh-cut lettuce during storage at 4°C.

4.2.2. Sensory analysis

The outcomes from the sensory analysis (i.e., scores provided by panellists) were treated statistically based on a multivariate general linear model to study the effect of the packaging film formulation and storage time on the sensory quality of vegetable samples. Interestingly, the type of film did not exert any significant effect ($p > 0.05$) on the sensory parameters studied (Table S1). Moreover, no liquid was present inside the container and no off-odour were observed when the bag was opened during the assay. Therefore, this similar performance among formulations and commercial bags suggest that the formulations designed in this study (A-D) could provide the product with an adequate sensory quality under the study conditions. As film formulation did not have significant impact on the sensory quality of the product, the evolution of each sensory

attribute was assessed using the mean score calculated with the values from all formulations (Table 9). The ANOVA analysis found statistical differences ($p < 0.05$) between different storage times, indicating that scores for the analysed sensory attributes changed over time. A Tukey test was applied to determine homogenous groups of attribute scores as a function of storage time. In such a way, those attributes less affected by time would show a lower number of homogenous groups, indicating that the attribute scores are statistically similar over storage. On the contrary, if the attribute scores result in several significant homogenous groups, it would signal that the attribute is strongly affected by storage time. Results from this statistical analysis showed that Dehydration was the attribute less affected by storage as scores were included only in two subsets (a and b), with similar score values from day 2–4 and from day 6–10, respectively. This result would demonstrate a suitable WVP properties of the formulations tested to avoid water loss in this vegetable product. On the contrary, Visual freshness and Browning showed different score values for all storage times, indicating that those attributes were most influenced by time. In the case of presence of liquid inside the package and off-odour, no changes were detected over storage time. As all formulations exhibited similar sensory quality, Fig. 7 only shows results for the evolution of visual appearance of the fresh-cut lettuce packaged in formulation A at days 0, 2, 4, 6 and 10 of storage at 4°C.

Table 9. Mean and standard deviation of the scores reported by the panellists for the sensory attributes of the fresh-cut lettuce samples packaged in the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging bags at each analysis time during storage at 4 °C.

Attribute	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Day 10
Visual freshness	*5.00±0.0 ^a	4.60±0.35 ^a	3.92±0.33 ^b	3.20±0.28 ^c	2.40±0.00 ^d
Browning	5.00±0.0 ^a	4.96±0.09 ^a	4.36±0.33 ^b	3.36±0.46 ^c	2.44±0.36 ^d
Dehydration	5.00±0.0 ^a	4.84±0.00 ^a	4.40±0.20 ^a	3.64±0.48 ^b	3.12±0.23 ^b
Product/Package liquid	5.00±0.0 ^a	5.00±0.00 ^a	5.00±0.00 ^a	5.00±0.00 ^a	5.00±0.00 ^a
Off-odour	5.00±0.0 ^a	5.00±0.00 ^a	5.00±0.00 ^a	5.00±0.00 ^a	5.00±0.00 ^a

^a Different letters in the row represent statistically homogenous groups obtained by Tukey test ($P \leq 0.05$).

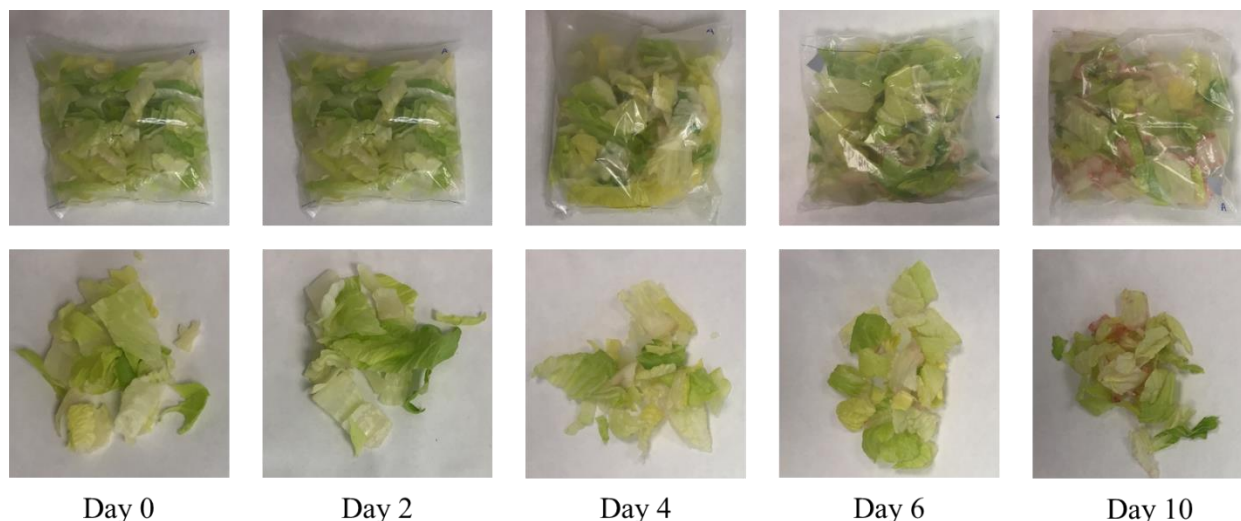


Figure 7. Evolution of visual appearance of the fresh-cut lettuce packaged in formulation A at days 0, 2, 4, 6 and 10 of storage at 4°C.

4.2.3. Microbiological analysis

To evaluate the effect of the formulations on microbial quality of the product, microbial growth of relevant microbiological groups in leafy green products were monitored during storage at 4°C (Ioannidis et al., 2018; Randazzo et al., 2009; Yousuf et al., 2018). To enable a quantitative comparison, observed microbial counts were used to fit the Baranyi and Roberts model (Baranyi and Roberts, 1994) using the software DMFit (Baranyi, 2017). The results from the fitting process are presented in Table 10 and Fig. 8. The initial mean microbial counts were 2.75, 2.59, 2.18 and 3.16 log(cfu/g) for aerobic mesophilic bacteria (AMB), lactic acid bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* (ENT) and *Pseudomonas* spp., respectively. According to the microbiological counts, *Pseudomonas* spp. were found in higher initial concentrations while *Enterobacteriaceae* showed the lowest initial concentrations. This initial microbial profile agreed with other previous works dealing with packaged fresh-cut lettuce (Abadias et al., 2008; Alfonzo et al., 2018; Manhique et al., 2020). The main kinetic parameters obtained from the fitted growth models are presented in Table 10. These parameters were submitted to statistical analysis to evaluate the potential differences in the growth performance due to the packaging formulation. Interestingly, the developed PLA-Ecoflex®-LCNF formulations produced a significant delay in the start of the growth of LAB in comparison to the commercial formulation in which this group started to grow at time 0. This delay in the growth was also apparent in the case of *Enterobacteriaceae*, but only for those formulations with higher PLA content (i.e., formulation A and C). Besides that, no significant effect of the formulated and commercial packaging on the growth rate (μ_{max}) ($p=0.985$) and maximum population density (N_{max}) ($p=0.997$) of the studied microorganisms was observed.

Table 10. Kinetic parameters estimated from the Baranyi and Roberts (1994) model for the counts of aerobic mesophilic bacteria, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. obtained during storage at 4°C of fresh-cut lettuce samples packaged in the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) packaging bags.

Bacteria spp.	Formulation	μ_{\max} (h ⁻¹) ^a	λ (h) ^b	N_{\max} (log CFU/g) ^c	SE ^d	Adj. R ² ^e
Aerobic mesophilic bacteria	A	0.017	-	5.814	0.221	0.965
	B	0.028	26.951	5.888	0.185	0.979
	C	0.017	-	5.859	0.189	0.973
	D	0.020	-	6.178	0.055	0.998
	E	0.019	-	6.187	0.234	0.971
Lactic acid bacteria	A	0.008	76.018	3.403	0.063	0.966
	B	0.004	-	3.247	0.031	0.987
	C	0.005	-	3.592	0.048	0.984
	D	0.008	-	3.604	0.038	0.994
	E	0.009	-	3.329	0.034	0.989
<i>Enterobacteriaceae</i>	A	0.039	31.689	5.484	0.051	0.999
	B	0.028	-	5.377	0.066	0.997
	C	0.036	14.167	5.489	0.091	0.996
	D	0.031	-	6.090	0.268	0.968
	E	0.030	-	5.819	0.197	0.982
<i>Pseudomonas</i> spp.	A	0.015	-	5.748	0.155	0.977
	B	0.016	-	5.828	0.094	0.992
	C	0.018	-	5.622	0.138	0.980
	D	0.033	-	5.668	0.020	0.999
	E	0.018	-	5.397	0.130	0.979

^a Maximum specific growth rate (h⁻¹)

^b Lag time (λ , h)

^c Maximum population density (log cfu/g)

^d Standard error of fitting.

^e Adjusted coefficient of determination of the fitted Baranyi and Roberts model (Adj. R²).

5. Conclusions

This study made an attempt to combine two biodegradable polymers namely PLA and Ecoflex® with a biopolymer as LCNF obtained from an enzymatic pre-treatment of wheat straw waste, demonstrating a significant improvement of the packaging properties in terms of optical properties, water vapour permeability and antioxidant capacity, compared to a commercial formulation typically used for packaging fresh-cut products. The formulations exhibiting better performance corresponded to those made up of 70:30 PLA: Ecoflex® with 0.5 and 1% LCNF. Although the mechanical properties did not improve in the new formulated packagings, compared to the commercial type, results were analogous to other commercial materials (PET, PS). More interestingly, the application of the developed packaging formulations in a simulated real environment using a fresh-cut lettuce showcased a similar performance to the commercial

formulation, resulting in comparable sensory microbiological quality over storage at 4 °C. Despite the remarkable results obtained for fresh-cut lettuce, the developments presented in this work were not specifically designed ad hoc for any product, hence, further research will be needed for a more particular industrial application of the prototypes, that should consider, among other aspects, the product characteristics, and environmental and storage conditions.

All and all, the prototypes developed in this work, grounded on principles of circular (bio)economy, were a successful proof of concept showing that biodegradable materials (PLA, Ecoflex®) can be combined with valorised compounds obtained from agricultural residues (LCNF) to create more eco-friendly and sustainable food packaging systems.

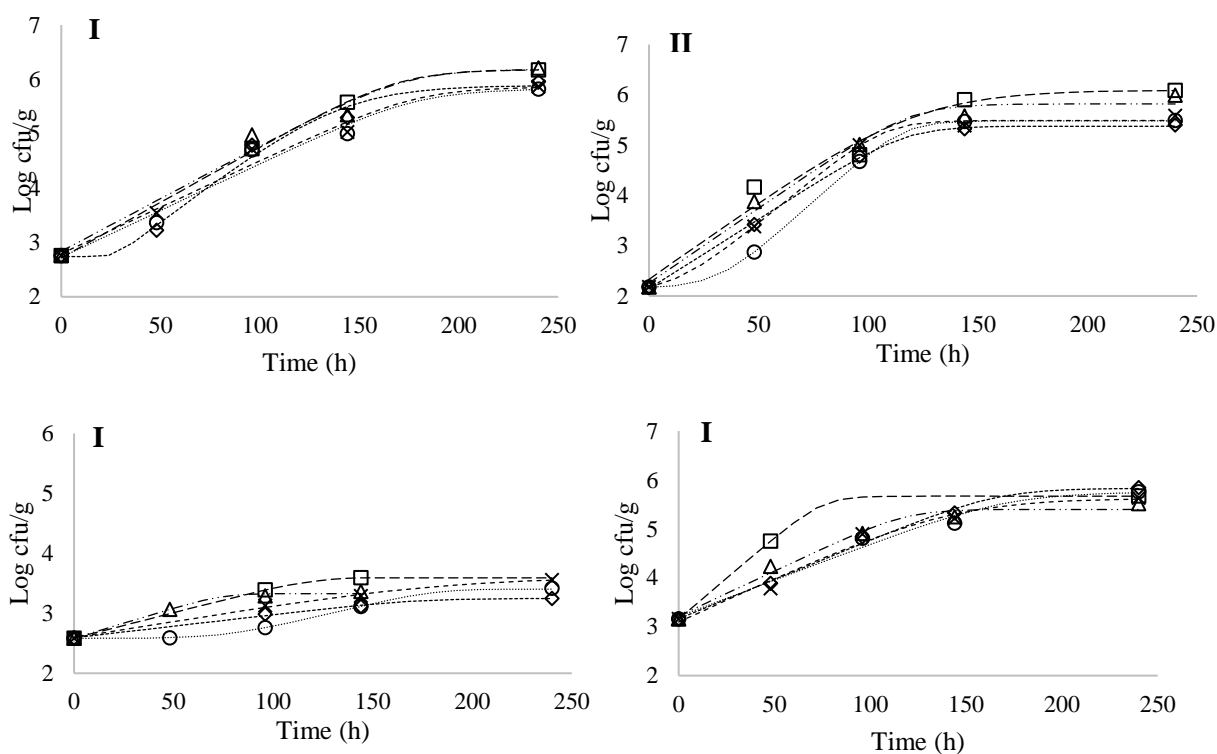


Figure 8. Observed counts and fitted growth curves for aerobic mesophilic bacteria (I), lactic acid bacteria (II), *Enterobacteriaceae* (III) and *Pseudomonas* spp. (IV) monitored during storage of fresh-cut lettuce samples packaged in the formulated and commercial packaging bags, corresponding to A (○), B (◇), C (x), D (□) and E (▲).

6. References

Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Vinas, I., 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>.

AENOR, s. f. Standard Test Method for Determination of Oxygen Gas Transmission Rate,

Permeability and Permeance at Controlled Relative Humidity through Barrier Materials Using a Coulometric Detec Tor (ASTM F1927-14).

AENOR, s. f. Standard Test Method for the Determination of Carbon Dioxide Gas Transmission Rate through Barrier Materials Using an Infrared Detector (ASTM F2476-20).

Alfonzo, A., Gaglio, R., Miceli, A., Francesca, N., Di Gerlando, R., Moschetti, G., Settanni, L., 2018. Shelf life evaluation of fresh-cut red chicory subjected to different minimal processes. *Food Microbiol.* 73, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.008>.

Andrade, M.S., Ishikawa, O.H., Costa, R.S., Seixas, M.V.S., Rodrigues, R.C.L.B., Moura, E. A.B., 2022. Development of sustainable food packaging material based on biodegradable polymer reinforced with cellulose nanocrystals. *Food Packag. Shelf Life* 31. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100807>.

Arrieta, M., 2014. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. In: *Caracterización y análisis de los procesos de degradación*. Univ. Politécnica Val., p. 202.

Auras, R., Harte, B., Selke, S., 2004a. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.* 835–864 <https://doi.org/10.1002/mabi.200400043>.

Auras, R., Harte, B., Selke, S., 2004b. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.* 4, 835–864. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400043>.

Auras, R., Harte, B., Selke, S., 2004c. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.* 4, 835–864. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400043>.

Avérous, L., Le Digabel, F., 2006. Properties of biocomposites based on lignocellulosic fillers. *Carbohydr. Polym.* 66, 480–493. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.04.004>.

Azeredo, H.M.C., Rosa, M.F., Henrique, L., Mattoso, C., 2017. Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Ind. Crop. Prod.* 97, 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.013>.

Babae, M., Jonoobi, M., Hamzeh, Y., Ashori, A., 2015. Biodegradability and mechanical properties of reinforced starch nanocomposites using cellulose nanofibers. *Carbohydr. Polym.* 132, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.043>.

Balköse, P.D., Can, B.D., 2015. Characterising BOPP Film Using TGA Decomposition Kinetics, 0-4.

- Baranyi, J., 2017. DMFit manual. Inst. Food Res. Norwich Res. Park 1, 5.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0).
- Bascón-Villegas, Isabel, Sánchez-Gutiérrez, Mónica, Pérez-Rodríguez, Fernando, Eduardo Espinosa, A.R., 2021. Lignocellulose nanofiber obtained from agricultural wastes of tomato, pepper and eggplants improves the performance of films of polyvinyl alcohol (PVA) for food packaging. *Foods* 10, 3043. <https://doi.org/10.3390/foods10123043>.
- Basf Plastics, 2013. Biodegradable Polymers Inspired by Nature.
- Benito-González, I., López-Rubio, A., Martínez-Sanz, M., 2018. Potential of lignocellulosic fractions from *Posidonia oceanica* to improve barrier and mechanical properties of bio-based packaging materials. *Int. J. Biol. Macromol.* 118, 542–551. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.052>.
- Bioplastics, E., 2018. 13th European Bioplastics Conference.
- Cai, Y., Lv, J., Feng, J., 2013. Spectral characterization of four kinds of biodegradable plastics: poly (lactic acid), poly (butylenes adipate-Co-terephthalate), poly (Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) and poly (butylenes Succinate) with FTIR and Raman spectroscopy. *J. Polym. Environ.* 21, 108–114. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0534-2>.
- Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X., Auras, R., 2016. Poly (lactic acid) — mass production, processing, industrial applications and end of life. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107, 333–366. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.010>.
- Crane, M., 2019. Potential for Earth-Friendly Plastic Replacement: New Biodegradable «plastic» Is Tough, Flexible [WWW Document]. Ohio State Univ. URL. Accedido 5.16.22. www.sciencedaily.com/releases/2019/04/190409083223.htm.
- Dow, A.C., 2004. The Sustainability of NatureWorks™ Polylactide Polymers and Ingeo™ Polylactide Fibers a : an Update of the Future Initiated by the 1 St International Conference on Bio Based Polymers, pp. 551–564. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400023>.
- Espinosa, E., Sánchez, R., González, Z., Domínguez-Robles, J., Ferrari, B., Rodríguez, A., 2017a. Rapidly growing vegetables as new sources for lignocellulose nanofiber isolation: physicochemical, thermal and rheological characterisation. *Carbohydr. Polym.* 175, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.055>.

- Espinosa, E., Sánchez, R., Otero, R., Domínguez-Robles, J., Rodríguez, A., 2017b. A comparative study of the suitability of different cereal straws for lignocellulose nanofibers isolation. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 990–999. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.156>.
- Espinosa, E., Bascón-Villegas, I., Rosal, A., Pérez-rodríguez, F., Chinga-carrasco, G., Rodríguez, A., 2019. PVA/(ligno) nanocellulose biocomposite films. Effect of residual lignin content on structural, mechanical, barrier and antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 141, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.262>.
- Felix de Andrade, M., Diego de Lima Silva, I., Alves da Silva, G., David Cavalcante, P.V., Thayse da Silva, F., Bastos de Almeida, Y.M., Vinhas, G.M., Hecker de Carvalho, L., 2020. A study of poly (butylene adipate-co-terephthalate)/orange essential oil films for application in active antimicrobial packaging. *LWT (Lebensm-Wiss. & Technol.)* 125, 109148. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109148>.
- Ferrer, A., Pal, L., Hubbe, M., 2017a. Nanocellulose in packaging. *Advances in barrier layer technologies* 95, 574–582.
- Ferrer, A., Pal, L., Hubbe, M., 2017b. Nanocellulose in packaging: advances in barrier layer technologies. *Ind. Crop. Prod.* 95, 574–582. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.012>.
- Frone, A.N., Batalu, D., Chiulan, I., Oprea, M., Gabor, A.R., Nicolae, C., Raditoiu, V., Trusca, R., Panaitescu, D.M., 2020. Morpho-structural, thermal and mechanical properties of PLA/PHB/cellulose biodegradable nanocomposites obtained by compression molding, extrusion, and 3D printing. *Nanomaterials* 10, 51. <https://doi.org/10.3390/nano10010051>.
- García, A., González Alriols, M., Spigno, G., Labidi, J., 2012a. Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. *Biochem. Eng. J.* 67, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.013>.
- García, A., González, M., Spigno, G., Labidi, J., 2012b. Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. *Biochem. Eng. J.* 67, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.013>.
- Gonc, I., Nunes, C., Mendes, S., Martins, L.O., Ferreira, P., Coimbra, M.A., 2017. CotA laccase-ABTS/hydrogen peroxide system: an efficient approach to produce active and decolorized. Chitosan genipin films 175, 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.029>.
- Gross, K.C., Wang, C.Y., Saltveit, M.E., 2016. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. *Agric. Res. Serv. United States Dep. Agric.* 66, 68–70.

Gürler, N., Paş, a, S., Temel, H., 2021. Silane doped biodegradable starch-PLA bilayer films for food packaging applications: mechanical, thermal, barrier and biodegradability properties. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 123, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.05.030>.

Han, J.H., 2014. Chapter 9 - edible films and coatings: a review. In: Han, J.H. (Ed.), *Innovations in Food Packaging*, pp. 213–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>.

Holcroft, D., 2015. Water relations in harvested fresh produce. *Postharvest Educ. Found. White Pap* 1–16.

Iahnke, A.O.E.S., Costa, T.M.H., De Oliveira Rios, A., Flôres, S.H., 2016. Antioxidant films based on gelatin capsules and minimally processed beet root (*Beta vulgaris* L. var. *Conditiva*) residues. *J. Appl. Polym. Sci.* 133, 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.43094>.

Ioannidis, A.G., Kerckhof, F.M., Riahi Drif, Y., Vanderroost, M., Boon, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., 2018. Characterization of spoilage markers in modified atmosphere packaged iceberg lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* 279, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.034>.

Jonoobi, M., Mathew, A.P., Abdi, M.M., Makinejad, M.D., Oksman, K., 2012. A comparison of modified and unmodified cellulose nanofiber reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin Screw extrusion. *J. Polym. Environ.* 20, 991–997. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0503-9>.

Jose, J., Thomas, V., Raj, A., John, J., Mathew, R.M., Vinod, V., Rejeena, I., Mathew, S., Abraham, R., Mujeeb, A., 2020. Eco-friendly thermal insulation material from cellulose nanofiber. *J. Appl. Polym. Sci.* 137, 3–7. <https://doi.org/10.1002/app.48272>.

Karkhanis, S.S., Stark, N.M., Sabo, R.C., Matuana, L.M., 2017. Blown film extrusion of poly(lactic acid) without melt strength enhancers. *J. Appl. Polym. Sci.* 134, 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.45212>.

Karkhanis, S.S., Stark, N.M., Sabo, R.C., Matuana, L.M., 2018. Water vapor and oxygen barrier properties of extrusion-blown poly (lactic acid)/cellulose nanocrystals nanocomposite films. *Compos. Part A* 114, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.08.025>.

Koseki, S., Isobe, S., 2005. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.012>.

Kretzschmar, U., 2009. *LWT - food Science and Technology* Potential alternative disinfection

methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT–Food Sci. Technol.* 42, 686–693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>.

Kunanusont, N., Pongsa, U., Bunsiri, A., Somwangthanaroj, A., 2014. Effect of relative humidity on oxygen permeability of modified poly (lactic acid) blown films. *Pure Appl. Chem. Int. Conf. (PACCON 2014 1)*, 630–633.

Lin, N., Dufresne, A., 2014. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect. *Eur. Polym. J.* 59, 302–325. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>.

Manhique, G.A., Hessel, C.T., Plessis, E.M.D.U., Lopes, S.M., Elias, S.D.O., Tondo, E.C., Korten, L., 2020. Prevalence of Enterobacteriaceae on ready to eat salads. *Drinking Water and Surfaces in Food Markets of Maputo , Mozambique* 8, 63–73. <https://doi.org/10.12691/jfnr-8-1-9>.

Molinaro, S., Cruz Romero, M., Boaro, M., Sensidoni, A., Lagazio, C., Morris, M., Kerry, J., 2013. Effect of nanoclay-type and PLA optical purity on the characteristics of PLA-based nanocomposite films. *J. Food Eng.* 117, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.021>.

Moorhead, D.L., Callaghan, T., 1994. Effects of increasing ultraviolet B radiation on decomposition and soil organic matter dynamics: a synthesis and modelling study. *Biol. Fertil. Soils* 18, 19–26. <https://doi.org/10.1007/BF00336439>.

Mora, Imbernón, Almudena, s. f.. Guía técnica a inia de envase y embalaje [WWW Document]. URL. <http://www.guiaenvase.com/bases/guiaenvase.nsf/V02wn/LáminasOpenDocument>.

Nemat, B., Razzaghi, M., Bolton, K., Rousta, K., 2022. Design affordance of plastic food packaging for consumer sorting behavior. *Resour. Conserv. Recycl.* 177, 105949. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105949>.

Oliveira, M., Wijnands, L., Abadias, M., Aarts, H., Franz, E., 2011. Pathogenic potential of *Salmonella Typhimurium* DT104 following sequential passage through soil, packaged fresh-cut lettuce and a model gastrointestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 148, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.013>.

Oliveira, A., Castro, P.M., Amaro, A.L., de Sain, J., Pintado, M., 2016. Optimization of temperature, relative humidity and storage time before and after packaging of baby Spinach leaves using response surface methodology. *Food Bioprocess Technol.* 9, 2070–2079. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1785-z>.

Pamuła, E., Błazewicz, M., Paluszkiewicz, C., Dobrzyński, P., 2001. FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibers composites. *J. Mol. Struct.* 596, 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00688-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00688-3).

Peppelenbos, H.W., Van 't Leven, J., 1996. Evaluation of four types of inhibition for modelling the influence of carbon dioxide on oxygen consumption of fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 7, 27–40. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(96\)80995-1](https://doi.org/10.1016/0925-5214(96)80995-1).

Phattarateera, S., Pattamaprom, C., 2019. Comparative performance of functional rubbers on toughness and thermal property improvement of polylactic acid. *Mater. Today Commun.* 19, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.02.012>.

Plastics, 2020. The Facts 2020. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data.

Randazzo, C.L., Scif o, G.O., Tomaselli, F., Caggia, C., 2009. Polyphasic characterization of bacterial community in fresh cut salads. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.019>.

Rezaei, M., Mohseni, M., Yahyaei, H., 2016. A study on water and oxygen permeability of BOPP coated with hybrid UV cured nanocoatings. *Prog. Org. Coating* 99, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.05.006>.

Sadeghifar, H., Venditti, R., Jur, J., Gorga, R.E., Pawlak, J.J., 2017. Cellulose-lignin biodegradable and flexible UV protection film. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 625–631. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b02003>.

Sánchez-Gutiérrez, M., Bascón-Villegas, I., Espinosa, E., Carrasco, E., Pérez- Rodríguez, F., Rodríguez, A., Rodríguez, A., 2021. Cellulose Nanofibers from Olive Tree Pruning as Food Packaging Additive of a Biodegradable Film, pp. 1–15.

Savadekar, N.R., Kadam, P.G., Mhaske, S.T., 2015. Studies on the effect of nano-alumina on the performance properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) composite films. *J. Thermoplast. Compos. Mater.* 28, 1522–1536. <https://doi.org/10.1177/0892705713513292>.

Sepulveda, J., Villegas, C., Torres, A., Vargas, E., Rodriguez, F., Baltazar, S., Prada, A., Rojas, A., Romero, J., Faba, S., Galotto, M.J., 2020. Effect of functionalized silica nanoparticles on the mass transfer process in active PLA nanocomposite films obtained by supercritical impregnation for sustainable food packaging. *J. Supercrit. Fluids* 161. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104844>.

- Sharip, N.S., Ariffin, H., 2019. Cellulose nanofibrils for biomaterial applications. *Mater. Today Proc.* 16, 1959–1968. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.074>.
- Siracusa, V., Ingraio, C., 2017. Correlation amongst gas barrier behaviour, temperature and thickness in BOPP films for food packaging usage: a lab-scale testing experience. *Polym. Test.* 59, 277–289. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.02.011>.
- Siracusa, V., Blanco, I., Romani, S., Tylewicz, U., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., 2010. Poly (lactic acid)-modified films for food packaging application: physical, mechanical, and barrier behavior. *J. Appl. Polym. Sci.* 116, 2658–2667. <https://doi.org/10.1002/app>.
- Spiridon, I., Anghel, N.C., Darie-Nita, R.N., Iwánczuk, A., Ursu, R.G., Spiridon, I.A., 2020. New composites based on starch/Ecoflex®/biomass wastes: mechanical, thermal, morphological and antimicrobial properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 156, 1435–1444. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.185>.
- Stark, N.M., 2016. Opportunities for cellulose nanomaterials in packaging films: a review and future trends. *J. Renew. Mater.* 4, 313–326. <https://doi.org/10.7569/JRM.2016.634115>.
- Stoica, M., Marian Antohi, V., Laura Zlati, M., Stoica, D., 2020. The financial impact of replacing plastic packaging by biodegradable biopolymers - a smart solution for the food industry. *J. Clean. Prod.* 277, 124013 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124013>.
- Teramura, Alan H., 1983. Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plantarum* 58, 415–427. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb04203.x>.
- Trifol, J., Marin Quintero, D.C., Moriana, R., 2021. Pine cone biorefinery: integral valorization of residual biomass into lignocellulose nanofibrils (LCNF)-Reinforced composites for packaging. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9, 2180–2190. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c07687>.
- Vargas, F., González, Z., Sánchez, R., Jiménez, L., Rodríguez, A., 2012. Cellulosic pulps of cereal straw as raw material for the manufacture of ecological packaging. *Bioresources* 7, 4161–4170.
- Vermeulen, A., Devlieghere, F.R.P., 2018. Optimal packaging design and innovative packaging technologies for minimally processed fresh produce. In: *Quantitative Methods for Food Safety and Quality in the Vegetable Industry*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68177-1_9.
- Vink, E.T.H., Davies, S., 2015. Life cycle inventory and impact assessment data for 2014. *Ingeo Polylactide Production* 11, 167–180. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0003>.

Wang, J., Gardner, D.J., Stark, N.M., Bousfield, D.W., Tajvidi, M., Cai, Z., 2018. Moisture and oxygen barrier properties of cellulose nanomaterial-based films. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6, 49–70. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03523>.

Wang, Y., Liu, S., Wang, Q., Ji, X., Yang, G., Chen, J., Fatehi, P., 2021. Strong, ductile and biodegradable polylactic acid/lignin-containing cellulose nanofibril composites with improved thermal and barrier properties. *Ind. Crop. Prod.* 171, 113898. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113898>.

Xing, C., Matuana, L.M., 2016. Epoxidized soybean oil-plasticized poly(lactic acid) films performance as impacted by storage. *J. Appl. Polym. Sci.* 133, 1–8. <https://doi.org/10.1002/app.43201>.

Yousuf, B., Qadri, O.S., Srivastava, A.K., 2018. Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: a review. *LWT–Food Sci. Technol.* 89, 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.051>.

Yu, H.Y., Zhang, H., Song, M.L., Zhou, Y., Yao, J., Ni, Q.Q., 2017. From cellulose nanospheres, nanorods to nanofibers: various aspect ratio induced nucleation/ reinforcing effects on polylactic acid for robust-barrier food packaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 43920–43938. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09102>.

Supplementary material

Table S1. Mean scores reported by the panellist for the sensory attributes of fresh-cut lettuce samples packaged in the formulated (A, B, C and D) and commercial (E) bags at each analysis time during storage at 4°C.

Attribute	Formulation	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Day 10
Visual freshness	A	5.00	4.00	4.00	3.60	2.40
	B	5.00	4.80	4.20	3.00	2.40
	C	5.00	4.60	3.40	3.40	2.40
	D	5.00	4.80	4.20	3.00	2.40
	E	5.00	4.80	3.80	3.00	2.40
Browning	A	5.00	4.80	4.60	3.80	3.00
	B	5.00	5.00	4.00	3.00	2.60
	C	5.00	5.00	4.00	3.80	2.20
	D	5.00	5.00	4.60	2.80	2.20
	E	5.00	5.00	4.60	3.40	2.20
Dehydration	A	5.00	4.80	4.60	4.40	3.40
	B	5.00	4.80	4.60	3.80	3.20
	C	5.00	4.80	4.20	3.40	3.20
	D	5.00	4.80	4.40	3.20	2.80
	E	5.00	5.00	4.20	3.40	3.00
Liquid in product/bag	A	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	B	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	C	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	D	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	E	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Off-odour	A	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	B	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	C	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	D	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	E	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00

**Conclusiones/
Conclusions**

A continuación, se exponen las conclusiones obtenidas en cada uno de los artículos que conforman la presente Tesis Doctoral:

Publicación I: Bascón-Villegas, Isabel, Espinosa, Eduardo, Sánchez, Rafael, Tarrés, Quim Pérez-Rodríguez, Fernando, Rodríguez, Alejandro. Horticultural Plant Residues as New Source for Lignocellulose Nanofibers Isolation: Application on the Recycling Paperboard Process. *Molecules* 2020, 25, 3275.

1) La aplicación de lignonanofibras de celulosa (LNFC) procedentes de residuos hortícolas produce una disminución del grosor y la porosidad, y un aumento de la densidad de la hoja de papel. Esto se debe a la mayor fuerza de unión entre las fibras adyacentes y el relleno de los huecos, lo que da lugar a una mayor compactación de la matriz de fibras.

2) La adición del 4,5% de LNFC oxidada por el reactivo TEMPO procedente de residuos de berenjena produjo el mayor incremento en la longitud de rotura, el módulo de Young, el índice de desgarro y el índice de ruptura en comparación con las LNFC obtenidas de pimiento y tomate

3) El uso de LNFC en el proceso de reciclaje del cartón como alternativa al batido mecánico produce un mayor efecto de refuerzo y permitiría aumentar los ciclos de reciclaje de las mismas fibras entre 3 y 10 veces más.

Publicación II: Bascón-Villegas, Isabel, Sánchez-Gutiérrez, Mónica, Pérez-Rodríguez, Fernando, Espinosa, Eduardo, Rodríguez, Alejandro. Lignocellulose nanofiber obtained from agricultural wastes of tomato, pepper and eggplants improves the performance of films of polyvinyl alcohol (PVA) for food packaging. *Foods* 2021, 10, 3043.

1) En general, las LNFC obtenidas a partir de residuos agrícolas de cultivos de tomate, pimiento y berenjena, mejoraron la resistencia térmica, la permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas de films formulados con PVA.

2) Las LNFC obtenidas a partir de residuos agrícolas de cultivos de tomate, pimiento y berenjena confirieron capacidad antioxidante a los films que no estaba presente en el film no reforzado.

3) Los films formulados con un 7% de LNFC procedente de residuos de cultivos de berenjena mostraron mejores resultados en cuanto al módulo de Young, el alargamiento a la rotura, la estabilidad térmica y la barrera UV.

Publicación III: Bascón-Villegas, Isabel, Pereira, Miguel, Espinosa, Eduardo, Sánchez-Gutiérrez, Mónica, Rodríguez, Alejandro, Pérez-Rodríguez, Fernando. A new eco-friendly packaging system incorporating lignocellulose nanofibers from agri-food residues applied to fresh-cut lettuce. *Journal of Cleaner Production* 2022, 372, 133597.

- 1) La combinación de polímeros biodegradables, PLA y Ecoflex[®], con LNFC obtenidas mediante pretratamiento enzimático procedentes de la paja de trigo, demostró una mejora significativa de las propiedades ópticas, permeabilidad al vapor de agua y capacidad antioxidante de los envases formulados en comparación con una formulación comercial utilizada habitualmente para el envasado de productos frescos.
- 2) Las formulaciones 70:30 PLA: Ecoflex[®] con 0,5 y 1% de LNFC mostraron un mejor rendimiento, y aunque las propiedades mecánicas no mejoraron en comparación con el envase comercial estudiado, estos resultados fueron análogos a otros materiales comerciales (PET, PS).
- 3) La aplicación de las formulaciones en la simulación del envasado de lechuga recién cortada mostró un rendimiento similar al de la formulación comercial, resultando en una calidad sensorial y microbiológica comparable, alcanzándose una vida útil de 10 días.
- 4) Los prototipos desarrollados supusieron una prueba de concepto exitosa que demuestra que los materiales biodegradables (PLA, Ecoflex[®]) pueden combinarse con compuestos valorizados obtenidos de residuos agrícolas (LNFC) para crear sistemas de envasado de alimentos más ecológicos y sostenibles.

Conclusión global

Los resultados demostraron que los residuos agroalimentarios pueden ser valorizados satisfactoriamente, mediante la producción de LNFC y su posterior aplicación, tanto en el proceso de reciclaje del cartón como en la generación sistemas de envasado de alimentos innovadores, sostenibles y respetuosos con el medio ambiente.

The conclusions derived from each research paper and that compose this Doctoral Thesis are shown below:

Publication I: Bascón-Villegas, Isabel, Espinosa, Eduardo, Sánchez, Rafael, Tarrés, Quim Pérez-Rodríguez, Fernando, Rodríguez, Alejandro. Horticultural Plant Residues as New Source for Lignocellulose Nanofibers Isolation: Application on the Recycling Paperboard Process. *Molecules* 2020, 25, 3275.

- 1) The application of lignocellulose nanofiber (LCNF) resulted in a decrease in thickness and porosity, and an increase in density, of the paper sheet. This is due to the stronger bonding between the adjacent fibers and the gap filling yielding a better compaction of the fiber matrix.
- 2) The addition of 4.5% TEMPO-oxidized LCNF from agricultural residues of eggplant crop produced the largest increase in the breaking length, Young's modulus, tear index, and burst index compared to LNFCs from tomato and pepper.
- 3) The use of LCNF in the paperboard recycling process as an alternative to mechanical beating enhanced reinforcing effect and would increase the recycling cycles of the same fibres by 3 to 10 times.

Publication II: Bascón-Villegas, Isabel, Sánchez-Gutiérrez, Mónica, Pérez-Rodríguez, Fernando, Espinosa, Eduardo, Rodríguez, Alejandro. Lignocellulose nanofiber obtained from agricultural wastes of tomato, pepper and eggplants improves the performance of films of polyvinyl alcohol (PVA) for food packaging. *Foods* 2021, 10, 3043.

- 1) In general, LCNF obtained from agricultural residues of tomato, pepper and eggplant crops improved the thermal resistance, water vapour permeability and mechanical properties of films formulated with PVA.
- 2) LCNF obtained from agricultural residues of tomato, pepper and eggplant crops provided antioxidant capacity to the films that was not present in the non-reinforced film.
- 3) Films formulated with 7% LCNF from agricultural residues of eggplant crop showed better results in terms of Young's modulus, elongation at break, thermal stability and UV barrier.

Publication III: Bascón-Villegas, Isabel, Pereira, Miguel, Espinosa, Eduardo, Sánchez-Gutiérrez, Mónica, Rodríguez, Alejandro, Pérez-Rodríguez, Fernando. A new eco-friendly

packaging system incorporating lignocellulose nanofibers from agri food residues applied to fresh-cut lettuce. *Journal of Cleaner Production* 2022, 372, 133597.

- 1) The combination of biodegradable polymers, PLA and Ecoflex[®], with LCNF obtained by enzymatic pre-treatment from wheat straw, showed a significant improvement in the optical properties, water vapour permeability and antioxidant capacity of the formulated films compared to a commercial formulation commonly used for fresh produce packaging.
- 2) The 70:30 PLA: Ecoflex[®] formulations with 0.5 and 1% LCNF showed improved performance, and although mechanical properties were not improved compared to the commercial packaging studied, these results were analogous to other commercial materials (PET, PS).
- 3) The application of the formulations in the simulation of fresh-cut lettuce packaging showed similar performance to the commercial formulation, resulting in a comparable sensory and microbiological quality, reaching a shelf-life of 10 days.
- 4) The developed prototypes were a successful proof of concept demonstrating that biodegradable materials (PLA, Ecoflex[®]) can be combined with valorised compounds obtained from agricultural waste (LCNF) to create more environmentally friendly and sustainable food packaging systems.

General conclusion

The results demonstrated that agri-food waste can be successfully valorised through the production of LCNF and its subsequent application, both in the cardboard recycling process and in the generation of innovative, sustainable, and environmentally friendly food packaging systems.

